



**RELAÇÕES DE *Phakopsora pachyrhizi* COM
SEMENTES DE SOJA**

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR

**RELAÇÕES DE *Phakopsora pachyrhizi* COM
SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:
Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Brito Júnior, Joel Guimarães de
Relações de *Phakopsora pachyrhizi* com sementes de soja / Joel Guimarães de
Brito Júnior. -- Lavras : UFLA, 2007.
93 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Soja. 2. Semente. 3. Inoculação. 4. Ferrugem. 5. Germinação. 5. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3493

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR

**RELAÇÕES DE *Phakopsora pachyrhizi* COM
SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de abril de 2007

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, Inteligência Suprema, causa primária de todas as coisas,
A Jesus Cristo, coordenador maior deste Planeta, modelo e guia da Humanidade,
A meus pais, em especial, minha mãe, expressão encarnada do amor sem limites,
pela oportunidade de, neste momento e lugar, vivenciar mais uma etapa de
aprendizado no infinito Universo do Conhecimento,

DEDICO

Ao meu avô, Jayme Ferreira de Brito (*in memoriam*), pelo exemplo de caráter,
pelo incentivo e orientação, norteando sempre minha formação profissional.
À avó querida, Maria José dos Santos Leite (*in memoriam*), expressão singela de
amor, doação e acolhimento maternal.
Aos meus irmãos, Zulma, Ronney, Waldo, Soraya e Robson, pelo apoio
incondicional e amizade sincera.
Aos filhos queridos, Tatiana, Luciana, Daniel, Mariana e Ana Júlia, motivadores
valerosos na busca constante do aprimoramento moral e profissional.
À Tânia, esposa amada, parceira e companheira leal em todas as conquistas
empreendidas ao longo dessa caminhada existencial,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar-me possibilidades novas de aperfeiçoamento intelecto-moral.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por conceder-me a oportunidade de novamente participar de seu privilegiado corpo discente.

Ao Departamento de Fitopatologia desta Universidade, pela oportunidade de usufruir de seus valiosos recursos para a conclusão deste mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo incentivo financeiro, contribuindo para a condução e a concretização dos trabalhos experimentais.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí, MG, pela liberação para a realização do mestrado.

Ao corpo de professores e funcionários administrativos do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí, MG, aos quais agradeço, na pessoa de seu diretor geral, Professor Ivan C. Magalhães, pelo apoio e incentivos constantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa Institucional de Qualificação Docente para a Rede Federal de Educação Profissional e Tecnológica (Capes/PIQDTec), pela concessão de apoio financeiro, durante os nove últimos meses de realização do curso.

Ao Professor Dr. José da Cruz Machado, pela orientação nos trabalhos, mas, acima de tudo, pela amizade sincera, traduzida em todos os momentos de convivência, com manifestações de confiança, incentivo e apreço.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pela dedicação incansável e pela constante demonstração de amizade e capacidade profissional, ao longo de todo o mestrado.

A toda a equipe de funcionários (administrativos, laboratoristas, assistentes de laboratório e de campo, auxiliares de limpeza e demais serviços) do Departamento de Fitopatologia que, de maneira direta ou indireta, estiveram ligados à concretização deste projeto de pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) Ângela, Cláudio, Cristiano, Adriano, Vivian, Michele, Luciana, Francisco, Rodrigo, Adelávio, Zélia e Cleuza que, sempre solícitos, estiveram presentes em momentos importantes, disponibilizando prestação de serviços e conhecimentos, em prol da efetivação dos trabalhos experimentais.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, com os quais tive a grata satisfação de conviver, usufruindo da amizade, confiança e prestação de auxílio em momentos diversos de dificuldades, durante os dois anos de curso.

Ao Departamento de Agricultura, em especial aos professores e laboratoristas do Setor de Sementes e do Laboratório de Cultura de Tecidos que, sempre com muita presteza, atenderam às solicitações em função de nossos trabalhos experimentais.

Ao professor Marcelo Cirillo e à colega e amiga Dejânia Vieira de Araújo, pela valiosa contribuição prestada no processamento das análises estatísticas.

À Dra. Maria de Fátima Zoratto, pelas amostras de sementes tão gentilmente cedidas.

Ao Sr. Heitor José Maretti, Técnico de Desenvolvimento de Produtos da Fazenda Experimental Agrícola da empresa BASF S.A., pela prestimosa concessão de material vegetal com presença de inóculo, para a utilização em ensaios preliminares.

Ao colega e amigo Jonas Guimarães e Silva, pela amizade, apoio e companherismo durante esses dois anos.

À sogra querida, Edith A. Passos, pela sempre carinhosa acolhida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1: Introdução Geral e Referencial Teórico	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Ocorrência e importância econômica da ferrugem da soja no Brasil	4
2.2 Aspectos Taxonômicos e Epidemiológicos	6
2.3 Ciclo de vida de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	8
2.4 Viabilidade do inóculo	10
2.5 Relação patógeno/semente no grupo das ferrugens de plantas	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 2: Ocorrência de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em amostras de sementes de soja	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Coleta e manutenção das amostras de sementes	26
2.3 Quantificação de urediniosporos nas amostras	26
2.4 Germinabilidade dos urediniosporos	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Ocorrência de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em sementes de soja	29
3.2 Germinabilidade dos urediniosporos	31
4 CONCLUSÕES	32

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 3: Viabilidade de urediniósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Coleta e preparo de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	39
2.2 Adequação e Condução do teste de viabilidade do inóculo.....	39
2.4 Inoculação e armazenamento das sementes	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Adequação do teste de viabilidade	45
3.2 Coloração de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i> associados a sementes armazenadas	48
4 CONCLUSÕES	52
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO 4: Transmissibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> a partir de sementes de soja, em condições controladas	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Transmissibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> por sementes de soja, em ambiente protegido	60
2.1.1 Teste de sanidade das sementes	60
2.1.2 Inoculação das sementes	61
2.1.3 Preparo dos substratos e semeadura	63
2.1.4 Estruturas de proteção anti-esporos	64

2.1.5 Manejo das plantas	65
2.1.6 Ocorrência de sintomas da ferrugem	67
2.1.7 Delineamento experimental	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4 CONCLUSÕES	71
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
ANEXOS	76

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Relações de *Phakopsora pachyrhizi* com sementes de soja**. Lavras: UFLA, 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).¹

A ferrugem da soja tem sido, nos últimos anos, uma das mais sérias ameaças ao cultivo dessa oleaginosa no Brasil, em razão de sua natureza explosiva e em função da inexistência de variedades com resistência aceitável. Em adição aos reflexos negativos de sua presença nas áreas de produção comercial de grãos, a ocorrência de *P. pachyrhizi*, em amostras de sementes, procedentes de diferentes localidades no país, tem sido detectada em análises sanitárias de laboratório. O presente trabalho foi conduzido com o intuito de verificar a ocorrência e viabilidade de *P. pachyrhizi* em amostras de sementes de soja recebidas de produtores e ao longo do período de armazenamento, e avaliar a transmissibilidade do agente da ferrugem a partir de sementes contaminadas. Pelo método de exame de suspensão de lavagem, com posterior contagem de urediniósporos, a ocorrência de *P. pachyrhizi* foi detectada em todas as amostras analisadas a uma taxa variável de 83 a 1056 urediniósporos/100 sementes. Em ensaio de armazenamento, usando sementes contaminadas artificialmente com o patógeno, não houve germinação dos urediniósporos ao longo de seis meses. Nestas condições, pelo teste de tetrazólio, observou-se que no período de armazenamento, em condições naturais, houve uma queda brusca dos índices de viabilidade dos urediniósporos, após a primeira época avaliada, tendo 2% destes esporos apresentado atividade enzimática ao final de seis meses. Em relação ao estudo de transmissibilidade, sementes com contaminação artificial de *P. pachyrhizi*, foram semeadas em vasos dentro de caixas com armação de madeira revestidas por plástico transparente e tecido antiafídico, pelo período de 80 dias, em condições controladas. Paralelamente, as sementes contaminadas com o patógeno foram semeadas em substrato de areia e mantidas em câmaras de crescimento vegetal, com temperaturas de 15 e 20 \pm 2°C e umidade relativa elevada, pelo período de 20 dias. Em nenhum desses ensaios, foram observados sintomas da ferrugem nas plantas emergidas.

¹Comitê de orientação: José da Cruz Machado – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA (Professor Co-orientador).

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães. **Association of *Phakopsora pachyrhizi* with soybean seeds**. 2007. 93p. Dissertation (Master in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil).¹

Soybean rust has been one of the most devastating diseases in Brazil over the last 3 years, being considered an obstacle for the expansion of this crop in the country. Besides its explosive epidemiological nature, the control of such disease is difficult in reason of the inexistence of cultivars with acceptable resistance. In addition, the occurrence of *P. pachyrhizi*, in seed samples of soybean from different regions in Brazil, has been detected in health tests in the Seed Pathology Laboratory of the Federal University of Lavras, MG. Based on that, the present work was proposed with the following aims: 1- to verify the occurrence of that fungus in seed samples of soybean collected in different seed fields located in some areas in Brazil, 2- to evaluate the viability of urediniospores, artificially incorporated to seeds, along a storage period of six months under natural conditions and 3- to evaluate the transmission of that pathogen from seeds to emerged plants under different conditions. By the washing method the occurrence of *P. pachyrhizi* was detected in all seed samples analyzed at a rate ranging from 83 to 1056 urediniósporos/100 seeds. In specific trial using artificially contaminated seeds, germination of urediniospores was not observed during six months storage. Under those conditions, viability of urediniospores, as revealed by the tetrazolium test, declined sharply after the first time of evaluation. At the end of the storage period, 2% of the spores examined presented enzymatic activity. In relation to seed transmission, that was checked out under two different conditions. In one trial, seeds were sown in pots which were kept in individual boxes with protection against external contamination for the period of 80 days. In another experiment, seeds contaminated with urediniospores were sown in trays containing sand substrate and kept in incubation room under 15 e 20 ±2°C for three weeks. In any case symptoms of rust disease were observed in the emerged plants.

¹Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-adviser Professor).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

INTRODUÇÃO GERAL

A ocorrência da ferrugem da soja, no Brasil, foi constatada, primeiramente, em cultivo de soja na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais, a Epamig, em Lavras, MG, em 1979 (Deslandes, 1979). Embora tenha sido encontrada em outras áreas produtoras de soja, nos estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná e no Distrito Federal, nos anos subseqüentes, causando danos variáveis, a sua ocorrência, em geral, não foi considerada de natureza epidêmica, deixando de ser uma preocupação prioritária, mas constituindo-se em um risco potencial para os produtores brasileiros.

A partir de 2001, em uma de suas formas mais agressivas, de origem asiática, a ferrugem da soja passou a causar danos dos mais preocupantes, havendo, inicialmente, relatos de prejuízos da ordem de US\$ 24,7 milhões (Yorinori et al., 2002). Estima-se que, na safra de 2005/6, os prejuízos tenham sido em torno de US\$ 1,75 bilhão, contabilizados nessa soma, além do valor da perda em toneladas, os produtos e demais recursos utilizados para o seu controle no campo (Roessing, 2006). Os reflexos negativos desses danos são percebidos rapidamente na pauta de exportação do país onde o volume de grãos de soja representa uma parcela das mais expressivas. Um agravante decorrente da ocorrência explosiva dessa doença no Brasil, nos últimos anos, foi o aumento substancial do uso de fungicidas para o seu controle, praticado em quase todas as regiões produtoras no país.

Em adição aos reflexos negativos da ocorrência da ferrugem nas áreas de produção comercial de grãos, foi constatada, em análises sanitárias de amostras de soja realizadas pelo Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, a

ocorrência de urediniósporos do agente etiológico da referida doença, associados às sementes de algumas amostras destinadas a exportação, o que inviabiliza a aprovação destes lotes para o comércio com alguns países que exigem o certificado negativo para este e outros patógenos.

A longevidade do inóculo (urediniósporos) do referido agente patogênico é curta, havendo registros de sua viabilidade por 50 dias (Caldwell & Laing, 2001) e por 15 a 270 dias, sob condições artificiais de estocagem, ou seja, inóculo em ambiente na ausência do hospedeiro natural (Godoy & Flausino, 2004; Zambenedetti & Alves, 2004).

Diante da escassez de informações sobre a associação de *P. pachyrhizi* com sementes de soja, sob vários aspectos, como viabilidade de inóculo durante o armazenamento e transmissibilidade deste fungo via sementes, torna-se evidente que estudos pontuais sobre estes aspectos são necessários para as condições brasileiras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ocorrência e importância econômica da ferrugem da soja no Brasil

A cultura da soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] é atacada por duas espécies de fungo pertencentes ao gênero *Phakopsora*, que são os agentes etiológicos da doença denominada ferrugem: *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur (fase anamórfica: *Malupa vignae*) e *Phakopsora pachyrhizi* H. Sidow & Sidow (fase anamórfica: *Malupa sojae*). Ono et al. (1992) demonstraram a possibilidade de se diferenciar estas espécies por meio de estudos morfológicos dos teliósporos e das télias. No entanto, a sua diferenciação pode ser realizada, também, por intermédio de técnicas de PCR (Frederick et al., 2002).

P. meibomiae, agente etiológico da ferrugem “americana”, ocorre de forma natural no Continente Americano. O fungo utiliza uma vasta série de hospedeiros, podendo infectar, naturalmente, cerca de 42 espécies em 19 gêneros de leguminosas e, ainda, mais 18 espécies em 12 gêneros, quando a inoculação é artificial (Hennen, 1996).

P. pachyrhizi, nativo do Oriente (China) e agente etiológico da ferrugem “asiática” (terminologia adotada com a finalidade de se diferenciar da ferrugem “americana”), presente na Ásia e Austrália, foi detectado, pela primeira vez fora desses países, no Hawaii, em 5 de maio de 1994 (Bonde & Peterson, 1996; Kilgore, 1996). No continente africano, foi constatada, pela primeira vez, em Uganda, em 1996, em área experimental de soja (Kawuki et al., 2003). Em 1998, foi detectado no Zimbábue e Zâmbia (Levy, 2004) e, em 2001, na África do Sul (Caldwell & McLaren, 2004; Pretorius et al., 2001). No continente americano, a primeira constatação da ferrugem “asiática” foi feita no Paraguai, em 5 de março de 2001 (Paiva, 2001) e no oeste e no norte do Paraná (Londrina), entre 26 e 28

de maio de 2001 (Yorinori et al., 2002).

A rápida expansão e a dimensão de perdas que esta tem causado destacam a importância da ferrugem “asiática” (Yorinori et al., 2003; Yorinori et al., 2004), promovendo o declínio de rendimento, que torna inviável a colheita em diversas lavouras dos Cerrados. A área afetada no Brasil e no Paraguai, em 2001, foi estimada em 10.000 ha. Na safra 2001/02, a expansão da doença ocorreu em quase toda região produtora de soja do Paraguai e em, aproximadamente, 60% das áreas de produção no Brasil, onde as perdas estimadas nessa safra foram de 569,2 mil toneladas (US\$125,5 milhões; US\$220,50/t) (Yorinori et al., 2002). Na safra 2002/03, a área de produção no Brasil atingida pela ferrugem superou o índice de 90%, provocando perdas superiores a 3,3 milhões de toneladas ou o correspondente a US\$737,5 milhões (US\$223,50/t) (Yorinori et al., 2003). Na safra seguinte (2003/04), as perdas ultrapassaram US\$1,2 bilhão (US\$260,80/t), equivalente a 4,6 milhões de toneladas (Yorinori, 2004).

Além do Brasil e do Paraguai, a ferrugem foi detectada em parcelas experimentais na Argentina, no final da safra 2001/02, na localidade de Misiones (Rossi, 2003). No final da safra 2003/04 (abril), atingiu lavouras semeadas tardiamente nas principais áreas de produção do país. Na Bolívia, a doença foi detectada, pela primeira vez, em 2003, no plantio de inverno (julho), causando severas perdas em algumas lavouras não tratadas com fungicidas (Navarro et al., 2004). Atualmente, pode-se dizer que a ferrugem “asiática” encontra-se disseminada por todo o hemisfério sul do continente americano.

Em 10 de novembro de 2004, foi feita a primeira notificação de sua ocorrência nos Estados Unidos, tendo sido encontrada em unidades experimentais da Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana (Rogers & Redding, 2004).

A ocorrência de *Phakopsora* sp em sementes de soja, conforme

detectada no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em 2004, em amostras provenientes de áreas produtoras em Mato Grosso (Machado, comunicação pessoal, 2005), é um fato novo que pode caracterizar risco, do ponto de vista de defesa sanitária e um aspecto de relevância questionável, do ponto de vista de qualidade de sementes, em esquemas de certificação regional (Machado, 1988; Neergaard, 1977). O fundamento é o de que os agentes etiológicos de ferrugens não são, salvo raras exceções, transmissíveis por sementes de seus hospedeiros. Os riscos se caracterizam, no entanto, pelo fato de as sementes constituírem em veículos de disseminação para a maioria dos agentes etiológicos de doenças de plantas. Na medida em que patógenos e hospedeiros interagem ao longo do tempo, e daí podendo sofrer influências e transformações biológicas de toda ordem e intensidade, todas as possibilidades de investigação sobre as verdadeiras relações entre *P. pachyrhizi* e sementes de soja devem ser, por conseguinte, exploradas, conforme se faz com qualquer outro tipo de patossistema (Neergaard, 1977).

