

PABLO KENNEDY DA SILVA PEREIRA

**RESISTÊNCIA DE SEIS ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS AO ISOLADO
MONOPUSTULAR PPUFV02 DE *Phakopsora pachyrhizi***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do curso de Agronomia, para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.
Modalidade: trabalho científico.
Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel
Coorientador: Leandro Luiz Borges

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

PABLO KENNEDY DA SILVA PEREIRA

**RESISTÊNCIA DE SEIS ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS AO ISOLADO
MONOPUSTULAR PPUFV02 DE *Phakopsora pachyrhizi***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências do curso de Agronomia, para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.
Modalidade: trabalho científico.
Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel
Coorientador: Leandro Luiz Borges

APROVADO: 28 de junho de 2017.

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

SUMÁRIO

Página

RESUMO	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A cultura da soja	1
1.2. Importância econômica	2
1.3. Doenças da soja	2
1.4. Ferrugem Asiática da Soja (FAS).....	3
1.4.1. Sintomatologia.....	4
1.5. Estratégias de controle.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Material genético	6
2.2. Inoculação e avaliação fenotípica da resistência	6
2.3. Análises de microscopia	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
4. CONCLUSÕES	14
5. REFERÊNCIAS	15

RESUMO

A ferrugem asiática da soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é a principal doença da sojicultura no Brasil. Esse patógeno se caracteriza por apresentar uma ampla gama de hospedeiros. O objetivo desse trabalho foi avaliar as reações de 10 acessos de plantas leguminosas após inoculação de *P. pachyrhizi*. Espécies de crotalária (*Crotalaria spectabilis*, *C. juncea* e *C. ochroleuca*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides*), puerária (*Pueraria phaseoloides*) e soja perene (*Neonotonia wightii*) foram desafiadas com o isolado monopostular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* efetuando-se as avaliações fenotípicas e microscópicas das reações observadas. Os acessos de calopogônio (CAL-0041 e CAL-0042) e soja perene (SP-0052) foram uniformemente suscetíveis, enquanto os acessos de *C. juncea* (CJ-0071) e de *C. spectabilis* (CS e CE-0062) foram imunes. Já os acessos de *C. ochroleuca* (CO-1, CO-2 e CO-0081) foram altamente resistentes, com a presença de pontos necróticos nos tecidos inoculados. Observou-se variabilidade de reação entre plantas do acesso de puerária (PU-0132) com a identificação de plantas resistentes e suscetíveis dentro do acesso avaliado. A avaliação fenotípica foi confirmada pelas análises microscópicas. Nas plantas imunes observou-se a germinação dos esporos e ausência de crescimento micelial nos tecidos vegetais, enquanto que nas suscetíveis observou-se germinação, crescimento de micélio e formação de estruturas reprodutivas (urédias). Esses resultados demonstram que plantas de calopogônio e soja perene podem ser fontes de inóculo de *P. pachyrhizi* no campo. A existência de plantas resistentes e suscetíveis dentro do acesso de puerária estudado permitirá a realização de estudos genéticos visando determinar a base genética da resistência do acesso PU-0132 ao isolado PPUFV02.

Palavras-chave: Leguminosas; *Phakopsora pachyrhizi*; Resistência, Microscopia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cultura da soja

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae tendo seu centro de origem na costa leste da Ásia. As espécies silvestres de soja são plantas rasteiras encontradas principalmente ao longo do rio Yangtse da China, que vem sendo submetida a um processo de domesticação e melhoramento (EMBRAPA SOJA, 2017).

A soja foi levada para os jardins botânicos europeus no final do século XV, mas somente no início do século XX é que o grão despertou o interesse das indústrias devido ao seu alto teor de óleo e proteínas (EMBRAPA SOJA, 2017). Possivelmente, devido às condições climáticas adversas, países como Rússia, Inglaterra e Alemanha inicialmente não obtiveram sucesso no cultivo (EMBRAPA SOJA, 2017). O cultivo em escala comercial iniciou-se nos Estados Unidos nos primórdios do século XX, mas foi em 1921 que a cadeia produtiva da soja se consolidou com a criação da *American Soybean Association* (ASA) (APROSOJA BRASIL, 2017).

