

**PRESERVAÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi*
Sydow & Sydow E ASPECTOS
EPIDEMIOLÓGICOS E ULTRA-
ESTRUTURAIS DA SUA INTERAÇÃO COM A
SOJA (*Glicyne max* (L.) Merrill)**

ELISANDRA BATISTA ZAMBENEDETTI

2005

59205
050375

ELISANDRA BATISTA ZAMBENEDETTI

**PRESERVAÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Syuow e
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DA SUA
INTERAÇÃO COM A SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

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

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Zambenedetti, Elisandra Batista

Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultraestruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L). Merrill) / Elisandra Batista Zambenedetti. -- Lavras : UFLA, 2005.

92 p. il.

Orientador: Euardo Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Phakopsora pachyrhizi*. 2. Uredosporos. 3. Armazenamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3494

ELISANDRA BATISTA ZAMBENEDETTI

**PRESERVAÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow E
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DA SUA
INTERAÇÃO COM A SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

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

APROVADA em 21 de janeiro de 2005

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

UFLA

Prof. Dr. Pedro Milanez de Rezende

DAG-UFLA

Eduardo Alves

Prof. Dr. Eduardo Alves

**Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

A Deus, pelo dom da vida.

À minha mãe, Isolina Batista Zambenedetti (*in memoriam*).

Como gostaria poder ver o brilho dos seus olhos no dia de hoje. Brilho que sempre esteve presente em todas as minhas conquistas e na realização de todos os meus sonhos. Sinto não poder sentir o calor do seu abraço e não ouvir suas doces palavras de orgulho. Lamento muito, mas sei também que sou uma pessoa abençoada por ter tido a chance de compartilhar tantos outros momentos com você. Sou muito grata por tantas recordações que me fazem chorar...lágrimas de saudades e de lembranças que serão eternas. Você viverá para sempre em meu coração, na minha memória na minha vida.

OFEREÇO.

Ao meu pai, Vilson Zambenedetti, pelo amor mais sincero e apoio incondicional em todos esses anos.

Ao meu irmão, Gian pelo carinho e pelos momentos de alegria.

Aos meus tios Domingos e Terezinha, pelo carinho com que nos receberam em sua casa e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus primos, Raul e Gleci, por sempre me incentivarem a seguir nos estudos e por toda ajuda.

Ao meu Amor, Rodrigo, pela paciência, pelo incentivo e por estar sempre me apoiando nas decisões importantes.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves, pela orientação, confiança e apoio muito importantes na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, pelo incentivo, e valiosas sugestões no decorrer do trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Milanez de Rezende por ter aceitado o convite para participar da banca.

A pesquisadora da EMBRAPA Soja Dra. Claudia Vieira Godoy, pela acolhida e pela valiosa contribuição para o início dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Daniel Cassetari Neto, por iniciar-me na Fitopatologia.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e experiência, muito importantes para a minha formação profissional.

Aos colegas do Departamento, em especial os do Laboratório de Patologia de Sementes, pela amizade, companheirismo e boa convivência.

Aos amigos de turma, Daniel, Igor e Pedro pela amizade e ajuda durante a realização deste trabalho.

As minhas amigas e companheiras de todas as horas, Dejânia, Fabiane e Valquiria, pelo apoio e pela convivência diária durante esses dois anos.

Aos amigos Anderson, Ângela, Gabriela, Beatriz, Evando, Enia, Jadir, Juliana, Flavio, Renata, Renatinha, Ricardo, Silvy e Patrícia, pelos laços de amizade formados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico.....	6
2.1 Agente etiológico.....	6
2.2 Taxonomia.....	7
2.3. Ciclo de vida.....	7
2.4 Modo de penetração.....	8
2.5 Sintomatologia.....	9
2.6 Condições ambientais favoráveis.....	10
2.7 Resistência varietal.....	10
2.8 Conservação de inóculo.....	12
2.9 Ultra-estrutura.....	14
3 Referências bibliográficas	16
CAPÍTULO 2 Efeito de diferentes métodos de armazenamento na germinação de uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> Sydow & Sydow.....	23
1 Resumo.....	24
2 Abstract.....	25
3. Introdução.....	26
4 Material e métodos.....	27
4.1 Preparo e manutenção do inóculo.....	27
4.2 Coleta e tipos de armazenamento.....	27
4.3 Teste de germinação.....	28

uredósporos germinados e com formação de apressório ficando atrás apenas do cultivar BRS 154 o qual apresentou maior porcentagem de germinação (85,5%) e maior porcentagem de formação de apressório (66,5%). Na análise das amostras em MEV foi possível observar todo processo de infecção desde a germinação dos uredósporos até a colonização do tecido do hospedeiro e do início de formação das urédias. Tanto a formação de apressórios, como as penetrações ocorreram nas junções das células da epiderme e não no centro das células através da cutícula. Após 24 horas da inoculação os uredósporos começaram a murchar e com 48 horas os apressórios. Através da remoção da epiderme foi possível observar a formação das hifas primárias 48 horas após a inoculação e o desenvolvimento progressivo do micélio até o início da formação das urédias com 240 horas. Vários aspectos do processo são mostrados neste trabalho através das eletromicrografias de varredura.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico.....	6
2.1 Agente etiológico.....	6
2.2 Taxonomia.....	7
2.3. Ciclo de vida.....	7
2.4 Modo de penetração.....	8
2.5 Sintomatologia.....	9
2.6 Condições ambientais favoráveis.....	10
2.7 Resistência varietal.....	10
2.8 Conservação de inóculo.....	12
2.9 Ultra-estrutura.....	14
3 Referências bibliográficas	16
CAPÍTULO 2 Efeito de diferentes métodos de armazenamento na germinação de uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> Sydow & Sydow.....	23
1 Resumo.....	24
2 Abstract.....	25
3. Introdução.....	26
4 Material e métodos.....	27
4.1 Preparo e manutenção do inóculo.....	27
4.2 Coleta e tipos de armazenamento.....	27
4.3 Teste de germinação.....	28

4.4 Delineamento experimental.....	29
4.5 Análise dos dados.....	29
5 Resultados e discussão.....	30
6 Conclusões.....	34
7 Referências bibliográficas.....	35
CAPÍTULO 3 Avaliação dos componentes de resistência em diferentes alturas de copa para ferrugem da soja (<i>P. pachyrhizi</i>)	38
1 Resumo.....	39
2 Abstract.....	40
3 Introdução.....	41
4 Material e métodos.....	43
4.1 Cultivares utilizados.....	43
4.2 Plantio, preparo do inóculo e técnica de inoculação.....	43
4.3 Delineamento experimental e condução do experimento.....	44
4.4 Esporulação.....	44
4.5 Incidência e severidade.....	44
4.6 Análise dos dados.....	45
5 Resultados e discussão.....	46
5.1 Esporulação.....	46
5.2 Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) e da severidade (AACPS) da ferrugem.....	47
6 Conclusões.....	53
7 Referências bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 4 Estudo de microscopia de luz e eletrônica de varredura do processo de pré-penetração, penetração e colonização de <i>P. pachyrhizi</i> em folíolos de soja.....	59
1 Resumo.....	60

2 Abstract.....	62
3 Introdução.....	64
4 Material e métodos.....	66
4.1 Cultivares utilizados.....	66
4.2 Instalação e inoculação do experimento.....	66
4.3 Coleta das amostras.....	67
4.4 Preparação das amostras MEV.....	67
4.5 Clareamento de tecido.....	68
5. Resultado e discussão.....	70
5.1 Avaliação de porcentagem de germinação e formação de apressórios de uredósporos de <i>P.pachyrhizi</i>	70
5.2 Eventos de pré-penetração, penetração e colonização de <i>P.pachyrhiziem</i> folhas de soja.....	73
6. Conclusões.....	81
7. Referências bibliográficas.....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
ANEXOS.....	87

RESUMO

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) Lavras: UFLA, 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).*

A ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* tem sido uma das mais importantes doenças da cultura nos últimos anos no Brasil. Neste estudo procurou-se avaliar o efeito de diferentes métodos de armazenamento visando à preservação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* fora do hospedeiro e verificar aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da interação deste patógeno com soja. Dos cinco métodos testados para preservação o do nitrogênio líquido foi o de melhor resultado, pois além de preservar os uredósporos por mais tempo, também permitiu a recuperação da viabilidade dos mesmos. Em casa-de-vegetação foram inoculados com suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* 7 cultivares (Uirapuru, BRS 134, Pintado, BRS 154, BRS 215, FT2, BRS 231) e um genótipo PI459025 com gene de resistência *Rpp4*, para a avaliação dos parâmetros epidemiológicos. Houve diferença significativa entre os cultivares para área abaixo da curva da incidência (AACPI). Os cultivares BRS 134, FT2 e BRS 231 apresentaram maior valor AACPI, e foram significativamente diferentes dos demais cultivares. Entre os cultivares com menor valor de AACPI destacou-se a PI 459025. Para área abaixo da curva da severidade (AACPS) ocorreu interação entre a severidade e os terços avaliados, sendo que o terço médio foi o que permitiu separar com maior precisão as cultivares. Em todos os terços a PI 459025 e a cultivar FT-2 apresentaram menor e maior AACPS, respectivamente. No estudo do processo de infecção, realizado com o material clareado e observado em microscópio de luz, não se observou diferença entre os cultivares em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo, pois em todos ocorreu formação do mesmo, mas houve diferença entre os cultivares na porcentagem de germinação, na formação de apressório e conseqüentemente na penetração. As PI 23097 (acrescentada neste estudo) e PI 429025 apresentaram baixa porcentagem de uredósporos germinados e de formação de apressório, essa formação começou seis horas após a inoculação, sendo que nos outros cultivares teve início com quatro horas após a inoculação. O cultivar Pintado apresentou 55% de uredósporos germinados e 27,5% de apressórios formados apesar de ser considerado um cultivar suscetível, essa menor porcentagem de germinação e formação de apressório pode estar relacionado com a grande quantidade de cera nas folhas. O cultivar FT-2 apresentou menor quantidade de cera nas folhas e uma maior porcentagem de

uredósporos germinados e com formação de apressório ficando atrás apenas do cultivar BRS 154 o qual apresentou maior porcentagem de germinação (85,5%) e maior porcentagem de formação de apressório (66,5%). Na análise das amostras em MEV foi possível observar todo processo de infecção desde a germinação dos uredósporos até a colonização do tecido do hospedeiro e do início de formação das urédias. Tanto a formação de apressórios, como as penetrações ocorreram nas junções das células da epiderme e não no centro das células através da cutícula. Após 24 horas da inoculação os uredósporos começaram a murchar e com 48 horas os apressórios. Através da remoção da epiderme foi possível observar a formação das hifas primárias 48 horas após a inoculação e o desenvolvimento progressivo do micélio até o início da formação das urédias com 240 horas. Vários aspectos do processo são mostrados neste trabalho através das eletromicrografias de varredura.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

ABSTRACT

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Study of the preservation of *Phakopsora pachyrhizi*. Sydow & Sydow, epidemiological and ultra-structural aspects of its interactions with soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Lavras: UFLA, 2005. 92p. Dissertation (Master in Phytopathology).*

The soybean rust (caused by *Phakopsora pachyrhizi*) is an economically important disease has been caused substantial yield losses in soybean in Brazil on the last years. This study had been carried to evaluate the effect of different methods of storage on the preservation of uredospores and epidemiological and ultrastructural aspects of the interaction of this pathogen and soybean. Of the five tested methods the liquid nitrogen was of better resulted, therefore besides preserving inoculum for more time and also allowed the recovery of the viability from some samples. To study epidemiological aspect in this patosystem, the cultivars used were Uirapuru, BRS 134 Pintado, BRS 154, BRS 215, BRS 231, FT 2 and PI 459025 with a Rpp4 gene of resistance for soybean rust. The cultivars BRS 134 Pintado, FT 2 and BRS 231 showed high values of AUDIC and were significant different from the others. PI 459025 showed the lowest value of AUDIC. AUDSC PI 459025 cultivar showed the lowest value and FT 2 showed the high value. In the study of In decolorized sample was not observed difference between the cultivars in relation at development of the germ tube, but it was observed difference between the cultivar in the percentage of germination, the formation of apressorium and consequently in the penetration. PI 429025 presented lower percentage of germinated uredospores (20%) and of appressoria formation (11%), and the cultivar BRS 154 presented greater percentage of germination (85,5%) and greater percentage of appressoria formation (66,5%). The cultivar Pintado presented 55% of germinated uredospores e 27,5% of formed apressories although to be considered one cultivar susceptible, this slow percentage of germination and formation of apressorium can be related with the fact of this cultivar to have presented a great amount of wax in the leaf and that can have interfered with the germination of the uredospores. The cultivar FT-2 presented less amount of wax in leaves and a bigger percentage of germinated uredospores and with formation of appressorium. The observation from germination to colonization by SEM showed that the formation of appressoria started four hours after the inoculation on all cultivar and with six hours on genotypes PI 23097 and PI 459025. The appressoria were formed on junction of epidermal cells and the penetration taken place between the anticlinal walls and not take place direct on cuticle. 24 and 48 hours after inoculation (h.a.i) the uredospores and appressoria started to wither, respectively. The primary hypha

was formed 48 (h.a.i) and with 240 (h.a.i) the uredia were formed. Several aspects of this process are showed in this study by SEM micrographs.

* Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie originária da China, na Ásia, onde vem sendo cultivada há centenas de anos. Foi semeada pela primeira vez no Brasil, no território baiano em 1882, mas somente a partir de 1940 começou a ganhar importância na agricultura brasileira e em 1949 no cenário internacional. Até a década de 80, as lavouras da oleaginosa se concentravam no sul (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina). Com a abertura das fronteiras agrícolas e graças às suas características nutritivas e industriais e à sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, o cultivo expandiu por todo o território brasileiro, constituindo-se numa das principais plantas cultivadas na atualidade. O Brasil é o segundo maior produtor de soja e na safra 2004, produziu cerca de 50 milhões de toneladas. Essa leguminosa também é um dos principais produtos da pasta de exportação brasileira. Em 2004 o país exportou aproximadamente 21 milhões de toneladas de grãos, sendo que os principais compradores do grão foram a Holanda (1.140.425 mil/t), a China (585.553mil/t), a Alemanha (557.163mil/t) e a Espanha (371.146 mil/t) (Embrapa Soja 2004).

O segredo da competitividade brasileira está na produtividade da cultura. Enquanto a área plantada cresceu 18% na década de 90, o rendimento médio da cultura saltou de 1740 kg/ha para 2395 kg/ha, no mesmo período. O maior estado produtor brasileiro é o Mato Grosso, com uma área de aproximadamente quatro milhões de hectares, com uma produção de cerca de 13 milhões de toneladas e produtividade média de 3100 kg/ha, compatível com a norte-americana. O Paraná é o segundo produtor do grão, plantando uma área de 3,5 milhões de hectares, produtividade média de 3000 kg/ha e produção de 10,6 milhões de toneladas aproximadamente. O terceiro produtor brasileiro é o Rio

Grande do Sul, com área semelhante à do Paraná, porém, com menor produtividade, em média 2200 kg por hectare, totalizando uma produção de cerca de 7 milhões de toneladas. O estado de Minas Gerais é o sétimo colocado, com uma produção de 2659 mil toneladas.

Dentre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção de soja estão as doenças. No mundo, são conhecidas mais de 100 doenças na cultura da soja dependendo do local, algumas atingem níveis de dano econômico e outras passam despercebidas. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil, dentre elas, a ferrugem da soja, de ocorrência recente no Brasil e com potencial para causar danos elevados à cultura.

Estima-se que mais de 60% da área de soja brasileira tenha sido atingida pela ferrugem na safra 2001/2002, resultando em perdas de grãos de 569,2 mil toneladas, o equivalente a US\$ 125,5 milhões (US\$ 220,50 t). Na safra 2002/2003, as perdas foram estimadas em 3,4 milhões de toneladas, correspondendo ao valor de US\$ 737,4 milhões (US\$ 220,0/t) tendo mais de 80% de área sido afetada. Na safra 2003/2004, as perdas foram ainda maiores e chegaram a 4,6 milhões de toneladas, associadas ao que deixou de ser colhido e aos gastos com fungicidas e a sua aplicação, as perdas foram de, aproximadamente US\$ 2 bilhões (US\$ 266,72/t) (Yorinori & Lazzarotto, 2004).