2.2 Aspectos taxonômicos e epidemiológicos

O gênero *Phakopsora*, ao qual pertencem as espécies de fungo causadoras de ferrugem em soja, pode ser classificado, taxonomicamente, da seguinte maneira: Reino: *Fungi*, Filo: *Basidiomycota*, Classe: *Urediniomycetes*, Subclasse: *Urediniomycetidae*, Ordem: *Uredinales* e Família: *Phakopsoraceae*.

P. pachyrhizi é considerado um parasita obrigatório, ou seja, um organismo biotrófico, que depende de tecido vivo em hospedeiro para que possa completar seu ciclo.

No que tange aos aspectos epidemiológicos, Casey, citado por Vale (1985), constatou em seus estudos que epidemias severas da ferrugem podem

ocorrer quando dilatados períodos de molhamento foliar, cerca de dez horas/dia, e temperaturas em torno de 18° a 26°C coexistem. Já sob temperaturas acima de 30°C e abaixo de 15°C, bem como, em ambiente com baixa umidade relativa, o desenvolvimento da ferrugem sofre desaceleração. O mesmo autor afirma que temperaturas superiores a 27°C, por longo período de tempo, mesmo em condições favoráveis de molhamento foliar, pareciam dificultar o desenvolvimento do patógeno. Por outro lado, Sinclair & Backman (1989), também observaram que epidemias severas ocorriam em áreas cuja temperatura média diária se encontrava entre 18° e 28°C, com precipitações e períodos de molhamento foliar bastante prolongados (10 a 12 horas), estendendo-se por toda a safra. Os autores acrescentam que o período de germinação dos urediniósporos varia entre três e seis horas, sob temperaturas de 14°C a 29°C, no entanto, afirmam que tanto a germinação quanto a penetração no tecido foliar podem ocorrer sob influência de temperaturas situadas entre 8° e 28°C.

A manifestação de reduzidas pontuações (máximo 1mm de diâmetro), de tonalidade mais escura que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada tendendo a cinza-esverdeado, pode caracterizar sintomas iniciais da ferrugem asiática na planta de soja. Estas podem surgir em pecíolos, vagens e ramos, sendo, no entanto, mais evidente nas folhas, especialmente na superfície inferior (face abaxial) das mesmas. A quantidade de urédias se eleva com a idade da lesão, adquirindo coloração castanho-clara a castanho-escura. Estas se abrem em minúsculos poros, liberando os urediniósporos que, inicialmente hialinos, tornam-se, posteriormente, com o amadurecimento, de coloração bege. Após se acumularem ao redor dos poros, são carregados pelo vento, no transcorrer do tempo, podendo ser facilmente disseminados para áreas de cultivo situadas a curta ou a longa distância (Zambenedetti, 2005).

Cada lesão apresenta um número diverso de urédias, podendo variar de uma a seis, na medida em que transcorre o período de esporulação. Ao redor das

primeiras urédias, o tecido foliar passa a apresentar coloração castanho-clara a castanho-avermelhada, sendo, portanto, facilmente perceptível, tanto na face superior quanto na face abaxial da folha. As erupções, expondo notoriamente os poros abertos, destituídos de urediniósporos ao seu redor, caracterizam as urédias que não completam o processo de esporulação, o que facilita a distinção destas em relação às pústulas bacterianas, com as quais são, muitas vezes, confundidas (Zambenedetti, 2005). Segundo a mesma autora, a ferrugem pode também ser facilmente confundida com as lesões iniciais de mancha-parda (*Septoria glycines*), a qual produz lesões necróticas angulares e castanho-avermelhadas, envolvidas por halo amarelado, ocorrendo, em ambos os casos, clorose, seca e queda prematura de folhas infectadas.

Em trabalhos realizados por Melching et al. (1979), em condições de casa de vegetação, sob ausência de luz e a 20°C, urediniósporos de *P. pachyrhizi* apresentaram o início de sua germinação em uma hora e meia, a contar do instante de precipitação do orvalho, atingindo o nível máximo seis a sete horas após. De acordo com os autores, transcorridas cerca de oito horas de precipitação de orvalho e sob temperaturas que variaram entre 18°C e 26,5°C, a incidência de lesões ocorrentes foi multiplicada por dez vezes, quando comparada com o período de seis horas, sob as mesmas temperaturas. As lesões iniciais surgiram sete dias após a inoculação e a produção de urediniósporos secundários teve início aos nove dias. Em estudos desenvolvidos em casa de vegetação, por Godoy & Canteri (2004), na Embrapa Soja, Londrina, lesões iniciais puderam ser observadas cinco a seis dias após a inoculação e as primeiras frutificações (urédias) com seis a sete dias após a inoculação.

2.3 Ciclo de vida de *Phakopsora pachyrhizi*

Geralmente, *P. pachyrhizi* é relatado em estágio de urédia e télia, não

tendo ainda sido constatados os demais estágios que compõem o ciclo de vida das ferrugens. Em trabalho desenvolvido por Green (1984), não se conseguiu observar o estágio 0 de espermogamia e o estágio I de aécio, sendo constatado apenas o estágio II, de urédias, as quais são anfígenas, porém, com a maior parte presente na face abaxial da folha. Segundo o mesmo autor, também o estágio IV, germinação do teliósporo formando a basídia, não foi observado acrescentando que o estágio III, formação de télia, é, normalmente, confundido com o estágio de urédia. A cor da télia é de castanha a chocolate e possui de 2 a 7 esporos na camada interna (Ono et al., 1992). É desconhecido o papel do teliósporo no ciclo de vida de *P. pachyrhizi*, conforme Bromfield (1976). Saksirirat e Hoppe (1991) relataram terem observado a germinação dos teliósporos, porém, na tentativa de se reproduzir o experimento, não obtiveram sucesso.

De acordo com Koch et al. (1983), a penetração na folha do hospedeiro se dá de modo direto, através da cutícula, no centro de células da epiderme foliar. Por outro lado, Zambenedetti (2005) constatou, em seus estudos, a ocorrência de penetração em junções de células epidérmicas, com raras penetrações via estômato. Ainda, segundo Koch et al. (1983), o urediniósporo, ao germinar, cria um tubo germinativo de menor dimensão, na extremidade do qual surge um apressório. A partir deste, ocorre a formação de um *peg* de penetração que é introduzido na cutícula do hospedeiro, bem como através da parede celular de sua epiderme. O mesmo autor afirma que a penetração da célula epidermal ocorre, aproximadamente, seis horas após a inoculação, ocorrendo, em seguida, a expansão do *peg* de penetração, originando, assim, a vesícula epidermal. Constitui-se, a partir dessa, a hifa de penetração que perpassa a célula da epiderme, alcançando o espaço intercelular. A hifa secundária se forma como consequência do alongamento da hifa primária, momento em que ocorre a formação de um septo na porção intercelular da hifa de penetração. Zambenedetti (2005), no entanto, elucida que esta modalidade de

penetração é atípica em ferrugens e acrescenta que a mesma valoriza, em muito, o patossistema *Phakopsora*-soja, quando são envolvidos estudos ultra-estruturais. Destaca ainda, a autora, que a planta, como consequência do surgimento de variados eventos decorrentes deste tipo de penetração, promove a formação de barreiras estruturais, tornando-a resistente ao patógeno.

2.4 Viabilidade do inóculo

Na literatura científica são relatados variados métodos de preservação de urediniósporos referentes a diversos gêneros de agentes etiológicos de ferrugens, porém, são poucos os trabalhos relativos à preservação de esporos de *P. Pachyrhizi*.

Estudos conduzidos por Schein (1962) demonstram que os urediniósporos dos agentes etiológicos das ferrugens sofrem perda de sua viabilidade, de forma acelerada, quando não são tomados cuidados especiais no sentido de preservá-los. Segundo o mesmo autor, quando se trata da preservação *in vitro* da viabilidade dos urediniósporos das ferrugens, de modo geral, temperatura de 5°C e umidade por volta de 50%, são consideradas condições ideais no que diz respeito a armazenamento a curto e a médio prazos. Confirmando a afirmativa anterior, Nutman & Roberts (1963) concluíram, por meio de estudos envolvendo a biologia de *Hemileia vastatrix*, que, ao armazenar urediniósporos secos, estes manifestaram tempo de vida relativamente curto, percebendo-se uma queda de sua viabilidade em torno de 50%, após 2 dias.

De acordo com Schein (1962), a manutenção da viabilidade residual de *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli* em torno de 40% foi obtida à temperatura de -60°C, por um período superior a 670 dias de armazenamento, permanecendo inviáveis, no entanto, à temperatura de -16°C, no período compreendido

entre 1 a 5 meses após a instalação do experimento. No entanto, segundo Kirali (1970), a preservação da viabilidade de microrganismos tem se apresentado com maior eficiência quando se utiliza o nitrogênio líquido (-196°C) como meio preservativo.

Kilpatrick et al. (1971), em estudos relacionados com urediniósporos de *Puccinia graminis* var. *tritici*, perceberam que o declínio da viabilidade, após dez anos de armazenamento, foi bastante reduzido quando foi utilizado o nitrogênio líquido para a sua preservação, vindo a confirmar a constatação de Loegering et al. (1966). Estes últimos, ao estudarem o mesmo patógeno utilizando técnica semelhante de armazenamento, verificaram a inexistência de alterações aparentes no declínio da viabilidade, durante cinco anos. Existem, todavia, estudos que sugerem a inaplicabilidade da técnica de preservação de determinados fungos em nitrogênio líquido (Doebler & Rinfret 1963, Wellman & Waldem, 1964).

Por outro lado, alguns relatos se referem à indução de dormência em urediniósporos provenientes de exposição à temperatura ultrafria de nitrogênio líquido (Bromfield, 1964; Loegering & Harmon, 1962; Loegering et al., 1966). Entretanto, o referido estado de dormência é passível de reversão sob aplicação de choque térmico à temperatura de 40°C durante 5 minutos (Bromfield, 1964; Leath et al., 1966; Loegering & Harmon, 1962). Em sustentação a essa afirmativa, Zambolim (1973), conduzindo trabalhos com *Hemilélia vastatrix*, e *Uromyces phaseoli* var. *typica*, constatou a necessidade de aplicação de choque térmico (40°C por 5 a 15 minutos) visando à quebra de dormência em urediniósporos de *H. vastatrix* provocada por exposição à nitrogênio líquido (-196°C), o que foi considerado dispensável com relação à *U. phaseoli*.

Contudo, Zambenedetti (2005), em estudos realizados com *P. Pachyrhizi*, enfatiza que o armazenamento em nitrogênio líquido, além de ser

constatado como o melhor método de preservação da viabilidade de urediniósporos do referido patógeno, constitui procedimento que permite a recuperação do poder germinativo de esporos dormentes.

Em estudos empreendidos por Furtado (2007), foi avaliado o efeito de diversas temperaturas de armazenamento na preservação da viabilidade de *P. Pachyrhizi*, tais como, temperatura ambiente, 5°C (geladeira), -20°C (freezer) e -80°C (deep freezer), considerando-se urediniósporos desidratados e não desidratados. Os autores constataram que a maior capacidade de preservação dos urediniósporos também se deu sob as temperaturas mais baixas, chegando a até 231 dias. Também, em trabalhos conduzidos por Vale (1985), com citações de Bromfield (1976) e Zambolim & Chaves (1974), foi utilizada a técnica de armazenamento em nitrogênio líquido, com algumas adaptações, visando à manutenção da viabilidade dos urediniósporos de *P. Pachyrhizi*.

No que se refere à viabilidade de urediniósporos associados à sementes de soja, APHIS (2004) manifesta preocupação em relação a algumas questões. Inicialmente, expõe que, por ser considerado parasita obrigatório, *P. Pachyrhizi* apresenta perda de viabilidade muito rápida em seus urediniósporos, após a morte das plantas hospedeiras. Citando Yeh et al. (1982a), o mesmo autor acrescenta que a ferrugem asiática da soja não é transmitida por semente ou solo infestado. No entanto, admite a possibilidade de, por intermédio do comércio de exportação, carregamentos de grãos ou sementes de soja trazerem consigo urediniósporos. Estes, segundo o autor, durante o manuseio dos grãos, poderiam ser levados pelo vento e depositados sobre plantas de soja ou outros hospedeiros, em áreas adjacentes.

Por outro lado, Park et al. (2006), em seus estudos, demonstraram que esporos da ferrugem da soja podem sobreviver durante as condições típicas de inverno da Louisiana, EUA, tornando-se fonte de inóculo para novas infecções, no próximo período de cultivo, naquela região.

No que se refere à avaliação da viabilidade de unidades propagativas, o teste de tetrazólio, inicialmente aplicado com o objetivo de se avaliar a viabilidade de sementes de vegetais, foi estudado por Pathak et al. (1978) para aplicação em testes com *Peronospora manshurica*. Este teste tem como princípio a ação do sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio como indicativa da presença de atividade de enzimas desidrogenases que, por sua vez, reagem reduzindo o sal de tetrazólio, originando o trifenilformazan, de coloração vermelha estável e não difusível (Delouche et al., 1976; França Neto, 1999). Sua adaptação, portanto, realizada por Pathak et al. (1978), objetivou a introdução de novo método de análise de rotina em laboratórios para a detecção de oósporos de *P. manshurica* em sementes de soja, com presença ou não de incrustações do patógeno, bem como a determinação da viabilidade dos referidos esporos.

2.5 Relação patógeno/semente no grupo das ferrugens de plantas

As sementes constituem o elemento essencial de sustentação da vida no Planeta, uma vez que cerca de noventa por cento das lavouras agrícolas dependem destas estruturas para propagação (Neergaard, 1977). Ao mesmo tempo em que são consideradas como componente de larga importância na economia e no comércio mundiais, as sementes são produzidas e transportadas a grandes distâncias, com a finalidade de serem plantadas e cultivadas para originarem produtos e subprodutos consumíveis pela população planetária.

Como qualquer grupo de patógenos, os fungos são disseminados por vários veículos, como vento, água, insetos e animais. No entanto, nenhum é tão eficiente quanto as sementes, especialmente por se considerar que o patógeno por elas veiculado possui maior chance de provocar doenças nas plantas que delas se originaram. Como consequência, a disseminação do patógeno a outras

plantas sadias pode dar início a uma provável epidemia (Neergaard, 1977).

Segundo Machado (1988), a veiculação de patógenos por sementes pode ser efetivada de três formas: a primeira, em mistura com as sementes, junto a resíduos que compõem a fração impura do lote, onde se encontram fragmentos vegetais, sementes de plantas invasoras e partículas do solo, podendo conter micélio dormente, corpos de frutificação e esporos de fungos, cistos ou galhas de nematóides, células bacterianas e partículas de vírus, escleródios ou estromas fúngicos; a segunda forma pode se dar por intermédio de adesão passiva à sua superfície, por fim, a terceira maneira de transporte de patógenos se refere à presença deste no interior de sementes, podendo se localizar nas camadas externas ou, até mesmo, no embrião. Segundo o autor, essa é a maneira mais comum de veiculação entre os agentes transmitidos por sementes.

Informações sobre a viabilidade do inóculo de *P. pachyrhizi* em associação com sementes de soja armazenadas em circunstâncias recomendadas para as condições brasileiras, bem como a transmissibilidade do patógeno via semente, não foram encontradas na literatura. De acordo com Hershman (2004), *P. pachyrhizi* não é um organismo transmitido por sementes de soja, porém, o risco de contaminação por esta via é alto. Segundo esse autor, a inexistência de estudos neste campo faz com que a preocupação pelo papel das sementes como veículo de disseminação da doença torne se ainda mais elevada.

Todavia, contrariando o que diz respeito à transmissibilidade de agentes etiológicos das ferrugens, de sementes para plantas, Halfon-Meiri (1983) constatou que *Puccinia carthami*, agente etiológico da ferrugem do “cártamo” (*Carthamus tinctorius*), é o único fitopatógeno dessa natureza conhecido, até então, por ser transmitido de sementes para plântulas.

Provavelmente, o fato de fungos causadores de ferrugens não serem transmitidos pelas sementes de seus hospedeiros, via de regra, tem sido a causa da inexistência, ainda, de pesquisas neste campo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. Research at the USDA, ARS containment facility on soybean rust and its causal agent. In: RUST WORKSHOP, 1995, Urbana. **Proceedings...** Urbana: College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences: National Soybean Research Laboratory, 1996. p. 12-17 (Publication Number 1) Editado por J. B. Sinclair, G. L. Hartman.

BROMFIELD, K. R. Cold-induced dormancy and its reversal in uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, n. 1, p68-74, Jan. 1964.

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

CALDWELL, P. M.; McLAREN. Soybean rust research in South Africa. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soybean 2004. p. 361-364.

CALDWELL, P.; LAING, M. **Soybean Rust** - a new disease on the move. 2001. Disponível em: <http://www.saspp.org/content/view/20/11/> Acesso em: 28 mar. 2007.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.

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

DOEBLER, G. F.; RINFRET, A. P. Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 85, n. 1, p. 485, 1963.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZIZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Org.) **Vigor em sementes**: conceitos e testes. Londrina: Comitê de Vigor, ABRATES, 1999. v. 1, p. 8. 1-8. 7.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 217-227, Feb. 2002.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Preservação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 79, 2005. Supplement. (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, n. 1, p. 97-101, jan./fev. 2004.

GODOY, C. V.; FLAUSINO, A. M. Efeito da temperatura na germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, viabilidade e sobrevivência em diferentes condições de armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 2004, **Anais...** Gramado, RS, 2004. p. 124.

GREEN, A. **Soybean rust**. Pests not known to occur in the United States or of limited distribution. USDA-APHIS-PPQ, 1984. n. 56

HALFON-MEIRI, A. Seed transmission of *safflower* rust (*Puccinia carthami*) in Israel. **Seed science & Technology**, Zurich, v. 11, n. 3, p. 835-851, 1983.