Dados históricos apontam para 1882 como a chegada da soja no Brasil, após a instalação de ensaios experimentais no estado da Bahia. Porém data de 1901 o marco principal da cultura em âmbito nacional devido ao início dos cultivos na Estação Agrônômica de Campinas e a distribuição de sementes para os produtores paulistas (BONATO & BONATO, 1987).

Em 1914 a cultura finalmente chega ao Rio Grande do Sul, onde se adaptou devido às semelhanças das variáveis climáticas locais em relação as regiões produtoras dos Estados Unidos (BEZERRA et al., 2015; APROSOJA BRASIL, 2017). A introdução da soja na agricultura brasileira como cultura de verão em opção ao trigo, que até então era a principal cultura no sul do Brasil, foi de grande importância para a expansão do setor de criação de aves e suínos. A utilização da soja para produção de farelo foi tão importante que no ano de 1966 a produção nacional chegou a aproximadamente 500 mil toneladas (EMBRAPA, 2017).

Decorrente do aumento das indústrias e da demanda internacional de grãos, aliado ao desenvolvimento de novas variedades adaptadas aos diferentes climas das regiões brasileiras, a sojicultura obteve um grande crescimento a partir da década de 70.

Desta forma, devido à incorporação de regiões como a centro-oeste, a soja tornou-se uma das culturas mais importantes para o agronegócio brasileiro (APROSOJA BRASIL, 2017).

1.2. Importância econômica

Atualmente, os três maiores produtores mundiais de soja são Estados Unidos, Brasil e Argentina (EMBRAPA SOJA, 2017). O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor com uma área plantada prevista para a safra 2016/2017 de 33,9 milhões de hectares (ha) atingindo uma produtividade de 3.338 kg/ha e produção de 113 milhões de toneladas. Dentre os estados produtores destaca-se o Mato Grosso, com uma produção de 30,5 milhões de toneladas, seguido por Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2017).

A cadeia produtiva da soja é de extrema importância do ponto de vista sócio-econômico nacional, visto que em 2011 gerou em torno de 1,5 milhão de empregos em 17 estados do país, além de ter movimentado cerca de 24 bilhões de dólares devido à exportação de grãos, farelo e óleo (ABIOVE, 2017).

Como em todas as espécies cultivadas, fatores bióticos e abióticos podem prejudicar o desempenho das plantas em condições de campo reduzindo sua capacidade produtiva. Dentre os fatores bióticos que acometem a cultura da soja destacam-se as doenças que, de forma geral, ocasionam perdas médias que variam de 15 a 20% da produção (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2014).

1.3. Doenças da soja

No Brasil, aproximadamente 40 doenças ocorrem nas lavouras de soja, sendo essas causadas por fungos, bactérias, nematoides ou vírus (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2014). É válido ressaltar que esse número tende a receber um acréscimo devido à opção pela monocultura em alguns polos produtores, constante risco da introdução de novos patógenos no país e expansão das áreas produtoras (MATSUO et al., 2015).

As principais doenças que acometem a cultura da soja são: ferrugem asiática, oídio, mofo-branco, podridão-de-carvão, podridão radicular de *Phytophthora*, mancha-alvo, mela, cancro-da-haste, além das doenças provocadas por nematoides (MATSUO et al., 2015).

Dentre as doenças foliares mais agressivas destaca-se a ferrugem asiática da soja (FAS) (SINCLAIR & HARTMAN, 1999). A FAS atua diretamente sobre a capacidade produtiva dessa cultura, uma vez que reduz sua atividade fotossintética devido à desfolha prematura decorrentes da destruição do tecido foliar (ANDRADE & ANDRADE, 2002). Como resultado da ação de duas espécies do gênero *Phakopsora*, a soja pode vir a desenvolver dois tipos de ferrugens: a americana causada por *P. meibomiae*, ou a asiática que tem como agente causal o fungo *P. pachyrhizi* (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017).

1.4. Ferrugem Asiática da Soja (FAS)

Originária da Ásia, a FAS foi observada pela primeira vez no Paraguai em março de 2001 e rapidamente se disseminou pela América do Sul. No Brasil seu primeiro relato foi no estado do Paraná e atualmente se encontra amplamente disseminada em todas as regiões produtoras de soja do país (YORINORY & LAZZAROTTO, 2004). Nos EUA, líder mundial na produção de soja, a FAS só foi descrita no ano de 2004 (SHNEIDER et al., 2005).

