



**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E INDUÇÃO
DE TÉLIA NO PATOSSISTEMA *Phakopsora*
pachyrhizi-SOJA**

PATRÍCIA FERREIRA CUNHA SOUSA

2005

59168
050435

PATRÍCIA FERREIRA CUNHA SOUSA

DESCARTADO

maileir
ASSINATURA

Data 16/08/17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
UFLA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E INDUÇÃO DE TÉLIA NO
PATOSSISTEMA *Phakopsora pachyrhizi*-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. Hilário Antônio de Castro

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

CLAS 633.303.025

REGISTRO 59168

DATA 31-08-17

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

Sousa, Patrícia Ferreira Cunha

Identificação molecular e indução de télia no patossistema *Phakopsora pachyrhiz* – soja / Patrícia Ferreira Cunha Sousa. -- Lavras : UFLA, 2005.
54 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Soja. 2. Doença fungica. 3. Télia. 4. Análise de PCR. 5. Incubação. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.349425

PATRÍCIA FERREIRA CUNHA SOUSA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E INDUÇÃO DE TÉLIA NO
PATOSSISTEMA *Phakopsora pachyrhiz* -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 4 de fevereiro de 2005

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA-MG

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA-MG

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG-MG



Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

“Há circunstâncias na vida em que a dignidade humana pode exigir grandes sacrifícios, isto é, heroísmo. Ninguém tem autoridade moral para exigir do outro um comportamento heróico. Cada um de nós tem essa obrigação, não porque outros lhe peçam ou censurem se não fizer, mas porque as próprias coisas lhe pedem, pede-o, sobretudo a dignidade humana. A história de todas as culturas está cheia de gestos exemplares deste tipo, fora do normal estatístico. Mas estas escolhas podem surgir na vida de todos os homens, em circunstancias normais”.

Juan Luis Lorda

Aos meus pais,

**Lúcia & Raimundo, pelo apoio e amor em todas as etapas de
minha vida.**

À minha querida irmã,

Letícia, pela força e amizade.

Aos meus avós maternos,

Filomena e Adão (*in memorian*)

Aos meus avós paternos,

Angelina (*in memorian*) e José (*in memorian*)

DEDICO

Ao meu namorado,

**Rogério Sebastião Batista Correa, pelo amor e incentivos na
minha vida.**

À família Batista Correa,

**(Alice, Álvaro, Alan Rodrigo e Lílian Roberta), pela
amizade e carinho.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida e a quem pude recorrer nos momentos de angústia.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, por me propiciarem a realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa de estudos.

Aos funcionários da Embrapa Soja e a Dra. Cláudia V. Godoy, pelo apoio e dedicação nos trabalhos de biologia molecular.

À EPAMIG Uberaba, na pessoa do Dr. Neylson Arantes, pelo apoio técnico e científico nas macrorregiões Triângulo e Alto Paranaíba.

Ao orientador Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro, pela logística e conselhos demonstrados durante o curso.

Ao co-orientador Prof. Dr. Eduardo Alves, pela disponibilidade e incentivos durante o mestrado.

Aos professores José da Cruz Machado, Ricardo Magela de Souza, Edson Pozza e Mário Lúcio, pela amizade, valiosas contribuições e pelos ensinamentos no decorrer deste curso.

Aos amigos de curso, Igor, Daniel, Elisandra, Juliana Campos e Pedro, pela amizade e convívio.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Ângela, Rute Emília, Edinho, Marli, Nice, Cidinha, Sidney, Eloísa Leite, Ana e Renata, pela amizade, convívio e ajuda.

Aos amigos da Pós-Graduação, Luciana Maria, Cássia, Jadir, Zuleide, Patrícia Baston, Carol, Fred, Josimar, Cristiano, José Mauro e Marcos Freitas, pelo convívio e amizade.

As queridas amigas, Simone Érika, Bel (Isabel), Tati (Tatiana), Renata, Mariney e Simone Asmar, pela força e as palavras certas nos momentos mais complicados da minha vida.

Aos queridos amigos do brejão, Douglas, José Pantaleão (Zé Pato), Elton (Pezão), Saulo (Cimental), Fernando, Maciel, Gilson, Plínio, Paulo Sussuca e Nicolau, pela interminável amizade.

Aos amigos Reinaldo (Bidu), João (Lafon), Júlio (Luneta), Cicero (Ceára) e Frederico (Fredão), Cláudio, Simone Aparecida, Dona Conceição e Galeno, pelos momentos de alegria e descontração.

Ao querido amigo Ildon Rodrigues do Nascimento, pela valiosa ajuda na correção e término deste trabalho.

À família Nakasone Ishida (Alessandra, Emilio, Ana Carolina e o “bebezinho”), pelas alegrias e incentivos.

Às amigas do estado do Paraná, Maria e Luciana Borgo, pelo apoio e alegrias nas horas mais difíceis desse trabalho.

A todos que estiveram presentes de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	
Aspectos gerais da ferrugem da soja.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A cultura da soja	4
2.2 Ferrugem da soja.....	5
2.2.1 Histórico e distribuição geográfica.....	5
2.2.2 Sintomatologia.....	7
2.2.3 Etiologia.....	7
2.2.4 Epidemiologia.....	8
2.3 Identificação molecular.....	9
2.4 Formação de télia.....	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 2	
Identificação molecular de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> agente causal da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 Coleta das amostras.....	25
2.2 Extração do DNA.....	26
2.3 Reação de PCR.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4 CONCLUSÕES.....	31

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPITULO 3	
Indução da formação de télia por <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em soja utilizando diferentes temperaturas.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Plantas testadas.....	39
2.2 Preparação e manutenção do inóculo.....	39
2.3 Inoculação e incubação.....	39
2.4 Preparação das amostras para o MEV.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4 CONCLUSÕES.....	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

RESUMO

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha. **Identificação molecular e indução de télia no patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-Soja**. Lavras: UFLA, 2005, 54p. Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).¹

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] hoje cultivada é muito diferente de seus ancestrais, que eram plantas rasteiras, originadas do leste Asiático. Com a extensão das áreas de cultivo dessa leguminosa, a ferrugem da soja tornou-se um sério problema a cultura. Essa doença é causada por duas espécies: *Phakopsora pachyrhizi*, a “Asiática” e *P. meibomiae*, a “Americana”. *P. pachyrhizi* é conhecida por reduzir drasticamente os rendimentos de produção e sua rápida expansão está causando perdas severas no campo, fazendo deste patógeno foliar o mais destrutivo dentre os que infectam a soja, com impacto na produção de soja no Brasil e no mundo. Devido à falta de informações precisas sobre as espécies causadoras de ferrugem da soja no Brasil e no estado de Minas Gerais, este trabalho teve como objetivo caracterizar urediniosporos de ferrugem da soja, em folhas coletadas nas regiões produtoras no estado de Minas Gerais por métodos moleculares e também estudar a indução de télia por este patógeno em diferentes temperaturas. A caracterização molecular feita por meio de PCR com os “primers” específicos Ppml/Ppa2 para *P. pachyrhizi* e Ppml/Pme2 para *P. meibomiae*, mostrou que todas as 86 amostras coletadas no estado de Minas Gerais foram da espécie *P. pachyrhizi*. Para a indução de télia foram usadas três diferentes câmaras de crescimento vegetal com temperaturas: de 10°C, 15°C e 20°C e duas cultivares de soja, Pintado e Uirapuru. As plantas foram inoculadas aos 30 dias após plantio e, após sete dias foram colocadas na câmara de crescimento vegetal com as temperaturas citadas. As leituras tiveram início após 15 dias da transferência das plantas para cada câmara. As observações foram feitas em microscópio estereoscópio a cada cinco dias e, para qualquer lesão suspeita, eram feitos cortes em micrótomo de mesa e analisados em microscópio de luz. Aos 25 dias após o início das leituras houve, o aparecimento de télia na câmara de crescimento a 15°C na cultivar Uirapuru, e aos 30 dias na cultivar Pintado, respectivamente, confirmada com cortes finos do material fresco e observação ao microscópio de luz com aumento de 400x e microscópio eletrônico de varredura. Observaram-se dois tipos de télias, tendo as arredondadas a elípticas com espessura média de 77µm e comprimento de 35,25µm, e camada apical de 1,42µm, predominaram na cultivar Uirapuru e as alongadas com espessura média de 127,33µm e comprimento de 41,33µm, e

¹ Comitê de Orientação: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).

camada apical de 1,9 μ m predominado na cultivar Pintado. O formato dos teliósporos também variou entre as cultivares, havendo predominância do formato mais clavado na cultivar Pintado, com medidas de 6,97 μ m de largura e 14,91 μ m de comprimento e um formato mais arredondado no cultivar Uirapuru com 7,02 μ m x 10,02 μ m de comprimento.

ABSTRACT

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha. **Molecular identification and telia induction in the patosystem *Phakopsora pachyrhiz* Soybean.** 2005. 54p. Dissertation (Master in Phytopathology - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil)¹

The soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crops currently cultivated present significant differences its ancestrals, originated in Asian east region. With the extension of cultivating areas of that leguminous the soybean rust became a serious problem to the farmers. That disease is caused by two species: *Phakopsora pachyrhizi*, the "Asian" and to *P. meibomiae*, the "American". *P. pachyrhizi* is known by reducing the production drastically and its fast expansion has been causing severe losses in the field, meaning that such pathogen is one of the most destructive to soybean with impact in the soybean production in Brazil and in the world. Due to the lack of information on the species causing soybean rust in Brazil and Minas Gerais State, this work had as objective to characterize soybean rust uredospores, in leaves collected in producing areas in the State of Minas Gerais by molecular methods also to study the induction of the telia by this pathogen on different temperatures. The molecular characterization done through PCR with the specific primers Ppm1/Ppa2 for *P. pachyrhizi* and Ppm1/Pme2 for *P. meibomiae*, showed that all the 86 samples collected in the State of Minas Gerais were of the species *P. pachyrhizi*. For the induction of the telia 3 different growth chambers with temperatures of 10°C, 15°C and 20°C and two cultivars of soybean, Pintado and Uirapuru were used. The plants were inoculated 30 days after sown and after 7 days of the inoculation they were placed in the growth chamber with the mentioned temperatures. The evaluations had beginning after 15 days transference for each camera, the observations were made in microscope stereoscope every five days, and for any lesion suspects it was made cuts in table microtome, and analyzed in light microscope. At 25 days after started the readings was observed telias in leaves from growth chamber with 15°C in the cultivar Uirapuru, and to the 30 days in cultivar Pintado, respectively. It was confirmed with fine cuts of the fresh material and observation to the light microscope with increase of 400x and scanning electron microscope two types of telia were observed, one round-elliptical with width of 77 µm and length of 35.25 µm and apical layer of 1.42 µm, on cultivar Uirapuru, the other type measuring 127.33 µm of width and 41.33 µm length with apical layer of 1.9 µm

¹ Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor); Eduardo Alves – UFLA (Co-adviser).

of the cultivar Pintado. The shape of the teliospore also varied among the cultivars, in the cultivar Pintado clave shape spores were more frequent measuring 6.97 μm of width and 14.91 μm of length. In the cultivar Uirapuru teliospores were rounder with size 7.02 μm x 10.02 μm of length.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DA FERRUGEM DA SOJA

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil, na safra 2003/04, foi o segundo produtor mundial de soja sendo responsável por 25% das 200 milhões de toneladas produzidas. Minas Gerais ocupa a 7ª posição entre os estados produtores, sendo o Triângulo e o Noroeste mineiros as regiões com maiores produções. Porém, a cultura vem se expandindo por todas as regiões do estado. Da safra 2002/03 para a safra 2003/04, a área plantada em Minas Gerais aumentou de 810 para 861 mil hectares e a produção cresceu de 2,3 para 2,4 milhões de toneladas (Agrianual, 2004). Com o expressivo aumento da área plantada, as doenças de distintas origens bióticas e abióticas tornaram-se um sério entrave à produção. Assim, dentre as doenças de final de ciclo que afetam a soja, a ferrugem vem se destacando nos últimos anos no país, devido ao seu alto potencial em causar danos à cultura (Andrade & Araripe-Andrade, 2002).