HENNEN, J. F. The Taxonomy of the rusts. In: RUST WORKSHOP, 1995, Urbana. **Proceedings...** Urbana: College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences: National Soybean Research Laboratory, 1996. p. 29-32.

HERSHMAN, D. **Could Soybean Rust Be Imported Into The United States With Seed, Bulk Grain Or Meal?** 2004. Disponível em: <http://www.uky.edu/Ag/kpn/pdf/kpn_1029.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2007.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKUMUHABWA, P. Yield loss associated with soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 151, n. 1, p. 7-12, Jan. 2003.

KILLGORE, E. M. Field notes on the detection of soybean rust, initial surveys and the current status of the disease in Hawaii. In: RUST WORKSHOP, 1995, Urbana. **Proceedings...** Urbana: College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences: National Soybean Research Laboratory, 1996. p. 38-45

KILPATRICK, R. A.; HARMON, D. L.; LOEGERING, W. Q.; CLARK, W. A. Viability of uredospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* stored in liquid nitrogen. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 55, n. 10, p. 871-873, Oct. 1971.

KIRALI, Z. **Methods in Plant Pathology** (With specie reference to breeding for diseases resistance). Budapest, Hungria: Académiai Kiadó, 1970. 600 p.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

LEATH, K. T.; ROMING, R. W.; ROWELL, J. B. A system for storing rust spores in liquid nitrogen. **Phytopathology**, St. Paul, v. 56, n. 2, p. 570, Feb. 1966.

LEVY, C. Zimbabwe – a country report on soybean rust control, pp. 340-348. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soybean 2004. p. 361-364.

LOEGERING, W. Q.; HARMON, D. L. Effect of thawing temperature on urediospores of *Puccinia graminis* var. *tritici* frozen in nitrogen liquid. **Plant Disease**, St. Paul, v. 46, n. 1, p. 299-302, Jan. 1962.

LOEGERING, W. Q.; HARMON, D. L.; CLARK, W. A. Storage of uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici* in liquid nitrogen. **Plant Disease**, St. Paul, v. 50, n. 2, p. 502-506, Feb. 1966.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.

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

NAVARRO, J. C.; NAKASATO, R.; UTIAMADA, C. M.; YORINORI, J. T. First report of “asian” soybean rust in Bolivia. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 85-86. (Embrapa Soja. Documentos, 228).

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1977. v. 2, 1191 p.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. Et. Br. **British Mycological Society Transactions**, Cambridge, v. 46, n. 1, p. 27-48, 1963.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycology Research**, New York, v. 96, n. 10, p. 825-850, Oct. 1992.

PAIVA, W. M. **Roya de la soja**. Itapúa: Ministério de Agricultura y Ganaderia, Subsecretaria de Agricultura, Dirección de Investigación Agrícola: Centro Regional de Investigación Agrícola – CRIA, 2001. (Comunicado Técnico – Reporte Oficial, Série Fitopatologia, 1).

PARK, S.; HAZARD, N.; CHANDA, A. K.; CHEN, Z. Y. **Viability of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores under simulated winter conditions**. In: Plant Management Network International, 2006. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/infocenter/topic/soybeanrust/2006/posters/10.asp>>. Acesso em: 01 abr. 2007.

PATHAK, V. K.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Detection of *Peronospora manshurica* (Naum.) Syd. in seeds of soybean, *Glycine max*. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 8, n. 1, 1978. p. 21-28.

PRETORIUS, Z. A.; KLOPPERS, R. J.; FREDERICK, R. D. First report soybean rust in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 1288, 2001.

ROESSING, A. C. **Impacto econômico da ocorrência da ferrugem asiática na soja**. EMBRAPA. 2006. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta_php?cod_pagina_sa=141&cultura=1>. Acesso em: 01 abr. 2007.

ROGERS, J.; REDDING, J. **USDA confirms soybean rust in United States**. APHIS. 2004, News Release N° 0498. 04.

Disponível em:

<http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/_s.7_0_A/7_0_1OB?contentidonly=true&contentid=2004/11/0498.xml. >. Acesso em: 01 abr. 2007.

ROSSI, R. L. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 1, p. 102, Jan. 2003.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 132, n. 4, p. 339-342, Aug. 1991.

SCHEIN, R. D. Storage viability of bean rust uredospores. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, n. 2, p. 653-657, Feb. 1962.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. Minnesota, USA: APS Press, 1989.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – APHIS. **Status of scientific evidence on risks associated with the introduction into the Continental United States of *Phakopsora pachyrhizi* with imported soybean grain, seed and meal**. Beltsville, 2004. Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/ppq/ep/soybean_rust/sbr_riskevidoc2_23_04.pdf>
Acesso em: 15 mar. 2007

VALE, F. X. R. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1985. 104 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

YORINORI, J. T.; GODOY, C. V.; MOREL PAIVA, W.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; NUNES JUNIOR, J. Evolução da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil, de 2001 a 2003.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, p. 210, ago. 2003. Suplemento.

YORINORI, J. T.; NUNES JR., J.; GODOY, C. V.; LAZZAROTTO, J. J. Situação da ferrugem “asiática” no Brasil, safra 2003/04. In: **Resumos... REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL**, 26., Ribeirão Preto, 2004. Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 134-135. (Embrapa Soja. Documentos, 234).

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; **Ferrugem da Soja: *Phakopsora pachyrhizi*** Sydow. Londrina: Embrapa Soja, 2002.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 6, p. 103, 2003. Suplemento.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F. Epidemia da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 178-179, 2002. Suplemento.

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 DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Foz do Iguaçu, 2002. 94 p.

YORINORI, J. T.; UTIAMADA, C. M.; SATO, L. N.; MUTTA, F. T. T.; ROIM, F. B. Perdas ocasionadas pela ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 210, 2003. Suplemento.

WELLMAN, A. M.; WALDEM, D. B. Qualitative and quantitative estimates of viability for some fungi periods of storage liquid nitrogen. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 585-593, Jan. 1964. In: **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 51, n. 1, p. 539-540, 1967.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora Pachyrhizi* Sydow & Sydow e Aspectos Epidemiológicos e Ultra Estruturais da sua Interação com a Soja (*Glycyne Max* (L.) Merrill)**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E. Efeito de diferentes métodos de armazenamento na germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 2004, Gramado. **Anais...** Gramado, RS. 2004. 164 p.

ZAMBOLIM, L. **Efeito de Baixas Temperaturas e do Binômio Temperatura-Umididade Relativa sobre a Viabilidade dos Uredósporos de *Hemileia vastatrix* Brk. Et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth.** 1973. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA DE *Phakopsora pachyrhizi* EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Ocorrência de *Phakopsora pachyrhizi* em amostras de sementes de soja**. In: Relações de *Phakopsora pachyrhizi* com sementes de soja. Lavras: UFLA, 2007. p.21-33. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).¹

Phakopsora pachyrhizi, agente etiológico da ferrugem asiática da soja, é considerado um patógeno não transmissível por semente, a exemplo dos demais agentes etiológicos de ferrugens em geral. Por esta razão, estudos sobre este aspecto não têm sido realizados, embora a veiculação do inóculo desses fungos por sementes seja um fato conhecido. Especificamente para o patossistema *P.pachyrhizi* e soja, a presença de esporos do fungo aderido à superfície de sementes foi registrada na Universidade Federal de Lavras, MG, por meio de análises sanitárias de amostras provenientes de algumas localidades produtoras de soja no país. No presente trabalho, 30 amostras de sementes de soja obtidas de regiões produtoras de alguns municípios dos estados de Mato Grosso e Minas Gerais foram submetidas ao teste de sanidade, exame de suspensão da lavagem das sementes. A presença de *P. pachyrhizi* foi detectada em todas as amostras analisadas, havendo uma variação do índice de ocorrência na faixa de 83 a 1067 urediniosporos/100 sementes.

¹ Comitê de orientação: José da Cruz Machado – UFLA (Professor Orientador), Edson Ampélio Pozza – UFLA (Professor Co-orientador).

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Occurrence of *Phakopsora pachyrhizi* in seed samples of soybean.** In: Relationship of *Phakopsora pachyrhizi* with soybean seeds. 2007. p.21-33. Dissertation (Master in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil).¹

Phakopsora pachyrhizi, the aetiologic agent of Asiatic soybean rust, is considered a pathogen which is not seed-transmitted. Although fungi causing rusts in general may be transported by seeds of their hosts, reports on that aspect are hardly found in literature. The presence of urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi* in seed samples analyzed in the Seed Pathology Laboratory of the Federal University of Lavras, MG, Brazil, has been detected over the past few years. In the present work 30 seed samples collected in different seed fields in two States in Brazil were submitted to the seed health analysis by using washing method. The occurrence of that pathogen was detected in all seed samples, at a rate ranging from 83 to 1067 urediniospores per 100 seeds.

¹ Comitê de orientação: José da Cruz Machado – UFLA (Professor Orientador), Edson Ampélio Pozza – UFLA (Professor Co-orientador).

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), oleaginosa de grande expressão no mercado internacional, vem se tornando, a cada dia, uma das culturas líderes no rol daquelas que ocupam maiores áreas cultivadas no território brasileiro. Como consequência, especialmente em razão do monocultivo, novas doenças têm surgido e desafiado a pesquisa, no âmbito da fitopatologia.

As doenças fúngicas têm se destacado tanto em função do número expressivo de ocorrências, quanto em relação à severidade de manifestação, mormente, sob condições ambientais favoráveis.

A ferrugem asiática da soja, que tem como agente etiológico o fungo *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, está presente em praticamente todos os países produtores dessa oleaginosa.

P. pachyrhizi, como a totalidade dos agentes causais das ferrugens de plantas, é considerado patógeno não transmissível por semente. Em decorrência, não se têm desenvolvido trabalhos experimentais que avaliem a transmissão de urediniosporos por essa via.

Em comentários registrados por Hershman (2004), em texto cujo título questiona a possibilidade da ferrugem da soja ser levada aos campos de produção dos Estados Unidos via sementes, grãos ou farelos, há indicação da necessidade de se promover em estudos que respondam a questões dessa natureza.

Bradley (2005), ao considerar que o agente etiológico da ferrugem da soja não é disseminado por sementes, afirma que o mesmo não sobrevive em sua superfície, porém, não descarta a possibilidade de que permaneça viável em partes de tecidos de vagens e folhas, misturados às sementes.

Por outro lado, a constatação de urediniósporos de *P. Pachyrhizi*, associados à superfície de sementes de soja em amostras provenientes do estado do Mato Grosso, por ocasião de análises realizadas no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, levanta questionamentos sobre as implicações deste fato sob vários ângulos. Em algumas situações, na condição de sementes destinadas à exportação, há a necessidade de emissão de certificado negativo para a presença deste e de outros patógenos, condição precípua para se tornar viável o procedimento comercial.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em amostras de sementes de soja de diferentes procedências, e sua germinação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e manutenção das amostras de sementes

Foram amostrados lotes de sementes de soja das cultivares MG/BR-46 (Conquista) e BRSMT Pintado, safra 2005/2006, procedentes de alguns municípios dos estados de Mato Grosso e Minas Gerais (Tabela 1), perfazendo um total de 30 amostras. Estas foram remetidas ao Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG, onde foram processadas as avaliações.

Todas as amostras foram acondicionadas em câmara fria, com temperatura de $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de 50%, até a realização da análise sanitária.

2.3 Quantificação de urediniósporos nas amostras

Após homogeneização, foram compostas, a partir de cada amostra, cinco subamostras de 100 sementes e estas foram submetidas à metodologia de obtenção de suspensão de lavagem, adaptada de Pathak et al. (1978). Para tal procedimento, as subamostras foram colocadas em Erlenmeyers de 250ml com a adição de 15ml de água destilada por frasco e, em seguida, submetidas à agitação mecânica em agitador horizontal, por 10 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada à velocidade de 2.500 rpm, por 10 minutos. Após descarte do líquido sobrenadante, adicionaram-se, em cada tubo, 2,0ml de água destilada ao precipitado, acrescidos de 10 μL de Tween 20 (em solução à 25%), submetendo-se à agitação manual, possibilitando efetiva homogeneidade. Em seguida, foram retirados 15 μL de cada subamostra que, depois de vertidos em lâmina para

microscopia e cobertos com lamínula, foram quantificados e, conseqüentemente, obtido o índice de ocorrência de urediniósporos/100 sementes.

TABELA 1. Origem (município/estado) das amostras de sementes submetidas à avaliação, quanto à ocorrência de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Amostra	Município/estado de origem
01	Rondonópolis, MT
02	Rondonópolis, MT
03	Lavras, MG
04	Lavras, MG
05	Lavras, MG
06	Lavras, MG
07	Lavras, MG
08	Lavras, MG
09	Lavras, MG
10	Alto Garças, MT
11	Alto Garças, MT
12	Alto Garças, MT
13	Alto Garças, MT
14	Alto Garças, MT
15	Alto Garças, MT
16	Alto Garças, MT
17	Alto Garças, MT
18	Alto Garças, MT
19	Alto Garças, MT
20	Alto Garças, MT
21	Alto Garças, MT
22	Alto Garças, MT
23	Alto Garças, MT
24	Alto Garças, MT
25	Alto Garças, MT
26	Alto Garças, MT
27	Alto Garças, MT
28	Alto Garças, MT
29	Rondonópolis, MT
30	Alto Garças, MT

2.4 Germinabilidade dos urediniósporos

Com a finalidade de conhecer o índice percentual de germinabilidade dos urediniósporos, foram tomados 40µL do conteúdo remanescente do exame de suspensão de lavagem e espalhados, utilizando alça de Drigalsky, em meio ágar-água (solidificado), 1,5%, em placa de Petri (35 x 10 mm). Em seguida, após serem envolvidas em papel alumínio, as placas foram acondicionadas em BOD, à temperatura de 25°C, onde permaneceram por 4 horas. Ao fim deste período, as placas foram levadas ao microscópio de luz, quantificando-se, em termos percentuais, o número de urediniósporos germinados. Foram considerados germinados apenas aqueles cujo tubo germinativo apresentou comprimento superior ou igual à menor dimensão do esporo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ocorrência de *Phakopsora pachyrhizi* em sementes de soja

Urediniósporos de *P. pachyrhizi* foram detectados em todas as amostras de soja analisadas (Tabela 2).

Assumindo que as amostras analisadas são representativas dos lotes dos quais foram extraídas, pode-se inferir que o número provável de urediniósporos a serem levados para a área de plantio estaria entre $2,4 \times 10^7$ e $3,2 \times 10^8$, em cada hectare, o que representaria algo entre 2.490 e 32.000 unidades propagativas/m², considerando-se o menor e o maior número de urediniósporos/100 sementes encontrados nas amostras analisadas.

A formação de esporos viáveis ocorrentes em hastes, vagens e em folhas ainda presentes na planta ou, mesmo, naquelas folhas desprendidas de plantas doentes que permanecem na superfície do solo, no final do ciclo da cultura, pode provocar a contaminação das sementes, durante a colheita (Neergaard, 1977). Segundo Zambolim (2006), urediniósporos presentes em folhas caídas no solo podem apresentar uma sobrevivência de até três meses. Isto posto, aventa-se a possibilidade de, ao se processar a colheita da soja, em campos de produção de sementes infestados, com a utilização de colheitadeiras mecânicas, obter-se, por conseqüência, a contaminação das mesmas. A formação de uma massa de esporos de ferrugem, provocada pelo atrito da máquina com as plantas processadas, bem como com as folhas presentes no solo, resultaria no assentamento desses sobre as sementes. Dessa forma, seria favorecida a disseminação dos urediniósporos para outras áreas de plantio, o que se daria em razão da manipulação das mesmas durante a semeadura. Isso explicaria a presença dos urediniósporos associados às sementes que constituem as amostras

em estudo. Em princípio, esta tem sido a dinâmica de contaminação das sementes por inóculo de patógenos como os agentes das ferrugens.

TABELA 2. Número médio de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* presentes em amostras de sementes de soja provenientes de diferentes áreas dos estados de Mato Grosso e Minas Gerais. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Amostra	Número médio de urediniósporos por 100 sementes
01	83
02	275
03	100
04	100
05	300
06	325
07	250
08	150
09	293
10	640
11	445
12	400
13	427
14	1067
15	533
16	480
17	800
18	560
19	293
20	640
21	667
22	427
23	613
24	533
25	347
26	507
27	640
28	293
29	667
30	533

3.2 Germinabilidade dos urediniósporos

Nenhum dos urediniósporos avaliados pelo teste de germinabilidade em meio ágar-água manifestou qualquer sinal de germinação, ou seja, não foi observado qualquer indício de formação de tubo germinativo. Portanto, em todas as amostras, os urediniósporos associados às sementes encontravam-se em aparente estado de inatividade metabólica ou de dormência.

É importante ressaltar que este tipo de resultado seria previsível, considerando-se o período decorrente entre a colheita da soja realizada por volta de março e abril, e o período deste levantamento ocorrido nove meses depois. Conforme já é conhecido, o poder germinativo dos urediniósporos apresenta reduções drásticas em curto período de tempo. Segundo Caldwell & Laing (2001), a sobrevivência de urediniósporos de *P. pachyrhizi* é de 50 dias. No entanto, segundo Zambolim (2006), essa sobrevivência é de até três meses, em folhas caídas no solo. Por sua vez, Zambenedetti (2005), em estudos relacionados à preservação de urediniósporos dessa referida espécie, concluiu que temperaturas mais elevadas, como as de dessecador (10°C), refrigerador (4°C) e folha herbarizada (24 a 30°C), provocaram quedas bruscas no poder germinativo dos referidos esporos. Sobre esta questão, o autor acrescenta que essas condições de temperatura podem induzir, nestes esporos, um estado de dormência, ou, até mesmo, levá-los à morte. Portanto, em razão do longo período de condicionamento das sementes analisadas, em câmara fria e seca, é possível que se tenha favorecido a uma condição de dormência dos referidos urediniósporos, resultando em interrupção temporária de seu poder germinativo.