Esta doença tem como agente etiológico duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*. A primeira *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, agente etiológico da ferrugem "americana", é nativa do Continente Americano e ocorre em leguminosas silvestres e cultivadas, desde Porto Rico até o sul do estado do Paraná (Ponta Grossa) Trata-se de um fungo mais restrito a áreas de clima mais ameno e raramente causa danos econômicos. A segunda *P. pachyrhizi* Sydow & Sydow, agente etiológico da ferrugem "asiática", presente na maioria dos países que cultivam a soja.

A ferrugem da soja desenvolve-se mais lentamente em alguns cultivares de soja do que em outros. Vários foram os mecanismos sugeridos para explicar esse tipo de resistência, denominado "slow rusting". Esses possíveis mecanismos são a redução da penetração no hospedeiro, a diminuição do desenvolvimento do micélio dentro do tecido do hospedeiro, o aumento do tempo antes da erupção das pústulas e a redução na produção dos uredósporos (Sztejnberg e Wahl, 1976). Baseado nessas informações, o estudo da ultraestrutura dos cultivares de soja é uma das possibilidades para explicar esse tipo de resistência. A hipótese é a de que os fatores estruturais pré e pós-formados são os responsáveis por conferir resistência dos cultivares de soja ao agente da ferrugem.

Estudos ultra-estruturais dos tecidos das plantas suscetíveis e resistentes ao agente da ferrugem da soja podem revelar os mecanismos de defesa utilizados por elas. Estas informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de cultivares com resistência à doença, dessa forma contribuindo para a aplicação de uma técnica barata e eficaz de manejo da doença, ou seja, a resistência. Outro fator importante para o desenvolvimento de trabalhos com este patógeno é o modo de preservação do inóculo. O inóculo das ferrugens, na maioria das vezes, é mantido em plantas e isso pode causar sérios problemas como contaminação por outras raças do mesmo patógeno, ou por outros fungos, além de ser um trabalho muito demorado e de dedicação constante (Prescott & Kernkamp, 1971). Outro inconveniente é que, em algumas regiões, não se pode ter plantas de soja inoculadas com o patógeno o ano inteiro, pois o clima não é propício para o desenvolvimento da doença.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) estudar o melhor método de armazenamento de uredósporos de *P. pachyrhizi*; ii) estudar a epidemiologia da ferrugem em alguns cultivares de soja apresentando diferentes níveis de resistência e suscetibilidade; iii) avaliar, a nível ultra-estrutural, os eventos de pré-penetração e penetração que podem levar ao estabelecimento de

relações parasíticas em alguns cultivares de soja com diferentes níveis de resistência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agentes etiológicos

A ferrugem da soja tem, como agente etiológico, duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*, *Phakopsora pachyrhizi* e a *Phakopsora meibomiae*. Os primeiros relatos de *P. pachyrhizi* datam de 1902 no Japão. Já em 1914, a doença apareceu em vários outros países orientais, causando uma série de epidemias no sul da Ásia. *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, agente etiológico da ferrugem "americana", encontrada na América, foi identificada pela primeira vez em Porto Rico, em 1976 (Vakili, 1978) e no Brasil, em Lavras, MG, em 1979 (Deslandes, 1979). É ainda vista esporadicamente em cultivos comerciais de soja no Planalto Central, DF, Cristalina, GO e em Minas Gerais (Região do Triângulo Mineiro). Na Região Sul, ocorre anualmente, sem causar danos significativos, nos municípios de Londrina, Tamarana, Mauá da Serra, Faxinal e Ponta Grossa, no Paraná. Desde sua primeira identificação no Brasil, em 1979, o único surto com perdas econômicas foi registrado em 1987/88, em São Gotardo, Minas Gerais.

A ocorrência da doença nas diversas regiões produtoras tem variado, com anos de presença bastante visível e anos de ausência. Além da soja, o fungo infecta, naturalmente, 42 espécies em 19 gêneros de leguminosas e mais 18 espécies em 12 gêneros, quando inoculadas artificialmente (Hennen, 1995). Ela é mais comum no final da safra, em soja safrinha (outono/inverno) e em tigueria, estando restrita às áreas de clima mais ameno, localizadas no sul do e estado do Paraná e nas regiões altas dos Cerrados (Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais).

P. pachyrhizi Sydow & Sydow, causadora da ferrugem "asiática", encontra-se presente na maioria dos países que cultivam a soja e, a partir da

safr de 2000/2001, também no Brasil e no Paraguai. Em 5 de março de 2001, uma epidemia de ferrugem foi constatada causando sérios prejuízos no município de Pirapó (Itapúa). (Morel, 2001; Yorinori et al. 2002). Posteriormente, em levantamento realizado no período de 23 a 25 de maio de 2001, em soas guaxas e de safrinha, foi constatada severa incidência da doença desde Capitán Miranda até Colônia e Guazú (Ruta 7, km 45), no Paraguai. No Estado do Paraná, a doença foi identificada em maio de 2001. Na safr 2001/2002 apresentou grande expansão atingindo os estados do RS, de SC, do PR, de SP, de MG, do MS, do MT e de GO. A doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento varia entre 18°C a 28°C. Em condições ótimas, as perdas na produtividade podem variar de 10% a 80%.

2.2 Taxonomia

Os fungos causadores da ferrugem da soja são assim classificados:

Reino: Fungi

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Uredinales

Família: Phakopsoraceae

Nome atual: *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow

Phakopsora meibomiae (Arthur) Arthur

2.3 Ciclo de vida

O fungo *P. pachyrhizi* é descrito normalmente em estágio de urédia e télia. Não se sabe ao certo se ele produz os cinco estágios do ciclo de vida das

ferrugens. Green, (1984) em seu trabalho, não conseguiu observar o estágio 0, que é a espermogamia e o estágio I de aécio. Apenas foi verificado o estágio II, de urédias, as quais são anfigenas, porém, com a maior parte na face abaxial da folha. O estágio III, formação de télia, é confundida com a urédia. A cor da télia é castanha a chocolate e possui de 2 a 7 esporos na camada interna (ONO et al., 1992). O Estágio IV, germinação do teliósporo formando a basídia, não foi observado por Green (1984) em seus trabalhos. Bromfield (1976) relatou que o papel do teliosporo no ciclo de vida do fungo *P. pachyrhizi* é desconhecido. Em 1991, Saksirirat e Hoppe observaram a germinação do teliósporos, mas, depois, tentaram reproduzir novamente o experimento e não obtiveram sucesso.

2.4 Modo de penetração

A penetração na folha do hospedeiro é direta entre as junções da célula epidérmica e muito raramente ocorre por estômato. Para germinar o uredósporo precisa formar um tubo germinativo curto, delimitado por um apressório, terminando em um septo. O apressório é freqüentemente sessil ao uredósporo. Da base do apressório, desenvolve um *peg* de penetração que penetra pela cutícula do hospedeiro e pela parede da célula epidermal. A penetração da célula epidermal ocorre 6 horas após a inoculação. Uma vez dentro da célula epidermal o *peg* de penetração expande-se para formar a vesícula epidermal e logo depois a hifa de penetração que atravessa a célula da epiderme e emerge no espaço intercelular e no tecido do mesófilo. Um septo é formado na porção intercelular da hifa de penetração, enquanto a hifa primária se estende para formar a hifa secundária (Koch et al., 1983). Este tipo de penetração direta é raro em ferrugens, mas, por outro lado, torna o patossistema *Phakopsora*-soja de grande valor para estudos ultra-estruturais. Neste tipo de penetração pode ocorrer uma

série de eventos que levam à formação de barreiras estruturais pela planta, os quais podem levar à resistência da mesma ao patógeno.

2.5 Sintomatologia

Os primeiros sintomas da ferrugem são caracterizados por minúsculos pontos (máximo 1mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeado. Estas lesões podem aparecer nos pecíolos, nas vagens e nos ramos, porém, são mais abundantes nas folhas, principalmente na superfície inferior. O número de pústulas, também chamadas de urédias aumentam com a idade da lesão e adquirem cor castanho-claro a castanho-escuro, abrem-se em um minúsculo poro, expelindo os uredósporos. Os uredósporos, inicialmente de coloração hialina, à medida que envelhecem se tornam de cor bege. Estes se acumulam ao redor dos poros e com o tempo são carregados pelo vento.

O número de urédias por lesão pode variar de uma a seis, à medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha ao redor das primeiras urédias adquire coloração castanho-claro (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão do tipo “reddish-brown” - RB) e são facilmente visíveis em ambas às faces da folha. As urédias que deixaram de esporular apresentam as pústulas, nitidamente, com os poros abertos, o que permite distinguir da pústula bacteriana, com as quais são freqüentemente confundidas.

A ferrugem pode também ser facilmente confundida com as lesões iniciais de mancha parda (*Septoria glycines*), que formam um halo amarelo ao redor de lesões necróticas, angular e castanho-avermelhadas. Em ambos os casos, as folhas infectadas amarelam, secam e caem prematuramente.

os uredósporos de *H.vastatrix* após serem retirados do nitrogênio líquido precisavam de um choque térmico de 40° C por um período de 5 a 15 minutos para que houvesse a quebra de dormência, já os uredósporos de *U. phaseoli typica* não necessitavam de tratamentos posteriores.

2.9 Ultra-estrutura

Trabalhos a nível ultra-estutural utilizando a microscopia eletrônica de varredura já foram desenvolvidos com o patossistema *P. pachyrhizi*/soja. McLean & Byth, (1981) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de uredósporos de *P. pachyrhizi* em cultivares suscetíveis, resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todos os cultivares não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo. Houve diferença na porcentagem de uredósporos germinados, formação de apressório e penetração. Os cultivares Tainung-3 e Tainung-4 apresentaram-se resistentes à germinação dos uredósporos, portanto, a resistência desses cultivares é de pré-penetração e penetração e o cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos uredósporos, pois eles germinavam e penetravam no tecido do hospedeiro, mas não conseguiam desenvolver. Esses resultados mostraram que no estudo comentado, a resistência ocorreu na fase de pós-penetração.

Outro fator importante que pode levar à resistência dos cultivares é a constituição química e topográfica das folhas. Allent et al. (1991) aplicaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) para estudar estes fatores em 27 espécies de fungos ferruginosos, dentre eles *P. pachyrhizi*. Perceberam que, em locais da folha nos quais as diferenças no plano topográfico atingiam aproximadamente 0,4-0,8µm, o fungo formava apressório, tendo as diferenças sido menores que o número acima a formação de apressório eram

série de eventos que levam à formação de barreiras estruturais pela planta, os quais podem levar à resistência da mesma ao patógeno.

2.5 Sintomatologia

Os primeiros sintomas da ferrugem são caracterizados por minúsculos pontos (máximo 1mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeado. Estas lesões podem aparecer nos pecíolos, nas vagens e nos ramos, porém, são mais abundantes nas folhas, principalmente na superfície inferior. O número de pústulas, também chamadas de urédias aumentam com a idade da lesão e adquirem cor castanho-claro a castanho-escuro, abrem-se em um minúsculo poro, expelindo os uredósporos. Os uredósporos, inicialmente de coloração hialina, à medida que envelhecem se tornam de cor bege. Estes se acumulam ao redor dos poros e com o tempo são carregados pelo vento.

O número de urédias por lesão pode variar de uma a seis, à medida que prossegue a esporulação, o tecido da folha ao redor das primeiras urédias adquire coloração castanho-claro (lesão do tipo TAN) a castanho-avermelhada (lesão do tipo “reddish-brown” - RB) e são facilmente visíveis em ambas as faces da folha. As urédias que deixaram de esporular apresentam as pústulas, nitidamente, com os poros abertos, o que permite distinguir da pústula bacteriana, com as quais são freqüentemente confundidas.

A ferrugem pode também ser facilmente confundida com as lesões iniciais de mancha parda (*Septoria glycines*), que formam um halo amarelo ao redor de lesões necróticas, angular e castanho-avermelhadas. Em ambos os casos, as folhas infectadas amarelam, secam e caem prematuramente.

2.6 Condições ambientais favoráveis

Segundo Sinclair & Backman (1989), as epidemias mais severas de ferrugem foram observadas em áreas onde as temperaturas médias diárias são menores que 28°C, com precipitações ou longos períodos de molhamento foliar (10 a 12 horas) ocorrendo por toda safra. Os uredósporos germinam entre três e seis horas sob temperaturas de 14°C a 29°C, porém, a germinação e a penetração no tecido da folha podem ocorrer à temperatura variando de 8°C a 28°C (Sinclair & Hartman, 1999).

Em condições de casa-de-vegetação, sob ausência de luz e a 20°C, uredósporos de *P. pachyrhizi* iniciaram a germinação em uma hora e meia, a partir do momento em que se iniciou o orvalho, atingindo o máximo após 6 a 7 horas. Após 8 horas de orvalho e sob temperaturas de 18°C a 26,5°C, a quantidade de lesões resultantes foi 10 vezes maior do que após 6 horas sob as mesmas temperaturas. O surgimento das primeiras lesões ocorreu sete dias após a inoculação e a produção de uredósporos secundários iniciou-se aos nove dias (Melching et al., 1979). Em estudos realizados em casa-de-vegetação na Embrapa Soja, Londrina, observou-se que as primeiras lesões podem ser visíveis 5 a 6 dias após a inoculação e as primeiras frutificações (urédias) podem ser visíveis 6 a 7 dias após a inoculação (Godoy & Canteri, 2004).

Os uredósporos são facilmente disseminados para lavouras próximas ou a longas distâncias, pelo vento.

2.7 Resistência varietal

Segundo Van Der Plank, (1966), a resistência de plantas a doenças pode ser classificada em: resistência vertical ou específica capaz de atuar com grande eficiência sobre raças específicas do patógeno e resistência horizontal,

inespecífica ou de campo, caracterizada por ser ativa contra as raças do patógeno, embora com eficiência inferior e podendo ser afetada por fatores do ambiente.

Na soja tem sido observado um tipo de resistência responsável por retardar o progresso da doença, ou seja, diminuir a velocidade da doença ao longo do tempo, denominada como horizontal. Outro fato observado é que genótipos resistentes na fase vegetativa passam a sofrer os efeitos da doença na fase reprodutiva e culminam em baixo rendimento denominado como resistência da planta jovem. Isso foi verificado no ensaio de competição de variedades de soja realizado anualmente na área experimental da Fundação Chapadão, na safra 2001/2002, onde os materiais foram avaliados quanto ao comportamento em relação à ferrugem. Conforme a soja foi evoluindo no seu ciclo, o índice de doença aumentou e o número de trifólios na haste principal decresceu (Andrade & Andrade, 2002).

A obtenção de cultivar de soja resistente à ferrugem asiática tem sido um desafio para a pesquisa. Genes dominantes para resistência qualitativa, denominados *Rpp1* a *Rpp4*, identificados em introduções de plantas (PI's) e cultivares são relatados na literatura (Bromfield & Hartwig, 1980; McLean & Byth, 1980; Hartwig, 1986). No entanto, a estabilidade dessa resistência é duvidosa, devido à grande variabilidade do patógeno. Em Taiwan observou-se a existência de pelo menos uma raça, contendo três genes de virulência. (Bromfield, 1981). Dezoito raças foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão (Yamaoka et al., 2002).

A busca por variedades resistentes à ferrugem da soja no Brasil iniciou-se no inverno de 2001, onde testes em condições controladas de casa-de-vegetação, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, identificaram cultivares com resistência a essa doença, baseado na presença de lesões de hipersensibilidade do tipo RB. As variedades BRS 134, BRSMS Bacuri, CS 201, FT-17, FT-2,

IACpl1, KIS 601 e OCEPAR 7, quando inoculadas com esporos de *P. pachyrhizi*, apresentavam reação de hipersensibilidade, produzindo lesões RB com pouca ou nenhuma esporulação (Yorinori et al., 2002b). Com base na genealogia desse grupo de variedades, verificou-se que a resistência era derivada da cultivar FT-2 e determinada por um gene dominante. Essa resistência foi quebrada rapidamente com isolado do fungo proveniente do Mato Grosso. Das quatro fontes de resistência já descritas na literatura, apenas aquelas com os genes *Rpp2* e *Rpp4* permanecem resistentes à ferrugem no Brasil (Arias et al., 2004).