Estima-se que mais de 70% da área de soja do Brasil tenham sido atingidas pela ferrugem na safra 2003/04, resultando em perdas de 4,6 milhões de toneladas, equivalente a US\$ 1,22 bilhão. Nesta safra houve expressiva quantidade de inóculo nas áreas devido à alta severidade da doença na safra anterior, com presença contínua de inóculo no ar. Os primeiros relatos da doença em Minas Gerais na safra 2003/04 foram em Conceição das Alagoas e Planura, no início de dezembro de 2003 (Yorinori & Lazzarotto, 2004).

A ferrugem da soja é um problema para os agricultores desde o início do século XX. O fungo foi disseminado do Japão para Austrália, Índia, China, África, Caribe, Porto Rico, Havaí e América do Sul (Bromfield, 1984). Em países onde a ferrugem da soja é problema estabelecido, as perdas variam de 10% a 80%. A intensidade das perdas depende da suscetibilidade da variedade utilizada, estágio de crescimento no qual a ferrugem foi estabelecida e condições

climáticas durante a estação de crescimento da cultura (Yang et al., 1991). Esta doença é causada por duas espécies do gênero *Phakopsora*: a primeira *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, causadora da ferrugem “Americana”, por ser nativa do continente americano, ocorre em leguminosas silvestres e cultivadas, desde Porto Rico até o sul do estado do Paraná. É um fungo restrito a áreas de clima mais ameno e raramente causa danos econômicos. Já a segunda, *P. pachyrhizi* Sydow & Sydow, causadora da ferrugem “Asiática” ou “Australiana”, mais agressiva, está presente na maioria dos países que cultivam a soja e, a partir da safra de 2000/01, vem causando danos também no Brasil. *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, causam sintomas idênticos nos estádios iniciais da infecção, sendo muito difícil a separação pela sintomatologia em condições de campo e pela morfologia dos uredinósporos. Por isso, a identificação correta e rápida das espécies que ocorrem em cada região torna-se um fator importante para o estabelecimento de um programa de controle adequado.

Assim, uma das formas de identificação mais precisa das ferrugens é por meio do estudo da morfologia da télia e dos teliosporos. Porém, no caso da ferrugem da soja, a ocorrência de télia no campo é rara. Ela somente seria possível em temperaturas inferiores a 25°C, pois nenhum trabalho de indução realizado até hoje relatou a produção de télia em temperaturas superiores, sendo temperaturas acima desta mais comuns na maioria das regiões produtoras de soja no Brasil (Dufresne et al., 1987).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivos identificar por meio de análise de PCR, a espécie ou as espécies de ferrugem da soja presente nos campos de produção no estado de Minas Gerais, testar a eficácia da técnica na distinção das espécies causadoras de ferrugem da soja e determinar a temperatura e o período em câmaras climatizadas necessários para a formação de télia nas cultivares de soja Uirapuru e Pintado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da soja

A soja vem ocupando posição de destaque na expansão da agricultura ocidental (Miyasaka & Medina, 1981), com a produção mundial concentrada apenas em três países: EUA, Brasil e Argentina, que respondem por 80% da produção e 90% da comercialização mundial (Arantes & Souza, 1993). Apesar dos inúmeros problemas com o clima, pragas e doenças, o crescimento segue com novas áreas de cultivo a cada dia em todos os continentes.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é conhecida pelo homem há mais de 5.000 anos, porém, somente foi domesticada a partir do século XI a.C., no Norte da China. O seu centro de origem, de acordo com Vavilov (1951), está localizado entre as regiões Central e Oeste da China, evoluindo da espécie *Glycine soja* por acúmulo de características quantitativas e qualitativas resultantes de mutações genéticas (Hymowitz, 1970). Desde então, permaneceu no Oriente pelos dois milênios seguintes, fato atribuído à agricultura e economia chinesa serem muito fechadas. A cultura foi difundida com o crescimento do comércio e seu cultivo então se desenvolveu em direção ao Sul da China, Coréia, Japão e Sudeste da Ásia (Miyasaka & Medina, 1981). Sua dispersão pelo ocidente iniciou-se pela Europa, local onde o cientista alemão Englebert Kaempher, em 1712 vindo do Japão, trouxe as primeiras sementes. Naquele continente, a soja foi cultivada na Áustria, Polônia, Suíça, Holanda, Inglaterra, França e Itália (Piper & Morse, 1923).

Na América do Norte, o primeiro relato sobre o cultivo de soja foi em 1804, no estado americano da Pensilvânia, como forrageira, depois foi introduzida no estado de Massachusetts. Até 1916, os Estados Unidos ainda eram importadores de soja da Manchúria, porém, em 1931 a produção norte-

americana já era de 400 mil toneladas e, a partir de 1941, a área de produção para grãos superou o cultivo como forrageira (Probust & Judd, 1973).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, na Bahia, por Gustavo Dutra. Os imigrantes japoneses trouxera-na soja para São Paulo em 1908 e um professor gaúcho, Craig, introduziu-a oficialmente em 1914 no Rio Grande do Sul (Embrapa, 1974). A partir de 1946, tiveram início os trabalhos de melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares, o que propiciou, a partir de 1970, a expansão de novas fronteiras agrícolas para o cultivo da soja nos estados de: Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Maranhão, Piauí, Tocantins, Pará, Rondônia e Roraima. Na Argentina, a cultura da soja teve início em 1957, com variedades norte-americanas. No Paraguai, foi em 1946, com a introdução de linhagens do Uruguai (Porter, 1947).

A cultura da soja foi recentemente explorada, porém, sua difusão por Minas Gerais é antiga. De acordo com Humnicutt (1930), a soja já era estudada e pesquisada em Lavras-MG, antes de 1930. A divulgação da cultura da soja foi intensificada a partir de 1940; mesmo assim, até 1970 a produção era baixa, em torno de 70 a 500 toneladas por ano.

A expansão da soja em Minas Gerais iniciou-se na região do Triângulo Mineiro, nas cidades de Capinópolis em 1966 e Uberaba, em 1967. Assim, a partir de 1972, a soja se expandiu para as regiões do Alto Paranaíba e Noroeste. Atualmente, estima-se que 62% da área agrícola no Triângulo Mineiro, 25% no Noroeste e 13% no Alto Paranaíba sejam cultivadas com soja (IBGE, 2004).

2.2 Ferrugem da soja

2.2.1 Histórico e distribuição geográfica

O primeiro relato da ferrugem da soja foi no Japão, em 1902. Em 1934, o patógeno foi encontrado em vários outros países asiáticos e depois mais ao sul, como na Austrália (Bromfield & Hartwig, 1980). Na Índia, a ferrugem da soja

foi relatada em 1951, entretanto já havia sido relatada em outras espécies de *leguminosae* (Sharma & Mehta, 1996). Houve vários relatos da ferrugem da soja na África Equatorial (Javaid & Ashraf, 1978), mas o primeiro relato confirmado de *P. pachyrhizi* no continente Africano foi em 1996, nos países do Quênia, Ruanda e Uganda. Desde então, o patógeno foi disseminado no sul com ocorrências na Zâmbia e Zimbábue, em 1998, Moçambique, em 2000 e África do Sul, em 2001 (Levy et al., 2002). A doença foi observada também no Havai, em 1994, em soja cultivada nas ilhas de Oahu, Kakaha, Kauai e Hilo (Killgore & Heu, 1994).

Na América do Sul, o primeiro relato desta doença foi no Brasil em 1979, descrita por Deslandes, infectando soja e outras leguminosas (*Lab lab purpureus*, *Phaseolus lunatus* e *Glycine wightii*) em Lavras-Minas Gerais. Porém, a primeira epidemia de *P. pachyrhizi* ocorreu somente em fevereiro de 2001 no Paraguai. A doença foi encontrada em 2001, em plantas de soja, nas áreas limítrofes entre Brasil e Paraguai. Em 2002, a ferrugem da soja foi difundida ao longo do Paraguai e algumas áreas do Brasil, com relatos de severos danos da doença em alguns campos em ambos os países (Morel & Yorinori, 2002). Neste mesmo ano, o patógeno também foi encontrado numa área ao norte da Argentina (Rossi, 2003). Durante a safra de 2003, o patógeno foi detectado na maioria das regiões produtoras de soja do Brasil com perdas de 3,4 milhões de toneladas (Yorinori & Lazzarotto, 2004). No Paraguai, as perdas de produção foram menores devido às condições secas, enquanto na Argentina a doença não foi disseminada às principais áreas de produção. Os Estados Unidos eram, até a safra 2003/04, o único país produtor no mundo onde a ferrugem da soja não havia sido detectada (Morel & Yorinori, 2002), porém, nesta safra 2004/05, a ferrugem foi relatada no Estado de Louisiana (APHIS, 2004).

2.2.2 Sintomatologia

O sintoma mais comum de ferrugem da soja são pústulas variando de cor cinza-verde a bronzeado, marrom-escuro, marrom-avermelhado. As pústulas tendem a ser de forma angular, por serem retidas pelas nervuras e são mais evidentes na superfície abaxial das folhas (Yorinori, 1982).

Inicialmente, as pústulas são pequenas, principalmente na superfície abaxial das folhas (Yorinori, 1982). Nesta fase, a ferrugem da soja poderia ser confundida com doenças de origem bacteriana, mas, quando as pústulas ferruginosas amadurecem, começam a produzir grande número de esporos pulverulentos não observados em bacterioses (Sinclair & Backman, 1989).

As pústulas de ferrugem são mais comuns no lado inferior das folhas, mas também podem desenvolver em pecíolos, vagens e talos. As folhas podem amarelar, cair prematuramente e, devido à redução na área fotossintética nas plantas, pode ocorrer redução no número de vagens e peso das sementes (Bromfield, 1984).

Os sintomas mais comuns da ferrugem “Asiática” são pústulas de coloração palha (tipo TAN) a marrom-escuro ou marrom-avermelhada (tipo RB) e manchas com urédias que liberam os urediniosporos (Andrade & Araripe-Andrade, 2002).

2.2.3 Etiologia

A ferrugem da soja tem como agentes etiológicos duas espécies do gênero *Phakopsora*, *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, pertencentes ao Filo Basidiomycota, Ordem Uredinales e Família Phakopsoraceae. Sobrevivem durante o inverno sob condições desfavoráveis em hospedeiros alternativos, podendo persistir nestes hospedeiros ao longo do ano, tomando-se importantes fontes de inóculo primário (Hartman et al., 1992).

O gênero *Phakopsora* infeta mais de 95 espécies de plantas de mais de 42 gêneros (Bromfield, 1984), sendo, além da soja, outras espécies do gênero *Glycine* (Ono et al., 1992; Rytter et al., 1984; Vakili, 1979). Burdon & Marshall (1981) e Burdon & Speer (1984) incluíram na lista muitos legumes selvagens e comestíveis, dentre eles *Cajanus cajan*, *Crotalaria* sp., *Desmodium* sp., *Lablab purpureum*, *Glycine wightii*, *Phaseolus lunatus*, *P. vulgaris* e *Vigna unguiculata*, que podem ser usados para estudos de infecção e ciclo do patógeno, de acordo com Ono et al. (1992). Ambas as espécies de ferrugem da soja possuem enorme gama de hospedeiros, sendo o Kudzu (*Pueraria lobata*) leguminosa difundida amplamente nos Estados Unidos, o qual poderia servir como fonte de inóculo ou hospedeiro secundário para *P. pachyrhizi* no sul daquele país. No Brasil, nesta safra 2004/05, a ferrugem “Asiática” da soja foi identificada no Kudzu, no município de Palmeira, PR (Embrapa, 2004).