A espécie *P. pachyrhizi* é pertence ao filo Basidiomicetes, ordem Uredinales e família Phakopsoraceae. *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico que foi descrito com base em sua fase telial. Características morfológicas, juntamente com análises de DNA da região ITS e PCR em tempo real são os principais métodos de distinção entre os patógenos causadores da ferrugem asiática e americana (FREDERICK et al., 2002; TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2014; CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017).

Amplamente disseminado pelas regiões produtoras de soja do mundo, o agente etiológico da FAS é disperso pelo vento. Quando em condições ótimas de desenvolvimento, ou seja, períodos longos de molhamento foliar e temperaturas variando de 18 a 26,5°C, as perdas podem chegar até 90% de produtividade em lavouras comerciais (TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2014). O efeito da doença é tão devastador que somente na safra 2013/14 foram gastos cerca de 2,2 bilhões de dólares com defensivos para controle desse fungo (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2017).

1.4.1. Sintomatologia

Os sintomas da FAS são caracterizados inicialmente pela presença de pequenas pontuações (1-2 mm de diâmetro) de coloração verde-acinzentada e formação de pequenas saliências na face abaxial das folhas. Com o passar do tempo, as urédias, estruturas em forma de vulcão com um pequeno orifício, surgem nas lesões por onde são liberados os uredósporos (YORINORI et al., 2005). As lesões adquirem formato angular e podem ocorrer em toda as partes vegetativas da planta e em qualquer estágio fenológico (HENNING et al., 2014). A doença tem fluxo ascendente, ou seja, evolui das porções baixas das plantas, onde se encontram as folhas mais velhas, em direção ao seu ápice (MATSUO et al., 2015).

Com o decorrer da doença, os genótipos de soja podem apresentar três respostas visuais à inoculação do fungo sendo elas: IR (*immune response*), ou seja, resposta imune; lesões RB (*reddish-brown*), típicas de resistência parcial; ou lesões TAN, que é característica de plantas suscetíveis ao patógeno (MILES et al., 2011; MATSUO et al., 2015).

1.5. Estratégias de controle

A FAS exige uma série de medidas para que seu controle seja eficaz (SOARES et al., 2004). Em busca de menores perdas em decorrência da doença têm sido recomendado à adoção de medidas como: utilização de cultivares precoces, semeadura no início da época recomendada para cada região e o constante monitoramento da lavoura entre outras (BARROS et al., 2008; TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA, 2014). A forma de controle mais utilizada é o controle químico (SOARES et al., 2004; BARROS et al., 2008). O controle químico é realizado com pulverizações de misturas dos fungicidas, principalmente, da classe dos triazóis e estrobilurinas (GODOY et al., 2016). De acordo com Andrade e Andrade (2002), a utilização de fungicidas é eficiente desde que as aplicações sejam realizadas no início da infecção. Segundo Barros et al. (2008), o controle químico da FAS ocasiona maior peso de sementes, menor porcentagem de abortamento de vagens e aumento no ciclo da cultura.

Buscando reduzir as fontes de inóculo de *P. pachyrhizi* e interromper seu ciclo, já que se trata de um fungo biotrófico, foi criado o vazio sanitário. Essa normativa

adotada em 11 estados brasileiros e o Distrito Federal determina um período de 60 a 90 dias sem soja no campo (EMBRAPA SOJA, 2017). Outra medida adotada por Goiás, Mato Grosso, Paraná e Tocantins foi a criação de um calendário de plantio tendo como objetivo principal a redução do número de aplicações de fungicidas (EMBRAPA SOJA, 2017).

A utilização de cultivares com resistência durável à *P. pachyrhizi* é a alternativa mais interessante e desejável para o controle da FAS, tanto do ponto de vista econômico como ambiental (Garcia et al., 2008). Atualmente a resistência específica à *P. pachyrhizi* é conhecida e oito locos foram mapeados recebendo a sigla *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*) e são eles: *Rpp1* (MCLEAN & BYTH, 1980), *Rpp2* (BROMFIELD et al., 1980a), *Rpp3* (BROMFIELD et al., 1980b; HARTWIG & BROMFIELD, 1983), *Rpp4* (HARTWIG, 1986), *Rpp5* (GARCIA et al., 2008), *Rpp6* (LI et al. 2012), *Rpp1-b* (KIM et al. 2012) e *Rpp?* (Hyyuga) (MONTEROS et al., 2006). É válido ressaltar que ao longo dos anos relativo sucesso foi obtido na obtenção de cultivares resistentes à FAS, porém devido à variabilidade genética dos isolados de *P. pachyrhizi* existentes esse se torna um grande desafio a ser superado (ROSA, 2016).