4 CONCLUSÕES

As sementes de soja constituem meio de transporte de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, unidades propagativas do agente etiológico da ferrugem asiática da soja, podendo, assim, representar, de alguma forma, potencial via de disseminação desse fitopatógeno, com riscos epidemiológicos.

Os urediniósporos associados às sementes de soja de amostras analisadas não apresentaram qualquer indício de germinação, quando submetidos ao teste em meio ágar-água.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALDWELL, P.; LAING, M. **Soybean Rust** - a new disease on the move. 2001. Disponível em: <http://www.saspp.org/content/view/20/11/>
Acesso em: 28 mar. 2007.
- BRADLEY, C. A. **Recent information on fungicides for rust control in north Dakota**. 2005. Disponível em:
<<http://www.ndsu.nodak.edu/soydiseases/rust.shtml>>. Acesso em: mar. 2007.
- HERSHMAN, D. **Could Soybean Rust Be Imported Into The United States With Seed, Bulk Grain Or Meal?** 2004. Disponível em:
<http://ces.ca.uky.edu/bourbon/anr/AgNewsarticles/july_15.htm>. Acesso em: 05 jul. 2005.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1977. v. 2, 1191 p.
- PATHAK, V. K.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Detection of *Peronospora manshurica* (Naum.) Syd. in seeds of soybean, *Glycine max*. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 8, n. 1, p. 21-28, 1978.
- ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora Pachyrhizi* Sydow & Sydow e Aspectos Epidemiológicos e Ultra Estruturais da sua Interação com a Soja (*Glycine Max* (L.) Merrill)**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ZAMBOLIM, L. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: ZAMBOLIM, L. (Ed). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa: UFP-DFP, 2006. Cap. 5, p.73-98.

CAPÍTULO 3

VIABILIDADE DE UREDINIÓSPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Viabilidade de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi***. In: Relações de *Phakopsora pachyrhizi* com sementes de soja. Lavras: UFLA, 2007. p.34-54. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).¹

De acordo com relatos de literatura, urediniósporos de *P. pachyrhizi* apresentam germinabilidade reduzida na ausência do hospedeiro. Dentre as causas que podem ser responsáveis por esta baixa germinabilidade, o estado de dormência dos esporos é uma possibilidade que se levanta. Neste trabalho o intuito foi estabelecer uma metodologia para avaliação da viabilidade dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*, visando à sua aplicação em testes de sanidade de sementes, no caso, o exame de suspensão de lavagem das sementes. A utilização do teste de tetrazólio, neste estudo, foi assumida com base em seu uso, já conhecido, para outros patossistemas, como *Peronospora manshurica* em soja. Inicialmente a técnica foi adaptada, tendo se em mente aspectos como concentração do sal de tetrazólio (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), temperaturas (30° e 35°C) e períodos de exposição das sementes (24, 48, 72 e 96 horas). Com base na adaptação do teste estabelecida, a viabilidade média de urediniósporos encontrada foi de até 87%, enquanto a germinação desses esporos, em meio ágar-água, foi de 45%. Pelos resultados deste ensaio, a aplicação do referido método na avaliação da viabilidade de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, associados à sementes de soja, pode ser de utilidade em testes de sanidade, para o presente patossistema. Em ensaio específico, usando sementes contaminadas artificialmente com o patógeno, não houve germinação dos urediniósporos ao longo de seis meses de armazenamento. Nestas condições, houve uma queda acentuada dos índices de viabilidade dos urediniósporos, após a primeira época avaliada, tendo 2% destes esporos apresentado atividade enzimática ao final do referido período.

¹ Comitê de orientação: José da Cruz Machado – UFLA (Professor Orientador), Edson Ampélio Pozza – UFLA (Professor Co-orientador).

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Initial studies on viability of urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi* associated to soybean seeds.** 2007. p.34-54. Dissertation (Master in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil).¹

According to literature, urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi* present low germinability in nature in the absence of the host. One of the postulated reasons for that is the dormancy that may occur in those spores. In this study the aim was to establish a methodology to evaluate the viability of the urediniospores of that fungus, looking at its application into seed health test in complement to the washing method. Initially, the work was concentrated on the adaptation of the tetrazolium test, as it has been used for that purpose in the case of *Peronospora manshurica* in soybean seeds. Concentrations of the tetrazolium salt (0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%), temperatures (30° and 35°C), and exposition periods of seeds (24, 48, 72 and 96 hours), were considered in that phase. Based on the tetrazolium method, percentage of viability of urediniospores of a fresh isolate of *Phakopsora pachyrhizi* was of 87%, and germination rate of 45% as evaluated in agar method. In an additional trial, viability of *Phakopsora pachyrhizi* inoculum associated to soybean seeds, checked out during six months storage under natural conditions, declined to 2% in the end of that period. Such index presented a reduction of an average of 80% after the first time of evaluation, taken place 30 days after the beginning. From that time germination of urediniospores was not observed during the whole period of storage.

¹ Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-adviser Professor).

1 INTRODUÇÃO

Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & Sydow, agente etiológico da ferrugem asiática da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], tem sido objeto de um número crescente de pesquisas, em função de sua complexidade no que se refere a aspectos fisiológicos e epidemiológicos.

A totalidade dos agentes etiológicos de ferrugens, por apresentar hábitos biotróficos, é capaz de completar seu ciclo reprodutivo apenas na presença de seus hospedeiros vivos (Agrios, 2005; Kendrick, 1992). A germinabilidade de *P. pachyrhizi* tem sido relatada como sendo bastante reduzida, em período muito curto de tempo, quando na ausência de planta hospedeira, exceto em condições de preservação bastante específicas (Caldwell & Laing, 2001; Zambenedetti & Alves, 2004; Godoy & Flausino, 2004).

A falta de informações referentes à viabilidade do inóculo em associação com sementes armazenadas, em circunstâncias recomendadas para as condições brasileiras, bem como em relação à transmissibilidade da doença via sementes, é notória. No entanto, Hershman (2004) admite existir um alto risco de contaminação por essa via, apesar de não ser *P. pachyrhizi* um organismo transmitido por sementes de soja. Embora não seja a ferrugem da soja uma doença originária de semente, Bradley (2005) questiona a possibilidade de sobrevivência de seu agente causal em tecidos de vagens ou folhas infectados, em mistura com as sementes. Uma outra evidência da preocupação do transporte de inóculo de *P. pachyrhizi* por sementes de soja é apresentada por McGee (2002), que descreve protocolo de teste de sanidade para avaliação de ocorrência deste tipo de inóculo, em amostras de sementes de soja.

A ocorrência de urediniósporos de *Phakopsora* sp associados à superfície de sementes de soja, registrada por Machado (Comunicação pessoal,

2005) constitui, pelo menos, fato que caracteriza risco, no que se refere à defesa sanitária, especialmente no tocante à qualidade de sementes em esquemas de certificação regional (Machado, 1988; Neergaard, 1977).

A quase totalidade dos esporos de fungos manifesta dormência em determinada fase de vida, geralmente antecedente à germinação, quando então, apresentam metabolismo bastante reduzido (Deacon, 1997; Kendrick, 1992). Portanto, parte-se do pressuposto de que, ao se avaliar a germinabilidade de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, pode-se não estar determinando sua viabilidade, caso estes esporos encontrem-se em estado de dormência.

Em estudos empreendidos por Zambenedetti (2005), foi constatada a condição de dormência em urediniósporos de *P. pachyrhizi*, cujo índice de germinabilidade variou de forma crescente, após o armazenamento dos mesmos esporos na presença de nitrogênio líquido.

Tomando como referência o trabalho desenvolvido por Pathak et al. (1978), que constataram a possibilidade de utilização do teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade de oósporos de *Peronospora manshurica*, optou-se por, utilizando-se os mesmos princípios, definir como objetivo deste trabalho a adequação da técnica, visando à avaliação da viabilidade de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, associados à sementes de soja, bem como a determinação da longevidade desses esporos, ao longo do período de armazenamento das referidas sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos laboratoriais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

2.1 Coleta e preparo de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Os urediniósporos foram obtidos a partir de folhas de soja com ferrugem, recém-colhidas de plantas cultivadas em casa de vegetação.

A coleta foi realizada sobre papel alumínio, por liberação mecânica (leves toques na superfície ventral das folhas). Os esporos obtidos foram acondicionados em Eppendorf e este mantido em refrigerador convencional, por até 24 horas.

2.2 Adequação e condução do teste de viabilidade do inóculo

A solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (sal de tetrazólio), responsável pela coloração de esporos viáveis, foi preparada em tampão (pH 6,5 – 7,0), conforme Pathak et al. (1978). Para o preparo da solução tampão, foram adicionadas duas partes da solução “A” (0,545g de KH_2PO_4 em 60ml de água deionizada), em três partes da solução “B” (2,149g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 90ml de água deionizada). Após homogeneização, foram vertidos cinco volumes de 24ml de solução tampão, em Erlenmeyers, acrescidos de dosagens de sal de tetrazólio (zero; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48g), resultando nas concentrações: zero; 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%.

Com a intenção de se promover a otimização do processo de penetração da solução de tetrazólio nos urediniósporos, realizou-se a pré-embebição do inóculo por meio da adição de 45mg de urediniósporos em 120ml de água deionizada, obtendo-se, ao final, uma suspensão com concentração de 9×10^4 urediniósporos/ml. Mediante agitação contínua da suspensão de inóculo, pipetaram-se, utilizando pipeta automática, 120 amostras de 1,0ml, vertendo-as em tubos de ensaio (15 x 100mm) envolvidos em papel alumínio e acondicionando-os, em seguida, em BOD, à temperatura constante de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

Decorrido o período de pré-embebição, adicionou-se, em cada tubo, 1,0ml de solução de tetrazólio (TZ), conforme concentração correspondente. Aos tubos que deveriam conter o percentual zero de sal de tetrazólio, foi adicionado 1,0ml de solução tampão. Após homogeneização, levaram-se os tubos às BODs correspondentes, ou seja, 60 tubos (5 concentrações de TZ x 4 períodos de incubação x 3 repetições) à temperatura de 30°C e outros 60 tubos a 35°C .

Os tubos, contendo as respectivas suspensões de esporos na presença de sal de tetrazólio, permaneceram nas BODs durante os períodos de incubação testados. Ao se completar cada período, os tubos foram subtraídos do condicionamento térmico e seu conteúdo submetido à avaliação colorimétrica. Para tal, pipetaram-se $15\mu\text{L}$ da solução contida em cada tubo e verteu-se em lâminas para microscopia, avaliando-se o percentual de esporos coloridos, em microscópio de luz. Para a determinação do percentual de urediniósporos coloridos, foram tomados, por referência, alguns critérios existentes para avaliações em sementes de vegetais (Delouche et al., 1976; França Neto, 1999). Foram considerados viáveis todos os esporos com coloração de amarelo-alaranjado a laranja-avermelhado, incluindo o vermelho, em qualquer intensidade.

Pelo motivo de não haver diferença significativa entre os períodos de exposição, optou-se por adotar o tempo de 24 horas, pela maior rapidez na obtenção de resultados, bem como pelo menor risco de contaminação do meio, o que poderia resultar em falso positivo. Com relação à temperatura de exposição, optou-se pela utilização de 35°C, em razão de se ter definido essa temperatura, em testes preliminares, como sendo a ideal para a fase de pré-embebição dos urediniósporos, adotando-se, portanto, em todo o teste, uma única temperatura de trabalho.

Uma parcela dos urediniósporos coletados para o ensaio de adequação do teste de tetrazólio foi submetida à avaliação de germinabilidade em ágar-água, resultando em 45% de esporos germinados.

Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, tendo sido aplicado o esquema fatorial 4x4x2, na combinação dos fatores concentração da solução de tetrazólio (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), período de exposição dos urediniósporos à solução de tetrazólio (24; 48; 72; 96 horas) e temperaturas de exposição dos urediniósporos à solução de tetrazólio (30° e 35°C). Foram utilizadas 3 repetições, sendo cada repetição representada por um tubo de ensaio contendo 2ml de suspensão de urediniósporos.

A análise estatística dos dados foi efetuada aplicando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000) e o gráfico foi plotado no programa Microsoft® Office Excel 2003.

2.4 Inoculação e armazenamento das sementes

Para avaliar a longevidade de urediniósporos associados à sementes de soja, sob condições de armazenamento em ambiente protegido, procedeu-se a avaliações periódicas (com intervalos de 30 dias), utilizando-se o método do teste de tetrazólio, anteriormente descrito. Nos mesmos intervalos de tempo, avaliou-se também a germinabilidade dos referidos esporos, aplicando-se o método ágar-água, já descrito.

Foram utilizadas, neste ensaio, sementes de soja cultivar MG/BR-46 (Conquista), peneira 2, classe S2, com grau de pureza 99% e índice de germinação de 80%. Seu percentual de umidade foi avaliado em 10,3%, à temperatura de 29,3°C.

O procedimento de inoculação se deu com a utilização de inóculo retirado de 40 trifólios de plantas de soja, com presença de grande número de pústulas. As folhas foram colocadas no interior de saco plástico, com capacidade para 50 kg, acrescentando-se, em seguida, 6,0 kg de sementes de soja a serem inoculadas. Na seqüência, o saco plástico foi fechado e vedado, sofrendo, em seguida, agitação manual, com movimentos leves e intermitentes, por cerca de 2 minutos, após o quê, foi deixado em repouso, ainda fechado, por cerca de 30 minutos. Em seguida, foram retiradas todas as folhas e nova mistura foi efetuada, permitindo, dessa maneira, a distribuição homogênea dos urediniósporos na superfície das sementes.

Com a finalidade de conhecer a concentração de esporos associados às sementes recém-inoculadas, coletaram-se, por amostragem, 200 sementes, que foram submetidas a exame de suspensão de lavagem, conforme metodologia adaptada de Pathak et al. (1978), obtendo-se como resultado, $1,25 \times 10^5$ esporos/100 sementes. Na seqüência, utilizando-se a mesma suspensão de lavagem das sementes, avaliou-se a germinabilidade dos urediniósporos em

meio ágar-água. Em seguida, foram coletadas três amostras de 200 sementes cada e, após a obtenção da suspensão de lavagem, foi realizado o teste de tetrazólio, à concentração de 0,5%, em 24 horas de exposição a 35°C, com a intenção de se avaliar o percentual de esporos coloridos no momento da inoculação.

As sementes inoculadas foram divididas em seis amostras, acondicionadas em sacos de papel que, por sua vez, foram embalados, conjuntamente, em saco de papel trifoliado, específico para acondicionamento de sementes de soja. O armazenamento se deu na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A temperatura e a umidade relativa do ar foram continuamente monitoradas, durante seis meses, utilizando-se termo-higrógrafo convencional (Figuras B11 – B24).

A cada intervalo de 30 dias, foi subtraída uma amostra e levada ao Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da UFLA, onde foram processadas as análises de germinabilidade e viabilidade dos urediniósporos, conforme metodologias citadas anteriormente.

Em razão da ocorrência de alguns resultados com valor zero, no que se refere à percentual de urediniósporos coloridos, os dados foram ajustados para $\sqrt{x+0,5}$. A análise estatística foi feita utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2000) e o gráfico foi plotado no programa Microsoft® Office Excel 2003.

Avaliação da germinabilidade dos urediniósporos

O percentual de germinabilidade dos urediniósporos associados a sementes foi determinado a partir da solução remanescente do exame de suspensão de lavagem, da qual foram tomados 40µL e, em seguida, vertidos em meio de cultura ágar-água, 1,5%, em placa de Petri (35 x 10 mm) que, após

espalhados na superfície do meio solidificado, utilizando alça de Drigalsky, foram mantidos em BOD, a 25°C, por 4 horas, na ausência de luz. Após o referido período, as placas foram conduzidas ao microscópio de luz, onde foram quantificados, em termos percentuais, os urediniósporos que apresentaram tubo germinativo, cujo comprimento fosse igual ou superior à menor dimensão do esporo.

Delineamento experimental e análise estatística

Para o ensaio de avaliação da longevidade de urediniósporos associados a sementes de soja, sob condições de armazenamento em ambiente protegido, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento) e três repetições. Cada repetição foi constituída por uma amostra de 200 sementes, da qual foram avaliados 100 urediniósporos quanto à coloração (% de esporos coloridos).

Para a análise de variância, não foi considerado o período zero, em razão do percentual de urediniósporos a este correspondente ser extremamente elevado, em relação aos demais. Optou-se, portanto, por considerá-lo de forma isolada, apenas como valor demonstrativo da viabilidade dos esporos no momento da inoculação das sementes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Adequação do teste de viabilidade

A solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio influenciou na mudança de coloração de considerável percentual de urediniósporos, especialmente quando foram utilizadas dosagens menores do referido sal (Figura 1a).