O alcance da gama de hospedeiros das duas espécies causadoras da ferrugem da soja é incomum entre patógenos de ferrugem, pois a maioria das espécies de ferrugem possui gama de hospedeiros restrita a algumas espécies de plantas. O grande número de espécies de hospedeiros aumenta a probabilidade deste patógeno sobreviver durante o inverno no sul dos Estados Unidos, como também na América Central e do Sul (Joann et al., 1984). No Brasil ainda não se conhece a gama de hospedeiro deste fungo.

2.2.4 Epidemiologia

As espécies de *Phakopsora* infectam mais de 90 espécies de plantas da família *leguminosae*. Os estádios uredinal e telial ocorrem em soja e outras espécies de leguminosas (Marchetti et al., 1975). Assim, de acordo com Kitani & Inoue (1960), citados por Marchetti et al. (1975), os urediniosporos de *P. pachyrhizi* germinam entre temperaturas de 8°C a 32°C, com o ótimo de 25°C, 3 horas após incubação, aumentando entre 6 e 12 horas (McLean & Byth, 1981).

A penetração ocorre após 6 horas a 24°C, porém, estes autores utilizando a mesma temperatura observaram que entre, 3 e 6 horas, não ocorreu penetração, mas, entre 6 e 48 horas, a percentagem de penetração aumentou, sendo máxima após 35 horas.

A disseminação do fungo ocorre por meio da fase uredinal, a qual determina a fase de epidemia no campo. Os urediniósporos podem sobreviver numa ampla faixa de temperatura, conforme demonstrado no experimento realizado por Kochman (1979), no qual amostras de urediniósporos secos foram expostas em oito temperaturas diferentes por 8 horas, com posterior teste de germinação em ágar-água. Este autor concluiu-se que a melhor temperatura para sua sobrevivência foi 21°C, por 4 a 16 horas, ocorrendo drástica redução na germinação quando expostos a temperaturas entre 28°C e 42°C.

Os fatores mais importantes que favorecem a infecção são temperaturas de 15°C a 28°C, umidade relativa de 75% a 80%, com precipitação e períodos longos de umidade da folha. A umidade é essencial, por isso há a exigência da presença de água na fase líquida para germinação e desenvolvimento dos urediniósporos. A névoa com orvalho proporciona essas condições satisfatórias para infecção (Kochman, 1979).

Ao contrário da maioria dos fungos causadores de ferrugens que penetram por aberturas naturais, como estômatos, os urediniósporos da ferrugem da soja podem penetrar também diretamente pela cutícula da folha, epiderme e, principalmente, nas junções entre as células (Zambenedetti, 2005), aumentando, assim, a rapidez da infecção. O período latente é de aproximadamente 9 a 10 dias (Koch et al., 1983).

2.3 Identificação molecular

A detecção de patógenos fúngicos biotróficos e específicos, como a ferrugem, por métodos convencionais, inclui a identificação por meio de

microscópio e teste de inoculação em diferentes espécies hospedeiras ou cultivares. Este processo é trabalhoso e demorado e além disso, depende de padrões subjetivos para características morfológicas de fungos. A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi desenvolvida no início dos anos 80 do século passado (Henson & French 1993; Martin et al, 2000). Baseados nesta técnica foram desenvolvidos “primers” específicos e altamente sensíveis para a detecção e diagnose das espécies do gênero *Phakopsora* (Frederick et al, 2002). Este método revela a presença de sucessões de DNA na amostra e, assim, detectam e diferenciam as espécies de fungos. Em adição, para a detecção de patógenos fúngicos, a partir de marcadores moleculares como polimorfismo de DNA ao acaso (RAPD) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), foram desenvolvidos *fingerprinting* (impressão digital) de DNA para monitorar a estrutura genética de populações dos patógenos fúngicos.

O DNA ribossomal apresenta um *cluster* gênico dividido nos genes 18S, 5.8S e 28S, separados pelas regiões ITS1 e ITS2, as quais são transcritas dando origem ao RNA ribossômico (RNAr). O *cluster* gênico que codifica para RNAr existe em centenas de cópias no genoma fúngico. Este *cluster* gênico apresenta grandes contrastes, regiões conservadas e outras altamente variáveis, mostrando-se eficiente para estudos da filogenia, bem como a detecção molecular de fungos (Lee & Taylor, 1992; Matsumoto et al., 1999). A região 18S é mais conservada e, por isso, utilizada para a comparação de organismos distantemente relacionados. A região 28S é mais variável, adequada para comparação de diferentes gêneros e espécies; já a região 5,8S, entre as regiões ITS 1 e 2, é a que mais evolui, por isso é apropriada para diferenciar espécies relacionadas (Fungaro, 2000) (Figura 1).

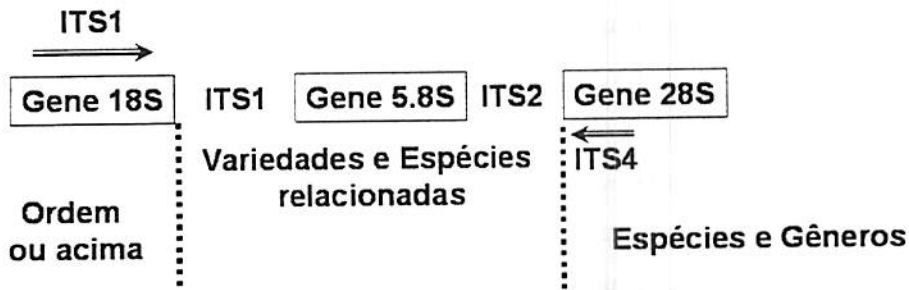


FIGURA 1. Estrutura do *cluster* gênico que codifica RNA ribossômico. Fonte: Fungaro (2000)

Devido ao “primer” ITS universal projetado por White et al. (1990), sucessões ITS de uma ampla variedade de fungos encontram-se disponíveis num banco de dados. O alinhamento das sucessões ITS promove informações com respeito à variação de sucessão interespecíficas e “primers” específicos que puderam ser projetados adequadamente. Os “primers” ribossomais derivados da região ITS foram extensivamente usados em PCR para a detecção de patógenos fúngicos, incluindo *Phytophthora infestans* (Tooley et al., 1997; Jyan, 2002), *P. lateralis* (Winton & Hanson, 2001), *Ustilago esculenta* (Chen & Tzeng, 1999) e a diferenciação dos agentes da ferrugem da soja *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* (Frederick et al., 2002).

2.4 Formação de télia

As espécies causadoras de ferrugem da soja podem ser diferenciadas pela morfologia da télia e teliósporos. Assim, segundo Ono et al. (1992), a caracterização morfológica por meio da télia produzida pelas espécies é feita pelas seguintes características: télia com 1 a 4, raramente cinco, camadas de teliósporos com parede cor de canela a castanho-claro, espessura de 1,5 a 2,0 μm , mas com células da camada apical com até 6 μm nos esporos superiores;

esporos anamorfos (urediniósporos) com 16 a 31 por 12 a 24 μm , poros germinativos de 6 a 8, às vezes 10, dispersos na zona equatorial e às vezes abaixo desta, é referente a *P. meibomiae*. Télia com 2 a 7 camadas de esporos, parede cor pálida, marrom-amarelada a descolorada, aproximadamente 1 μm de espessura, levemente espessada (-3 μm) apicalmente nos esporos superiores; esporos anamorfos (urediniósporos) com 18 a 34 por 15 a 24 μm , poros germinativos de 4 a 6, às vezes 10, mais ou menos dispersos na zona equatorial, indicam a espécie *P. pachyrhizi*.

Na maioria das ferrugens da ordem Uredinales, as télias são produzidas em resposta às condições ambientais desfavoráveis para a continuação vegetativa dos fungos (Crane & Hiratsuka, 2000). Mendgen (1984), citado por Crane e Hiratsuka (2000), relata que a parede espessa dos teliósporos permite a sobrevivência do fungo em condições adversas. Desse modo, o estágio telial das ferrugens é o critério mais importante usado na taxonomia (Cummins, 1978, citado por Yeh et al., 1982). A maioria das descrições de *P. pachyrhizi* leva em consideração o estágio uredinal, pois é o estágio mais comum nos seus hospedeiros, sendo um critério muito similar entre as espécies. Isto ocasionou confusão na taxonomia com mais de doze sinônimas. Somente Sydow & Sydow (1914) e Arthur (1917) descreveram as télias e os teliósporos de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, respectivamente. O primeiro relato da formação de teliósporos em ferrugens foi feito por Waters (1928) e, em *P. pachyrhizi*, por Hsu e Wu (1968), citados por Yeh et al. (1982), em soja incubada a 15°C, 36 dias após inoculação.

Assim, Yeh et al. (1981), estudando o efeito da temperatura na formação dos teliósporos, observaram a formação de télia 25 dias após a inoculação em três diferentes cultivares e 28 dias após a inoculação na PI-230971 e TK-5. As plantas foram mantidas por 20 dias em câmara de crescimento a 22°C. Folhas destacadas de plantas crescidas em câmara de crescimento por 10 dias após a

inoculação foram incubadas por 14 dias a 10°C e 15°C. Nas folhas inoculadas no momento da incubação não houve sintomas a 10°C e as urédias apareceram aos 45 dias após a inoculação a 20 e 25°C. Entretanto, télias foram observadas aos 38 dias após inoculação a 15°C e aos 20 dias após a inoculação a 20°C.

A ocorrência de télia no campo somente seria possível em temperaturas inferiores a 25°C, pois nenhum trabalho de indução realizado até hoje relatou a produção de télia em temperaturas superiores, fato mais comum na maioria das regiões produtoras de soja no Brasil (Dufresne et al., 1987).

Saksirirat & Hoppe (1991) relataram que a produção de télia por *P. pachyrhizi* pode ser induzida pela regulação da temperatura, baseados no experimento de Poolpol & Pupipat (1985) na Tailândia, os quais obtiveram sucesso na indução de télia em soja e 23 outras espécies de leguminosas à temperatura de 17°C noturna e variação de 20°C a 22°C diurna.

A télia constitui uma forma de resistência das ferrugens. Martinelli et al. (1995) comentam esta característica para a ferrugem da folha da aveia, os quais por meio de indução precoce da télia, restringiu quantitativamente a evolução dessa ferrugem no campo, devido ao retardamento do desenvolvimento da doença, consequência da fase de sobrevivência atribuída a télia, fato ainda não relatado no Brasil. Entretanto, para *P. pachyrhizi*, esta forma de sobrevivência parece não ter importância para a infecção primária como constatado por Tan YuJun et al. (2001), na China. Porém, pode ser útil para a geração de variabilidade no patógeno, devido à ocorrência da reprodução sexuada, o que é de extrema importância para os programas de melhoramento genético. Martinelli et al. (1995) relatam a importância da fase de télia na geração de novas raças de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* e outras ferrugens

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 546 p.

ANDRADE, P. J. M.; ARARIPE-ANDRADE, D. F. A. Ferrugem Asiática: uma ameaça a Sojicultura brasileira. Embrapa Agropecuária Oeste, 2002. 11 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica; n. 11).

APHIS-Factsheet Louisiana Soybean Rust Detection. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fcsheet_faq_notice/faq_phalasoysbeanrust.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2004.

ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. Cultura da soja nos cerrados: anais Piracicaba: POTAFOS, 1993. 535 p.

ARTHUR, J. C. Uredinales of Puerto Rico based on collections made by H. H. Whetzel. *Mycologia*, New York, v. 9, n. 1, p. 55-104, 1917.

BROMFIELD, K. R. Soybean rust. St. Paul: American Phytopathological Society, 1984. (Monograph, n. 11)

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, Madison, v. 20, n. 2, p. 254-255, Mar./Apr. 1980.

BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. Inter- and intra-specific diversity in the disease-response of *Glycine* species to the leaf-rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Ecology*, Oxford, v. 69, n. 2, p. 381-390, 1981.

BURDON, J. J.; SPEER, S. S. A set of differential *Glycine* hosts for the identification of pathotypes of *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Euphytica*, Wageningen, v. 33, n. 3, p. 891-896, Nov. 1984.

CHEN, R. S.; TZENG, D. D. S. PCR-mediated detection of *Ustilago esculenta* in water oat (*Zizania latifolia*) by ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Plant Pathology Bulletin*, v. 8, p. 149-151, 1999. Identification of races of *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Euphytica* 33:891-896.

CRANE, P. E.; HIRATSUKA, Y. Evidence for environmental determination of uredinia and telia production in *Chrysomyxa pirolata* (inland spruce cone rust). *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 78, n. 5, p. 660-667, May 2000.

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.

DUFRESNE, L. A.; BEAN, G. A.; BONDE, M. R.; GOTH, R. W. Effects of temperature and light intensity on telia development by Puerto Rico and Taiwan isolates of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust fungi. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n. 7, p. 629-631, July 1987.

EMBRAPA SOJA-Sistema de Alerta. Disponível em:
<http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/mostra_alerta.php?pagina=57>. Acesso em: 22 out. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Anteprojeto de Implantação do Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Brasília, DF, 1974. 113 p.

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

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Uberlândia, MG, Ano III, n. 14, p. 12-16, Mai/Jun. 2000.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; HYMOWITZ, T. Sources of resistance to soybean rust in perennial *Glycine* species. *Plant Disease*, St. Paul, v. 4, n. 4, p. 396-399, Apr. 1992.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HUNNICUTT, B. H. Feijão Soja. *Boletim de Agricultura, Zootecnia e Veterinária*, Belo Horizonte, v. 3, n. 9/12, p. 41-46, 1930.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, Bronx, v. 24, p. 408-421, 1970.

INSTITUTO BRASILEIRA DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE.
Levantamento sistemático da produção agrícola-safra 2004. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em:
10 nov. 2004.

JAVAID, I.; ASHRAF, M. Some observations on soybean diseases in Zambia and occurrence of *Pyrenochaeta-Glycines* on certain varieties. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 62, n. 1, p. 46-47, Jan. 1978.

JOANN, L. R.; DOWLE, W. M.; BROMFIELD, K. R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, v. 68, n. 9, p. 818-819, Sept. 1984.

JYAN, M. H. Variation and migration of Taiwanese *Phytophthora infestans* populations. 2002. Thesis (Master) - National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

KILLGORE, E.; HEU, R. First report of soybean rust in Hawaii. **Plant Diseases**, St. Paul, v. 78, n. 12, p. 1216, Dec. 1994.

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

KOCHMAN, J. K. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 30, n. 2, p. 273-277, 1979.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of fungus-like protocistan *Phytophthora* spp., inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology Evolution**, Lawrence, v. 9, n. 4, p. 636-653, July 1992.

LEVY, C.; TECHAGWA, J. S.; TATTERSFIELD, J. R. The status of soybean rust in Zimbabwe and South Africa. In: **BRAZILIAN SOYBEAN CONGRESS**, 2002, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. Paper read... Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 2002.

MARCHETTI, M. A.; UECKER, F. A.; BROMFIELD, K. R. Uredinal Development of *Phakopsora pachyrhizi* in Soybeans. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, n. 7, p. 822-823, July 1975.

MARTIN, R. R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 38, p. 207-239, 2000.

MARTINELLI, J. A.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Indução precoce de telia- outra forma de resistência à ferrugem da folha da aveia presente no Brasil. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v. 21, n. 3/4, p. 257-258, 1995.

MATSUMOTO, C.; KAGEYAMA, K.; SUGA, H.; HYAKUMACHI, M. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5. 8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience*, Tokyo, v. 40, p. 321-331, 1999.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Histological Studies of Pre-penetration Development and Penetration of Soybeans by Rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 32, n. 3, p. 435-443, 1981.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). *A soja no Brasil*. Campinas: ITAL, 1981. 1062 p.

MOREL, W.; YORINORI, J. T. Situacion de la roya de la soja en el Paraguay. Capitan Miranda, Paraguay: Ministerio de Agricultura y Granaderia, Centro Regional de Investigacion Agricola, 2002. (Boletim de Diulgacion, n. 44).

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

PIPER, C. V.; MORSE, W. J. *The soybean*. New York: McGraw Hill, 1923. 310 p.

PORTER, R. H. *Crop development in Paraguay*. Washington: Food Supply Division, U. S. Institute of Inter-American Affairs, 1947. 94 p.

PROBUST, J. S.; JUDD, R. W. Origin, U. S. history and development, and world distribution, In: CALDWELL, B. E. et al. (Ed). *Soybeans: improvement, productions and uses*, Madison, 1973. p. 1-15.

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, p. 102, 2003. Supplement.

RYTTER, J. L.; DOWLER, W. M.; BROMFIELD, K. R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rusts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 9, p. 818-819, Sept. 1984.

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

SHARMA, N. D.; MEHTA, S. K. Soybean rust in Madhya Pradesh. **Acta Botanica Indica**, Meerut, v. 24, p. 115-116, 1996.

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

SYDOW, H.; SYDOW, P. A contribution to the knowledge of parasitic fungi of the island of Formosa. **Annual Micology**, v. 12, p. 108, 1914.

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

TOOLEY, P. W.; BUNYARD, B. A.; CARRAS, M. M.; HATZILOUKAS, E. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1467-1475, Apr. 1997.

VAKILI, N. G. Field survey of endemic leguminous hosts of *Phakopsora pachyrhizi* in Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 63, n. 11, p. 931-935, Nov. 1979.

VAVILOV, N. I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. **Chron. Bot.** 13, the Ronald Press Company, New York, 1951.

WATERS, C. W. The Control of Teliospore and Urediniospore Formation By Experimental Methods. **Phytopathology**, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 157-213, Feb. 1928.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T.; INNIS, D. M. (Ed.). "PCR protocols: a guide to methods and applications". New York: Academic Press, USA, 1990.

WINTON, L. M.; HANSEN, E. M. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *Forest Pathology*, Berlin, v. 31, n. 5, p. 275-280, Oct. 2001.

YANG, X. B.; TSCHANZ, A. T.; DOWLER, D. W.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reduction of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 11, p. 1420-1426, Nov. 1991.

YEH, C. C.; SINCLAIR, J. B.; TSCHANZ, A. T. *Phakopsora pachyrhizi*: Uredial Development, Uredospore Production and Factors Affecting Teliospore Formation on soybeans. *Australian Journal of Agricultural Research*, Collingwood, v. 33, n. 1, p. 25-31, 1982.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 10, p. 1111-1112, Oct. 1981

YORINORI, J. T. Doenças da soja causadas por fungos. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 8, n. 94, p. 40-46, out. 1982.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. Situação da ferrugem Asiática da soja no Brasil e na América do Sul. Londrina, PR: EMBRAPA-CNPQ, 2004. 30 p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 236).

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). Dissertação de Mestrado. 2005 (92p.)

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Phakopsora pachyrhizi*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DA SOJA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

RESUMO

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha. **Identificação molecular de *Phakopsora pachyrhizi* agente causal da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais In: Identificação molecular e indução de télia no patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-Soja.** Lavras: UFLA, 2005, p.20-33 (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).¹

A ferrugem “Asiática” da soja, causada por *P. pachyrhizi*, tem sido responsável por grandes perdas na produção brasileira de soja nas últimas safras. Um diagnóstico preciso da distribuição da doença e a identificação das espécies prevalentes nas regiões produtoras no Brasil, tornaram-se necessários para orientar o planejamento das medidas de controle. A caracterização molecular baseada em PCR tem se mostrado uma ferramenta útil para atender a essa necessidade. Neste estudo, foi realizada a coleta de 86 amostras de folhas infectadas com urediniosporos de *Phakopsora* nas principais regiões produtoras de soja do estado de Minas Gerais (Triângulo, Alto Paranaíba, Noroeste, Sudoeste e Sul), envolvendo 22 municípios. A extração de DNA foi feita pelo método de CTAB. Para a reação da polimerase em cadeia, foram utilizados conjuntos de “primers” específicos para cada espécie, sendo o “primer” Ppml/Ppa2 específico para *P. pachyrhizi* e Ppml/Pme2 específico para *P. meibomiae*. A reação de PCR foi conduzida seguindo as seguintes condições de ciclos: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida pela extensão da fita de 72°C por 7 minutos. A revelação em géis de agarose 1,5% mostrou que as 86 amostras pertenciam à espécie *P. pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem “Asiática”, ou seja, houve o aparecimento de bandas específicas apenas com o uso do conjunto “primer” Ppml/Ppa2 com tamanho aproximado de 141 pares de bases. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que a espécie do gênero *Phakopsora* presente em 100% das áreas analisadas no estado de Minas Gerais era *P. pachyrhizi*. Estas informações são importantes para orientar futuros programas de melhoramento visando resistência ao agente da ferrugem da soja no estado de Minas Gerais.

¹ Comitê de Orientação: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).



ABSTRACT

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha Molecular identification of *Phakopsora pachyrhizi* causal agent of soybean rust in the state of Minas Gerais¹. In: Molecular identification and telia induction in the patosystem *Phakopsora pachyrhizi*-Soybean. 2005, p.20-33. Dissertation (Master in Phytopathology - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil).¹

The soybean rust "Asian", caused by *P. pachyrhizi* has been responsible for great losses in the Brazilian production of soybean in the last years. The distribution of the disease and identification of the prevalent species in the producing areas in Brazil became necessary to guide the planning control measures. The molecular characterization based on PCR has been showing as useful tool to satisfy that need. In this study 86 samples of leaves infected by *Phakopsora* from the main areas producing soybean in the State of Minas Gerais (Triângulo, Alto Paranaíba, Noroeste, Sudoeste and Sul) were used. The extraction of DNA was made by the method of CTAB. For the polymerase chain reaction, specific primers were used for each species, been primer Ppm1/Ppa2 specific for *P. pachyrhizi* and Ppm1/Pme2 specific for *P. meibomiae*. In the amplification 30 cycles of 94°C by 3 minutes for desnaturation; 94°C for one minute, 55°C for one minute, 72°C for one minute and 30 seconds, and 72°C for 7 minutes for extension. The processing was made in gels of agarose 1.5% and it showed that the 86 samples belonged to the species *P. pachyrhizi*, agent causal of the "Asian" rust, in other words, there was the production of bands specific from the group primer Ppm1/Ppa2 with approximate size of 141 pairs of bases. These results show that the species *Phakopsora* present in 100% of the areas analyzed in the State of Minas Gerais was *P. pachyrhizi*. This information is important to guide futures breeding programs for resistance to the agent of soybean rust in the State of Minas Gerais.

¹ Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor); Eduardo Alves – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem da soja é causada por duas espécies do gênero *Phakopsora*, *P. pachyrhizi*, conhecida no oriente desde 1914 (Rytter et al., 1984), que é mais agressiva, causando perdas de 5% a 80% nas safras atuais (Kawuki et al., 2003) e *P. meibomiae*, menos agressiva, originária do hemisfério ocidental, principalmente América do Sul e Caribe. São espécies que ocorrem juntas no campo, cujos sintomas são semelhantes, porém, as perdas causadas são distintas.

A análise de PCR (Mullis, 1987) revolucionou a biologia molecular e os diagnósticos. Assim, técnicas de PCR, baseadas em DNA, tornaram-se a ferramenta preferida e rápida para a identificação de fitopatógenos. Existe grande número de “primers” de PCR clássico para identificação de fitopatógenos importantes e muitos mais ainda estarão disponíveis num futuro próximo. Ensaios de PCR oferecem muitas vantagens sobre o isolamento tradicional e métodos imunológicos, nos quais as mais importantes são especificidade e rapidez.