2.8 Conservação do inóculo

Vários métodos de preservação de uredósporos são descritos na literatura para diversos gêneros de ferrugem, mas para o fungo causador da ferrugem da soja muito pouco se sabe sobre armazenamento dos esporos.

Trabalhos realizados por Schein (1962), mostram que os uredósporos das ferrugens perdem rapidamente sua viabilidade quando cuidados especiais não são tomados no sentido de preservá-lo. Na preservação *in vitro* da viabilidade dos uredósporos das ferrugens, a temperatura de 5°C e umidade em torno de 50%, são condições ideais para armazenamento a curto e em médio prazo. Kilpatrick, (1967) e Nutman & Roberts, (1965), estudando a biologia de *Hemileia vastatrix* encontraram que uredósporos armazenados secos possuíam vida relativamente curta perdendo 50% da viabilidade após 2 dias.

Akai, 1957 relatou que uredósporos de *Puccinia triticina* congeladas a temperatura de -10°C não germinavam após 60 dias de armazenamento. Flor 1954 trabalhando com uredósporos de *Melanpsora lini* verificou que a porcentagem de germinação após um ano de armazenamento, a esta mesma temperatura, caiu para 1%.

Esses métodos de armazenamento descritos anteriormente são usados para preservação da viabilidade dos uredósporos a prazo relativamente curto. Para a preservação de materiais biológicos Meryam 1956 recomenda a utilização de baixas temperaturas.

Schein 1962 constatou que a -60°C os uredósporos de *Uromyces phaseoli* var *phaseoli* mantiveram viabilidade residual de 40%, após um período de 670 dias de armazenamento, contudo, a -16°C os esporos estavam inviáveis de 1 a 5 meses após a instalação do experimento. Quando se utiliza nitrogênio líquido (-196°C), a preservação da viabilidade dos microorganismos tem sido muito mais eficiente Kirali (1970).

Kilpatrick et al. (1971) trabalhando com uredósporos de *Puccinia graminis* var. *tritici* verificaram que após dez anos de armazenamento, houve pouca perda de viabilidade quando esses uredósporos foram armazenados em nitrogênio líquido. Loering et al. (1966), trabalhando com o mesmo patógeno e com a mesma técnica de armazenamento, observaram que não houve alterações aparente na redução da viabilidade num período de cinco anos. Outros estudos têm sugerido que nem todos os fungos podem ser preservados em nitrogênio líquido (Doebler & Rinfret 1963, Wellman & Waldem 1967).

Loeering et al. (1966), afirmaram que temperatura de -196°C induz dormência nos uredosporos. Bronfield (1964) e Loeering et al. (1962), trabalhando com *P. graminis* var *tritici*, concluíram que a temperatura ultrafria do nitrogênio líquido não mata os uredospóros, mas induz uma dormência que é reversível pelo calor. Neste caso, torna-se necessário algum tratamento prévio ou posterior a armazenagem, visando quebrar a dormência induzida nos uredósporos. Bromfield (1964), Loeering et al. (1962) e Leath et al. (1966) afirmaram que, com choque térmico a 40°C por 5 minutos, obtêm-se os melhores resultados na quebra da dormência dos uredósporos, Zambolim, (1973) trabalhando com *Hemilèia vastatrix* e *Uromyces phaseoli* typica observou que

os uredósporos de *H.vastatrix* após serem retirados do nitrogênio líquido precisavam de um choque térmico de 40° C por um período de 5 a 15 minutos para que houvesse a quebra de dormência, já os uredósporos de *U. phaseoli* típica não necessitavam de tratamentos posteriores.

2.9 Ultra-estrutura

Trabalhos a nível ultra-estutural utilizando a microscopia eletrônica de varredura já foram desenvolvidos com o patossistema *P. pachyrhizi*/soja. McLean & Byth, (1981) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de uredósporos de *P. pachyrhizi* em cultivares suscetíveis, resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todos os cultivares não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo. Houve diferença na porcentagem de uredósporos germinados, formação de apressório e penetração. Os cultivares Tainung-3 e Tainung-4 apresentaram-se resistentes à germinação dos uredósporos, portanto, a resistência desses cultivares é de pré-penetração e penetração e o cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos uredósporos, pois eles germinavam e penetravam no tecido do hospedeiro, mas não conseguiam desenvolver. Esses resultados mostraram que no estudo comentado, a resistência ocorreu na fase de pós-penetração.

Outro fator importante que pode levar à resistência dos cultivares é a constituição química e topográfica das folhas. Allent et al. (1991) aplicaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) para estudar estes fatores em 27 espécies de fungos ferruginosos, dentre eles *P. pachyrhizi*. Perceberam que, em locais da folha nos quais as diferenças no plano topográfico atingiam aproximadamente 0,4-0,8µm, o fungo formava apressório, tendo as diferenças sido menores que o número acima a formação de apressório eram

reduzidas. Esses fatores estão diretamente ligados à orientação e ao crescimento do tubo germinativo. Bonde et al. (1976) e Koch et al. (1983) utilizaram a ML e MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nesta interação, inclusive que a penetração deste fungo é direta sobre as folhas da epiderme. Mais recentemente, Adendorff e Rijkenberg (2000) aplicaram a MEV no estudo do processo de infecção de outra espécie de *Phakopsora*, a *P. apoda*, mostrando que o processo é bem semelhante aos de *P. pachyrhizi*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from urediospores of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, New York, v. 104, n. 3, p. 317-324, Mar. 2000
- AKAI, S. On the resistance of urediospores of *Puccinia triticina* to low temperature. **Ann. Phytopathology. Soc. Japan**, 19 (1-2): 15-17, 1954. In: **Revi. Appl. Mycology**. 36:13, 1957.
- ALLEN, E. A., HAZEN, B.E., HOCH, H.C., KWON, Y., LEINHOS, G.M.E., STAPLES, R.C., STUMPF, M. A., TERHUNE, B. T. Appressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 1, p. 323-331, 1991.
- ANDRADE, P. J. M. & ANDRADE, D. F. A. A. **Ferrugem Asiática: uma ameaça à soja cultura brasileira**. Dourados, MS. Fundação Chapadão (Circular Tecnica nº 1) 2002.
- ARIAS, C.A.A.; RIBEIRO, A.S.; YORINORI, J.T.; BROGIN, R.L.; OLIVEIRA, M.F. & TOLEDO, J.F.F. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakospora pachyrhizi* Sidow). **Anais, VII World soybean research conference**, Foz do Iguaçu, PR. 2004. p.100.
- BONDE, M.R.; MELCHING, J.S. & BROMFIEL, K.R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora*

pachyrhizi the cause of soybean rust. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 4, p.1290-1294. 1976.

BROMFIELD, K. R. Cold-induced dormancy and its reversal in uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, n. 1, p. 68-74, 1964.

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

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.

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. Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing. **Journal. Bacteriology**, v. 85, n. 1, p. 485, 1963.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Perdas de grãos com a ferrugem da soja**. Disponível em:
>[http://www.embrapacnpso.br/sistema de alerta da ferrugem.php](http://www.embrapacnpso.br/sistema%20de%20alerta%20da%20ferrugem.php)>. Acesso em:
20 nov. 2004.

FLOR, H.H. Longevity of urediospores of flax rust. **Phytopathology**, St. Paul, v. 44, n. 1, p. 469-471, 1954.

GOODOY, 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./feb. 2004.

GREEN, A. **Soybean rust**. Pests not known to occur in the United States or of Limited Distribution. Nº 56. **USDA-APHIS-PPQ**. 1984.

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

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Minnesota, USA: APS PRESS, 1999.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. **Crop Science** Madison, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, Nov./Dec. 1986.

HENNEN, J. F. The taxonomy of the soybean rusts. In: **SOYBEAN RUST WORKSHOP**, 1995, Urbanna, Illinois. **Proceedings...** College of Agricultural, consumer, and environmental Sciences, National Soybean Research Laboratory, 1995. v. 1, p. 29-32.

KILPATRICK, R.A. & MABEY, C. L. Survival of selected fungi stored in liquid nitrogen. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 539-540, 1976.

KIRALI, Z. **Methods in Plant Pathology** (With specie reference to breeding for diseases resistance). 1^a. Ed. Acad. Kiadó de Budapest, Hungria. 600p, 1970.

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. **Phytopathologische Zeitschrift**, Hamburg, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

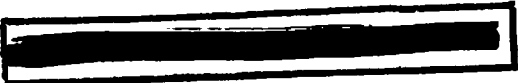
LEATH, K.T; ROMING, R.W & ROWELL, J.B. A system for storing rust spores in liquid nitrogen. **Phytopathology**, St. Paul, v. 56, n. 2, p. 570, 1966.

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

LOERING, 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, 1966.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 4, p. 461-463, Apr. 1976.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhiziz*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.



YORINORI, J. T.; YORINORI, M. A.; GODOY, C. V. Seleção de cultivares de soja resistentes à ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*). In: REUNIÃO SUL DE SOJA DA REGIÃO SUL, 30., 2002, Cruz Alta, RS. **Anais...** Cruz alta, RS, 2002b. p. 94.

WELLMAN, A.M & WALDEM, D.B. Qualitative and quantitative estimates of viability for some fungi after periods of storage in liquid nitrogen. **Canadium Journal of Microbiology**. V. 10, n. 1, p.585-593, 1964. In: **Plant Diseases Repoter**, v.51, n.1, p.539-540, 1967.

ZAMBOLIM, L. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura umidade relativa sobre a viabilidade dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br e *Uromyces phaseoli typica* Arth. 1973. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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, 1962.

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

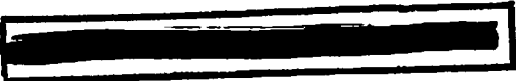
SZTEJNBERG, A.; WAHL, I. Mechanisms and stability of slow stem rusting resistance in *Avena sterilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 1, p. 74-80, Jan. 1976.

VAKILLI, N. G. Field observations and host range of soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* in Puerto Rico. In: WORKSHOP ON SOYBEAN RUST IN THE WESTERN, 1978, Hemisphere. **Proceedings...** Hemisphere, Porto Rico: Mayagenez Institute of Tropical Agriculture, 1978.

VAN DER PLANCK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. 2004. (Documentos/Embrapa Soja, n. 27).

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



YORINORI, J. T.; YORINORI, M. A.; GODOY, C. V. Seleção de cultivares de soja resistentes à ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*). In: REUNIÃO SUL DE SOJA DA REGIÃO SUL, 30., 2002, Cruz Alta, RS. *Anais...* Cruz alta, RS, 2002b. p. 94.

WELLMAN, A.M & WALDEM, D.B. Qualitative and quantitative estimates of viability for some fungi after periods of storage in liquid nitrogen. *Canadium Journal of Microbiology*. V. 10, n. 1, p.585-593, 1964. In: *Plant Diseases Repoter*, v.51, n.1, p.539-540, 1967.

ZAMBOLIM, L. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura umidade relativa sobre a viabilidade dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br e *Uromyces phaseoli typica* Arth. 1973. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO NA GERMINAÇÃO DE UREDÓSPOROS DE *Phakopsora* *pachyrhizi*.

1 RESUMO

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Efeito de diferentes métodos de armazenamento na germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. In: *Preservação de Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max*. (L.) Merrill). 2005. Cap. 2. P.23-37. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A ferrugem da soja, cujo agente etiológico é *P. pachyrhizi*, vem requerendo o desenvolvimento de pesquisas para entender o comportamento deste patógeno em nossas condições. Isso tem sido dificultado pelo fato dos uredósporos manterem a viabilidade por pouco tempo após serem retirados das plantas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes métodos de armazenamento na viabilidade do mesmo. O experimento foi realizado no DFP/UFLA. O inóculo foi multiplicado em plantas de soja mantidas em vasos em casa-de-vegetação. O material coletado foi armazenado em 5 diferentes condições: folhas herborizadas, dessecador (10°C), geladeira (4°C), deep-freezer (-80°C) e nitrogênio líquido (-196°C). Os uredósporos armazenados foram avaliados a cada trinta dias, em relação à porcentagem de germinação em meio agar-água 2%. Os uredósporos armazenados em nitrogênio líquido apresentaram maior porcentagem de germinação ao final das avaliações (270 dias). Os armazenados em dessecador apresentaram 0% de germinação no terceiro mês de avaliação e foram então transferido para o nitrogênio líquido e no mês seguinte apresentou 20% germinação. Portanto, o nitrogênio permitiu a recuperação da viabilidade dos uredósporos. Os uredósporos armazenados em geladeira apresentaram uma queda aos sessenta dias chegando a menos de 2% de germinação e, aos noventa dias, a germinação chegou a zero. Os uredósporos armazenados em folha herborizada sofreram uma queda brusca na germinação no primeiro mês, que foi de menos de 2% e, no mês seguinte, foi reduzida a 0%. Os uredósporos armazenados em deep-freezer apresentaram viabilidade até o terceiro mês de avaliação, depois chegou a zero. Com estes resultados, concluiu-se que quanto menor a temperatura o esporo permanece viável por mais tempo e o melhor método de armazenamento de uredósporos de *P. pachyrhizi* foi o nitrogênio líquido, que além de manter a viabilidade, permitiu a recuperação da mesma em tratamentos que já apresentavam baixos índices de germinação.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

2 ABSTRACT

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Effect of different methods of storage in the germination of uredospores of *Phakopsora pachyrhizi* In: Study of the preservation of *Phakopsora pachyrhiz* Sydow & Sydow and epidemiological and ultrastructural aspects of its interactions with soybean (*Glycine max* (L.) Merrill. 2005. Cap. 3. p. 23-37. Dissertation (Master in Phytopathology). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The soybean rust, whose etiologic agent is *P. pachyrhizi*, has been responsible for great damages in the last years in the Brazilian soybean field. That requires the development of research programs that help to understand the behavior of this pathogen in our conditions. The short viability of uredospores is the drawback conduct some researches on that disease. The objective of this work was to evaluate the effect of different methods of storage in the viability of the uredospores. The experiment was carried out in the Laboratory of the Phytopathology Department of UFLA. The inoculum was multiplied and kept on plants of soybean grown in pots in greenhouse. The uredospores collected was stored in 5 different conditions: detached dry leaves, desiccator (10°C), refrigerator (4°C), deep-freezer (-80°C) and liquid nitrogen (-196°C). The percentagem of germination stored uredospores was evaluated every thirty days, in water-agar medium. Spores stored in liquid nitrogen presented higher germination percentage. In desiccator the germination was nilling at the third month of evaluation, and that increased to 20% when uredospores were transferred to and kept in liquid nitrogen. The uredospores stored in the refrigerator presented a decline in germination the sixty days reading less than 2% and at the ninety days the germination declined to nill. On detached leaves uredospores suffered a big decline at the end of the first month storage. Under deep-freezer condition uredospores presented high rate of viability until the third month of evaluation, declining however later to nill. Based on these results lower temperature provided more appropriate conditions to storing uredospores of *P. pachyrhizi*. Then, storing spores in the liquid nitrogen was seen the rust efficient mean to keep viability of *P. pachyrhizi* longer.

* Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Estudos sobre genética, fisiologia e patogenicidade das ferrugens requerem a manutenção do inóculo de uredósporos por períodos longos. Usualmente, o inóculo de ferrugens é mantido no próprio hospedeiro ou em hospedeiros alternativos isso se deve ao fato do patógeno ser um fungo biotrófico. Essa técnica, entretanto, apresenta vários inconvenientes, pois, além de ser um trabalho demorado, exige dedicação constante, tornando-se assim a manutenção um processo complicado, sem contar que, em determinadas regiões, é impossível manter plantas de soja com o patógeno o ano inteiro. Além disso, pode acarretar contaminações, seja por outras raças do mesmo patógeno ou por outros fungos, além da possibilidade de ocorrer mutações do patógeno, devido às sucessivas passagens no hospedeiro (Prescott & Kernkamp, 1971)

Os uredósporos de *P. pachyrhizi* assim como os de outras ferrugens perdem a viabilidade rapidamente se cuidados especiais não são tomados para preservá-los em condições fora do hospedeiro. Na literatura, são citados vários métodos de armazenamento visando à preservação de uredósporos de várias ferrugens, mas pouco se sabe a respeito do armazenamento de uredósporos de *P. pachyrhizi*.