Atualmente são conhecidos 158 hospedeiros de *P. pachyrhizi* e os exatos limites dessa gama de hospedeiros ainda é desconhecida (SLAMINKO et al., 2008). É possível que algumas dessas espécies hospedeiras sejam importantes fontes de resistência à ferrugem asiática em soja, como já demonstrado para o feijão guandú (*Cajanus cajan*) (Kawashima et al., 2016). Esses autores identificaram e clonaram o gene de resistência *CcRpp01* capaz de conferir resistência aos 77 isolados de *P. pachyrhizi* coletados em diferentes regiões produtoras do Brasil, a dois isolados americanos e 01 isolado originário do Japão. Esse gene foi capaz de conferir resistência a *P. pachyrhizi* quando transferido para soja, corroborando a utilidade de outras espécies de leguminosas como fontes de resistência para a ferrugem asiática em soja. Essa possibilidade é fortalecida por observações de campo, onde não se observa a ocorrência da ferrugem asiática em plantas de outras espécies de leguminosas localizadas próximo ao campos de soja severamente atacados pelo patógeno.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da resistência ao fungo *Phakopsora pachyrhizi* em 10 acessos de seis espécies da família Fabaceae, visando identificar fenótipos contrastantes dentro ou entre os acessos analisados que permitam a realização de estudos genéticos visando determinar a base genética da resistência e futuros estudos de clonagem de novos genes de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Foram avaliados 10 acessos de plantas pertencentes a seis espécies da família Fabaceae quanto a resistência ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de plantas submetidas à inoculação com o isolado PPUFV02.

Acesso	Espécie	Total de plantas
PU-0132	<i>Pueraria phaseoloides</i>	10
SP-0052	<i>Neonotonia wightii</i>	10
CAL-0041	<i>Calopogonium mucunoides</i>	10
CAL-0042	<i>Calopogonium mucunoides</i>	10
CJ-0071	<i>Crotalaria juncea</i>	10
CE-0062	<i>Crotalaria spectabilis</i>	10
CS	<i>Crotalaria spectabilis</i>	10
CO-1	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	10
CO-2	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	10
CO-0081	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	10

2.2. Inoculação e avaliação fenotípica da resistência

Vinte sementes de cada espécie foram semeadas em vasos de 1L contendo areia. Após a germinação das sementes, 10 plântulas de cada espécie foram transplantadas em vasos de 0,5 L contendo uma mistura de solo e substrato em uma proporção de 4:3 (v/v). Após as folhas unifolioladas estarem completamente expandidas, as plantas foram submetidas à inoculação com o isolado monopustular PPUFV02 a uma concentração de 5×10^4 uredósporos/mL. Os uredósporos foram coletados e utilizados frescos para a preparação da suspensão que continha água destilada e Tween 20 (0,01%; v/v). A inoculação foi realizada utilizando atomizador de ar direto e a suspensão foi projetada na face abaxial das folhas.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 12 h em câmara de nevoeiro a 25 °C no escuro, sendo posteriormente transferidas para câmara de crescimento a 25 °C e avaliadas aos 7, 10 e 14 dias após a inoculação (DAI). Para a avaliação fenotípica das plantas foi utilizada uma escala diagramática (Figura 1) com notas variando de 0 a 4 de acordo com a severidade das lesões. Plantas que obtiveram notas inferiores ou iguais a 2 foram consideradas resistentes.