Especificidade de PCR depende da singularidade das sucessões selecionadas para os “primers” e sondas. As melhorias em tecnologias de sequenciamento estão fazendo a seleção de “primers” para PCR de rotina seguros (Schaad & Frederick, 2002).

Durante a última década, grande número de ensaios de PCR, inclusive PCR *real-time*, diferenciou espécies fúngicas. Alguns destes ensaios permitiram a diferenciação entre espécies muito próximas, de difícil separação com base em características morfológicas ou gama de hospedeiros (Schaad et al., 2003).

Desse modo, um diagnóstico preciso da ferrugem da soja aliado a práticas de manejo, como escolha de produtos e época exata de aplicação, evitariam as perdas no campo, como ocorreu em Minas Gerais na safra de 2003/04.

evitariam as perdas no campo, como ocorreu em Minas Gerais na safra de 2003/04.

A diagnose de campo é confusa, pois os sintomas iniciais da doença podem ser confundidos com outros sintomas causados por outros agentes, como pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) e mancha parda (*Septoria glycines*), por isso a necessidade de um diagnóstico rápido e preciso tomou-se evidente. Assim, técnicas moleculares têm se mostrado bastante eficientes para atender a estas necessidades. O uso dessas técnicas tornou possível a distinção genética entre espécies semelhantes morfológica e geneticamente, sendo utilizada principalmente para patógenos biotróficos como ferrugens e oídios (McDonald, 1997).

Dessa maneira, Gardes & Bruns (1993) testaram a especificidade de “primers” ITS para identificação de Basidiomicetos e Ascomicetos. Os resultados foram interessantes, pois o “primer” ITS4-B quando pareado com o “primer” universal ITS1 ou com o “primer” específico para fungos ITS1-F amplificaram eficientemente o DNA de todos os Basidiomicetos, separando-os do DNA dos Ascomicetos. Os concluíram que esses “primers” podem ser usados para a detecção de tecidos infectados com fungos do filo Basidiomycota, como as ferrugens, permitindo assim o estudo de sua distribuição territorial.

Deste modo, a descrição de “primers” específicos para as espécies *P. meibomiae* e *P. pachyrhizi* (Frederick et al., 2002) permitiu a identificação precisa de cada espécie por PCR. Amostras infectadas por ambas as espécies foram diagnosticadas no Brasil por Piuga et al.(2003).

Assim, neste estudo são descritos os resultados da utilização de “primers” específicos com alta sensibilidade na caracterização das espécies de *Phakopsora*, agente da ferrugem da soja presente nas principais regiões produtoras do estado de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

As amostras de folhas infectadas com os urediniósporos do agente etiológico da ferrugem da soja foram coletadas nas principais regiões produtoras de soja do estado de Minas Gerais, compreendendo as macrorregiões Sul, Sudeste, Sudoeste, Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste (Tabela 1), num total de 22 municípios. Todas as amostras de folhas contendo pústulas foram coletadas e levadas para o Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Universidade Federal de Lavras, onde os urediniósporos foram retirados com um pincel n° 6 em água destilada, colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e conservados em nitrogênio líquido a -196°C e no freezer a -20°C .

TABELA 1. Relação dos locais e cultivares de soja de onde se obteve amostras no Estado de Minas Gerais. Lavras-MG, 2005.

N°	Cidade	Cultivar
1 a 3	Casa-de-vegetação DFP/UFLA	BRS-215
4 e 6	Lavras	Embrapa-48
5	Lavras	Pintado
7	Lavras	M-SOY 109
8 a 11	Nova Ponte	Garantia
12 a 15	Santa Juliana	Nobreza
16	Capitólio	M-SOY 8001
17	Capitólio	Conquista
18 a 32	Delfinópolis	Conquista
33 a 36	Passos	Conquista
37	São Gotardo	Vencedora
38	Patos de Minas	Conquista
39	Conquista	Garantia
		“...Continua...”

“TABELA 1, Cont.”

40 e 42	Conquista	Robusta
41	Conquista	Conquista
43 a 46	Romaria	Robusta
47 a 49	Sacramento	Nobreza
50 a 51	São João Batista do Glória	Conquista
52	Iguatama	Conquista
53	São João Del Rei	M-SOY 8400
54	São João Del Rei	Robusta
55 a 58	Lagamar	Conquista
59 a 62	Água Comprida	Nobreza
63 e 67	Conceição das Alagoas	Conquista
68 e 69	Rio Paranaíba	Garantia
70	Rio Paranaíba	Robusta
71	Rio Paranaíba	Conquista
72 a 74	Presidente Olegário	Robusta
75 a 78	Iraí de Minas	Robusta
79	Uberaba	Conquista
80 e 84	Uberaba	Sublime
81 e 82	Uberaba	Confiança
83	Uberaba	Garantia
85	Uberaba	Robusta
86	Paracatu	Conquista

2.2 Extração do DNA

No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa-Soja em Londrina, PR, aproximadamente 10mg de urediniósporos foram colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionaram-se, em cada tubo, 500µL de tampão de extração CTAB (NaCl 5M, Tris-HCl 1M pH 8,0, EDTA 0,5M, β-mercaptoetanol, CTAB 5%, água destilada). Maceraram-se bem os esporos com pistilo, logo após estes foram incubados a 65°C por 60 minutos e posteriormente resfriados e centrifugados por 10 minutos a 2940 g.

Em seguida, o sobrenadante foi resgatado para novo tubo, ao qual adicionou-se volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitou-se por suaves inversões durante 5 minutos, depois centrifugou-se por 15 minutos a

2940g e repetiu-se os dois últimos passos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o DNA precipitado pela adição de 2/3 de isopropanol gelado (-20°C). Misturou-se por inversões até que os ácidos nucleicos se tornassem visíveis e depois incubou-se *overnight* a 4°C e, após, centrifugou-se a 6610g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA lavado com 500µL de etanol 70% e seco em estufa a 37°C, ressuspensionado em 400 µL de tampão TE (10 mL Tris-HCl pH 8,0; 1 mL EDTA pH 8,0) mais RNase (40µL/mg) e incubado em estufa a 37°C por 30 minutos. O DNA foi quantificado e qualificado utilizando-se ampliações por PCR.

2.3 Reação de PCR

Os “primers” específicos Ppm1/Ppa2 (5'-GCAGAATTCAGTGAA TCATCAAG-3'/5'-GCAACTCAAATCCAACAAT-3') para *P. pachyrhizi* e Ppm1/Pme2 (5'-GCAGAATTCAGTGAATCATCAAG-3'/5'-GCACTCAA-ATCCAACATGC-3') para *P. meibomiae* foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, SP, segundo padrões desenhados por Frederick et al. (2002). A reação de polimerase em cadeia foi conduzida em termociclador (Gene AMP PCR System 9700; Applied Biosystems®) com 30ng de DNA genômico. A reação de PCR foi realizada em volume total de 25µL contendo 100mM Tris-HCl; 500mM KCl (pH 8.3); 50mM MgCl₂; dATP, dGTP, dCTP, dTTP cada um na concentração de 2,5mM; cada “primer” na concentração de 10µM; e 1U (0,2µL) da Taq DNA polimerase. A desnaturação foi realizada a 94°C por 3 minutos; para amplificação foram realizados 30 ciclos a 94°C por um minuto, a 55°C por um minuto, a 72°C por um minuto e 30 segundos e, para anelamento e extensão da fita, a 72°C por 7 minutos.

Foi adicionada ao gel de agarose 1,5% água como controle negativo e isolados puros de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* para cada reação com os “primers” específicos, tampão TBE (Tris-borato-EDTA) com brometo de etídio.

Em seguida, foi realizada a corrida eletroforética em cuba horizontal a 120V por aproximadamente 3 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 86 amostras coletadas e analisadas pela PCR com o uso dos “primers” específicos Ppal/Ppml e Pme2/Ppml, pertenciam à espécie *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem “Asiática”. Estes resultados demonstram que a espécie predominante nos principais campos de produção de soja do estado de Minas Gerais na safra 2003/04 foi de *P. pachyrhizi*. Esta espécie é considerada mais agressiva, o que justifica os altos prejuízos verificados na última safra no estado.

Utilizando-se o “primer” específico para a detecção da espécie *P. pachyrhizi* Ppal/Ppml, ocorreu o aparecimento de bandas. O produto da reação foi uma banda equivalente a 141 pares de base (Figura 1), e não houve aparecimento de bandas para a reação com o “primer” Pme2/Ppml para a *P. meibomiae*, exceto no controle (dados não mostrados em figura).

De acordo com Deslandes (1979), a ferrugem da “Asiática” da soja foi detectada pela primeira vez em Lavras-MG, infectando soja e outras leguminosas. O trabalho de Akamatsu et al. (2004) confirmou por meio de técnicas moleculares, que amostras coletadas no estado de Minas Gerais, em 1979, eram de *P. pachyrhizi* e apenas algumas amostras apresentavam as duas espécies. Os autores utilizaram para essa identificação amostras herborizadas entre 1979 e 1983 do estado de Minas Gerais, sendo a extração do DNA genômico pelo método CTAB e a identificação molecular através de “primers” específicos para as duas espécies a partir de regiões codificantes (18S, 5.8S e 28S) separadas por duas regiões transcritas, porém, descartadas durante o processo (ITS1 e ITS2). Tais fatos confirmam os resultados deste trabalho.

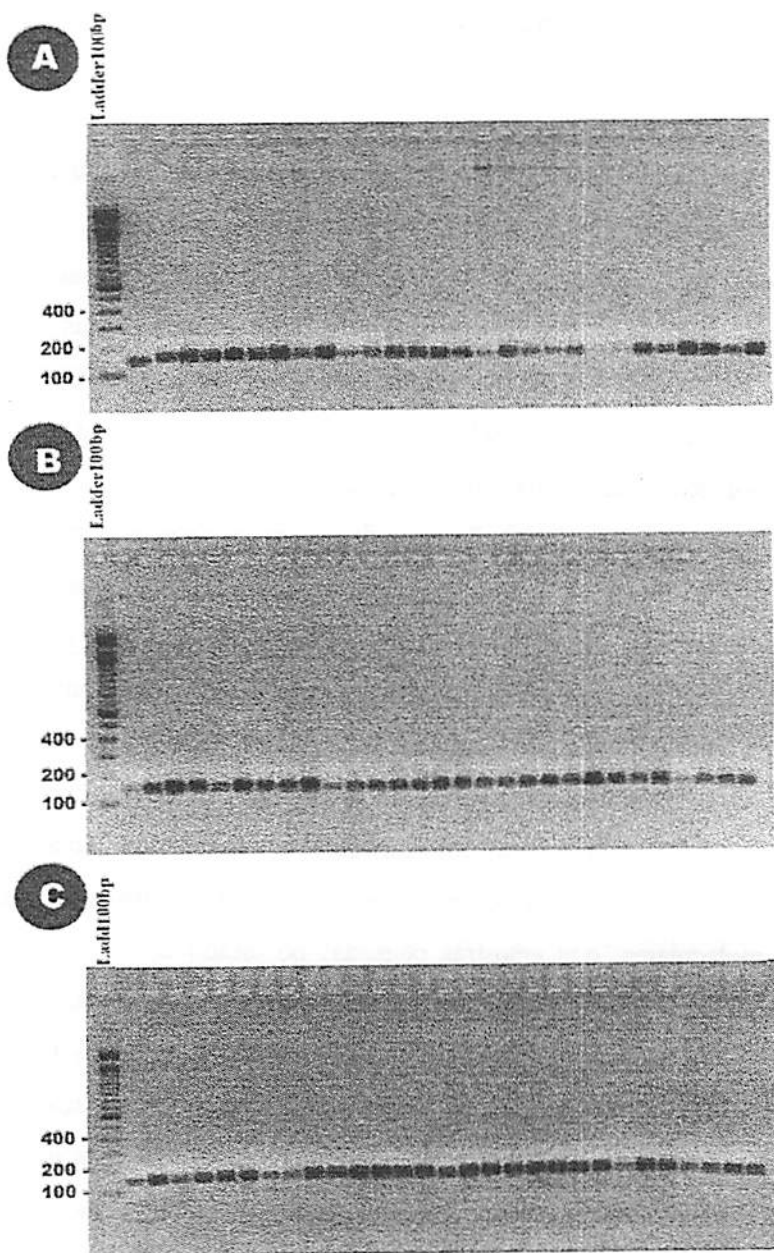


FIGURA 1. Gel de agarose da reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se o “primer” Ppm1/Ppa2, específico para *Phakopsora pachyrhizi*, amostras 1-28 (A), amostras 29-57 (B) e amostras 58-86 (C). Lavras, MG, 2005.