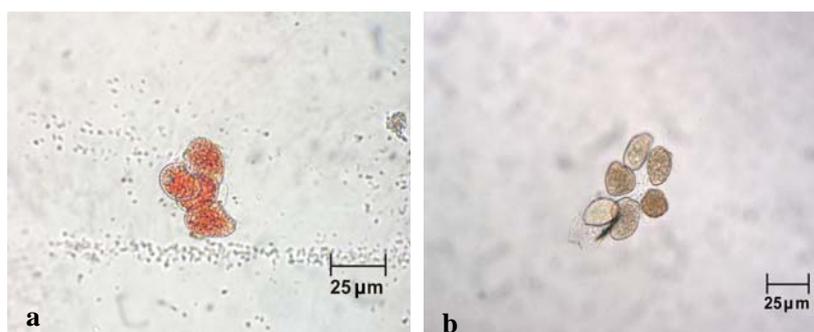


FIGURA 1. Fotomicrografia mostrando diferenças de coloração de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, na presença de solução de tetrazólio (0,5%), sob temperatura de 35°C, por período de 24 horas; (a) urediniósporos com tonalidade avermelhada; (b) urediniósporos não coloridos, em solução tampão sem tetrazólio.

O maior número de urediniósporos coloridos se deu na solução com concentração de 0,5% de sal de tetrazólio (Tabela 1). Este fato pode ser confirmado pelos dados da Figura 2, na qual se observa o decréscimo do percentual de urediniósporos coloridos em função do aumento da concentração

da solução de sal de tetrazólio, tendo como ponto máximo o percentual relativo à concentração de 0,5%.

TABELA 1. Percentual médio de urediniósporos coloridos na presença de solução de tetrazólio, por períodos diversos de exposição, em temperaturas de 30 e 35°C. UFLA – Lavras (MG), 2007.

<i>Concentração do sal de tetrazólio (%)</i>	<i>Tempo de Exposição (horas)</i>	<i>Nº médio de urediniósporos coloridos à 30 °C (%)</i>	<i>Nº médio de urediniósporos coloridos à 35 °C (%)</i>
zero	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
	96	0	0
0,5	24	80	87
	48	82	88
	72	85	89
	96	83	83
1,0	24	82	74
	48	85	75
	72	85	74
	96	77	85
1,5	24	71	74
	48	74	71
	72	79	73
	96	74	77
2,0	24	65	68
	48	67	69
	72	71	67
	96	71	75

A ocorrência de efeito significativo, pelo teste F ($P \leq 0,05$), se deu apenas na fonte de variação “concentração da solução de tetrazólio”. Para as

demais fontes (tempo de exposição, temperatura de exposição, interações duplas de concentração x tempo e concentração x temperatura de exposição e interação tripla de concentração x tempo x temperatura de exposição) não foi observado efeito significativo (Tabela 1A).

Portanto, ficaram assim definidos os parâmetros a serem utilizados no teste de viabilidade de urediniósporos associados às sementes: concentração de 0,5% da solução de sal de tetrazólio no tempo de 24 horas de exposição ao sal, em temperatura de exposição de 35°C. Essa condição promoveu a coloração de urediniósporos em tonalidades que variaram do laranja-avermelhado ao vermelho intenso, caracterizando presença de atividade enzimática, em maior ou menor grau de intensidade.

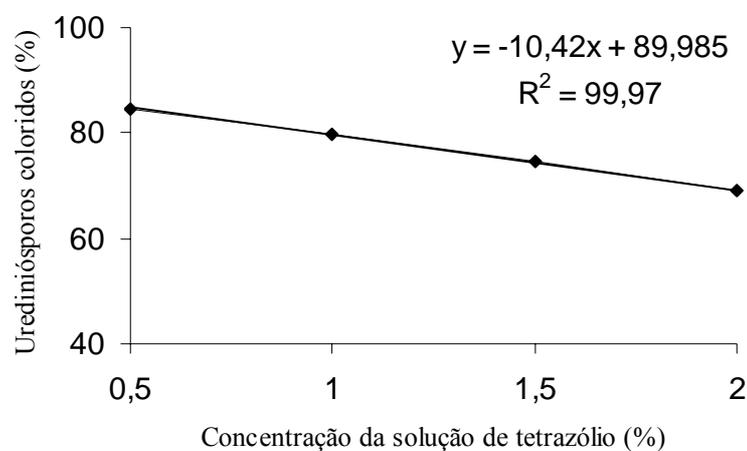


FIGURA 2. Equação de regressão para percentual de urediniósporos coloridos em função da concentração da solução de tetrazólio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Com o tempo de exposição mais dilatado, ou seja, 96 horas, houve uma tendência de escurecimento dos urediniósporos, de forma generalizada, o que dificultou a avaliação colorimétrica. Referindo-se a sementes, Lakon (1949) afirma que o processo de coloração, durante o teste de tetrazólio, deve ser completado, no máximo, em 24 horas, sob risco de ocorrer obscurecimento do conteúdo, em razão da rápida multiplicação de bactérias, caso ocorra contaminação do meio. A presença de bactérias vivas, segundo o mesmo autor, que também podem ser tingidas pelo tetrazólio, pode interferir no resultado, caso em que ocorre o tingimento de toda a solução aquosa.

3.2 Coloração de urediniósporos de *P. pachyrhizi* associados a sementes armazenadas

Conforme pode ser constatado (Tabela 2), por meio do teste de tetrazólio, em todos os períodos de armazenamento houve coloração de um número variado de urediniósporos obtidos da suspensão de lavagem das sementes. Essa coloração, indicativa de atividade enzimática, sugere a ocorrência de uma condição de viabilidade, com os esporos em aparente estado de dormência. No momento em que se procedeu a inoculação, 90% dos urediniósporos associados às sementes amostradas exibiram coloração específica. Por outro lado, de acordo com o resultado do teste de germinabilidade em ágar-água, 63% dos urediniósporos emitiram tubo germinativo. Todavia, à primeira avaliação, aos 30 dias, bem como nas cinco avaliações subseqüentes, não houve manifestação de qualquer sinal de emissão de tubo germinativo, por parte dos urediniósporos. Uma das hipóteses que poderia ser lançada para explicar este tipo de resultado seria a ocorrência do estado de dormência por parte dos esporos. A possibilidade de germinação subseqüente dos esporos seria um aspecto que ainda carece de maiores investigações.

TABELA 2. Percentual médio de urediniósporos coloridos, associados à sementes de soja, obtidos durante o período de armazenamento em unidade de beneficiamento de sementes, submetidos à solução de sal de tetrazólio 0,5% e incubados por 24 horas, a 35°C. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Períodos de armazenamento (dias)	Número médio de urediniósporos coloridos (%)
0	90
30	11
60	09
90	06
120	05
150	03
180	02

Pela análise de variância, a fonte de variação “período de armazenamento” apresentou efeito significativo em relação ao percentual de urediniósporos coloridos (Tabela 2B).

Na análise de regressão realizada para comparar o efeito do período de armazenamento das sementes com esporos de *P. pachyrhizi* (Figura 3), foi observado que o percentual de urediniósporos coloridos, sugerindo viabilidade, decresceu com o aumento do período de armazenamento das sementes, às quais aqueles se encontravam associados. Aos trinta dias de armazenamento, somente 11% dos esporos, em média, coloriram, representando uma queda de 79%, comparado ao percentual de esporos coloridos no momento da inoculação das sementes. A partir de então, houve uma tendência à manutenção de percentual inferior a 10%, ao longo de todo o período restante avaliado. Entretanto, ao final

do período, 2% dos urediniósporos permaneceram ainda viáveis. Este percentual poderia ser considerado de significância maior ou menor, dependendo do índice de infestação das sementes.

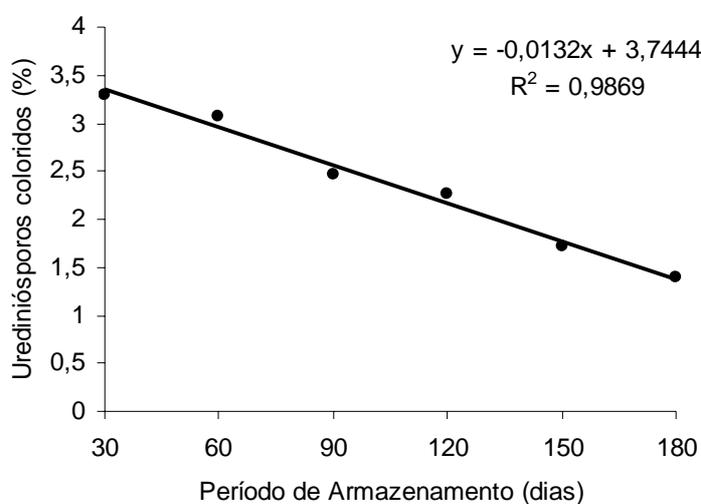


FIGURA 3. Equação de regressão para percentual de urediniósporos coloridos em função do período de armazenamento. UFLA, Lavras, MG, 2007.

As sementes contaminadas com *P. pachyrhizi*, ao serem manuseadas no campo, ou, mesmo, em áreas com presença de corrente de ar, favoreceriam a disseminação dos esporos a distâncias indeterminadas. Dessa maneira, unidades propagativas viáveis, sendo depositadas em plantas de soja voluntárias ou, mesmo, em plantas hospedeiras alternativas, sob condições climáticas favoráveis, poderiam constituir-se em fonte de inóculo primário, representando risco, no que se refere à questão epidemiológica.

O princípio do teste de tetrazólio, portanto, aplicado na avaliação da viabilidade de sementes de vegetais (Delouche et al., 1976; França Neto, 1999) e utilizado em metodologia adaptada para detecção de oósporos de *P. manshurica* (Pathak et al., 1978), tem aplicação também na diferenciação de coloração de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, em função da ocorrência de atividade enzimática em seu conteúdo celular.

4 CONCLUSÕES

Por meio do teste de tetrazólio modificado é possível diferenciar intensidades de coloração de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, o que constitui um procedimento potencial para complementar o teste de sanidade neste patossistema.

Com base na aplicação do referido teste, os urediniósporos associados às sementes de soja mantidas em condições de armazenamento por seis meses, apresentaram sinais de atividade enzimática em 2% dos esporos analisados, o que sugere viabilidade deste inóculo, durante o período considerado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by Fungi. In: AGRIOS, G. N. (Ed.) **Plant Pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. p. 385-614.

BRADLEY, C. A. **Recent information on fungicides for rust control in north Dakota**. 2005. Disponível em: <<http://www.ndsu.nodak.edu/soydiseases/rust.shtml>>. Acesso em: 13 mar. 2007.

CALDWELL, P.; LAING, M. **Soybean Rust** - a new disease on the move. 2001. Disponível em: <<http://www.saspp.org/content/view/20/11/>>. Acesso em: 28 mar. 2007.

DEACON, J. W. **Modern micology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997. 302 p.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZIZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Org.) **Vigor em sementes: Conceitos e testes**. Londrina: Comitê de Vigor, ABRATES, 1999. v. 1, p. 8.1-8.7.

GODOY, C. V.; FLAUSINO, A. M. Efeito da temperatura na germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, viabilidade e sobrevivência em diferentes condições de armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 2004, **Anais...** Gramado, RS, 2004. p. 124.

HERSHMAN, D. **Could Soybean Rust Be Imported Into The United States With Seed, Bulk Grain Or Meal?** 2004. Disponível em: http://www.uky.edu/Ag/kpn/pdf/kpn_1029.pdf
Acesso em: 01/04/2007.

KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. 2. ed. Waterloo: Mycologue Publications, Canada, 1992. 406 p.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 3, p. 389-394, 1949.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.

McGee, D. C. **Regulated non-seedborne pests**. 2002.
Disponível em <www.seedheath.org/RNSP.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2007.

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**, St. Paul, v. 73, n. 2, p. 117-122, Feb. 1989.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1977. v. 2, 1191 p.

PATHAK, V. K.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Detection of *Peronospora manshurica* (Naum.) Syd. in seeds of soybean, *Glycine max*. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 8, n. 1, p. 21-28, 1978.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora Pachyrhizi* Sydow & Sydow e Aspectos Epidemiológicos e Ultra Estruturais da sua Interação com a Soja (*Glycine Max* (L.) Merrill)**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E. Efeito de diferentes métodos de armazenamento na germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 2004, Gramado. **Anais...** Gramado, RS, 2004. 164 p.

CAPÍTULO 4

TRANSMISSIBILIDADE DE *Phakopsora pachyrhizi* A PARTIR DE SEMENTES DE SOJA, EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Transmissibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a partir de sementes de soja, em condições controladas.** In: Relações de *Phakopsora pachyrhizi* com sementes de soja. Lavras: UFLA, 2007. p.55-74. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).¹

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a transmissibilidade de *P. pachyrhizi* a partir de sementes de soja, por meio de dois ensaios. No primeiro, sementes, artificialmente contaminadas com uredinósporos foram semeadas em vasos contendo mistura de solo:areia:esterco, dentro de caixas de madeira com proteção individual, pelo período de 80 dias, em câmaras de crescimento vegetal. O segundo ensaio constou de semeadura em substrato de areia sob duas condições de temperatura, 15 e 20 ±2°C, com umidade atmosférica elevada. Nos dois ensaios, regas foram realizadas por meio de dispositivo de proteção contra contaminação externa. Ao final dos períodos de avaliação de ambos os ensaios, as plantas foram individualmente removidas e cuidadosamente examinadas com auxílio de microscópio estereoscópio, quanto à ocorrência de sinais e ou sintomas relativos à presença do patógeno. Em nenhum caso foi detectado qualquer indício da ocorrência de *P. pachyrhizi* nas plantas analisadas.

¹ Comitê de orientação: José da Cruz Machado – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA (Professor Co-orientador).

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de. **Level of interaction of *Phakopsora pachyrhizi* with seeds of soybean.** In: Relationship of *Phakopsora pachyrhizi* with soybean seeds. 2007. p.55-74. Dissertation (Master in Phytopathology – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil).¹

In this work the objective was to investigate the possibility of direct transmission of *Phakopsora pachyrhizi* by seeds of soybean under controlled conditions. In one trial, seeds, artificially contaminated with fresh harvested urediniospores, were sown in pots that were kept in separate wood boxes with protection against external contamination for the period of 80 days under controlled conditions. In another trial, contaminated seeds were sown in plastic trays containing sand substrate and that were maintained in growth rooms at temperatures of 15 e 20 ±2°C for three weeks. In both trials symptoms of rust disease were not observed in any emerged plants that were examined with aid of microscopes.

¹Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA (Co-adviser Professor).

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] vem se expandindo e se tornando um dos cultivos de maior expressão no Brasil e no mundo. Em contrapartida, um número crescente de novos patógenos parece avançar, na mesma proporção, no ataque a essa oleaginosa, no campo. Nas condições brasileiras, um número considerável de fungos fitopatogênicos infecta ou infesta sementes de soja. Considerados de maior importância, em razão de apresentarem maior eficiência em sua disseminação por essa via, *Phomopsis* sp., *Diaporthe faseolorum* f. sp. *meridionalis*, *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium semitectum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Aspergillus* spp. devem constituir, portanto, alvo de maior atenção, sob o aspecto de vigilância sanitária.

Em estudos realizados por Halfon-Meiri (1983), foi comprovada a transmissão, de semente para a planta, de *Puccinia carthami*, agente etiológico da ferrugem-de-cártamo (*Carthamus tinctorius*). Este fato demonstrou que pelo menos um dos agentes causais de ferrugem é passível de transmissão via sementes.

Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & Sydow, agente etiológico da ferrugem asiática da soja, atualmente, pode ser constatado como um dos mais importantes agentes causais de doenças bióticas nessa espécie vegetal, porém, a sua transmissão via semente é desconsiderada, o que também ocorre com a quase totalidade dos agentes etiológicos de ferrugens dos mais diversos cultivos.

Estudos têm demonstrado a possibilidade de ocorrência de dormência em urediniosporos de *P. pachyrhizi*, por períodos variáveis de tempo (Formento & Souza, 2006; Zambenedetti, 2005). Isso sugere que esporos, ao serem

submetidos à avaliação de germinabilidade, não tendo a sua germinação efetivada, podem encontrar-se em estado de dormência, o que caracterizaria a condição de viabilidade, constituindo-se, portanto, em provável potencial de ameaça ao patossistema em questão.

A ocorrência de urediniósporos de *Phakopsora* sp. em sementes de soja provenientes do estado de Mato Grosso, constatada pelo Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em 2004, representa um fato de relevância questionável, no que se refere a riscos de caráter epidemiológico.

Em razão da carência de trabalhos experimentais relacionados a essa questão, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de sinais ou sintomas da ferrugem em plantas de soja originadas de sementes infestadas com urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Transmissibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* por sementes de soja, em ambiente protegido

Para este estudo foram conduzidos dois ensaios, um em substrato composto (solo, areia e esterco) e outro em substrato de areia, ambos sob condições controladas.

O primeiro ensaio foi realizado na câmara de crescimento vegetal do Departamento de Agricultura da UFLA, cuja temperatura esteve situada em $20 \pm 2^\circ\text{C}$. O segundo ensaio, utilizando metodologia adaptada de Halfon-Meiri (1983), foi conduzido em duas câmaras de crescimento vegetal da área de Epidemiologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da mesma universidade, com temperaturas de 15 e $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foram utilizadas, nestes ensaios, sementes de soja da cultivar MG/BR-46 (Conquista), classe S2, com grau de pureza 99%. Seu percentual de umidade foi avaliado em 9,2% e o índice de velocidade de emergência em 11.

2.1.1 Teste de sanidade das sementes

Para a obtenção do perfil sanitário das sementes, foi empregado o método de papel de filtro (Neergaard, 1977), utilizando-se placas de Petri de 15cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em calda agarizada (ágar-água a 2%) acrescida de 84,7g de manitol, resultando em potencial osmótico de $-1,2\text{MPa}$ (Machado, 2003). Quatrocentas sementes foram distribuídas nas referidas placas (25 sementes/placa) e estas foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Ao término desse período, as placas

foram levadas ao microscópio estereoscópio e as sementes examinadas individualmente, obtendo-se, em termos percentuais, a incidência de fungos fitopatogênicos encontrados na amostra.