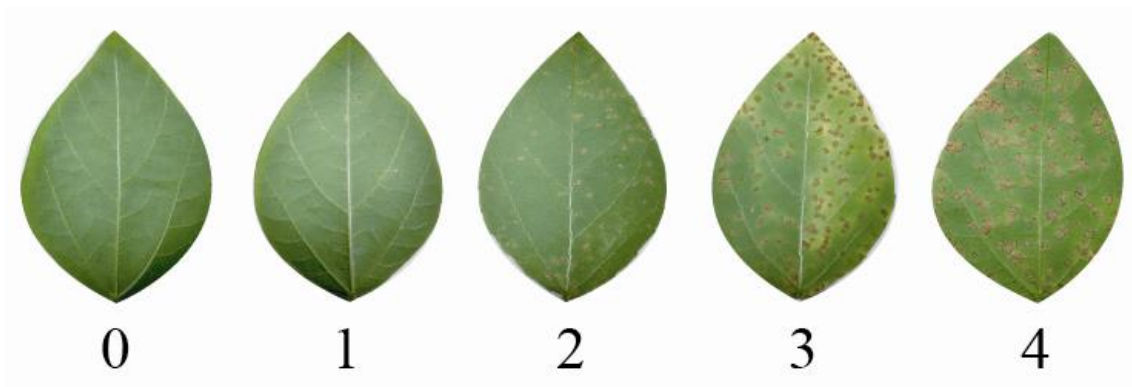


Figura 1. Escala diagramática para avaliação da ferrugem asiática.

2.3. Análises de microscopia

Efetuuou-se a avaliação em lupa estereoscópica (ZEISS Discovery V8) e em microscópio de fluorescência Olympus BX53F. Para a realização da análise fenotípica empregando-se microscopia de fluorescência foram retirados de plantas selecionadas três discos de tecido foliar lesionados e sadios que foram processados utilizando-se o procedimento descrito por Ayliffe et al. (2013). Os discos foram colocados em tubos plásticos de 15 mL contendo 10 mL de KOH 1M e SILVET L-77 Ag, numa proporção de 9,998 mL: 2 μ L, respectivamente. Os tubos foram identificados e mantidos em estufa a 37 °C. Após 24 horas de incubação, a solução foi descartada e trocada por 12 mL de Tris-HCl 50mM e os tubos mantidos em geladeira para conservação. Vinte e quatro horas antes da realização da microscopia, a solução de Tris-HCl 50mM foi substituída por 800 μ L de Tris-HCl 50mM + 200 μ L de aglutinina de gérmen de trigo (WGA) conjugada com o fluorocromo FITC; a aglutinina é uma lecitina que se liga especificamente à quitina presente na parede celular das estruturas fúngicas. Os tubos foram protegidos da luz com o auxílio de papel alumínio e mantidos à temperatura ambiente até a observação ao microscópio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de soja da variedade Conquista usadas como controle apresentaram lesões do tipo TAN e esporulação típica de reação de suscetibilidade. Tais resultados comprovam a viabilidade dos esporos utilizados na preparação da suspensão e eficiência da inoculação.

Os dois acessos de calopogônio (CAL-0041 e CAL-0042) foram suscetíveis ao isolado monopustular PPUFV02 obtendo nota máxima na escala de avaliação aos 14 DAI, observou-se queda das folhas sintomáticas em algumas das plantas inoculadas (Tabela 2). Esses resultados indicam que essa espécie pode ser uma importante fonte de inóculo do patógeno em condições de campo, corroborando os resultados de Slaminko et al. (2008).

Dentre os acessos de crotalária, os únicos que apresentaram algum tipo de lesão foliar, em decorrência do isolado PPUFV02, foram os de *C. ochroleuca*. Mesmo com a presença dessas lesões os acessos se enquadraram na categoria resistente, ou seja, nota inferior a 2. As demais crotalárias se mostraram imunes ao isolado não apresentando nenhum tipo de alteração macroscópica (Tabela 3). Considerando o elevado nível de resistências dessas espécies, seria interessante avaliar um maior número de acessos em cada espécie para identificar plantas suscetíveis que pudessem ser cruzadas com as plantas imunes visando à obtenção de populações segregantes para determinar o controle genético da resistência. Caso a resistência seja monogênica, talvez seja possível mapear e clonar o gene de resistência e transferi-lo para a soja, da mesma forma que foi feita para o gene *CC-Rpp01* de *Cajanus cajan* por Kawashima et al. (2016).