4 CONCLUSÕES

O “primer” Ppml/Ppa2 foi eficaz na identificação da espécie de ferrugem da soja presente nas amostras de folhas infectadas dos diferentes municípios do Estado de Minas Gerais.

Phakopsora pachyrhizi, agente etiológico da ferrugem “Asiática”, foi a espécie presente em todas as amostras coletadas no estado de Minas Gerais na safra 2003/04.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMATSU, M. A.; BARRETO, M.; AKAMATSU, R. Detecção e Distinção de *Phakopsora pachyrhizi* e *P. meibomiae* em Amostras do Herbário Uredinológico do Instituto Biológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 277-278, ago. 2004. Suplemento. Resumo.
- 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.
- 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. meibomiae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 217-227, Feb. 2002.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhances specificity for Basidiomycetes-application to the identification of Mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. p. 113-118, Apr. 1993.
- KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield Loss Associated with Soya Bean Rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 151, n. 1, p. 7-12, 2003.
- MCDONALD, B. A. The populations genetics of fungi, tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453, Apr. 1997.
- MULLIS, K. **Process for amplifying nucleic acid sequences**. 1987. U. S. Patent No. 4683202,
- PIUGA, F. F.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; OLIVEIRA, A. C. B.; GUERZONI, R. A.; NUNES, J. J.; PAIVA, W. M. Dupla Infecção de *Phakopsora pachyrhizi* e *P. meibomiae* em Lavouras de Soja no Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 25., 2003, Uberaba, MG. **Resumos...** Londrina, PR: Embrapa Soja, 2003.
- RYTTER, J. L.; DOWLER, W. M.; BROMFIELD, K. R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rusts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 11, p. 818-819, Nov. 1984.



SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology, Ontario**, v. 24, n. 3, p. 250-258, Sept. 2002.

SCHAAD, N W.; FREDERICK, R. D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W. L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M. D.; LUSTER, D. G. Advances in Molecular-Based Diagnostics in Meeting Crop Biosecurity and Phytosanitary Issues. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 305-324, 2003.



CAPÍTULO 3

INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE TÉLIA POR *Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA, UTILIZANDO-SE DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha. **Indução da formação de télia por *Phakopsora pachyrhizi* em soja utilizando-se diferentes temperaturas.** In: Identificação molecular e indução de télia no patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-Soja. Lavras: UFLA, 2005, p.34-52 (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).¹

A ferrugem da soja é uma doença que, nas últimas três safras, tem causado grandes perdas aos produtores no Brasil e em Minas Gerais devido a sua alta capacidade de causar danos. Esta doença é causada por duas espécies do gênero *Phakopsora*, *P. meibomiae* e *P. pachyrhizi*. O método mais seguro para a separação das duas é baseado nas características morfológicas dos teliósporos. O experimento teve como objetivo determinar a influência da temperatura na formação de télia em plantas de soja. Os trabalhos foram realizados em casa de vegetação e em câmaras de crescimento vegetal do DFP/UFLA com temperaturas de 10°C, 15°C e 20°C e as cultivares Uirapuru e Pintado, nos meses de fevereiro a abril de 2004. As plantas foram inoculadas 30 dias após a semeadura, no estádio V3. Após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença aos 7 dias, os vasos foram transportados para as respectivas câmaras de crescimento vegetal. As observações tiveram início 15 dias após a transferência das plantas para cada câmara. As leituras foram feitas em lupa a cada cinco dias e, no caso de lesão suspeita, eram preparados cortes histológicos no micrótomo e analisados em microscópio de luz. Lesões típicas de télias foram observadas em plantas crescendo a 15°C na cultivar Uirapuru no 25º dia após a transferência das plantas e na cultivar Pintado no 30º dia, confirmado com cortes finos do material fresco e observação em microscópio de luz com aumento 400x e microscópio eletrônico de varredura. Quanto ao tamanho e formato observaram-se dois tipos de télias: as arredondadas a elípticas com espessura média de 77µm, comprimento de 35,25µm e camada apical de 1,42µm, predominante na cultivar Uirapuru e a alongada com espessura média de 127,33µm, comprimento de 41,33µm e camada apical de 1,9µm predominante na cultivar Pintado. O formato dos teliósporos também variou entre as cultivares, no qual houve uma predominância do formato clavado na cultivar Pintado com medidas de 6,97µm de largura e 14,91µm de comprimento e um formato arredondado na cultivar Uirapuru com 7,02µm x 10,02µm de comprimento.

¹ Comitê de Orientação: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador); Eduardo Alves – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

SOUSA, Patrícia Ferreira Cunha Telia induction by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean using different temperatures. In: Molecular identification and telia induction in the patosystem *Phakopsora pachyrhizi*-Soybean. 2005, p.34-54. Dissertation (Master in Phytopathology - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil).¹

The soybean rust is a disease that has caused great losses to soybean crops in the State of Minas Gerais and in other States in Brazil in the last three years, due to its capacity to cause damage in that crop. This disease is caused by two species of the genus *Phakopsora*, *P. meibomia* and *P. pachyrhizi*. The safest method the separation the two is based on morphologic characteristics of the teliospores. The experiment aimed to determines the influence of temperature in the telia formation in leaves of soybean plants. The works were carried out in glasshouse and growth chamber at DFP/UFLA with temperatures of 10, 15 and 20°C, and two cultivars Uirapuru and Pintado, on summer to fall (from February to April) of 2004. The plants were inoculated 30 days after planting, in stage V3, after development of the first symptoms of the disease at 7th day; the pots were placed in the respective growth. Observations were started 15 days after transference to plants to each growth chamber. The evaluations were made in stereomicroscope every five days, and in case of suspect lesion, histological sections in microtome were prepared and analyzed in light microscope. Typical lesions of telia were observed in plants growing under 15°C in cultivar Uirapuru at the 25th day and in plants of the cultivar Pintado at the 30th day, confirmed of the was got though fine sections of the fresh material and observation in light microscope with resolution of 400x and scanning electron microscope. In relation to the size and shape, two types of telia were observed, one round-elliptical with width of 77 µm and length of 35.25 µm and apical layer of 1.42 µm, on cultivar Uirapuru, the other type measuring 127.33 µm of width and 41.33 µm length with apical layer of 1.9 µm of the cultivar Pintado. The shape of the teliospore also varied among the cultivars, in the cultivar Pintado clave shape spores were more frequent measuring 6.97 µm of width and 14.91 µm of length. In the cultivar Uirapuru teliospores were rounder with size 7.02 µm x 10.02 µm of length.

¹ Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor); Eduardo Alves – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem “Asiática” da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma doença endêmica no hemisfério oriental (Tan Yu-Jum et al., 1983). No hemisfério ocidental, esta doença tem causado perdas desde 1994, no Hawaii (Killgore & Heu, 1994), 2001 no Brasil e Paraguai (Morel & Yorinori, 2002), apesar do primeiro relato da doença feito por Deslandes em 1979 o qual encontrou *P. pachyrhizi* em soja (*Glycine max*), soja perene (*Glycine wightii*) e outras leguminosas no município de Lavras, Minas Gerais, em 2003 na África (Kawuki et al., 2003) e em 2004 nos Estados Unidos (APHIS, 2004).

Phakopsora pachyrhizi produz urédia e télia em folhas de soja e outras leguminosas (Yeh et al., 1981). As télias são de cor marrom-escuro, dispersas, agregadas e irregulares, com teliosporos curtos, clavados, com duas a sete camadas (Tan Yu-Jum et al., 1983). A morfologia das télias e teliosporos são usadas para a classificação dessa ferrugem (Ono et al., 1992). A germinação de teliosporos é necessária para a determinação do ciclo de vida (Koch & Hoppe, 1987; Saksirirat & Hoppe, 1991).

A ocorrência de télia e teliosporos foi relatada em 6 dos 87 hospedeiros de *P. pachyrhizi* (Keogh, 1976). Entretanto, nas regiões tropicais, a ausência da formação de télia dificulta o uso desta característica na classificação deste fungo (Bromfield, 1984).

A produção de télia em ferrugens é induzida pela regulação da temperatura (Saksirirat & Hoppe, 1991). Desse modo, Dufresne et al. (1987) compararam a formação de télia em diferentes temperaturas e observaram aparecimento de télia a 15°C e baixa intensidade de luz. Os mesmos autores observaram que o número de dias para a formação de télia dependia da agressividade do isolado e de sua interação com o ambiente e o hospedeiro.

Assim, diante do exposto, este trabalho teve como objetivo determinar a temperatura ideal e período em câmaras climatizadas necessário para a formação de télia por *Phakopsora pachyrhizi* em duas cultivares de soja ('Uirapuru' e 'Pintado').

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plantas testadas

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-MG (DFP-UFLA), com temperatura variando de 25°C a 30°C e umidade relativa de 80% a 95%. Foram utilizadas duas cultivares de soja: 'Uirapuru e Pintado'. As sementes foram plantadas em vasos com três litros de terra, sendo três plantas por vaso, num total de cinco vasos para cada temperatura e cultivar. Foram mantidas por 37 dias, até o aparecimento dos primeiros sintomas.

2.2 Preparação e manutenção do inóculo

Foi utilizado um isolado de *P. pachyrhizi* fornecido pelo CNPSO - EMBRAPA, multiplicado e mantido em casa de vegetação do DFP-UFLA em plantas de soja das cultivares Uirapuru e Pintado, de acordo com a metodologia descrita por Yeh et al. (1981) e Dufresne et al. (1987). Na inoculação das plantas para a manutenção do inóculo, urediniósporos foram coletados de folhas com urédias, utilizando-se pincel nº 6 em água destilada adicionando-se, em seguida, uma gota de Tween 20 (vol/vol) para melhor homogeneização do inóculo.

2.3 Inoculação e incubação

Plantas com dois pares de folhas trifoliados completamente expandidos foram inoculadas com suspensão de 2×10^5 urediniósporos por mL proveniente das plantas mantedoras de inóculo, aproximadamente 30 dias após o plantio, no estágio V3. Os urediniósporos foram pulverizados na face abaxial e adaxial das folhas, não sendo necessário mantê-las em câmara úmida devido à presença de irrigação por aspersão na casa de vegetação, a qual mantinha a umidade relativa

do ar entre 80% e 95%. Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por mais sete dias, até o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Então, os vasos foram levados para três câmaras de crescimento do DFP/UFLA com 10°C, 15°C e 20°C de temperatura e umidade relativa na faixa de 65 a 92% para a indução da formação de télias. Após 15 dias da transferência das plantas para as câmaras climatizadas, iniciaram-se as leituras, realizadas a cada cinco dias, nas quais avaliou-se a presença de télia em cada planta pela observação em estereomicroscópio com aumento de 100x e cortes histológicos das folhas feitos a mão ou em micrótomo manual para a preparação de lâminas semipermanentes e observação em microscópio de luz com aumento de 400x. Para um melhor detalhamento das estruturas observadas em microscópio de luz e para medição das características das télias e dos teliósporos amostras, foram também preparadas para a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.4 Preparação das amostras para MEV

Foram coletadas cinco folhas de cada amostra. Após a constatação da presença de urédias e télias, as folhas foram levadas para o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da UFLA (LME) onde se procedeu à preparação para MEV. Depois de coletadas, quadrados da folha com 0,5 cm de largura foram cortados e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24 horas. Em seguida, estes foram transferidos para líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 minutos e cortados transversalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e, subsequentemente, desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de fita de carbono de dupla face colocada sobre película de papel alumínio, cobertos com ouro e

observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP ®. Foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 14 mm. Procedeu-se também a medição das télias e dos teliósporos e da espessura das células da camada apical dos teliósporos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 25 dias após a transferência das plantas para a câmara climatizada a 15°C houve o aparecimento de lesões típicas de télia na cultivar Uirapuru e aos 30 dias na cultivar Pintado, confirmadas por cortes finos do material fresco e observações em estereomicroscópio (Figura 1), microscópio de luz com aumento 400x (Figura 2) e microscópio de varredura (Figura 3).