O condicionamento osmótico possibilitou a escolha das sementes, aparentemente livres de patógenos, para a utilização nos dois ensaios de transmissibilidade de *P. pachyrhizi*.

Realizou-se também, teste de germinação, de conformidade com as regras para análise de sementes – RAS (Brasil, 1992) e *International Seed Testing Association* (ISTA, 1976).

2.1.2 Inoculação das sementes

Para o primeiro ensaio (substrato composto), foram definidos quatro tratamentos, representando diferentes procedimentos de inoculação de *P. pachyrhizi* em sementes de soja. Tratamento 1: sementes não inoculadas, porém, tratadas em solução de hipoclorito de sódio, 1%, por 1 minuto e, em seguida, submetidas a três lavagens em água destilada. Posteriormente a esse procedimento, as mesmas foram espalhadas sobre papel “germitest”, para secagem. Tratamento 2: sementes com infestação natural (700 urediniósporos/100 sementes), avaliado por meio do exame de suspensão de lavagem. Tratamento 3: sementes com inóculo natural, conforme Tratamento 2, foram tratadas com uma calda de ágar-água, 1,0%, contendo 2×10^4 urediniósporos/ml, o que resultou em concentração de 2.600 urediniósporos/100 sementes. Para o preparo da calda, procedeu-se, inicialmente, à fusão do meio, aguardando, em seguida, o seu resfriamento (35°C), quando, então, foram adicionados a este 4,0ml de suspensão de urediniósporos de *P. pachyrhizi* ($2,82 \times 10^5$ esporos/ml). Após a obtenção de mistura homogênea, esta foi vertida sobre as sementes de soja, em placa de Petri e, em seguida, colocadas em ambiente

seco, com o propósito de favorecer sua secagem. Tratamento 4: sementes com inóculo natural, conforme Tratamento 2, foram embebidas em uma suspensão aquosa de inóculo, contendo $2,8 \times 10^5$ esporos/ml. Para este procedimento, as sementes foram vertidas em Erlenmeyer de 250ml, contendo 30ml de suspensão de esporos e, logo em seguida, retiradas e postas a secar em papel “germitest”. A concentração média de esporos, avaliada por intermédio do exame de suspensão de lavagem foi de $1,23 \times 10^4$ esporos/100 sementes.

No segundo ensaio (substrato de areia), foram utilizados três tratamentos que representaram, também, distintos procedimentos de inoculação de *P. pachyrhizi* em sementes de soja. Tratamento 1: sementes não inoculadas e tratadas em solução de hipoclorito de sódio, 1%, conforme Tratamento 1 do primeiro ensaio. Tratamento 2: sementes com inóculo natural (700 urediniósporos/100 sementes). Tratamento 3: sementes com reforço de inóculo, resultando em concentração de $2,8 \times 10^4$ urediniósporos/100 sementes. Este reforço de inóculo foi obtido a partir da agitação, por dois minutos, em um saco plástico, de sementes de soja com inóculo natural (700 urediniósporos/100 sementes), junto a 20 trifólios de planta de soja recém-coletados no campo, cobertos de soros urediniais de *P. pachyrhizi* em fase de efetiva esporulação. Em complemento, verteu-se sobre as mesmas sementes uma calda de ágar-água, 1,0%, contendo $3,3 \times 10^4$ urediniósporos/ml, conforme procedimentos conduzidos no Tratamento 3 do primeiro ensaio.

Para a utilização da calda de ágar-água, foi realizado teste preliminar, em que se avaliou a possibilidade de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, submersos em ágar-água solidificado, germinarem a índices satisfatórios, comparado à metodologia convencional. Para tal, foram misturados 4ml de suspensão de urediniósporos de *P. pachyrhizi* ($2,26 \times 10^5$ esporos/ml) a 30ml de meio ágar-água a 35°C. Após a obtenção de mistura homogênea, esta foi vertida em placa de Petri e, em seguida, levada à BOD, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, por 4 horas, na ausência de

luz. Subseqüentemente, foram tomados 40µL de suspensão de urediniósporos ($2,26 \times 10^5$ esporos/ml) e espalhados em superfície de meio ágar-água, 1,5%, solidificado, em placa de Petri (9,0cm de diâmetro), utilizando alça de Drigalsky. Em seguida, esta foi acondicionada em BOD, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, por 4 horas, na ausência de luz. Os índices de germinabilidade obtidos para os dois ensaios foram de 61%, para o método convencional e de 66%, para o de urediniósporos submersos.

2.1.3 Preparo dos substratos e sementeira

O substrato composto foi constituído de $0,12\text{m}^3$ de mistura de solo, areia e esterco, na proporção 3:2:1, com adição de 96g da formulação 4-14-8 e 117g de calcário dolomítico (PRNT = 95%). A referida mistura (solo: areia: esterco) foi submetida à técnica de fumigação com o uso de brometo de metila.

O substrato foi acondicionado em vasos de polietileno com capacidade de 5,0 litros que, em seguida, foram envolvidos por saco plástico para proteção contra esporos e, dessa forma, transportados diretamente para a câmara de crescimento vegetal ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), onde se deu a sementeira, à profundidade de 2,0cm, na proporção de 9 sementes/vaso.

Para o segundo ensaio, foram utilizados recipientes plásticos, com dimensões de 17,0 cm de diâmetro x 6,0 cm de profundidade, esterilizados e preenchidos com areia autoclavada e umedecida. Foram conduzidos dois ensaios sob temperaturas distintas. Cada ensaio foi implantado utilizando-se cinco repetições de 50 sementes. Estes foram mantidos em câmaras de crescimento vegetal de 15 e $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação artificial, utilizando lâmpadas fluorescentes, tipo 'luz do dia', com fotoperíodo de 12 horas diárias. Com a finalidade de se evitar a contaminação durante o transporte, os recipientes foram

envolvidos em sacos plásticos e, dessa maneira, conduzidos às respectivas câmaras para que se efetuasse a sementeira.

2.1.4 Estruturas de proteção anti-esporos

Com a finalidade de evitar contaminação externa por urediniósporos de *P. pachyrhizi*, via corrente aérea, os vasos referentes ao ensaio em substrato composto foram cobertos, individualmente, com armações de madeira, com dimensões 1,0 x 0,50 x 0,50m, envolvidas com plástico transparente, exceto na base (Figuras 1a e 1b). Em duas faces opostas da caixa protetora foram reservados espaços de 0,20 x 0,50m para serem preenchidos com tecido, tipo “tela antiafídica”, para permitir ventilação às plantas (Figura 1a).



FIGURA 1. Fotografias mostrando estruturas de madeira revestidas com plástico transparente, utilizadas para cobertura dos vasos. (a) Uma das faces opostas da caixa protetora com espaço preenchido com tecido, tipo “tela antiafídica”, permitindo ventilação junto às plantas; (b) Vasos, no interior das caixas de proteção, tendo ao seu redor quatro potes com água para a elevação da umidade relativa do ar.

O piso da câmara, por sua vez, foi revestido com plástico, evitando-se qualquer contato daquele com o ambiente interno das estruturas de proteção.

Os recipientes pertencentes ao ensaio em substrato de areia não receberam qualquer cobertura de proteção anti-esporos, em razão do reduzido período de permanência do ensaio na câmara (20 dias).

2.1.5 Manejo das plantas

Em relação ao primeiro ensaio (substrato composto), as regas foram efetuadas, semanalmente, por intermédio de mangueira flexível $\frac{3}{8}$ ", fixada por meio de perfuração na estrutura de madeira na face superior de cada caixa de proteção (Figura 2a).

Objetivando o monitoramento da presença de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, no ambiente externo às caixas protetoras, foram instaladas, semanalmente, durante 30 minutos, duas armadilhas de esporos, "Rotorod Sampler", situadas internamente e externamente ao ambiente do ensaio (Figura 2b).

Aos 18 dias pós-semeio, foi realizado o desbaste, deixando-se três plantas por vaso.

Em razão da ocorrência de ninfas de espécie de trips não identificada, em intensidade considerável, foi realizada aplicação do inseticida piretróide Decis 25 CE, na dosagem de 150µL/litro de água, aos 47 dias após o plantio.

Em relação ao segundo ensaio (substrato de areia), as plantas foram regadas manualmente, duas vezes a cada semana, utilizando regador plástico, tendo-se o cuidado de aplicar o mesmo volume de água por recipiente.

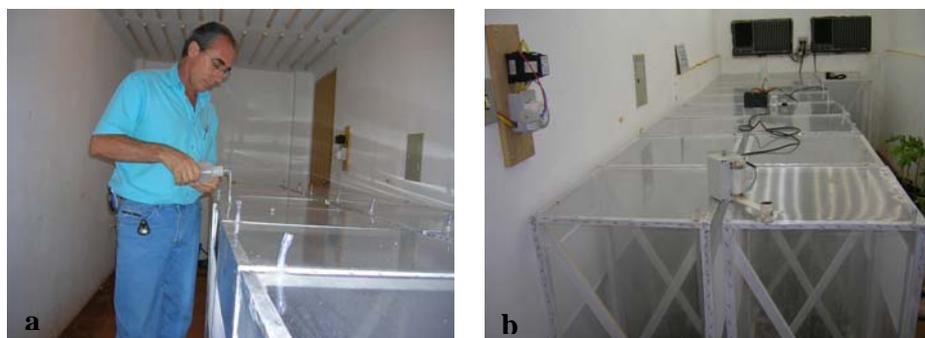


FIGURA 2. Fotografias mostrando administração de regas e monitoramento do ambiente com relação à presença de urediniósporos de *P. pachyrhizi* veiculados por corrente aérea. (a) Aplicação de volumes uniformes de água em cada vaso, com auxílio de pisseta graduada; (b) Utilização de armadilhas de esporos, tipo “Rotorod Sampler”.

A temperatura e a umidade relativa do ar, nas duas câmaras de crescimento vegetal, foram monitoradas diariamente, com uso de termohigrômetro TH02 e termômetro de máxima e mínima (Figura 3a), e os valores registrados em caderneta específica.

Com a intenção de se avaliar a possível entrada de urediniósporos no ambiente das câmaras, provenientes do meio externo, foram instaladas, semanalmente, durante 30 minutos, duas armadilhas de esporos “Rotorod Sampler”, uma em cada câmara. Não foi detectada a presença de urediniósporos em nenhuma das câmaras, durante o período de condução do ensaio.

A avaliação das plantas foi efetuada após coleta e acondicionamento em sacos plásticos. Todas as plantas foram analisadas em microscópio estereoscópio (Figura 3b).



FIGURA 3. Fotografias da condução do ensaio em substrato de areia sob condições controladas em câmara de crescimento vegetal, com posterior avaliação das plântulas em microscópio estereoscópio. (a) Plântulas em desenvolvimento, sob temperatura e umidade relativa do ar monitoradas diariamente; (b) Análise completa das plântulas quanto à ocorrência de sinais e ou sintomas relacionados a *P. pachyrhizi*.

2.1.6 Ocorrência de sintomas da ferrugem

Aos 80 dias após o plantio (estádio de desenvolvimento R1), foi realizada a coleta da parte aérea das plantas oriundas do ensaio em substrato composto, oportunidade em que foram destacadas todas as folhas e segmentadas as hastes e ramos, acondicionados em saco plástico e encaminhados à câmara fria ($10 \pm 2^\circ\text{C}$), para preservação, até o momento da avaliação. A análise do material coletado foi realizada em microscópio estereoscópio, onde foram avaliados folhas, folíolos, pecíolos hastes principais e ramos, quanto à ocorrência de sintomas de ferrugem (lesões), acompanhadas de urédias, com ou sem liberação de uredinósporos.

Algumas folhas que apresentavam lesões suspeitas receberam pulverização de água destilada, em ambas as superfícies, utilizando pulverizador manual pequeno e, em seguida, acondicionadas em placa de Petri (15cm de

diâmetro), contendo três folhas de papel de filtro umedecidas em água destilada. Na seqüência, foram levadas à câmara de incubação e mantidas à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por sete dias. Ao final deste período, foram levadas a microscópio estereoscópio e analisadas as lesões, no que se refere à formação de urédias.

Aos 20 dias após o semeio, as plantas provenientes do ensaio em substrato de areia foram extraídas dos recipientes, lavadas e conduzidas a microscópio estereoscópio, onde foram avaliados folíolos, cotilédones, epicótilos, hipocótilos e raízes, quanto à ocorrência de qualquer sinal da presença ativa ou passiva do patógeno.

Em ambos os ensaios, os índices de temperatura e umidade relativa foram monitorados diariamente, utilizando termo-higrômetro TH02. Foram considerados apenas os valores de máxima e mínima, para a obtenção das médias diárias (Figuras B1 – B10).

2.1.7 Delineamento experimental

Para o primeiro ensaio (substrato composto), utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um vaso contendo três plantas de soja.

No segundo ensaio (substrato de areia), foi aplicado o mesmo delineamento, porém, com três tratamentos e cinco repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência de sintomas da ferrugem

Não foi constatado qualquer sintoma ou presença de urédias da ferrugem nas plantas emergidas, coletadas nos dois ensaios. Da mesma forma nenhuma urédia foi detectada em folhas, com lesões suspeitas, que foram incubadas posteriormente em condições controladas.

Os sintomas normalmente observados em plantas de soja com ferrugem são frequentemente confundidos, em sua fase inicial, com os sintomas de outras doenças foliares, tais como mancha-parda (*Septoria glycines*), pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) e crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*). Os sintomas referentes à ferrugem ocorrem, em sua manifestação inicial, na forma de reduzidas pontuações cloróticas, evoluindo para lesões de coloração castanho-acinzentada e, posteriormente, podendo chegar à condição de necrose pontual (Vale, 1985). As urédias podem surgir em número de 1 a 6 por lesão, com coloração que varia entre o castanho-claro e o castanho-escuro, abrindo em um diminuto poro, por meio do qual expele os urediniósporos. Estes se concentram ao redor do poro de onde são carregados, posteriormente, pelo vento (Zambenedetti, 2005).

Conforme pode ser observado, por meio dos gráficos, para o primeiro ensaio (Figuras 1B, 3B e 5B), a temperatura média se manteve entre 20 e 25°C, como condição térmica favorável ao inóculo (Marchetti et al., 1976; Melching et al., 1989). É importante ressaltar que mesmo com o aumento da temperatura, a partir do quadragésimo quinto dia, não houve produção de sintomas que caracterizassem a ocorrência da ferrugem causada por *P. pachyrhizi*.

Com relação ao segundo ensaio (teste de areia), os valores de temperatura ocorreram, em uma das câmaras, em faixa com variações entre 14,3 e 16,7°C (Figura 9B). Na outra câmara de crescimento, a variação ocorreu entre 18,6 e 21,6°C (Figura 7B). Por outro lado, a umidade relativa do ar oscilou, nas duas câmaras, entre 60 e 98% (Figuras 8B e 10B).

Portanto, mesmo sob condição de temperatura e umidade relativa do ar favoráveis, não foi constatado qualquer sintoma ou presença de urédias da ferrugem nas plantas emergidas, coletadas nos dois ensaios. Nenhum soro uredinial foi detectado nas lesões suspeitas, em folhas mantidas na câmara de incubação.

Os resultados deste ensaio reforçam, portanto, a hipótese de que agentes causadores das ferrugens não são transmitidos diretamente de sementes contaminadas à progênie correspondente. Dependendo da viabilidade do inóculo, o que se postula, para os patossistemas de ferrugens, é uma transmissão indireta, que consiste na veiculação do inóculo pelas sementes e, a partir daí, podendo ser disseminado, de alguma forma, às plantas hospedeiras já em desenvolvimento na área de plantio. Esta dinâmica tem sido postulada com base no fato de que algumas doenças de parte aérea, cujos patógenos não são transmitidos pelas sementes, ocorrem em áreas onde outros agentes de disseminação não têm sido detectados.

4 CONCLUSÕES

Com base em dois ensaios, sob condições devidamente controladas, fica evidenciado que a transmissão direta de *Phakopsora pachyrhizi* à progênie, a partir de sementes de soja, artificialmente inoculadas, não ocorre.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

FORMENTO, A. N.; SOUZA, J. Overwinter and survival of asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in volunteer soybean plants in Entre Ríos Province, Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 826, June 2006.

HALFON-MEIRI, A. Seed transmission of *safflower* rust (*Puccinia carthami*) in Israel. **Seed science & Technology**, Zurich, v. 11, n. 3, p. 835-851, 1983.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 152-155, 1976.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 77-81, 2003.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredósporos of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, v.66, p.461-463.

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

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, v. 2, 1977. 1191 p.

VALE, F. X. R. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1985. 104 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora Pachyrhizi* Sydow & Sydow e Aspectos Epidemiológicos e Ultra Estruturais da sua Interação com a Soja (*Glycine Max* (L.) Merril)**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da soja no contexto político-sócio-econômico do país, na atualidade, tem justificado a preocupação constante das Instituições de pesquisa, em relação às barreiras que surgem naturalmente, em decorrência de sua expansão, como uma das culturas preferenciais do agronegócio. As doenças de soja vêm se tornando uma preocupação cada vez maior no Brasil, em razão do elevado custo para o seu controle e pelas perdas que decorrem do uso de sementes com qualidade comprometida.