Objetivo deste trabalho foi estudar o melhor método de armazenamento de uredósporos de *P. pachyrhizi* visando viabilizar a manutenção dos mesmos fora do hospedeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo e manutenção do inóculo

O cultivar BRS 154 foi semeado em vasos de plástico com 5kg de mistura de terra, areia e esterco (2:1:2) deixando-se quatro plantas por vaso. As plantas foram mantidas na casa-de-vegetação e inoculadas com o isolado de *P. pachyrhizi* proveniente da EMBRAPA Soja Londrina-PR, quando o segundo par de folhas trifoliada esta completamente expandido, o qual também se constituiu em fonte de inóculo para os trabalhos posteriores.

4.2 Coleta e tipos de armazenamento

Para o desenvolvimento desse experimento, foram utilizados cinco métodos de armazenamento já citados na literatura para diversas espécies de ferrugem. Após a coleta dos uredósporos, foram feitos testes de germinação para saber qual a porcentagem apresentada antes do armazenamento. Os tratamentos foram os seguintes:

Folha herborizada: folhas de soja com ferrugem foram coletadas de plantas mantidas em casa-de-vegetação, as folhas coletadas foram armazenadas em jornais e colocadas em prensas para secar, e depois de secas, foram colocadas em jornais novos e armazenadas no laboratório em temperatura ambiente.

Geladeira: os esporos foram coletados pelo método de batida, no qual foi colocado um papel branco em baixo das plantas e, com leves batidas nas folhas, os esporos caíam, sendo colocados em microtubos para serem armazenados em geladeira a 4°C.

Dessecador: os esporos foram coletados da mesma maneira que o anterior e colocados dentro de microtubos, em seguida eram colocados em dessecador e armazenados em câmara fria a 10°C.

Deep-Freezer: o mesmo método de coleta foi usado. Os microtubos contendo os esporos foram armazenados dentro de uma caixa de isopor e colocados em deep-freezer, com temperatura que variou de 60°C a 70°C.

Nitrogênio Líquido: foram armazenados dois tratamentos. No primeiro, os esporos foram coletados de maneira idêntica aos tratamentos anteriores e colocados em microtubos, em seguida acomodados em caniços e armazenados no botijão de nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C; no segundo tratamento, foram armazenados os esporos do dessecador que no terceiro mês apresentaram zero % de germinação.

4.3 Teste de germinação

Para o teste de germinação utilizou-se a suspensão de um mg de uredósporos de *P. pachyrhizi*/mL de água + 0,05 mL tween sendo essa a concentração usada em todas as avaliações (Valle, 1987). As amostras foram retiradas do local de armazenamento, pesadas e colocadas em Becker com água e tween, agitando por três minutos. Em seguida, foram transferidas para placas de Petri de nove cm de diâmetro contendo meio agar-água 2%. Foram colocados 50 µL da suspensão em cada placa e espalhada com o auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram acondicionadas em BOD a 23°C, no escuro, por 4 horas. Após a incubação, avaliou-se a porcentagem de germinação com o auxílio de microscópio de luz. Os uredósporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo era duas vezes maior que o tamanho do esporo.

4.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri dividida em quatro compartimentos, cinquenta esporos foram observados por compartimento, totalizando assim 200 esporos por placa.

4.5 Análise dos dados

Devido a grande quantidade de valor zero de germinação a fórmula para área abaixo da curva de progresso da germinação (AACPG), foi ajustada elevando ao quadrado. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0.5$. As análises foram feitas no programa SISVAR (Ferreira, 2000), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os tratamentos foi determinada a porcentagem de germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi* antes do armazenamento, cujos valores variaram entre 89% a 91%. Houve diferença significativa entre os métodos de conservação para AACPG (Tabela 3A, 4A, 5A e 6A). O método de armazenamento nitrogênio líquido apresentou menor valor de AACPG seguido dos armazenados em dessecador e deep-freezer, e os armazenados em folha herborizada e geladeira apresentaram maior AACPG (Tabela 1).

TABELA 1. Área abaixo da curva de progresso da germinação (AACPG) de uredósporos de *P. pachyrhizi*. UFLA, Lavras, MG, 2005.

TRATAMENTO	AACPG
Nitrogênio líquido	4928,3 a
Dessecador	2115,7 b
Deep-freezer	989,5 c
Folha herborizada	181,7 d
Geladeira	169,2 d

* Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nos uredósporos armazenados em nitrogênio líquido, observou-se queda de 40% na germinação após 30 dias, em seguida, ocorreu o retorno na germinação, apresentando aumento progressivo até os 120 dias, chegando a 70%, a partir desse período houve queda de 10%, estabilizando-se nos meses seguintes (Figura 1A). Este tipo de comportamento não foi relatado para outros gêneros de fungos causadores de ferrugem. Kilpatrick et al. (1971) trabalhando com uredósporos de *Puccinia graminis* var. *tritici*, verificaram que, após dez anos de armazenamento em nitrogênio líquido, houve pequena redução na viabilidade. Loering et al. (1966), trabalhando com o mesmo patógeno e com a mesma técnica de armazenamento, observou que não houve alterações aparentes na redução da viabilidade, num período de cinco anos.

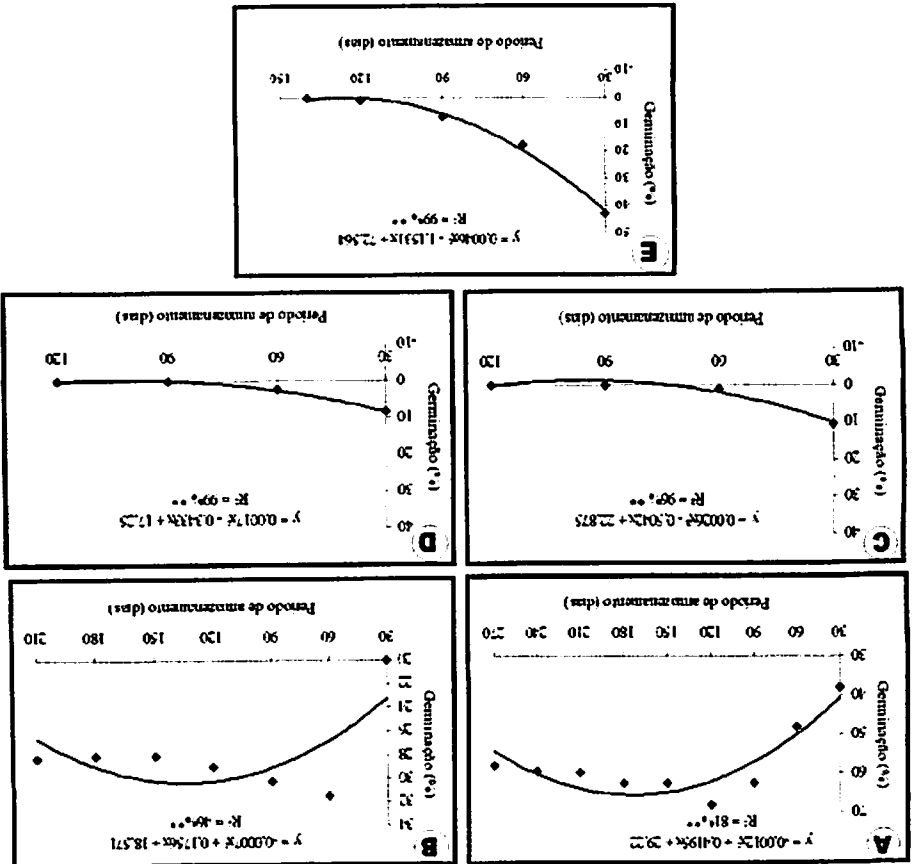
Os uredósporos armazenados no dessecador apresentaram 91% de germinação antes do armazenamento e, aos 30 dias após o armazenamento, houve uma queda brusca na porcentagem de germinação, chegando a 2% e, aos 90 dias, a germinação chegou a zero. Os uredósporos armazenados nessas condições, após perda total da germinação, foram transferidos para o nitrogênio líquido e, 30 dias após o armazenamento, foi realizada a avaliação na qual se observou aumento de 20% na germinação, chegando a 30% aos 60 dias. A partir desse período os uredósporos apresentaram queda de menos de 10% na porcentagem de germinação, mantendo-se estável até o final das avaliações (Figura 1B). Observou-se que a queda na germinação dos uredósporos armazenados no dessecador não representou a morte de todos os esporos, e sim um estágio de dormência de grande parte deles, a qual foi parcialmente quebrada quando os mesmos foram expostos ao nitrogênio líquido.

Este comportamento é totalmente contrário aos encontrados por Bromfield (1964) e Loreing et al. (1962) com o fungo *P. graminis* var. *tritici*, nos quais a temperatura ultra fria do nitrogênio líquido induziu dormência nos uredósporos, a qual foi revertida pelo calor. Portanto neste, caso, foi necessário

um tratamento posterior à armazenagem, visando à quebra de dormência. Mas, com o fungo *P. pachyrhizi* ocorreu o contrário os esporos, quando foram retirados do dessecador, estavam dormentes pois não estavam germinando e, quando foram colocados no nitrogênio líquido após um mês de armazenamento voltaram a germinar. Isso nos leva a crer que o nitrogênio líquido quebra a dormência dos uredósporos.

O tratamento com folha herborizada teve uma queda brusca aos 60 dias, isso foi verificado devido à redução na porcentagem de germinação que caiu de 97% para 2%, chegando a zero aos 90 dias (Figura 2A). Os uredósporos armazenados em geladeira apresentaram queda mais acentuada na germinação, mas perderam todo poder germinativo na terceira avaliação, ou seja, aos 90 dias (Figura 2B). No armazenamento em Deep-freezer, os uredósporos foram perdendo o poder germinativo aos poucos chegando a zero aos 150 dias após a avaliação (Figura 2C)

FIGURA 1. Equação de regressão para porcentagem de germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* armazenados em nitrogênio líquido (A), dessecador/nitrogênio líquido (B), folha herborizada (C), geladeira (D) e deep-freezer (E).



Dessa forma verificou-se que a temperatura baixa do nitrogênio líquido (-196°C) oferece boas condições para a preservação do poder germinativo dos uredósporos de *P. pachyrhizi* e as temperaturas altas do dessecador (10°C), geladeira (4°C) e da folha herborizada (24°C a 30°C) causam quedas bruscas podendo induzir dormência e morte dos mesmos. Estes dados levam a crer que uma das explicações para a capacidade de uredósporos de *P. pachyrhizi* disseminarem-se por longas distâncias está no fato de as baixas temperaturas manterem sua viabilidade, já que os mesmos a perdem com pouco tempo longe da urédia-mãe. Como os mesmos utilizam correntes aéreas elevadas para a dispersão, nas quais as temperaturas são extremamente baixas, permitindo que mantenham sua viabilidade e também que ocorra a quebra de dormência. Este fato já foi verificado para a ferrugem do trigo *P. graminis* var. *tritici* nos Estados Unidos, quando ocorre migração de esporos dos campos do Sul para o Norte do País (Nagarajan & Singh, 1990).

6 CONCLUSÕES

1. As temperaturas mais baixas foram as que mantiveram o poder germinativo dos uredósporos por mais tempo.

2. O nitrogênio líquido foi o melhor método de armazenamento para uredósporos de *P. pachyrhizi*, pois, além de manter o inóculo viável por um longo período, também permitiu a recuperação do poder germinativo dos que não estavam mais germinando.

3. Os tratamentos dessecador, deep-freezer, geladeira e folha herborizada não apresentaram eficiência na preservação do poder germinativo dos uredósporos de *P. pachyrhizi* por períodos longos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. Reunião Annual da Região Brasileira Da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...**São Carlos: UFScar, 2000. p.235.

KILPATRICK, R.A. & MABEY, C. L. Survival of selected fungi stored in liquid nitrogen. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 539-540, 1976.

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

LOERING, 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, 1966.

NAGARAJAN, S., & SINGH, H. Longe-distance dispersion of rust pathogens. **ANNUAL Review Phytopathology**, Palo Alto, v.28, n.1, p.139-153, 1990.

PRESCOTT, J. M. & KERNKAMP, M. F. Genetic stability of *puccinia graminis* var. *tritici* in criogenic storage. **Plant Disease**, St. Paul, v. 55, n. 2, p. 695-696, 1971.

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

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DE RESISTÊNCIA EM DIFERENTES ALTURAS DE COPA PARA FERRUGEM DA SOJA (*Phakopsora pachyrhizi*)

1 RESUMO

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Avaliação de resistência de cultivares de soja a *Phakopsora pachyrhizi* em casa-de-vegetação. In: __. *Preservação Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max.* (L.) Merrill). 2005. Cap. 3. P.37-57. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A ferrugem da soja destacou-se nas últimas safras devido à alta severidade que vem causando nas lavouras de soja. Diversos estudos estão em andamento para buscar informações sobre a resistência genética dos cultivares atualmente plantados. Em alguns cultivares tem sido observada uma redução no período latente e no período de incubação, reduzindo assim a taxa de progresso da epidemia. O objetivo do trabalho foi estudar o desenvolvimento da ferrugem da soja em diferentes cultivares, em condições de casa-de-vegetação. No experimento foram utilizados 7 cultivares (Uirapuru e BRS 134 Pintado, BRS 154, BRS 215, FT2, BRS 231) e uma PI, a PI459025 com gene de resistência Rpp4, inoculados com suspensão de esporos de *P. pachyrhizi*. O delineamento foi em blocos ao acaso com oito tratamentos e quatro repetições. As avaliações de incidência e severidade da ferrugem foram realizadas a cada cinco dias a partir do aparecimento dos sintomas até o declínio das plantas. Os valores de incidência e severidade foram transformados em proporções de área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e severidade (AACPS). Houve diferença significativa entre os cultivares para AACPI. Os cultivares BRS 134, FT2 e BRS 231 apresentaram maior valor AACPI, e foram significativamente diferentes dos demais cultivares. Entre os cultivares com menor valor de AACPI destacou-se a PI 459025. Para AACPS, ocorreu interação entre a severidade e os terços avaliados, mas não houve diferença significativa entre o terço inferior e o superior, mas em todos os terços, a PI 459025 e a cultivar FT-2 apresentaram menor e maior AACPS, respectivamente.

* Comitê de orientação: Eduardo Alves – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

2 ABSTRACT

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Evaluation of soybean cultivars for *Phakopsora pachyrhizi* resistance in greenhouse. In: Study of the preservation of *Phakopsora pachyrhiz* Sydow & Sydow and epidemiological and ultrastructural aspects of its interactions with soybean (*Glycine max* (L.) Merrill. 2005. Cap. 3. p. 38-58. Dissertation (Master in Phytopathology). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The soybean rust, caused by *Phakopsora pachyrhizi*, has been known to reduce drastically yields. Development of resistant cultivars to that disease is still in progress. Studies on that field have been conducted. In some cultivars it has been observed a reduction in the latent period and of the incubation period, thus reducing progress rate of the disease. The objective of this study was to evaluate the progress of the soybean rust in greenhouse. The cultivars used were Uirapuru, BRS 134 Pintado, BRS 154, BRS 215, BRS 231, FT 2 and PI 459025 with a Rpp4 gene of resistance to soybean rust. Inoculations were performed by spraying inoculum suspension on the leaves. The experimental design was complete randomized blocks with eight treatments and four replications. Disease intensity was assessed through incidence and severity every five days after the first symptoms of disease until the plants decline. The values of incidence and severity were transformed in equivalent area under the disease curve of incidence and area under the curve of severity of disease. The cultivars BRS 134 Pintado, FT 2 and BRS 231 showed high values of curve of incidence disease and were significant different from the others. The cultivar PI 459025 showed the lowest value of disease curve of incidence. Value of disease curve of severity for the cultivar PI 459025 was the lowest one and value of that index for FT-2 cultivars the highest.

* Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A ferrugem da soja, cujo agente etiológico é o fungo *P. pachyrhizi*, é um problema recente para a sojicultura nacional. Essa doença foi identificada pela primeira vez no Brasil em maio de 2001 (Yorinori et al., 2002a). Os sintomas iniciais da doença são pequenas pústulas foliares, de cor castanha a marrom-escura. Na face inferior da folha, observa-se uma ou mais urédias que se rompem liberando os uredósporos (Hartman & Sinclair, 1999).

As lesões formadas nas folhas podem ser classificadas como do tipo castanho-claro (TAN) ou castanho-avermelhada (RB – Reddish Brown). Lesões do tipo RB, com pouca ou nenhuma esporulação foram encontradas em materiais com genes dominantes de resistência a essa doença (Bromfield, 1981). A utilização de genes dominantes ou de efeito principal também é conhecida como resistência vertical ou qualitativa, devido à diferença entre plantas suscetíveis e resistentes ser de fácil visualização. É a chamada resistência “do tudo ou nada”, na qual a planta ou está livre da doença ou completamente tomada por essa (Camargo, 1995).

A lesão do tipo RB pode ser descrita como uma reação de hipersensibilidade. No fenômeno de hipersensibilidade, as células do hospedeiro, próximas ao ponto de penetração do patógeno, morrem logo após a infecção. O patógeno *P. pachyrhizi* necessita de células vivas para sobreviver e se multiplicar e, com a morte destas células, o crescimento do patógeno é limitado ao local de infecção. As células mortas do hospedeiro são, portanto, “altruístas”, isto é, oferecem sua vida para salvar o resto da planta. Do ponto de vista do melhoramento genético, a planta hipersensível é extremamente resistente, uma vez que o patógeno, nessas condições, tem sua reprodução limitada, cessando o processo epidêmico no campo (Camargo, 1995).

A necessidade de formas de resistência mais eficientes para o controle da ferrugem da folha da soja é uma realidade cada vez mais premente, pois a tradicional resistência qualitativa não é durável, em função da variabilidade do patógeno. A resistência parcial ou quantitativa, condicionada por genes de efeitos menores, pode ser uma alternativa de controle viável neste patossistema. Neste tipo de resistência, os genótipos apresentam reações dentro de uma amplitude contínua de variação, podendo exibir desde nenhuma resistência (extrema suscetibilidade) até bons níveis de resistência.

A resistência quantitativa é definida como um tipo de resistência incompleta, em que, embora o hospedeiro apresente reação de suscetibilidade, verifica-se uma baixa taxa de progresso da doença (Parlevliet, 1979; 1985). O progresso lento é o resultado dos efeitos combinados de componentes de resistência, tais como baixa frequência de infecção, período latente longo, pústulas pequenas, baixa produção de esporos por pústula e período infeccioso curto (Heagle & Moore, 1970; Ohm & Shaner, 1976; Szejmberg & Whal, 1976; Parlevliet, 1979; Whal et al., 1980). Em algumas interações patógeno-hospedeiro, um ou mais componentes podem ser responsáveis pela redução da doença no campo, o que se verifica, por exemplo, na interação cevada (*Hordeum vulgare* L.)-ferrugem da folha, com o aumento do período de latência (Parlevliet, 1976).

A investigação detalhada do comportamento diferenciado de genótipos no campo envolve quantificar os componentes de resistência responsáveis por reduzir a taxa de progresso da doença. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi quantificar os parâmetros monocíclicos da ferrugem da soja em 8 diferentes genótipos de soja e verificar a região da planta que melhor permite a avaliação desses componentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivares utilizados

Foram utilizados sete cultivares de soja e uma PI, escolhidas entre os materiais avaliados por Yorinori et al. (2002b), sendo esses, Uirapuru e BRS 134 com ciclo tardio, Pintado, BRS 154 e BRS 215 com ciclo médio, o cultivar F-T2 de ciclo precoce e o cultivar BRS 231 de ciclo semiprecoce, e uma PI459025 com gene de resistência Rpp4.

4.2 Plantio, preparo do inoculo e inoculação.

Os cultivares foram semeados em vasos de plástico com 5kg de mistura de terra, areia e esterco (2:1:2) deixando-se quatro plantas por vaso. As plantas foram mantidas na casa-de-vegetação e inoculadas quando o segundo par de folhas trifoliada esta completamente expandido com o isolado de *P. pachyrhizi*, proveniente do cultivar BRS 154, que foi a fonte de inóculo para os trabalhos posteriores.

Folhas com os sinais da doença foram coletadas da fonte de inóculo e lavadas com a ajuda de pincel para retirar os uredósporos. Logo após, os uredósporos foram suspensos em água destilada contendo tween 20 (0,1 mL/L). Para a inoculação, foram utilizados 10mL da suspensão (3×10^4 uredósporos por mL) em cada vaso. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com nebulizador que era acionado sempre que a umidade estivesse acima de 75%, para manter a umidade, fator essencial para a germinação e infecção do fungo (Marchetti et al., 1976).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Esporulação

Com as amostragens feitas no início do aparecimento das lesões foi possível observar as lesões esporulando em todos os cultivares. Em todos foram observadas lesões do tipo TAN; apenas na PI 459025 foi observada lesão do tipo RB. Todos os materiais avaliados apresentaram sintomas no sexto dia após a inoculação, mas a esporulação ocorreu em dias diferentes para cada um.

Nos cultivares Uirapuru, Pintado e BRS 154, a esporulação ocorreu no sexto dia após a inoculação; o cultivar BRS 134 esporulou no sétimo dia após a inoculação; já no cultivar BRS 215, a esporulação ocorreu no oitavo dia após a inoculação; os cultivares BRS 231 e FT-2 apresentaram esporulação no nono dia após a inoculação e na PI 459025, que possui gene de resistência completa *Rpp4*, a esporulação só ocorreu doze dias após a inoculação. Esses dados são coniventes com os de Marchetti et al. (1975), Melching et al. (1979), Pua e Ilag (1980), Yeh et al. (1982), Yorinori (2002a) e Godoy & Canteri (2004) os quais observaram que a maturação da urédia e o início da produção de uredósporos ocorreu entre o sétimo e o nono dia após a inoculação. No entanto, no material com o gene *Rpp4*, a latência foi superior ao período relatado, indicando que, além do gene de resistência completa, essa PI pode ter também genes de resistência quantitativa. Novas urédias continuaram sendo formadas durante quatro a cinco semanas depois da inoculação.

5.2 Área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPI) e da severidade (AACPS) da ferrugem

Houve diferença significativa entre os cultivares para AACPI (Tabela 1A). Os cultivares BRS 134, FT-2 e BRS 231 apresentaram maior valor da AACPI, e foram significativamente diferentes dos demais cultivares. Entre os cultivares com menor valor de AACPI destacou-se a PI 459025 (Figura 1).

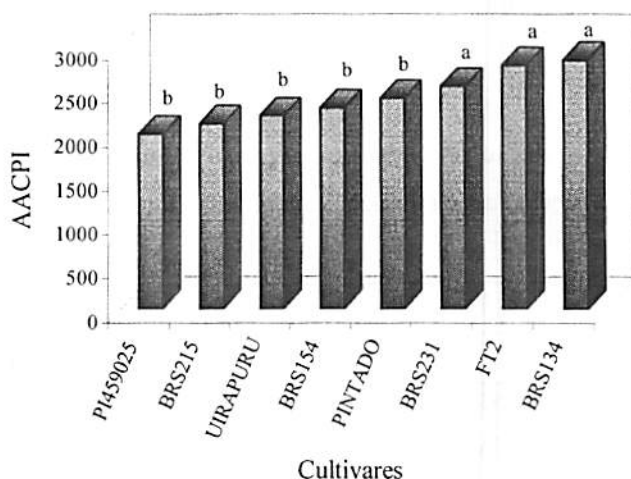


FIGURA 1. Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) de ferrugem da soja. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Para AACPS, ocorreu interação entre a severidade e os terços avaliados (Tabela 2A). Na interação cultivar terço, não houve diferença significativa entre os cultivares nos terços inferior e superior. No terço médio, houve diferença significativa. A PI 459025 apresentou menor valor de AACPS (931.1) e o

cultivar BRS 215 apresentou maior AACPS (1997,8). Os demais cultivares não apresentaram diferença estatística, com valores variando de 1085,3 a 1585,2 (Tabela 1). Porém, a PI 459025 apresentou menor AACPS nos terços avaliados. Isto ocorreu devido ao fato do cultivar apresentar o gene de resistência *Rpp4* com lesões do tipo RB (Bromfield, 1981). Os cultivares BRS 134 e FT-2, classificados por Yorinori et al. (2002b) como resistentes, em função da presença de lesões RB, apresentaram lesões do tipo TAN neste ensaio. Dessa forma, provavelmente a raça utilizada foi diferente da primeira raça constatada no Brasil, o que permitiu classificar esses materiais como resistentes no ensaio realizado por esses autores.

TABELA 1. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) de ferrugem da soja. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Terço		
	Inferior	Médio	Superior
PI 459025	1553,5 A a	931,1 B c	136,0 C a
BRS 134	1576,1 A a	1085,3 B c	446,4 C a
BRS 154	1659,0 A a	1465,6 A b	566,5 B a
BRS 215	1703,0 A a	1997,8 A a	756,0 B a
BRS 231	1768,3 A a	1260,0 B c	350,4 C a
Pintado	1780,8 A a	1570,4 A b	476,7 B a
Uirapuru	1823,1 A a	1122,8 A c	363,7 B a
FT-2	1875,6 A a	1585,2 A b	486,0 B a
Média	1717,4	1377,3	447,7

* Médias com mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

As plantas foram inoculadas uma única vez e a re-inoculação aconteceu naturalmente. Em todos os cultivares, a maior AACPS ocorreu no terço inferior, com média de 1717,4. Essa severidade pode ser explicada pelo fato de ter sido o local da inoculação, por estar recebendo constantemente esporos produzidos nos terços superiores e também devido à senescência dessas folhas, com conseqüente diminuição da disponibilização de nutrientes e comprometimento dos mecanismos de defesa.

A avaliação no terço médio possibilitou diferenciar os cultivares e apresentou um valor médio da AACPS (1377,3) em todos os cultivares. No terço superior foi observada a menor AACPS (447,7), devido à infecção tardia. Portanto, a avaliação no terço médio foi a mais eficiente para discriminar diferenças de resistência, em termos de severidade, entre os materiais, pois a senescência das folhas e alta pressão de inóculo, ocasionada pela inoculação das folhas do terço inferior e a baixa severidade no terço superior, fez com que os materiais não apresentassem diferenças em relação as variáveis estudadas.

Para plotar a curva de progresso da doença utilizou-se a média das avaliações realizadas nos três terços das plantas. Para a incidência, observou-se a presença de sintomas seis dias após a inoculação em todos os cultivares, mas o início da produção de esporos ocorreu em dias diferentes para cada cultivar. A PI 459025 apresentou menor incidência em todas as avaliações e o cultivar FT-2 apresentou maior incidência, tendo aos dezesseis dias após a inoculação, sido observada a maior incidência (Figura 2A)

Para a severidade da doença, houve aumento no número de lesões da primeira para a segunda avaliação em todos os cultivares, com exceção da PI 459025, que só apresentou aumento no número de lesões onze dias após a inoculação. Esse fato ocorreu devido a PI ter iniciado a esporulação aos doze dias após a inoculação, constatando que, além da resistência qualitativa essa PI pode ter também resistência quantitativa do tipo “slow rusting”. Aos 21 dias

após a inoculação, todos os cultivares apresentaram aumento na porcentagem de lesões e, 26 dias após a inoculação, foi observado o maior número de lesões/cm² de área foliar. Na avaliação seguinte, houve estabilidade e na última avaliação houve um novo aumento na porcentagem de lesões (Figura 2B).

A temperatura monitorada durante o período de avaliação da doença apresentou variação de 21,75°C a 26,95°C, com média de 24,35°C, não sendo um fator determinante para o progresso da doença em todos os cultivares avaliados (Figura 3). A umidade relativa do ar variou entre 53,57% a 85,50%, com média de 69,53%. Mesmo não havendo correlação significativa entre esta variável climática e o progresso da doença, observou-se aumento da incidência e da severidade da doença nos períodos de maior valor de umidade. Maior incidência da doença foi observado no período de 11 a 16 dias após a inoculação, coincidindo com o período de maior valor de umidade relativa do ar (Figura 3). Da mesma forma, a severidade apresentou maiores picos de doença aos 26 dias após a inoculação. Nesses mesmos dias, a umidade relativa do ar apresentou maiores valores (Figura 3)

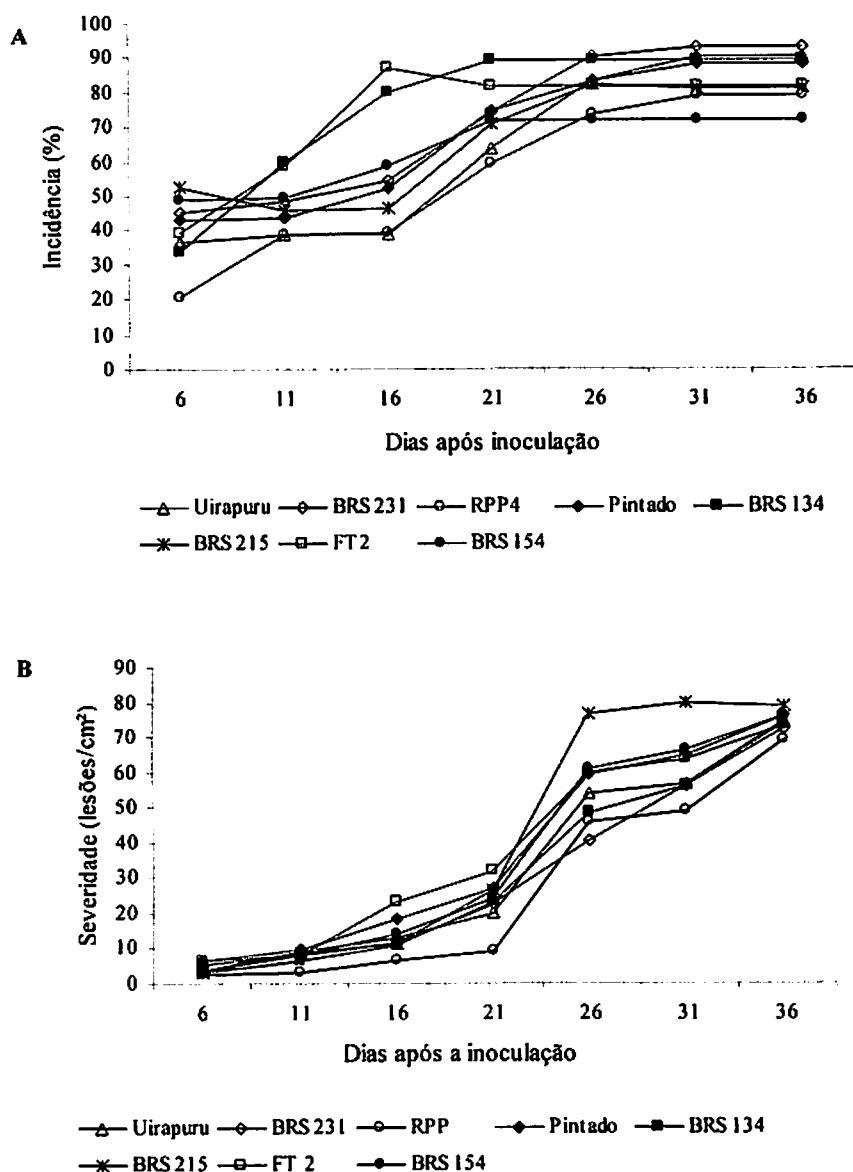


FIGURA 2. Curva de progresso da incidência (A) e da severidade (B) da doença. UFLA, Lavras, MG, 2005.