As plantas de soja perene apresentaram reações de suscetibilidade já na primeira avaliação (7 DAI), porém com desuniformidade entre plantas (Tabela 3). Aos 14 DAI todas apresentaram, de forma homogênea, elevado número de lesões no limbo foliar e princípio de esporulação, demonstrando a sua alta suscetibilidade ao isolado PPUFV02. Esses resultados demonstram que essa espécie é uma importante fonte de inóculo primário de *P. pachyrhizi*, uma vez que é frequentemente encontrada em beiras de estradas e/ou como vegetação de proteção de barrancos.

Foram identificadas plantas resistentes e suscetíveis no acesso PU-0132 de Puerária (Tabela 3). Foram observadas plantas com reações em ambos os extremos, ou seja, elevado número de lesões foliares conferindo a essas plantas a nota máxima na escala proposta e plantas imunes ao isolado recebendo por sua vez a nota zero. A disponibilidade de plantas com reações diferentes permitirá a obtenção de populações segregantes para estudo da herança da resistência nessa espécie e estudos visando à identificação do gene e sua clonagem, conforme anteriormente já destacado para o caso das crotalárias.

Tabela 2. Reação de diferentes acessos de espécies de leguminosas ao isolado PPUFV02.

Espécie	Genótipo/planta	Avaliação final
<i>Pueraria phaseoloides</i>	PU-0132-1	3
	PU-0132-2	2
	PU-0132-3	0
	PU-0132-4	3
	PU-0132-5	0
	PU-0132-6	3
	PU-0132-7	3
	PU-0132-8	4
	PU-0132-9	4
	PU-0132-10	4
<i>Calopogonium mucunoides</i>	CAL-0041-1	4
	CAL-0041-2	4
	CAL-0041-3	4
	CAL-0041-4	4
	CAL-0041-5	4
	CAL-0041-6	4
	CAL-0041-7	4
	CAL-0041-8	4
	CAL-0041-9	4
	CAL-0041-10	4
<i>Crotalaria juncea</i>	CJ-0071-1	0
	CJ-0071-2	0
	CJ-0071-3	0
	CJ-0071-4	0
	CJ-0071-5	0
	CJ-0071-6	0
	CJ-0071-7	0
	CJ-0071-8	0
	CJ-0071-9	0
	CJ-0071-10	0
<i>Crotalaria spectabilis</i>	CS-1	0
	CS-2	0
	CS-3	0
	CS-4	0
	CS-5	0
	CS-6	0
	CS-7	0
	CS-8	0
	CS-9	0
	CS-10	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	CO-2-1	0
	CO-2-2	0
	CO-2-3	0
	CO-2-4	1
	CO-2-5	1
	CO-2-6	0
	CO-2-7	0
	CO-2-8	1
	CO-2-9	0
	CO-2-10	0

Tabela 2. Reação de diferentes acessos de espécies de leguminosas ao isolado PPUFV02. (Continuação)

Espécie	Genótipo/planta	Avaliação final
<i>Neonotonia wightii</i>	SP-0052-1	4
	SP-0052-2	4
	SP-0052-3	4
	SP-0052-4	4
	SP-0052-5	4
	SP-0052-6	4
	SP-0052-7	4
	SP-0052-8	4
	SP-0052-9	4
	SP-0052-10	4
<i>Calopogonium mucunoides</i>	CAL-0042-1	4
	CAL-0042-2	4
	CAL-0042-3	4
	CAL-0042-4	4
	CAL-0042-5	4
	CAL-0042-6	4
	CAL-0042-7	4
	CAL-0042-8	4
	CAL-0042-9	4
	CAL-0042-10	4
<i>Crotalaria spectabilis</i>	CE-0062-1	0
	CE-0062-2	0
	CE-0062-3	0
	CE-0062-4	0
	CE-0062-5	0
	CE-0062-6	0
	CE-0062-7	0
	CE-0062-8	0
	CE-0062-9	0
	CE-0062-10	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	CO-1-1	0
	CO-1-2	0
	CO-1-3	0
	CO-1-4	0
	CO-1-5	1
	CO-1-6	0
	CO-1-7	1
	CO-1-8	0
	CO-1-9	0
	CO-1-10	0
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	CO-0081-1	1
	CO-0081-2	0
	CO-0081-3	0
	CO-0081-4	0
	CO-0081-5	0
	CO-0081-6	0
	CO-0081-7	0
	CO-0081-8	1
	CO-0081-9	0
	CO-0081-10	0

As avaliações fenotípicas foram confirmadas pela análise em lupa estereoscópica aos 16 DAI (Figura 02). Observou-se plena esporulação na soja (conquista) e em soja perene. Nos acessos de calopogônio foi possível a observação de urédias em início de esporulação. Os demais acessos apresentavam apenas lesões necróticas ou reação de imunidade (Figura 2).