A ferrugem asiática da soja se tornou, na atualidade, uma das mais ameaçadoras fitodoenças, cuja presença já é registrada em praticamente todas as áreas de produção de soja, no Brasil e no mundo. Por ser considerado, seu agente etiológico, um parasita biotrófico do grupo das ferrugens, acredita-se não ser esta uma das doenças transmitidas via semente. No entanto, em razão do que é demonstrado nestes estudos, percebe-se a necessidade premente de se efetuar novas pesquisas no campo da patologia de sementes, especialmente no tocante ao patossistema em questão. Os resultados apresentados nestes trabalhos sugerem ser a semente uma possível via de disseminação do agente da ferrugem da soja, pois possibilitaram constatar a presença de urediniósporos em todas as amostras analisadas, procedentes de algumas regiões no Brasil.

Com relação à longevidade dos esporos associados às sementes, os estudos envolvendo o uso do teste de tetrazólio, permitiram levantar a hipótese de um possível estado de dormência dos urediniósporos, por período de tempo considerável, em ambiente não controlado. Novos estudos se fazem necessários para confirmar esta hipótese, sendo necessária, por exemplo, a inclusão do ensaio de infectividade desses esporos, em paralelo à condução dos testes de germinabilidade e de viabilidade pelo tetrazólio.

Conforme foi observado, a transmissão direta da ferrugem, de semente contaminada para a planta de soja emergente, não foi constatada. Todavia, tomando por base os resultados obtidos nestes trabalhos, pode-se inferir que as sementes de soja são veículos de esporos de ferrugem, transportando-os a outras regiões de cultivo. Na dependência de sua viabilidade, estes esporos (urediniosporos) podem representar risco, do ponto de vista epidemiológico, caso alcancem plantas hospedeiras, em condições ambientais favoráveis.

Dessa maneira, na pressuposição de que novas pesquisas sejam empreendidas, envolvendo o patossistema soja – *P. pachyrhizi*, especialmente no que tange ao aspecto disseminação via sementes, espera-se que informações novas sejam somadas, possibilitando o esclarecimento de questões ainda não plenamente resolvidas.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao percentual de urediniósporos coloridos, em função da concentração da solução de tetrazólio, tempo e temperatura de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2007	77
TABELA 2A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao percentual de urediniósporos coloridos, associados à sementes de soja, em função do período de armazenamento das sementes. UFLA, Lavras, MG, 2007	77

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados referentes ao percentual de urediniósporos coloridos, em função da concentração da solução de tetrazólio, tempo e temperatura de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2007.

FV	GL	QMs e significância
		Urediniósporos coloridos (%)
Concentração	3	1085,416667 *
Tempo	3	48,027778 ns
Temperatura	1	0,00000000E+0000 ns
Concentração x Tempo	9	19,129630 ns
Concentração x Temperatura	3	93,583333 ns
Concentr. x Tempo x Temperat.	9	39,611111 ns
Erro	67	46,359453
CV (%)		8,85

* = teste F significativo, a 5%; **ns** = teste F não significativo, a 5%

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos dados referentes ao percentual de urediniósporos coloridos, associados a sementes de soja, em função do período de armazenamento das sementes. UFLA, Lavras, MG, 2007.

FV	GL	QMs e significância
		Urediniósporos coloridos (%)
Período de armazenamento	5	1,659815 *
Erro	12	0,356266
CV (%)		25,27

* = teste F significativo, a 5%;

ANEXO B	Página
FIGURA 1B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de dezembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 81
FIGURA 2B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de dezembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 81
FIGURA 3B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 82
FIGURA 4B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 82
FIGURA 5B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de fevereiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 83
FIGURA 6B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Agricultura no mês de fevereiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 83
FIGURA 7B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 84
FIGURA 8B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento (20 ±2°C) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007..... 84

FIGURA 9B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($15 \pm 2^{\circ}\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	85
FIGURA 10B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($15 \pm 2^{\circ}\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	85
FIGURA 11B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de março/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	86
FIGURA 12B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de março/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	86
FIGURA 13B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de abril/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	87
FIGURA 14B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de abril/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	87
FIGURA 15B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de maio/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	88
FIGURA 16B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de maio/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	88

FIGURA 17B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de junho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	89
FIGURA 18B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de junho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	89
FIGURA 19B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de julho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	90
FIGURA 20B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de julho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	90
FIGURA 21B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de agosto/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	91
FIGURA 22B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de agosto/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	91
FIGURA 23B	Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 01 a 04 de setembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	92
FIGURA 24B	Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 01 a 04 de setembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.....	92

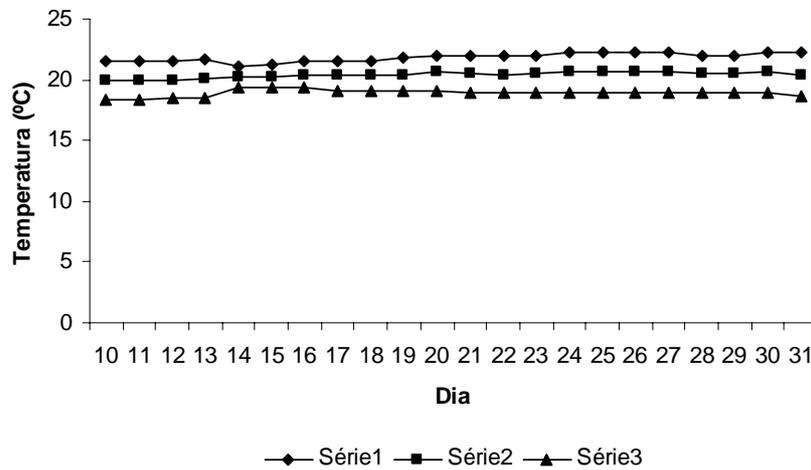


FIGURA 1B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 10 a 31 de dezembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

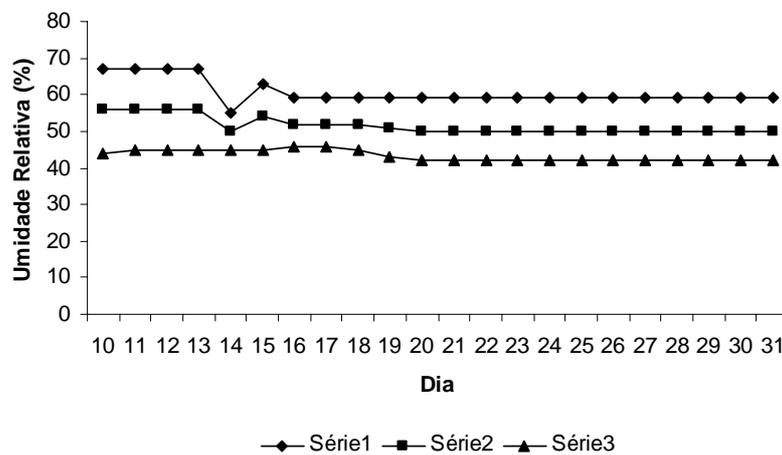


FIGURA 2B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 10 a 31 de dezembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

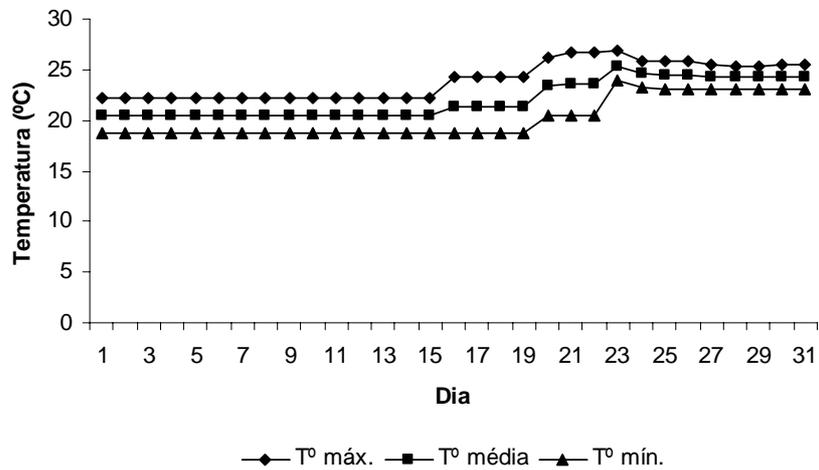


FIGURA 3B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no mês de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

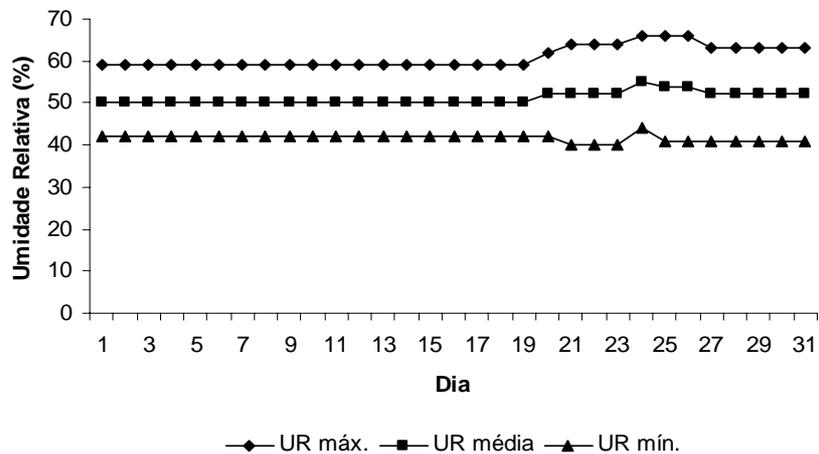


FIGURA 4B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no mês de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

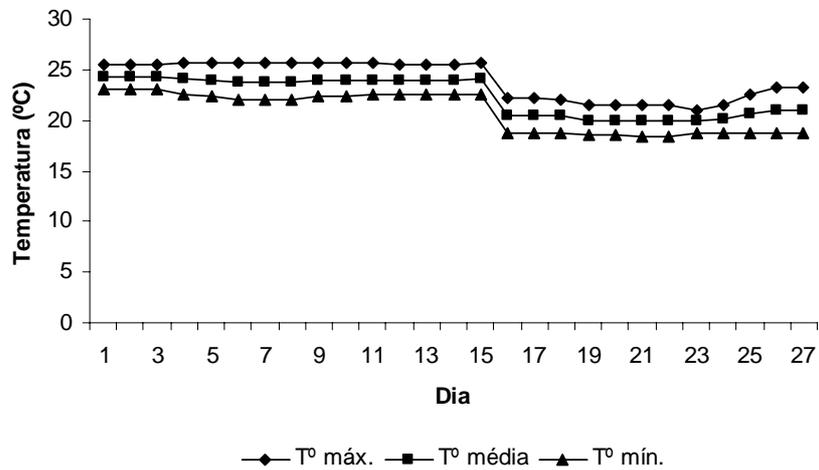


FIGURA 5B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 01 a 27 de fevereiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

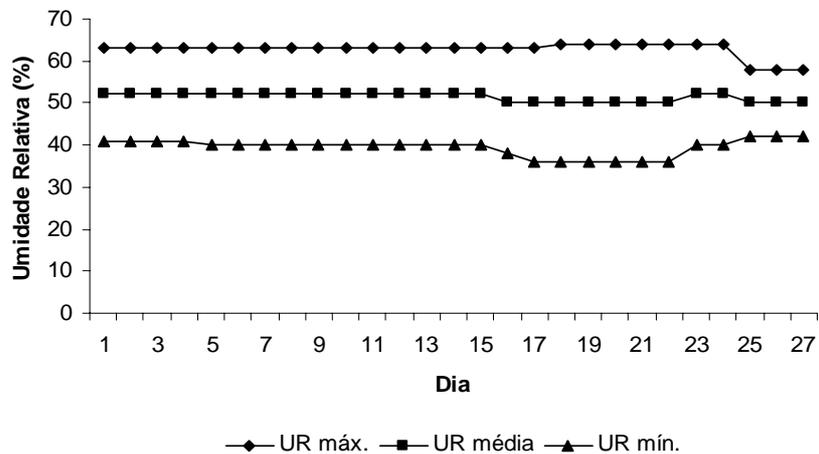


FIGURA 6B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 01 a 27 de fevereiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

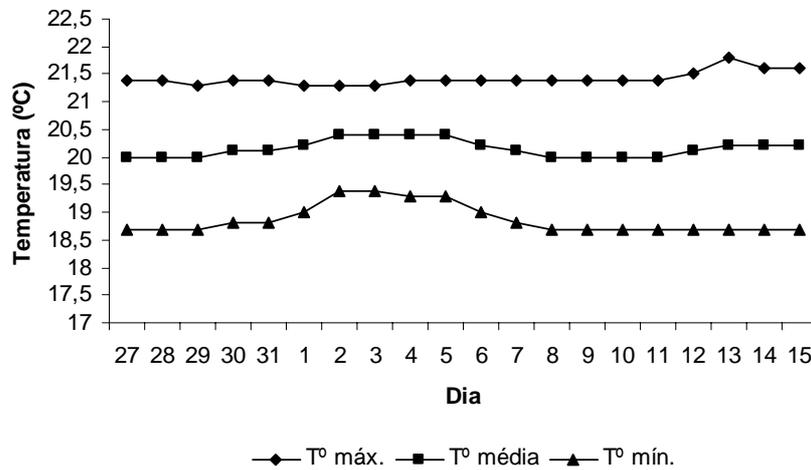


FIGURA 7B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

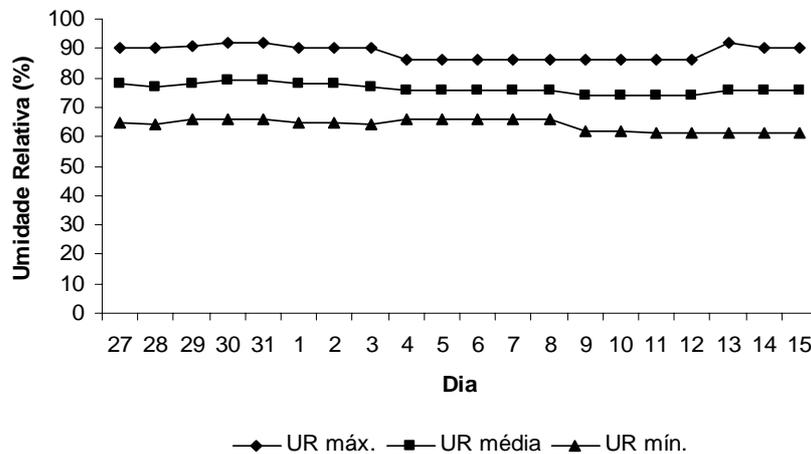


FIGURA 8B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

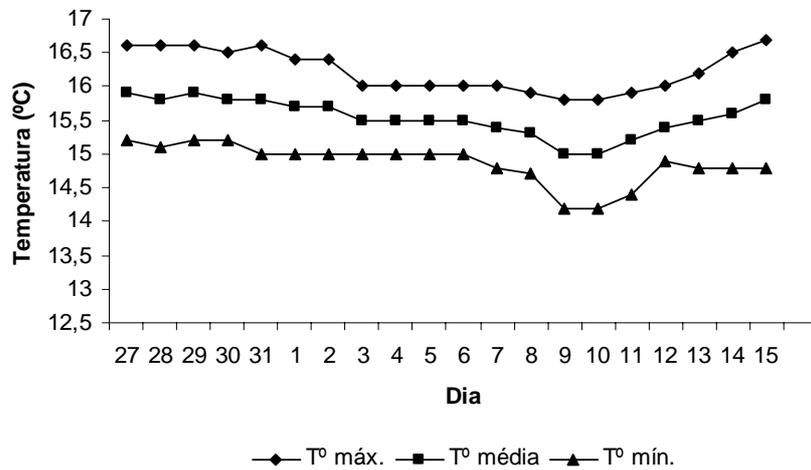


FIGURA 9B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($15 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

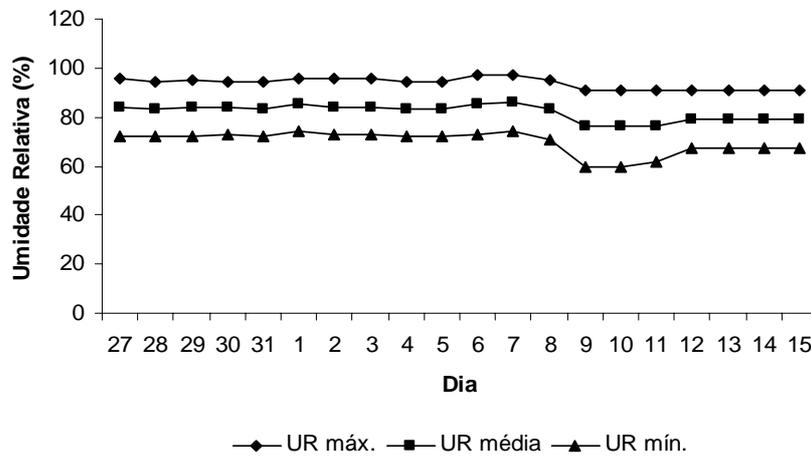


FIGURA 10B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na câmara de crescimento ($15 \pm 2^\circ\text{C}$) do Departamento de Fitopatologia, no período de 27 de dezembro/2006 a 15 de janeiro/2007. UFLA, Lavras, MG, 2007.