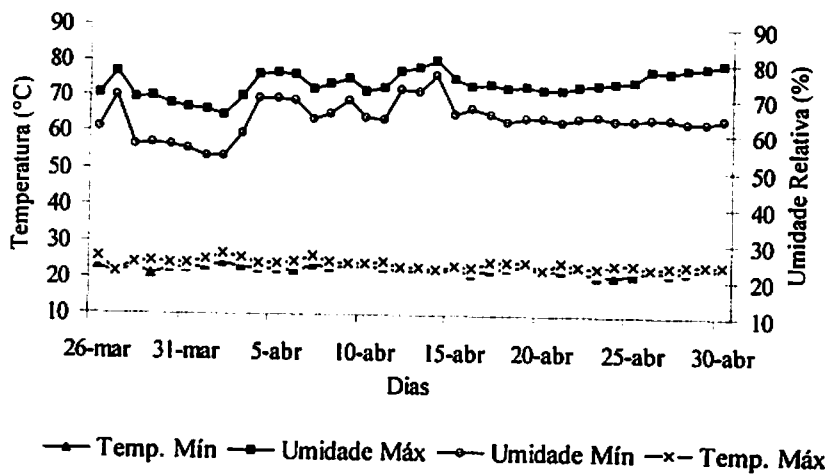


FIGURA 3. Variáveis climáticas (temperatura e umidade) no período de 26 de março a 30 de abril/2004. UFLA, Lavras, MG, 2005.

6 CONCLUSÕES

1. A PI 459025 apresentou menor progresso da incidência (AACPI) e da severidade (AACPS) em relação aos demais cultivares.

2. Para AACPS, ocorreu interação entre a severidade e os terços avaliados; entre os terços, não houve diferença significativa no terço inferior e superior, apenas no terço médio.

3. A maior diferença em relação à severidade foi encontrada no terço médio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J. F. F. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakospora pachyrhizi* Sidow). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., 2004, Foz do Iguaçu, PR. *Anais...* Foz do Iguaçu, PR, 2004. p. 100.
- 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.
- BROMFIELD, K. R. Differential reaction of some soybean accessions to *Phakopsora pachyrhizi*. *Soybean Rust News*, v. 4, p. 2, 1981.
- CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 470-491.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**, New York: J. Wiley, 1990.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANNUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFScar, 2000. p. 235.

GOODOY, 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./feb. 2004.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. **Crop Science Madison**, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, Nov./Dec. 1986.

HEAGLE, A. S.; MOORE, M. B. Some effects of moderate adult resistance to crown rust of oats. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 4, p. 461-466, Apr. 1970.

MARCHETTI, M. A.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 4, p. 461-463, Apr. 1976.

MARCHETTI, M. A.; UECKER, F. A.; BROMFIELD, K. R. Uredial desenvolvimento de *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, n. 7, p. 822-823, July 1975.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.

MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R.; KINGSOLVER, C. H. Infection, colonization and uredospores 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.

OHM, J. W.; SHANER, G. E. Three components os slow leaf-rusting at different growth stages in wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 11, p. 1356-1360, Nov. 1979.

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

PARLAVELIET, J. E. Partial resitance of balely to leaf rust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. **Euphytica**, Wageningen, v. 24, n. 1, p. 21-27, Feb. 1975.

PARLAVELIET, J. E. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. III. The inheritance of the host plant effect on latent period in four cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 25 n. 2, p. 241- 248, June 1976.

PARLAVELIET, J. E. Resistance of the nonrace-specific type. In: BUSHNELL, W. R.; ROELFS, A. P. (Ed.). **The cereal rusts: diseases, distribution, epidemiology and control**. New York: Academic Press, 1985. p. 501-525.

PUA, A. R.; ILAG, L. L. Ingress and pathogenic development of *Phakopsora pachyrhizi* Syd. In soybean. **Philippine Agriculturist**, Los Banos, v. 63, n. 1, p. 9-14, 1980.

SILVA, E. C. da; FERREIRA, D. F.; BEARZOTI, E. Avaliação do poder e taxas de erro tipo I do teste de Scott-Knott por meio de método de Monte Carlo. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 687-696, jul./set. 1999.

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

SZTEJNBERG, A.; WAHL, I. Mechanisms and stability of slow stem rusting resistance in *Avena sterilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 1, p. 74-80, Jan. 1976.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 1991.

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.

WHALE, I.; WILCOXSON, R. D.; ROWELL, J. B. Slow rusting of wheat with rust detected in the glasshouse. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 54-56, Jan. 1980.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of Genetics and Plant Pathology**, v. 68, p. 52-56, 2002.

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, 2002, Anais... Foz do Iguaçu, PR, 2002a. p. 94.

YORINORI, J. T.; YORINORI, M. A.; GODOY, C. V. Seleção de cultivares de soja resistentes à ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*). In: REUNIÃO SUL DE SOJA DA REGIÃO SUL, 30., Cruz Alta, RS, 2002. Anais... Cruz Alta, 2002b. p. 94.

CAPITULO 4

ESTUDO DE MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE VARREDURA DO PROCESSO DE PRÉ-PENETRAÇÃO, PENETRAÇÃO E COLONIZAÇÃO DE *Phakopsora pachyrhizi* EM FOLÍOLOS DE SOJA

1 RESUMO

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Estudo de microscopia de luz e eletrônica de varredura do processo de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. In: *Preservação de Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max.* (L.) Merrill). 2005. Cap. 4. p.59-84. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Neste estudo, as microscopias de luz e eletrônica de varredura foram utilizadas para acompanhar o desenvolvimento de *Phakopsora pachyrhizi* desde a germinação dos uredósporos até formação da uredia em folhas de cultivares de soja resistentes e susceptíveis. Uma gota com 20 μL de uma suspensão de esporos (3×10^4 uredósporos/mL) foi depositada em locais específicos dos folíolos, previamente marcados em forma de círculo com uma caneta de marca permanente, de 7 cultivares de soja (Uirapuru e BRS 134 Pintado, BRS 154, BRS 215, FT2, BRS 231) e duas PI a PI 23097 e PI459025 com gene de resistência Rpp2 e Rpp4, respectivamente. Após a inoculação as folhas destacadas foram acondicionadas em bandejas e levadas para uma B.O.D. a 23° C. Foram coletadas amostras de tecidos foliares dos locais inoculados nos tempos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 240h após a inoculação (h.a.i.). Essas amostras foram submetidas ao clareamento, e ao processo de preparação para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em todos os cultivares observou-se a formação de tubo germinativo, porém ocorreu variações na porcentagem de germinação, na formação de apressório e conseqüentemente na penetração. As PI 429025 e 23097 apresentaram uma baixa porcentagem de uredósporos germinados e formação de apressório, e a formação de apressórios nestes materiais começou seis horas após a inoculação, enquanto que nos outros cultivares a formação de apressórios iniciou-se com quatro horas após a inoculação. O cultivar Pintado apresentou 55% de uredósporos germinados e 27,5% de apressórios formados apesar de ser considerado um cultivar suscetível. Essa menor porcentagem de germinação e formação de apressório pode estar relacionada com o fato deste cultivar ter apresentado uma grande quantidade de cera na folha e isso pode ter interferido na germinação dos uredósporos. O cultivar FT-2 apresentou menor quantidade de cera nas folhas e uma maior porcentagem de uredósporos germinados e com formação de apressório ficando atrás apenas do cultivar BRS 154 o qual apresentou maior porcentagem de germinação (85,5%) e maior porcentagem de formação de apressório (66,5%).

infecção desde a germinação dos uredósporos até a colonização do tecido do hospedeiro e do início de formação das urédias. Tanto a formação de apressórios, como as penetrações ocorreram nas junções das células da epiderme e não no centro das células através da cutícula. Após 24 horas da inoculação os uredósporos começaram a murchar e com 48 horas os apressórios. Através da remoção da epiderme foi possível observar a formação das hifas primárias 48 horas após a inoculação e o desenvolvimento progressivo do micélio até o início da formação das urédias com 240 horas. Vários aspectos do processo são mostrados neste trabalho através das eletromicrografias de varredura.

Comitê de orientação: Eduardo Alves – UFLA (Professor Orientador); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

2 ABSTRACT

ZAMBENEDETTI, Elisandra Batista. Light and scanning electron microscopic studies of the prepenetration, penetration and colonization of soybean leaflets by *Phakopsora pachyrhizi*. In: **Study of the preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow and epidemiological and ultrastructural aspects of its interactions with soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).** 2005. Cap. 3. p. 59-82. Dissertation (Master in Phytopathology). Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Light (LE) and scanning electron microscopy (SEM) were used to study the development of *Phakopsora pachyrhizi* from uredospores germination to colonization on leaves of resistant and susceptible soybean. Drop of 20 μ L of a suspension of spores (3×10^4 uredospores/mL) was inoculated in several points on the outstanding leaflets, previously marked with a permanent marker pen, of the cultivars Uirapuru, BRS 134 Pintado, BRS 154, BRS 215, BRS 231, FT 2 and the genotypes PI 23097 and PI 459025 with Rpp2 and Rpp4 genes of resistance for soybean rust, respectively. After inoculation, leaves were stored in BOD at 23°C for incubation. Sample were taken at 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 48, 72, 96 and 240 hours after the inoculation and submitted the process of fixation for scanning electron microscopy (SEM) and decolorized in chloral hydrate. In decolorized sample was not observed difference between the cultivars in relation at development of the germ tube, but it was observed difference between the cultivar in the percentage of germination, the formation of apressorium and consequently in the penetration. PI 429025 presented lower percentage of germinated uredospores (20%) and of apressoria formation (11%), and the cultivar BRS 154 presented greater percentage of germination (85,5%) and greater percentage of apressoria formation (66,5%). The cultivar Pintado presented 55% of germinated uredospores e 27,5% of formed apressories although to be considered one cultivar susceptible, this slow percentage of germination and formation of apressorium can be related with the fact of this cultivar to have presented a great amount of wax in the leaf and that can have interfered with the germination of the uredospores. The cultivar FT-2 presented less amount of wax in leaves and a bigger percentage of germinated uredospores and with formation of apressorium. The observation from germination to colonization by SEM showed that the formation of apressoria started four hours after the inoculation on all cultivar and with six hours on genotypes PI 23097 and PI 459025. The apressoria were formed on junction of epidermal cells and the penetration taken place between the anticlinal walls and not take place direct on cuticle. 24 and 48 hours after inoculation (h.a.i) the


uredospores and appressoria started to wither, respectively. The primary hypha was formed 48 (h.a.i) and with 240 (h.a.i) the uredia were formed. Several aspects of this process are showed in this study by SEM micrographs.

* Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Major Professor); Edson Ampélio Pozza – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência do hospedeiro, ocorre a nível celular, ou seja, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Teoricamente, existem duas amplas categorias de defesa: a estrutural, morfológica ou anatômica e a bioquímica ou fisiológica (Ingham, 1973). Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto as reações químicas produzem substâncias tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas ao crescimento deste no interior do hospedeiro (Pascholati & Leite, 1995)

Obviamente, o grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos, pré ou pós-formados, nas respostas de resistência, variam de acordo com a interação patógeno-hospedeiro e, numa mesma interação, em função da idade da planta, do órgão ou tecido afetado, do estado nutricional e das demais condições do ambiente (Pascholati & Leite, 1994; 1995). Em certos casos, a resistência efetiva contra um patógeno pode também ser efetiva contra outro, indicando a presença de mecanismos de resistência comuns às duas interações. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para visualizar tais processos de infecção os microscópios de luz (ML), microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) proporcionam inestimáveis contribuições. Eles representam importantes ferramentas para entender os processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses agentes.



A superfície das plantas constitui-se na primeira linha de defesa contra fitopatógenos em potencial. Dentre as estruturas existentes nas plantas antes da chegada dos fitopatógenos e que podem contribuir para a resistência, estão a camada de cera impedindo a formação do filme de água, no qual os patógenos podem ser depositados e posteriormente germinar, e os tricomas que exercem a mesma função, além de repelir insetos, contribuindo assim de maneira indireta para com a resistência das plantas, mantendo as mesmas livres de microrganismos fitopatogênicos (Pascholati, 1995).

Para estudar os eventos de resistência que levam a planta a evitar a penetração ou deter o avanço do patógeno em seus tecidos, é importante entender como ocorrem os eventos de estabelecimentos de relações parasíticas estáveis entre o patógeno e o hospedeiro. No caso de *P. pachyrhizi* em soja, poucos estudos com microscopia eletrônica de varredura foram realizados até o momento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da microscopia de luz e eletrônica de varredura, os eventos de pré-penetração e penetração que levam ao estabelecimento de relações parasíticas e os fatores que levam ao desenvolvimento da resistência de alguns cultivares de soja ao agente da ferrugem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivares utilizados

Foram utilizados sete cultivares de soja, que foram, Uirapuru e BRS 134 com ciclo tardio, Pintado, BRS 154 e BRS 215 com ciclo médio, o cultivar F-T2 de ciclo precoce e o cultivar BRS 231 de ciclo semiprecoce, e duas PI, a PI 23907 e PI459025 com gene de resistência *Rpp2* e *Rpp4*, respectivamente.

4.2 Instalação do experimento e inoculação

Os genótipos foram semeados em vasos de plástico com 5kg de mistura de terra, areia e esterco (2:1:2) deixando-se quatro plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até atingirem o estágio vegetativo, então foram coletadas folhas de cada cultivar. As folhas coletadas foram lavadas com água corrente e detergente, secas e depois acomodadas em bandejas de plástico desinfestadas com álcool. No fundo das bandejas, foram colocadas duas folhas de papel 'germitest' umedecidas com água destilada e cobertas com papel alumínio perfurado, para permitir que os pecíolos ficassem em contato com a umidade (Barguil, 2004). Em seguida, foram desenhados 4 discos de 1 cm de diâmetro com uma caneta de marca permanente nas folhas a serem inoculadas, para facilitar os estudos de microscopia. No centro de cada círculo foi colocada uma gota de 50µL de suspensão de 3×10^4 uredósporos de *P. pachyrhizi*, por mL de água os mesmo utilizados no capítulo 2. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente para manter a umidade e colocadas em câmara de crescimento com temperatura de 23°C.

4.3 Coleta das amostras para microscopia

Após 4 horas, foram coletadas as primeiras amostras de cada cultivar da seguinte maneira: os círculos nos quais havia sido inoculado o fungo, foram cortados com a ajuda de um bisturi e colocados em microtubos de 1,5 mL contendo fixador, em seguida, armazenado na geladeira. As demais coletas foram realizadas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 240 horas após a inoculação.

Foram também coletadas para análise amostras de folhas com pústulas já desenvolvidas, de plantas dos mesmos cultivares que se encontravam em casa-de-vegetação, utilizados no experimento do capítulo 3.

4.4 Preparação das amostras para MEV

A preparação e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras MG. Após o material ser imerso em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de no mínimo 24 horas, cinco fragmentos de cada cultivar e de cada hora foram transferidos para uma solução tampão de caccodilato. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, depois lavadas em água destilada por três vezes e subsequente desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes) e, em seguida, levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, a

aumentos variáveis, havendo diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9, no qual foram selecionadas e preparadas as pranchas apresentadas neste trabalho.

Depois dessa primeira observação, as amostras que apresentavam esporos germinados com formação de apressório e penetrando, foram separados e, com ajuda de uma fita dupla face, a epiderme foi retirada das amostras com o intuito de observar como ocorre a penetração e o desenvolvimento do fungo dentro do tecido. Após serem retiradas, as amostras foram montadas em 'stubs' e cobertas com ouro, em seguida, observadas em microscópio eletrônico de varredura.

Com o objetivo de remover os apressórios formados nos pontos de penetração, observar o orifício provocado pelo *peg* e confirmar a penetração nas junções das células epidérmicas, amostras com 48 horas, depois de fixadas, foram colocadas em tampão caccodilato em Becker e levados ao aparelho sonicador ULTRASONIC CLEAR (Odontobras) frequência de 40 KHz por 20 minutos.

4.5 Clareamento do tecido

Com o objetivo de determinar o número de uredósporos germinados e apressórios formados, foi utilizada a técnica de clareamento.