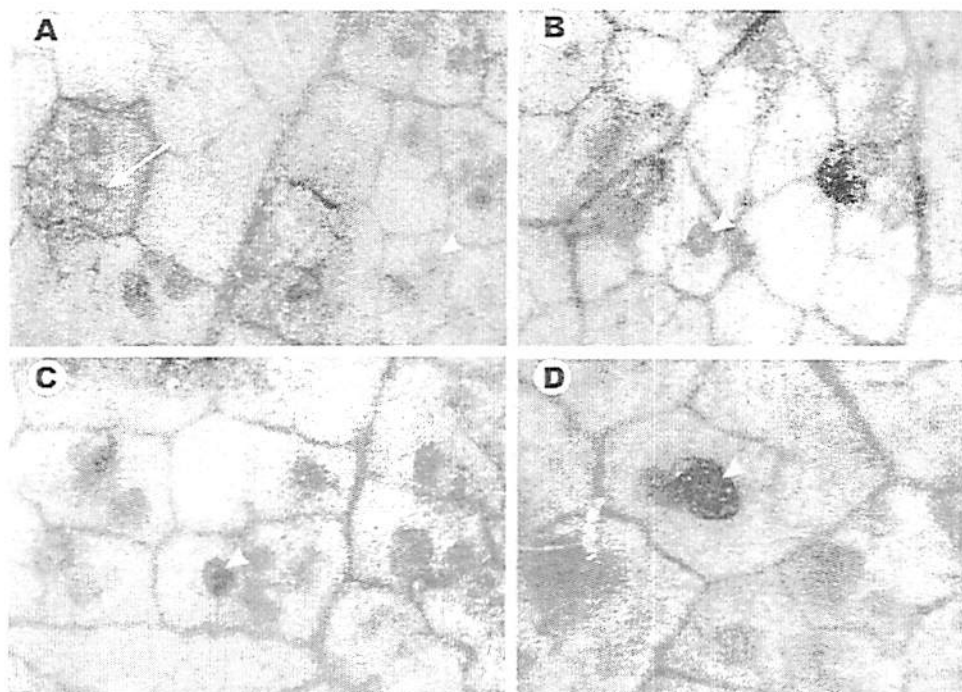


FIGURA 1. Observações em estereomicroscópio aos 30 dias após a transferência da plantas para as câmeras climatizadas cv. Pintado (A e C) e cv. Uirapuru (B e D), 25 dias após transferência. (Seta em A indica urédia; cabeças de seta em A – D indicam télias). Lavras, MG, 2005.

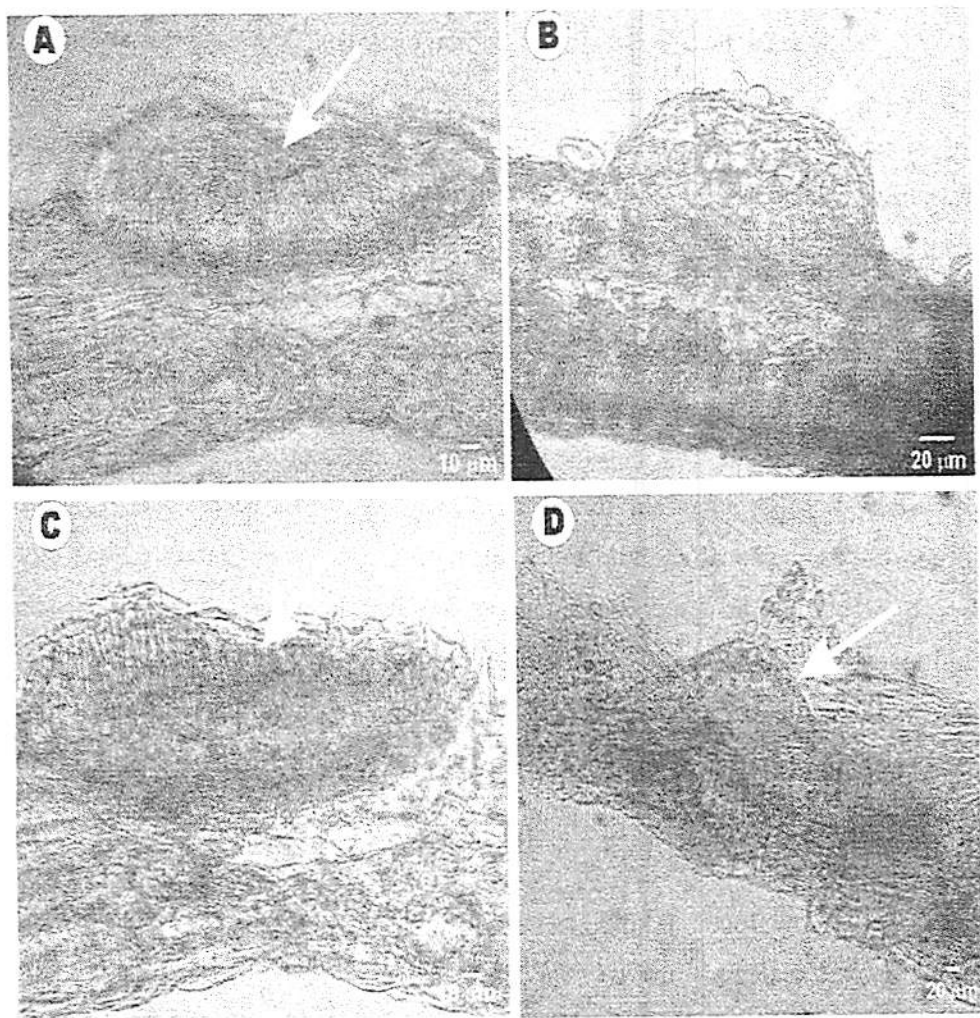


FIGURA 2. Observações de cortes transversais de folhas de soja em microscópio de luz aos 25 dias após a transferência da plantas para as câmeras climatizadas cv. Uirapuru (A e B) e 30 dias após transferência cv. Pintado (C e D). Setas em A e C mostram télias e B e D mostram de urédias. Lavras, MG, 2005.

Teliósporos de *P. pachyrhizi* foram relatados ocorrendo naturalmente em muitas localidades em diferentes hospedeiros, como em 2004 em soja na Argentina (Carmona et al., 2004) e no Japão (Kitani & Inoue, 1960, citados por Marchetti et al, (1975), em *Lab lab purpureus* e *Canavalia villosa* em Porto Rico (Vakili, 1981). Entretanto, estas regiões apresentam temperaturas amenas que propiciam condições para a produção das télias. Nas regiões produtoras de soja do Brasil dificilmente se têm temperaturas menores de 20°C por longo período no campo no período de cultivo da cultura.

Waters (1928) foi o primeiro a montar métodos experimentais para a formação de teliósporos em ferrugens. Dentre as várias necessidades para o estudo da formação do estágio telial, ele cita que o estado de resistência está ligado diretamente às condições climáticas de umidade, temperatura e resistência do hospedeiro. Os fatores intrínsecos ao fungo agem dependentemente às influências climáticas, ou seja, a habilidade do fungo de parasitar dependerá de sua reação às condições ambientais desfavoráveis para a continuação de seu desenvolvimento vegetativo e a produção, em seguida, de estruturas de sobrevivência.

Kitani & Inoue (1960), citados por Marchetti et al. (1975), foram os primeiros a empregar a técnica de Waters (1928), na indução de teliósporos de *P. pachyrhizi* pela manipulação da temperatura. Foram testadas temperaturas de 20°C, 15°C, 10°C e 5°C. Nenhuma télia foi formada a 20°C, somente dentro de 10, 14 e 20 dias após a incubação houve o aparecimento de télia nas temperaturas de 15°C, 10°C e 5°C, respectivamente.

Yeh et al. (1981) estudaram a indução da formação de teliósporos em soja e em mais nove hospedeiros, em temperatura máxima de 24°C e mínima de 15°C. Trinta e cinco dias após incubação, houve o aparecimento de télia e teliósporos em *Glycine wightii*, *G. canescens* e *G. javanica* e 30 dias após incubação em *G. max* e *Phaseolus erosus* e entre 50 e 60 dias em *Cajanus cajan*,

P. lunatus, *P. vulgaris*, *R. minima* e *Vigna unguiculata*. Assim, confirmou-se que temperaturas baixas, entre 15°C e 20°C, induzem à formação de télia. Em experimentos feitos pelos autores, na mesma época, em campo, com temperatura acima de 25°C, não foi observado o aparecimento de télia. Neste trabalho podem-se confirmar os resultados acima citados, mostrando que a temperatura de 15°C favorece a formação de télia. Este tipo de estudo ainda não havia sido realizado no Brasil.

Dufresne et al. (1987) concluíram que houve a influência da temperatura e da intensidade de luz na produção de télia, bem como dos fatores genéticos da cultivar e do fungo, no qual o isolado de *P. pachyrhizi* de Taiwan, mais agressivo, produziu télia mais rapidamente, enquanto que o isolado de *P. pachyrhizi* de Porto Rico, sob as mesmas condições, produziu mais lentamente.

Tan-YuJun et al. (2001a) estudaram a formação de teliósporos de *P. pachyrhizi* usando quatro cultivares de soja no campo e em câmaras de crescimento. Estes autores verificaram o aparecimento de télia nos dois ambientes avaliados, nos quais os fatores que influenciaram o aparecimento das télias foram o genótipo da cultivar, a temperatura, a umidade relativa e a intensidade de luz, sendo os fatores genótipo da cultivar e a temperatura os mais importantes e determinantes para a formação de télia. As condições básicas requeridas para a formação de teliósporos foram temperaturas médias diurnas acima de 20°C, com mínima diária de 16°C, no qual mais télias foram encontradas em plantas expostas a maiores flutuações de temperatura. Neste estudo verificou-se que as cultivares podem se comportar de forma diferente quanto ao tempo para a produção das télias, confirmando o encontrado por Dufresne et al. (1987) e Tan-YuJun et al. (2001a).

Tan-YuJun et al. (2001a) também demonstraram que teliósporos de menor tamanho foram formados mais cedo em genótipos suscetíveis, comparados com genótipos resistentes, no qual o tamanho da télia foi

inversamente relacionado com seu número. Confirmando os resultados apresentados neste estudo, os autores encontraram maior número de télias formado entre 13°C e 15°C e 200 lux, sob condições artificiais (câmara de crescimento), se comparadas com as condições naturais (campo).

O papel dos teliósporos no ciclo de infecção de *P. pachyrhizi* não é ainda bem esclarecido. Desse modo, Tan-YuJun et al. (2001b) realizaram alguns experimentos na tentativa de provar o fator sobrevivência admitido com a função biológica dos teliósporos em diversos ciclos de infecção. Assim, os autores observaram que teliósporos formados sob condições naturais foram incapazes de germinar e não causaram ferrugem da soja na cultura subsequente de soja no campo. Eles então concluíram que *P. pachyrhizi*, na China, é capaz de produzir teliósporos sob condições naturais, porém, não constituem fonte de infecção primária para plantas de soja.