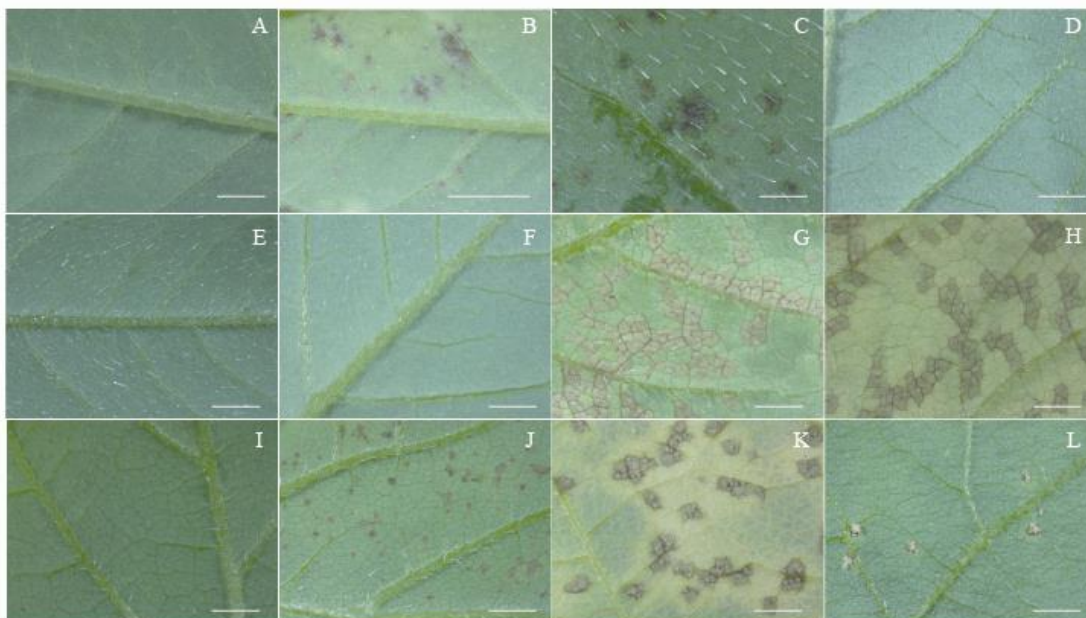


Figura 2. Reações de diferentes acessos de espécies de leguminosas ao isolado PPUFV02 aos 16 DAI. **(A)** *Crotalaria ochroleuca* C0-2, **(B)** *Crotalaria ochroleuca* C0-1, **(C)** *Crotalaria ochroleuca* C0-0081, **(D)** *Crotalaria spectabilis* CE-0062, **(E)** *Crotalaria juncea* CJ-0071, **(F)** *Crotalaria spectabilis* CS, **(G)** *Calopogonium mucunoides* CAL-0041, **(H)** *Calopogonium mucunoides* CAL-0042, **(I)** *Pueraria phaseoloides* PU-0132-5, **(J)** *Pueraria phaseoloides* PU-0132-1, **(K)** *Neonotonia wightii* SP-0052, **(L)** *Glycine max*.

Os resultados das avaliações foram também corroborados pelas análises microscópicas. O Corante WGA-FITC tem afinidade pela quitina, componente da parede celular das diferentes estruturas do fungo, permitindo uma análise detalhada do processo de germinação, penetração, colonização e esporulação (Figuras 3 e 4).

Os materiais de soja e soja perene foram altamente suscetíveis ao isolado PPUFV02 tendo presença nítida de sintomas e sinais nas avaliações visuais e com auxílio de lupa. Quando observadas ao microscópio a suscetibilidade foi confirmada com a presença de crescimento micelial e urédias no tecido do hospedeiro em avaliações aos 7 e 10 DAI. Quando inoculado em soja (conquista), o isolado foi mais agressivo sendo visível a presença de urédias esporulantes aos 10 DAI (Figura 3K e 3L). Também foi observado para os acessos de calopogônio a formação do tubo

germinativo e crescimento micelial no tecido foliar aos 7 DAI (Figura 3C). Aos 10 DAI observou-se tanto o crescimento micelial quanto a formação de urédias o que confirma a suscetibilidade dos acessos de calopogônio ao isolado PPUFV02 (Figuras 3E, 3F e 3G).