Para o clareamento foram utilizados quatro segmentos do material imerso em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2, coletados com 6 horas após a inoculação. As amostras foram submetidas ao clareamento seguindo a metodologia de Ryan & Clare (1974), modificada como segue: as amostras foram clareadas em uma mistura de ácido acético 100% e etanol absoluto (1:1, v/v). Os segmentos de folhas foram colocados, com a superfície

inoculada para cima, em placas de Petri de plástico contendo duas folhas de papel de filtro umedecido com a solução. Depois de 48 horas, os segmentos de folhas descoloridos foram então retirados e colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água para retirar o excesso do ácido acético/etanol permanecendo por um período de 30 minutos. Em seguida, os segmentos foram colocados em lâminas para microscopia, as quais foram coradas com azul de algodão.

Após o clareamento foliar, foi avaliada, com auxílio de microscópio de luz, a porcentagem de germinação e de formação de apressório nos cultivares.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da porcentagem de germinação e da formação de apressórios de uredósporos de *P. pachyrhizi*.

Não ocorreu diferença em relação à formação do tubo germinativo no material com clareamento, pois em todos os genótipos, o mesmo foi observado, mas houve diferenças entre os cultivares na porcentagem de germinação, na formação de apressório e, conseqüentemente, na penetração, como pode ser observado na Tabela 1. Os genótipos PI 23097 e PI 459025 apresentaram uma baixa porcentagem de uredósporos germinados e uma baixa porcentagem de formação de apressório (Figura 1A e B); a formação de apressórios começou seis horas após a inoculação, e nos outros cultivares, a formação de apressórios teve início quatro horas após a inoculação. Este material apresenta gene de resistência *Rpp 4*, sendo considerado resistente. Essa resistência ocorre já na fase de pré-penetração, retardando assim o início do aparecimento das lesões. Esses resultados são compatíveis com os resultados encontrados no Capítulo 3 em casa-de-vegetação, onde a PI 459025 começou a esporular alguns dias depois dos outros cultivares e apresentaram menor porcentagem de área afetada ao final do experimento.

O cultivar Pintado apresentou 55% de uredósporos germinados e 27,5% de apressórios formados (Tabela 1). Apesar de ser considerado um cultivar suscetível, essa menor porcentagem de germinação e formação de apressório pode estar relacionada com o fato desse cultivar ter apresentado uma grande quantidade de cera na folha (Figura 1C). Isso pode ter interferido na germinação dos uredósporos, pois o patógeno precisa de água líquida para poder germinar e formar apressório e também ter uma ligação direta com o hospedeiro. Essa

barreira física proporcionada pela presença da camada de cera impede a formação do filme de água na superfície da folha e conseqüentemente a germinação. O cultivar FT-2 apresentou menor quantidade de cera (Figura 1D) nas folhas e uma maior porcentagem de uredósporos germinados, e de apressório formado, ficando atrás apenas do cultivar BRS 154 o qual apresentou maior porcentagem de germinação (85,5%) e maior porcentagem de formação de apressório (66,5%).

TABELA 1. Porcentagem de germinação e formação de apressório de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* seis horas após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Cultivar	Germinação (%)*	Formação apressório (%)*
PI 459025	20,0 e	11,0 d
PI 23097	35,0 d	23,5 c
Uirapuru	42,0 d	36,5 c
Pintado	55,0 c	27,5 c
BRS 134	58,0 c	21,5 c
BRS 231	59,5 c	25,0 c
BRS 215	61,0 c	39,0 b
FT-2	73,5 b	60,5 a
BRS 154	85,5 a	66,0 a

* Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

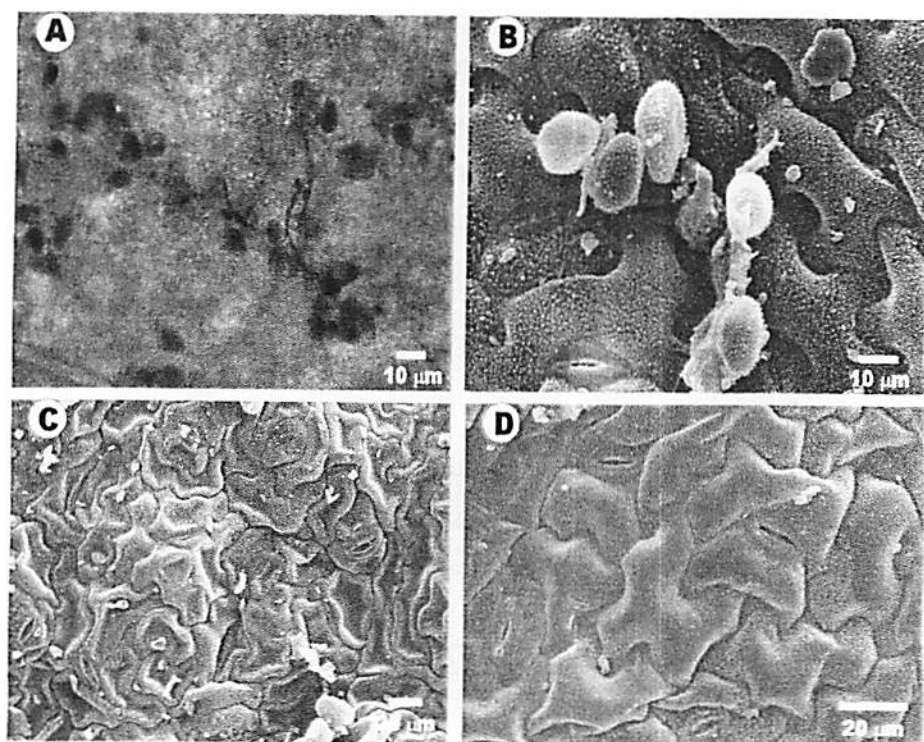


FIGURA 1. (A) Micrografia de luz obtida a partir da técnica de clareamento e (B-D) Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A e B) Baixa porcentagem de germinação dos uredósporos na PI 459025. (C) Cultivar Pintado com grande quantidade de cera na folha. (D) Cultivar FT-2 com baixa quantidade de cera na folha.

Observaram-se em MEV, que amostras dos cultivares Pintado e Uirapuru e das PI 23097 e PI 459025 coletados com 4, 5 e 6 h.p.i não apresentavam esporos na superfície, mesmo tendo sido inoculados com a mesma concentração utilizada nos outros. Com isso pode-se concluir que os esporos

quando não germinam, não ficam aderidos ao tecido do hospedeiro e, na hora de preparar as amostras para a MEV, eles se perdem. Este fato vem ao encontro dos resultados encontrados na avaliação dos espécimes submetidos ao clareamento, onde os esses cultivares apresentaram menor quantidade de esporos.

5.2 Eventos da pré-penetração, penetração e colonização de *P. pachyrhizi* em folhas de soja.

Em todos os cultivares observados quatro horas após a inoculação, os esporos já estavam germinados. Em alguns cultivares o apressório já estava formado, muitos deles cresceram quase o tamanho do esporo (Figura. 2 A e B). O tubo germinativo foi formado em qualquer lugar na superfície do hospedeiro.. Apesar da aparente ausência de orientação do crescimento dos tubos germinativos a formação do apressório foi verificada apenas nas junções das células epidérmicas (Figura 2 D). A predominância de apressórios formados nas junções de células epidérmicas ocorre comumente em outros gêneros fúngicos (Murray & Maxwell, 1975; Gold & Mendgen, 1984; Aveling et al.; 1994; McRoberts & Lennard, 1996; Araújo & Matsuoka, 2004). Portanto, esta tendência geral dos patógenos formarem apressórios nas junções das células, independentemente da espécie vegetal, pode significar que os estímulos para a formação de apressórios nessas espécies sejam características gerais da topografia foliar e das flutuações de nutrientes no microambiente das junções celulares (Araújo & Matsuoka, 2004).

Trabalho realizado por Koch et al. (1988) com o fungo *P. pachyrhizi* em lâminas revestidas com membrana artificial mostrou que houve maior quantidade de formação de apressório nas partes de maior declive nas lâminas. Alguns apressórios eram sésseis (Figura. 2 C) e os tubos germinativos atingiram tamanhos variados (9 a 143 μm) (Figura 3 A e B). Os maiores (acima de 50 μm)

não formaram apressório (Figura 3 C) e, quando isso ocorria, o apressório era pequeno (Figura 3 D). Nos menores, houve a formação de apressório e estes apresentaram tamanhos iguais ou maiores que o esporo que lhe deu origem (Figura 3 E e F).

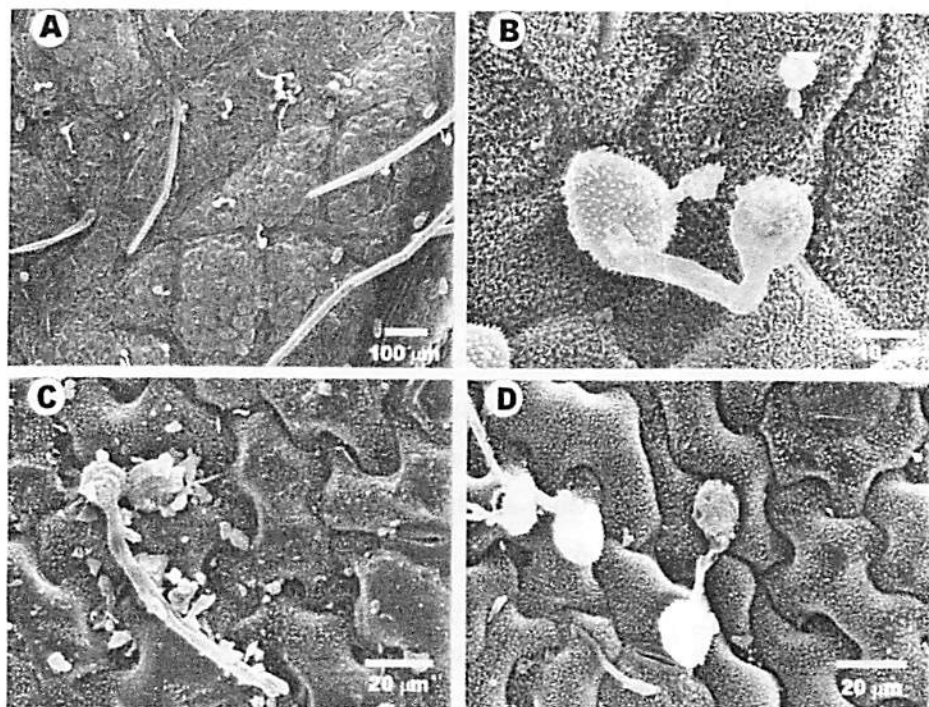


FIGURA2. Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A) Uredósporos na superfície da folha do hospedeiro (4 h.p.i). (B) Uredósporos germinado e com apressório formado. (C) Apressório sésil ao uredósporos que lhe deu origem. (D) Formação de apressório nas junções da célula do hospedeiro.

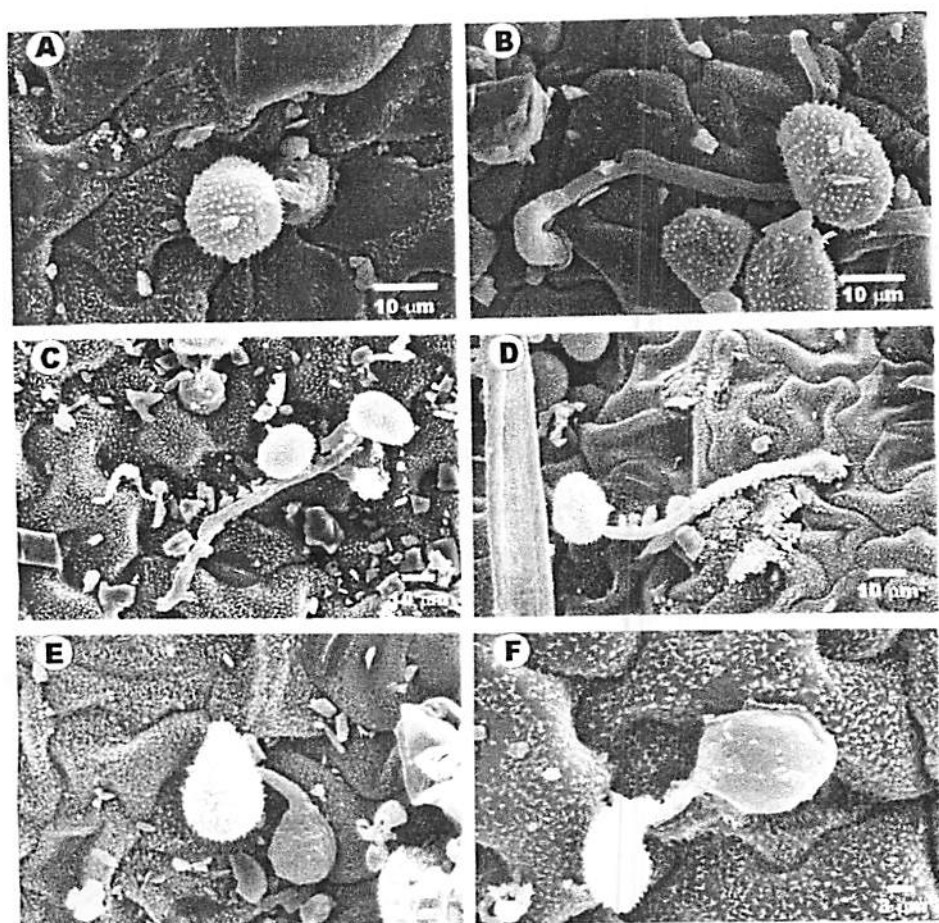


FIGURA 3. Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A e B) Tubos germinativos de tamanho variando entre (9 e 143 μm). (C). Tubo germinativo grande sem apressório (85,88 μm). (D) Tubo germinativo grande com apressório pequeno (Tg. 60,65 μm , A 8,66 μm). (E e F). Tubo germinativo pequeno e apressório, de tamanho igual ou maior que o esporo de origem.

Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Bonde et al. (1976) e Koch et al. (1983). O tamanho do tubo germinativo e do apressório está diretamente relacionado com o modo de penetração usada pelo fungo se é direta ou indireta, estes podem reduzir a quantidade de energia gasta com o crescimento do tubo germinativo para serem utilizada na penetração (Hunt, 1983).

Quanto à penetração foi observou-se que os *pegs* se formaram na base dos apressórios, e em todos os cultivares avaliados a penetração ocorreu sempre na junção das células da epiderme. Esses resultados são contrários aos apresentados por Koch et al. (1983) que afirmam que o fungo *P. pachyrhizi* penetra diretamente no hospedeiro através da cutícula na região central da célula e não nas junções (Figura 4. A, B, C, D).

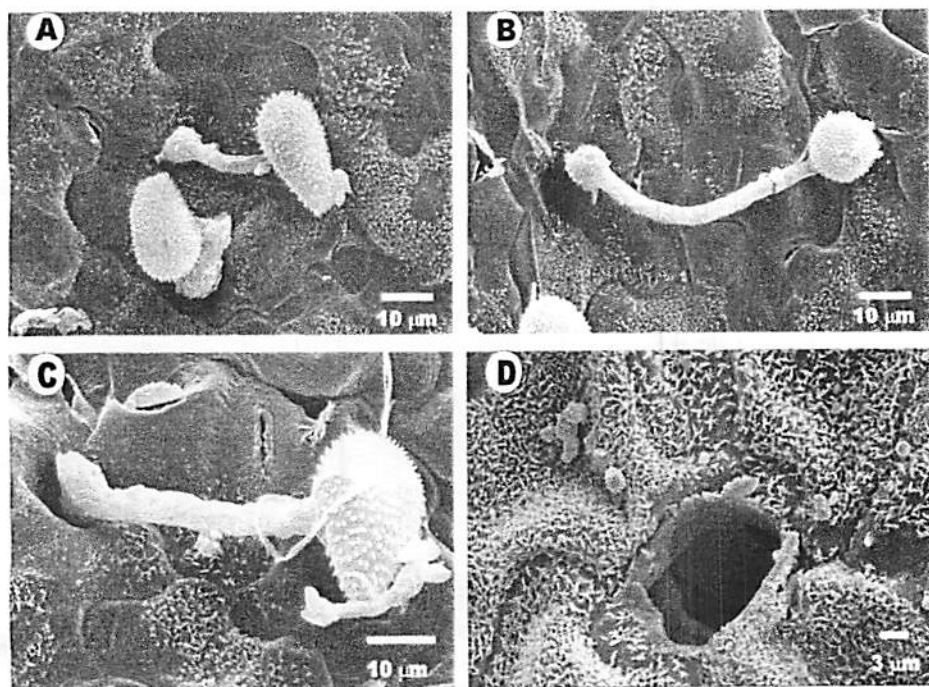


FIGURA 4 Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A) Apressório penetrando na junção da célula da epiderme. (B) Apressório afastado mostrando o buraco onde ocorreu a penetração. (C) Apressório e o *peg* de penetração penetrando nas junções das células da epiderme. (D) Orifício formado pela hifa de penetração (*peg*) do fungo.