As principais diferenças entre as duas espécies de ferrugem já citadas estão no formato da télia e dos teliósporos (Carvalho Jr. & Figueiredo et al., 2000). Quanto ao tamanho e formato das télias, pode-se inferir sobre dois tipos (Tabela 1), aquelas mais arredondadas com espessura média de 77µm, altura de 35,25µm e camada apical de 1,42µm, que predominaram nas folhas da cultivar Uirapuru após 25 dias da transferência das plantas para a câmara climatizada de 15°C (Figura 3E e 3F) e as mais alongadas com espessura média de 127,33µm, altura de 41,33µm e camada apical de 1,9µm que predominaram na cultivar Pintado após 30 dias (Figura 3B e 3D). O número médio de camadas de teliósporos variou de três na cultivar Uirapuru e cinco na cultivar Pintado (Tabela 1). O formato dos teliósporos também variou entre os cultivares, com predominância do formato mais clavado na cultivar Pintado com medidas de 6,97µm de largura e 14,91µm de altura e formato mais arredondado na cultivar Uirapuru com 7,02µm de largura e 10,02µm de altura (Tabela 2).

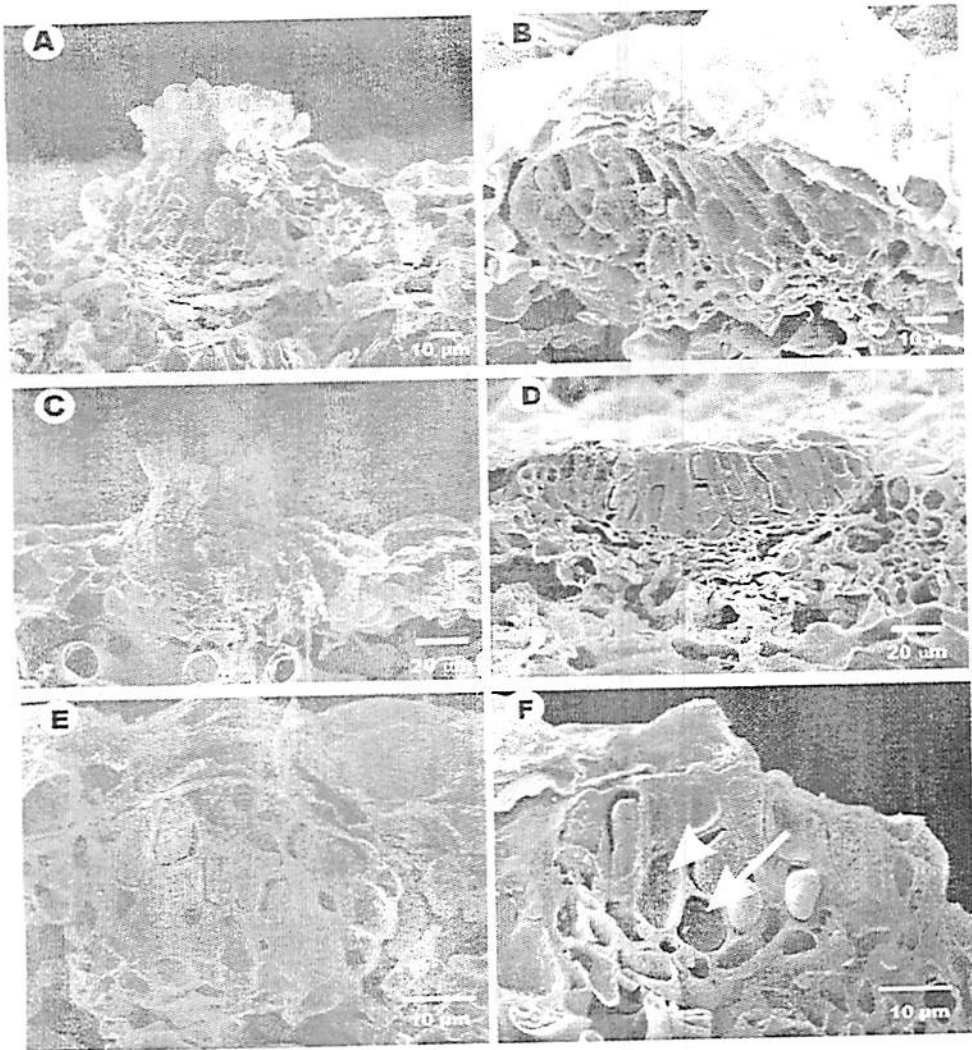


FIGURA 3. Eletromicrografias de varredura (A-B) - Folhas do cv. Uirapuru aos 25 dias após a transferência da plantas para as câmaras climatizadas (A) Corte transversal de uma urédia; (B) Corte transversal de uma télia em formato alongado; (C-D) - Folhas da cv. Pintado aos 30 dias após transferência Corte transversal de uma urédia; (D) Corte transversal de uma télia em formato alongado; (E) Formato de télia arredondado da cv. Uirapuru, aos 25 dias após transferência e (F) Formato de télia mais arredondado da cv. Pintado aos 30 dias após transferência para a câmara climatizada de 15°C. Seta indica tipo de teliósporos arredondado e cabeça de seta tipo clavado. As folhas foram cortadas em nitrogênio líquido. Lavras, MG, 2005.

Estes resultados confirmam a identidade do fungo como *P. pachyrhizi*, segundo os caracteres da camada apical e do número de camadas de teliósporos adotados por Carvalho & Figueiredo et al. (2000) e reforçam os dados de PCR feito para este isolado e apresentado no capítulo 2, para confirmação da identidade do fungo. Além disso, os resultados trouxeram informações importantes sobre a variação do formato dos teliósporos e do tamanho e formato das térias em função do hospedeiro, que não são destacados em trabalhos anteriores.

TABELA 1. Média das dimensões das télia em folhas infectadas com ferrugem da soja nas cultivares Pintado e Uirapuru, mantidas a 15°C. Lavras-MG, 2005.

Medida (μm)	cv. Pintado¹	cv. Uirapuru²
Largura	127,33	77
Altura	41,33	35,25
Camada apical	1,9	1,425
Nº camadas	5	3

¹Aos 30 dias após a transferência para a câmara climatizada.

²Aos 25 dias após a transferência para a câmara climatizada

TABELA 2. Média das dimensões dos teliósporos em folhas infectadas com ferrugem da soja nas cultivares Pintado e Uirapuru, mantidas a 15°C. Lavras-MG, 2005.

Medida (μm)	cv. Pintado¹	cv. Uirapuru²
Largura	6,87	7,02
Altura	14,91	10,02

¹Aos 30 dias após a transferência para a câmara climatizada.

²Aos 25 dias após a transferência para a câmara climatizada

4 CONCLUSÕES

A temperatura que promoveu maior produção de télia e teliósporos foi a de 15 °C.

Observou-se a presença de dois formatos de teliósporos, um clavado que predominou na cultivar Uirapuru e outro arredondado que predominou na cultivar Pintado.

Verificou-se também variação no tamanho e formato das télias nas cultivares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHIS-Factsheet Louisiana Soybean Rust Detection. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/Ipa/pubs/fcsheet_faq_notice/faq_phalasoymbcanrust.pdf> Acesso em 20 nov. 2004.

BROMFIELD, K. R. Soybean rust. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 1984. (Monograph, n. 11)

CARMONA, M.; GALLY, M.; LOPEZ, S. E. Roya Asiática de la soja: patometria de epidemias en Argentina y caracterizacion morfológica de *Phakopsora pachyrhizi* (Uredosporas y teleutosporas). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. 279, ago. 2004. Suplemento. Resumo.

CARVALHO J. A. A.; FIGUEIREDO, M. B. A. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 197-200, jan./mar. 2000.

DUFRESNE, L. A.; BEAN, G. A.; BONDE, M. R.; GOTH, R. W. Effects of temperature and light intensity on telia development by Puerto Rico and Taiwan isolates of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust fungi. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n. 7, p. 629-631, July 1987.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKAMUHABWA, P. Yield Loss Associated with Soya Bean Rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, v. 151, n. 1, p. 7-12, 2003.

KEOGH, R. C. The host range and distribution of *Phakopsora pachyrhizi* in New South Wales. *Australian Plant Pathology Society Newsletter*, Victoria, v. 5, n. 1, p. 51-52, 1976.

KILLGORE, E.; HEU, R. First report of soybean rust in Hawaii. *Plant Disease*, St. Paul, v. 78, n. 12, p. 1216, Dec. 1994.

KOCH, E.; HOPPE, E. E. Germination of the Teliospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Soybean Rust Newsletter*, Taiper, v. 8, p. 3-4, 1987.

MARCHETTI, M. A.; UECKER, F. A.; BROMFIELD, K. R. Uredinal Development of *Phakopsora pachyrhizi* in Soybeans. *Phytopathology*, St. Paul, v. 65, n. 7, p. 822-823, July 1975.

MOREL, W.; YORINORI, J. T. Situación de la roya de la soja en el Paraguay. Capitán Miranda, Paraguay. Ministerio de Agricultura y Granadería, Centro Regional de Investigación Agrícola, 2002. (Boletín de Divulgación, n. 44).

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

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

TAN YU-JUM, YU ZI-LIN, LIU JIA-LIN. Studies on the epidemic regulation and control of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. soybean research in China and the United States International Soybean. Urbana, Illinois, USA, 1983. (Intsoy Series Number, 25).

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

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

VAKILI, N. G. Distribution of *Phakopsora pachyrhizi* on *Lab lab purpureus* in Puerto Rico. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v. 65, n. 10, p. 817-819, 1981.

WATERS, C. W. The Control of Teliospore and Urediniospore Formation By Experimental Methods. *Phytopathology*, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 157-213, 1928.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 10, p. 1111-1112, Oct. 1981.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à alta agressividade da ferrugem “Asiática”, causada pela espécie *Phakopsora pachyrhizi*, houve grandes perdas na produção de soja na safra passada 2003/04 em todas as regiões produtoras do país, inclusive Minas Gerais. Mesmo com a expansão da cultura no estado, a produção esperada não superou as expectativas devido a grande intensidade da doença.

Assim a correta identificação do agente causal da ferrugem é de extrema importância para o manejo adequado dessa enfermidade. Dessa maneira, por meio deste trabalho, pode-se confirmar a presença de *P. pachyrhizi* em 100% das áreas coletadas no Estado.

Todas as 86 amostras coletadas, as quais foram analisadas pela reação da polimerase em cadeia (PCR) com o uso de “primers” específicos para cada espécie causadora da ferrugem da soja eram pertencentes à espécie *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem “Asiática”. No “primer” específico para a detecção da espécie *P. pachyrhizi* Ppa1/Ppm1, ocorreu o aparecimento de bandas, cujo produto da reação foi revelado por 141 pares de base, não ocorrendo o aparecimento de banda com o uso do “primer” específico para *P. meibomiae*, Pme2/Ppm1.

Esses resultados de PCR são confirmados pelas características morfológicas como sendo a espécie *P. pachyrhizi*. Características estas que são evidenciadas principalmente pela camada apical de até 3 µm de largura e 3-5 camadas de teliósporos.

Desse modo, o estudo das características morfológicas da télia e teliósporos obtidos com a indução desta fase em *P. pachyrhizi* reforçou os resultados obtidos pela identificação molecular.

Assim, a utilização de metodologias rápidas e seguras para a identificação da ferrugem com o uso de técnicas moleculares, juntamente com estudos das características morfológicas, é de extrema importância.

Assim, estudos futuros com outras técnicas moleculares e o estudo da biologia das principais fases do ciclo da ferrugem da soja são de grande relevância para a continuidade desta pesquisa.

Desse modo, espera-se que este trabalho seja o primeiro passo para que novas investigações sobre essa doença continuem.