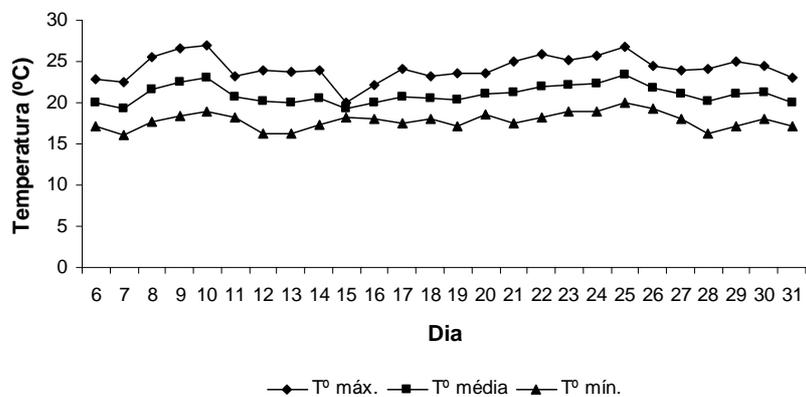


FIGURA 11B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 6 a 31 de março/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

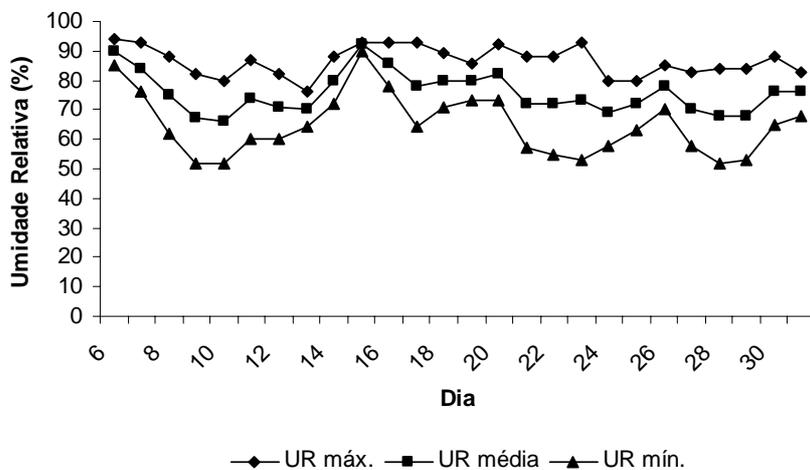


FIGURA 12B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 6 a 31 de março/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

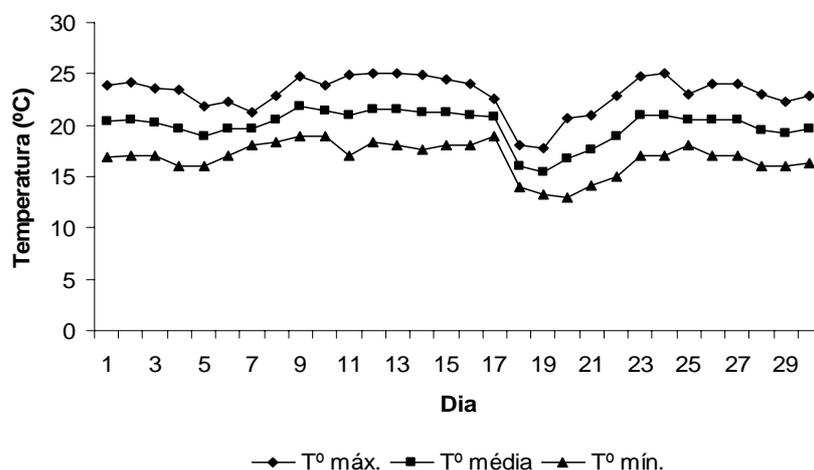


FIGURA 13B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de abril/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

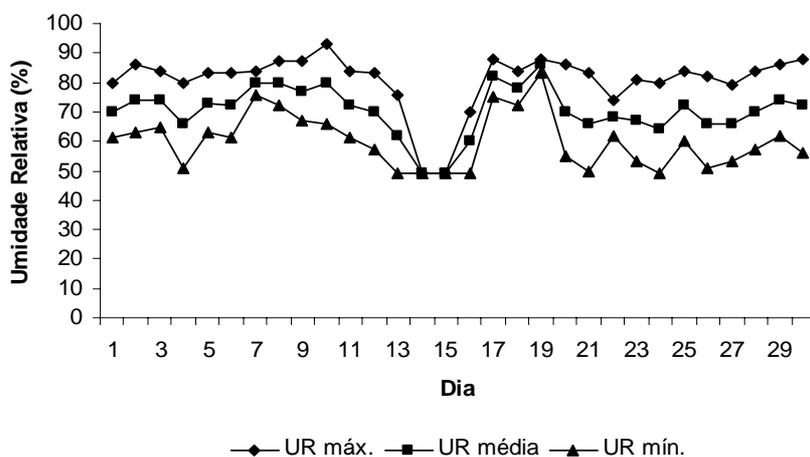


FIGURA 14B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de abril/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

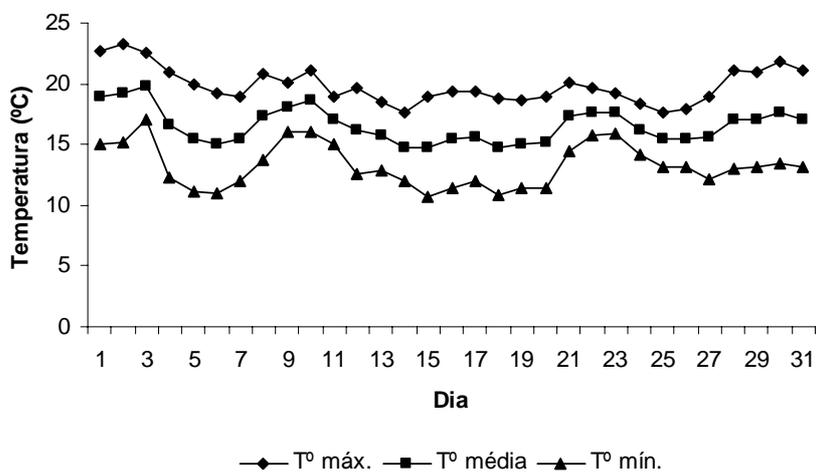


FIGURA 15B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de maio/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

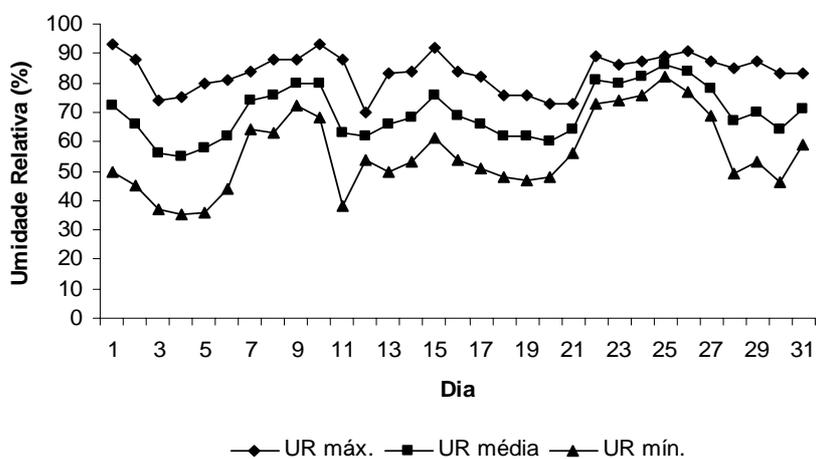


FIGURA 16B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de maio/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

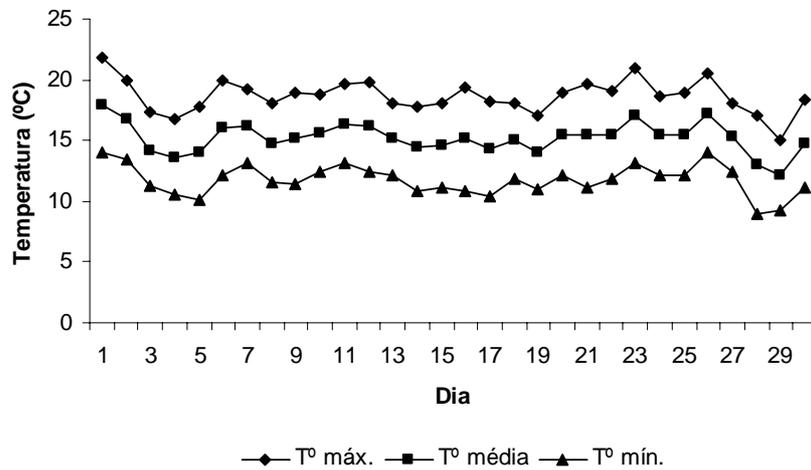


FIGURA 17B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de junho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

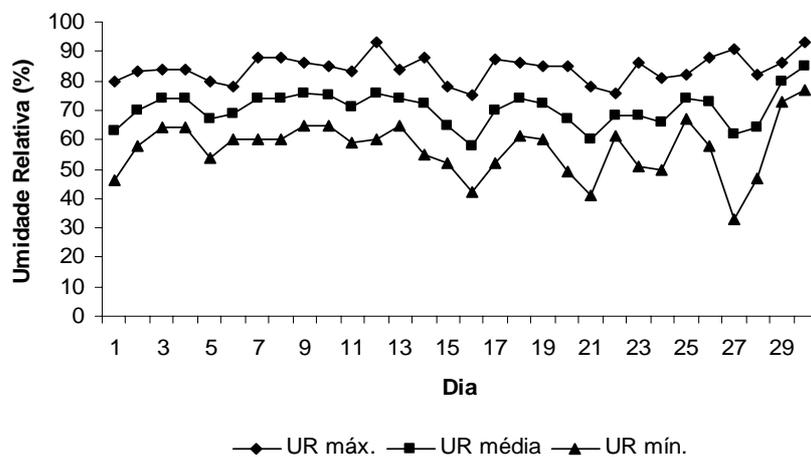


FIGURA 18B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de junho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

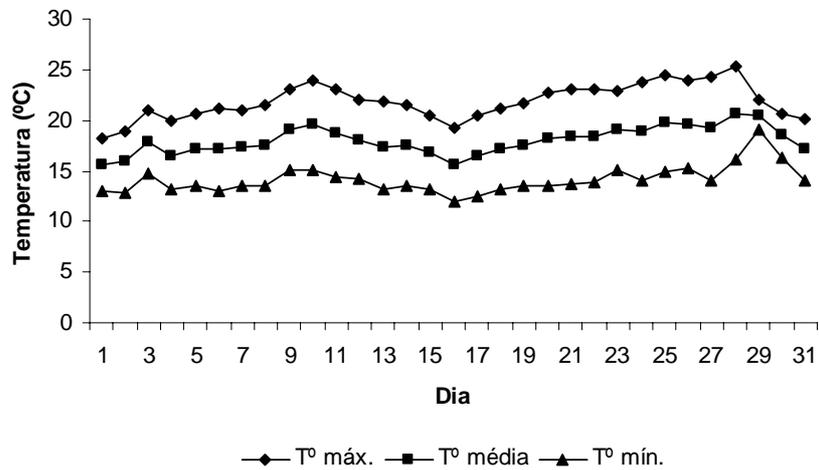


FIGURA 19B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de julho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

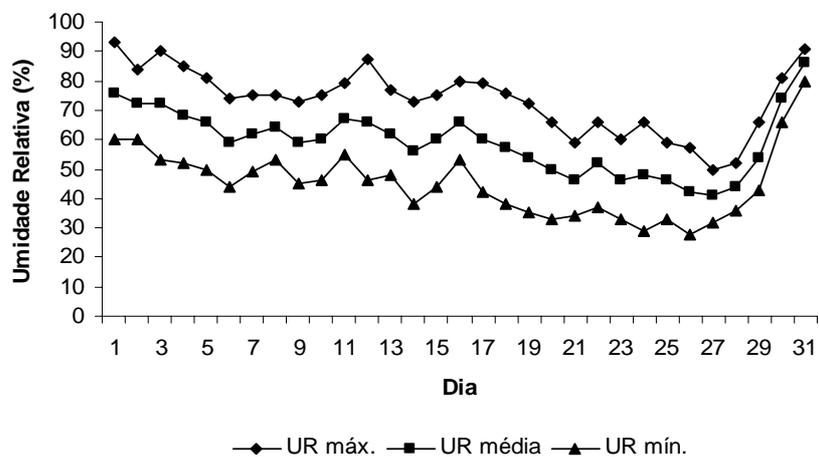


FIGURA 20B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de julho/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

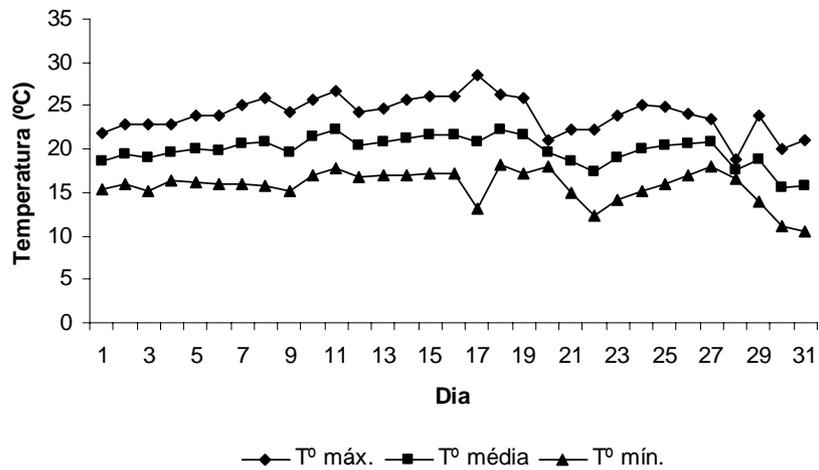


FIGURA 21B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de agosto/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

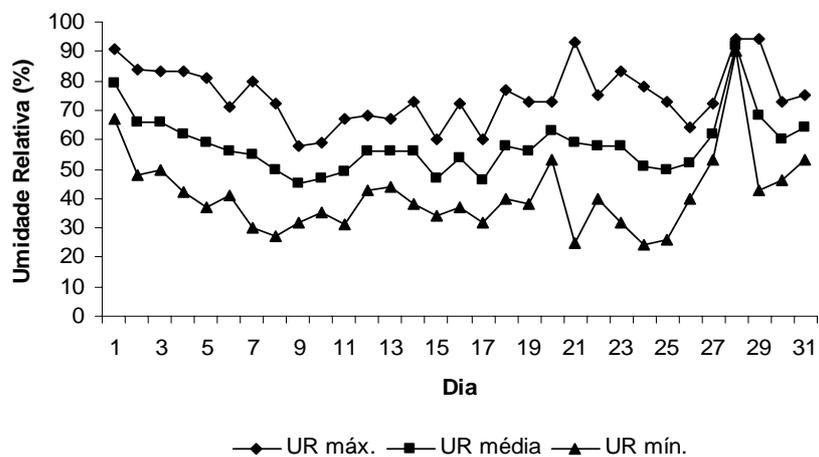


FIGURA 22B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no mês de agosto/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

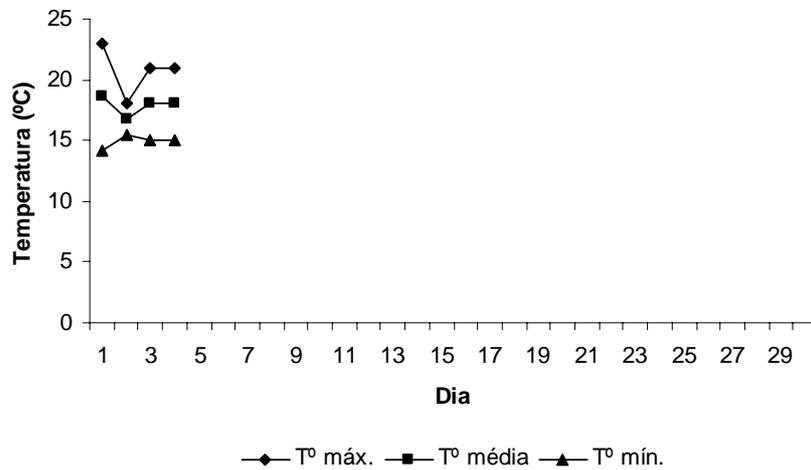


FIGURA 23B. Variáveis de temperatura (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 01 a 04 de setembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.

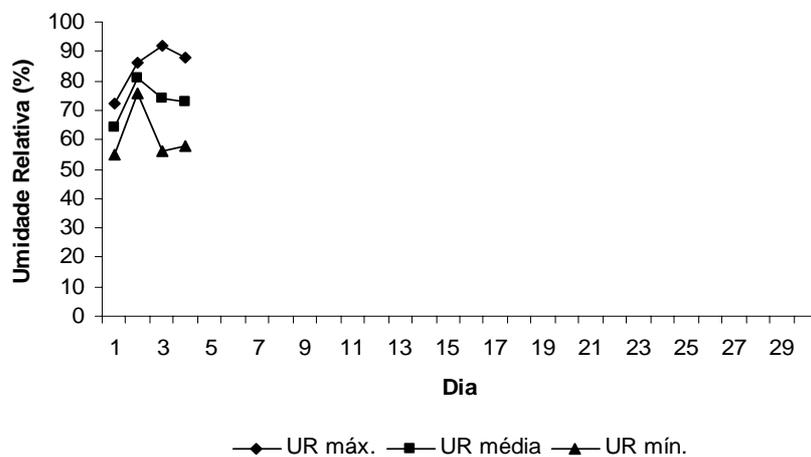


FIGURA 24B. Variáveis de umidade relativa (média, máxima e mínima), registradas na Unidade de Beneficiamento de Sementes do Departamento de Agricultura, no período de 01 a 04 de setembro/2006. UFLA, Lavras, MG, 2007.