Outro fator importante observado foi a menor quantidade de cera na superfície da folha onde o apressório foi formado (Figura 5 A). Esse fato foi observado por Adendorff & Rijkenberg (2000) com o patógeno *Phakopsora apoda*. Alguns uredósporos penetraram pelo estômato e, quando isso ocorria, não foi observada a formação de apressório (Figura 5 B).

A partir de 24 horas após a inoculação, os uredósporos que formaram apressório começaram a murchar. Isso indica que o conteúdo celular dos mesmos foi transferido para o tubo germinativo (Figura 5C). Os apressórios começaram a murchar 48 horas após a inoculação, pois nesse período já haviam penetrado (Figura 5D).

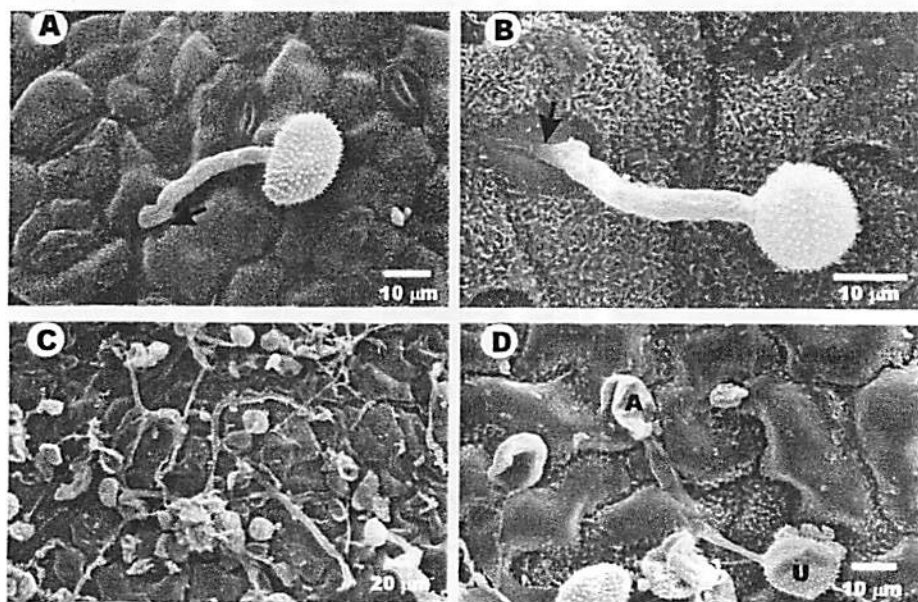


FIGURA 5. Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A) Menos cera na junção da célula da epiderme local de penetração do uredósporo (B) Penetração por estômato sem formação de apressório (C) Uredósporos murchos (24 h.p.i). (D) Uredósporos, tubo germinativo e apressório murchos (48 h.p.i).

Uma vez dentro da célula epidermal, o *peg* de penetração se expande para formar a vesícula transepidermal e, as hifas primárias começam a ser formadas se espalhando pelos espaços intercelulares do parênquima esponjoso atravessa a célula da epiderme e emerge no espaço intercelular e no tecido do mesófilo (Figura 6A).

Com 48 horas, as hifas secundárias já estavam se desenvolvendo dentro do tecido do hospedeiro (Figura 6 B) e desenvolvendo rapidamente, como pode-se observar nas Figuras 6 C e D.

A maturação da urédia e o conseqüente início da produção de uredósporos ocorreram entre o sexto e o décimo segundo dia após a inoculação, isso foi observado no capítulo 3, nas plantas que estavam em vasos na casa-de-vegetação. Mas, nas condições em que este experimento foi realizado (fungo inoculado em folhas destacadas e acomodadas em bandejas), foi observado, no décimo dia (as folhas só resistiram à avaliação até o décimo dia), apenas o início da formação de urédias em alguns dos cultivares avaliados. Isso pode ter acontecido pelo fato das folhas estarem fora da planta e com muitas de suas atividades metabólicas paradas e, como o fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório, este necessita de células vivas e dessas funções para sobreviver. Como isso não estava acontecendo, ele não conseguiu completar o seu ciclo e formar a pústula tão rapidamente.

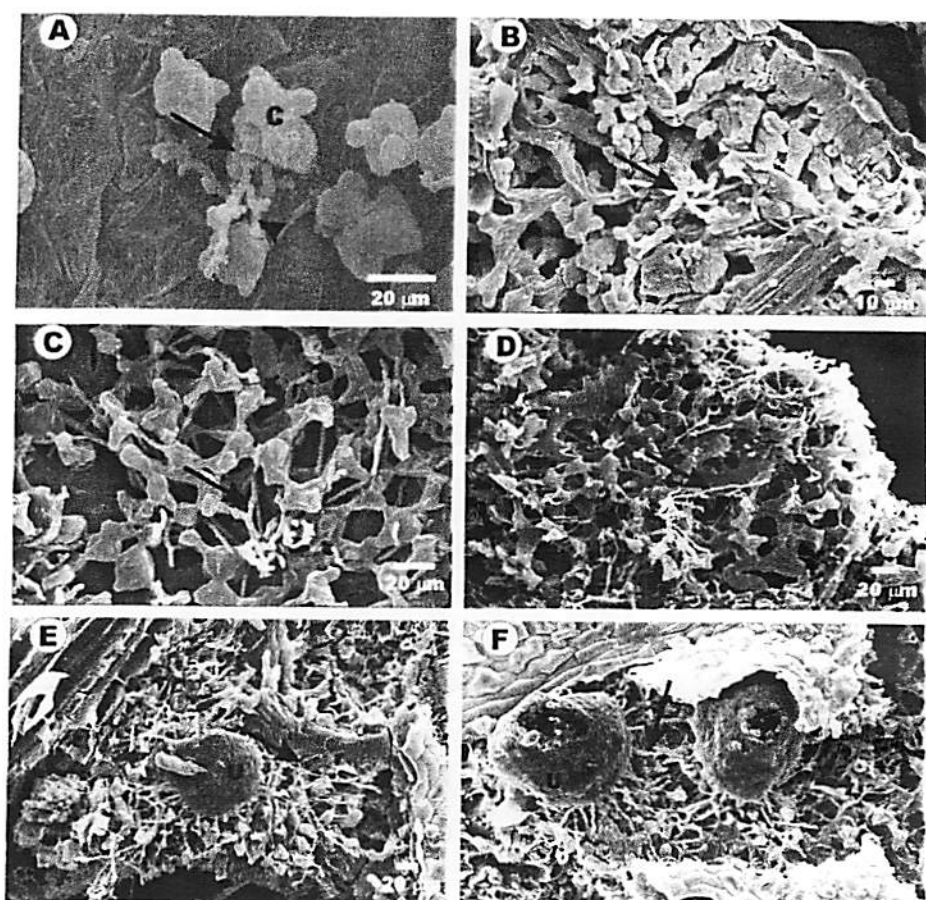


FIGURA 6. Eletromicrografias de varredura folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. (A) Visão interna da epiderme mostrando vesícula transepidermal (seta), hifas primárias (cabeça de seta) e célula do parênquima esponjoso (C) (48 h.p.i). (B e C) Hifas do fungo desenvolvendo dentro do tecido da folha do hospedeiro (48 h.p.i e 72 h.p.i), (D). Hifas do fungo ramificando todo o tecido do hospedeiro (96 h.p.i), (E) Início da formação da urédia 10 dias após a inoculação, (F) Hifas do fungo ramificando todo tecido da folha no local das pústulas.

6 CONCLUSÕES

1. O cultivar PI 459025 foi a que mostrou a maior resistente inicial à *P. pachyrhizi*, por ter apresentado a menor porcentagem de uredósporos germinados e apressórios formados.

2. A camada de cera é uma barreira física importante e deve ser levada em consideração na hora do melhoramento genético visando encontrar um cultivar resistente.

3. Os tubos germinativos que cresceram muito não formaram apressório e quando formavam eram pequenos, já os que apresentaram tubo germinativo pequeno, formavam apressórios de tamanho igual ou maior que o uredósporo que lhe deu origem.

4. O principal tipo de penetração utilizado por *P. pachyrhizi* foi a direta, pelas junções das células da epiderme.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from urediospores of *Phakopsora apoda*. *Mycological Research*, New York, v. 104, n. 3, p. 317-324, Mar. 2000
- ARAUJO, J. C. A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* em tomateiros resistentes e suscetível. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 3, p. 268-275, maio/jun. 2004.
- AVELING, T. A. S.; SNYAMAN, H. G.; RINJKENBERG, F. H. J. Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 72, n. 8, p. 1164-1170, Aug. 1994.
- BARGUIL, B.M. Indução de resistência e reação de cultivares de *Coffea arabica* L. a *Phoma costarricensis* Echandi. 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BECKETT, A.; HEATH, I.; BRENT; MCLAUGHLIN, D. J. An atlas of fungal ultrastructure, London: Longman, 1974.
- BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. *Phytopathology*, St. Paul, v. 66, n.11, p. 1290-1294, Nov. 1976.

GOLDE, R. E.; MENDGEN, K. Citology of basidiospore germination penetration and early colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 10, p. 1989-2002, Oct. 1984.

HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredospores. **Trans Brit. Mycol. Soc.** v. 51, p. 103-112, 1983.

INGHAM, J. L. Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectional and post-infectional resistance. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 78, n. 3, p. 314-335, 1973.

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. **Phytopathologische Zeitschrift**, Hamburg, v. 106 , n. 4, p. 302-320, 1983.

KOCH, E.; HOPPE, H. H. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 22, n. 3, p. 232-244, July 1988.

LITTLEFIELD, L. J.; HEALTH, M. C. **Ultrastructure of rust fungi**. Toronto: Academic Press, 1979. 275 p.

McROBERTS, N.; LENNARD, J. H. Pathogen behavior and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and monhost plants. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 742-752, Aug. 1996.

- MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizis*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.
- MURRAY, G. M.; MAXWELL, D. P. Penetration of *Zea mays* by *helminthosporium carbonum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 23, p. 2872-2883, Dec. 1975.
- 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.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, v. 1, p. 417-53. 1995.
- ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle-free sections on formvar-coated slot grids. **Ultramicrotomy**, v. 1, p. 151-155, 1975.
- RYAN, C. C.; CLARE, B. G. Coating of leaf surfaces with agarose to reaction fungal inoculum in situ for staining. **Stain Technology**, Baltimore, v. 49, n. 1, p. 15-18, 1974.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escassez de trabalhos sobre o comportamento do fungo *P. Pachyrrhizi* em diferentes situações e condições no Brasil levou o desenvolvimento de estudos para tentar esclarecer duvidas a respeito do assunto.

A partir de experimentos conduzidos neste trabalho, verificou-se que o melhor método de armazenamento de uredósporos fora do hospedeiro foi o nitrogênio líquido, pois além de manter o fungo germinando por mais tempo, proporcionou também a quebra de dormência do mesmo. Porém, trabalhos seguindo essa linha de raciocínio devem ser realizados para esclarecer estas questões e também para verificar se, apesar dos uredósporos estarem germinando, eles também possam estar viáveis, causando infecção nas plantas quando inoculados.

Outro fator importante foram os resultados obtidos em casa-de-vegetação, onde genótipos que apresentavam algum tipo de resistência em outros trabalhos realizados em campo mostraram-se suscetíveis nas nossas condições, essas divergências nos resultados podem estar relacionadas às condições climáticas de Lavras, MG, ou pode tratar-se de uma outra raça do fungo. Portanto estudos com esses genótipos podem ser realizados em condições de campo para melhor observar o comportamento dos mesmos em relação a este patógeno.

As divergências entre os resultados obtidos no trabalho com microscopia eletrônica de varredura em relação ao modo de penetração do patógeno e os trabalhos já publicados, podem estar relacionados com raças diferentes de *P. pachyrrhizi* ou ao comportamento diferente do patógeno devido às condições climáticas em que ele foi submetido. Estudos com microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão devem ser realizados para entender como

ocorre todo o processo de desenvolvimento patógeno dentro do tecido do hospedeiro estes estudos podem ajudar esclarecer a respeito de estruturas que levam ao desenvolvimento de barreiras químicas e estruturais que podem levar a resistência. Portanto mais pesquisas se fazem necessárias para entender a relação deste patossistema *P. pachyrhizi* x soja visando o desenvolvimento de genótipos resistentes.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	
Resumo da análise de variância sobre a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) de ferrugem da soja.UFLA, Lavras, MG, 2005.....	46
TABELA 2A	
Resumo da análise de variância sobre a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) de ferrugem da soja.UFLA, Lavras, MG, 2005.....	46
TABELA 3A	
Resumo da análise de variância sobre a área abaixo da curva de progresso da germinação (AACPG) uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i> , UFLA, Lavras, MG, 2005.....	30
TABELA 4A	
Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i> armazenado em nitrogênio líquido (Tratamento 1). UFLA, Lavras, MG, 2005.....	30
TABELA 5A	
Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i> armazenado em nitrogênio líquido (Tratamento 2). UFLA, Lavras, MG, 2005.....	30
TABELA 6A	
Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i> em diferentes condições de armazenamento. UFLA, Lavras, MG, 2005.....	30

TABELA	Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de	
7A	germinação de uredósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	
	armazenado em Deep-freezer. UFLA, Lavras, MG,	
	2005.....	30

TABELA 1A. Resumo da análise de variância sobre a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) de ferrugem da soja. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		AACPI
Cultivares	7	381514,41**
Resíduo	21	61375,61
CV (%)		10,33

**** = Teste de F significativo a 1%.**

TABELA 2A. Resumo da análise de variância sobre a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) de ferrugem da soja. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		AACPS
Cultivar	7	423398,04**
Terço	2	13823345,51**
Cultivar*Terço	14	118192,32*
Resíduo	69	50860,67
CV (%)		19,10

*** = Teste de F significativo a 5%; ** = Teste de F significativo a 1%.**

TABELA 3A. Resumo da análise de variância da área abaixo da curva do progresso da germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		AACPG
Tratamento	4	15745129,83**
Resíduo	15	4115,79
CV (%)		3,83

** = Teste de F significativo a 1%.

Dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0.5$

TABELA 4A. Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* armazenados em nitrogênio líquido (Tratamento 1). UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		Germinação (%)
Tempo	9	648,06**
Resíduo	27	1,79
CV (%)		2,21

** = Teste de F significativo a 1%.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* armazenados em nitrogênio líquido (Tratamento 2). UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		Germinação %
Tempo	6	54,82**
Resíduo	18	0,90
CV (%)		3,41

** = Teste de F significativo 1%.

TABELA 6A. Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* armazenados em diferentes condições. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio	
		Germinação %	
		Folha Herbarizada	Geladeira
Tempo	3	104,25**	64,33 **
Resíduo	9	0,69	1,94
CV (%)		28,99	50,71

** = Teste de F significativo 1%.

TABELA 7A. Resumo da análise de variância sobre a porcentagem de germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* armazenados em Deep-Freezer. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrado Médio
		Germinação %
Tempo	4	1269,92**
Resíduo	12	4,49
CV (%)		3,41

** = Teste de F significativo 1%.