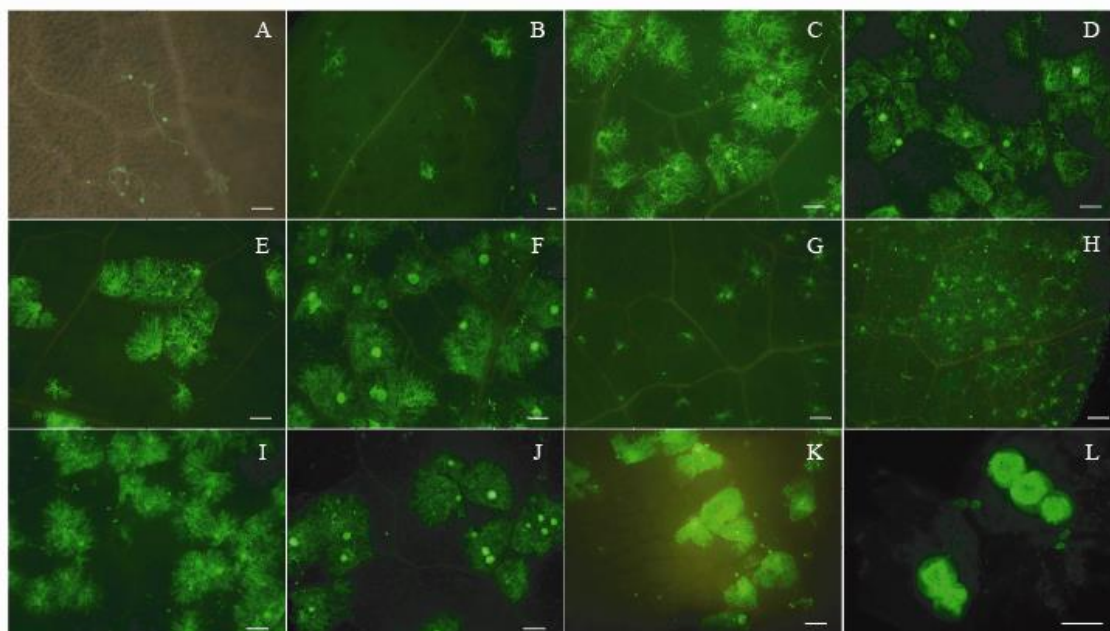


Figura 3. Análise microscópica das reações dos genótipos de leguminosas ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* aos 7 e 10 DAI. (A) *Crotalaria ochroleuca* C0-0081 7 DAI, (B) *Crotalaria ochroleuca* C0-0081 10 DAI, (C) *Calopogonium mucunoides* CAL-0041 7 DAI, (D) *Calopogonium mucunoides* CAL-0041 10 DAI, (E) *Calopogonium mucunoides* CAL-0042 7 DAI, (F) *Calopogonium mucunoides* CAL-0042 10 DAI, (G) *Pueraria phaseoloides* PU-0132-1 7 DAI, (H) *Pueraria phaseoloides* PU-0132-1 10 DAI, (I) *Neonotonia wightii* SP-0052 7 DAI, (J) *Neonotonia wightii* SP-0052 10 DAI, (K) *Glycine max* 7 DAI, (L) *Glycine max* 10 DAI.

A análise microscópica das folhas inoculadas dos acessos de *C. juncea* e *C. spectabilis* evidenciou a germinação dos esporos e ausência de crescimento micelial (Figura 4D, 4E e 4F), corroborando o fenótipo macroscópico de imunidade observado tanto aos sete quanto aos 10 DAI.

Nos três acessos de *C. ochroleuca* observou-se a presença de esporos germinados e a penetração do patógeno no tecido vegetal, sendo o processo de colonização observado por meio do crescimento micelial aos 10 DAI. Esse resultado é condizente com a observação de pontos necróticos indicativos de um crescimento micelial limitado nos tecidos penetrados (Figuras 4A, 4B e 4C).

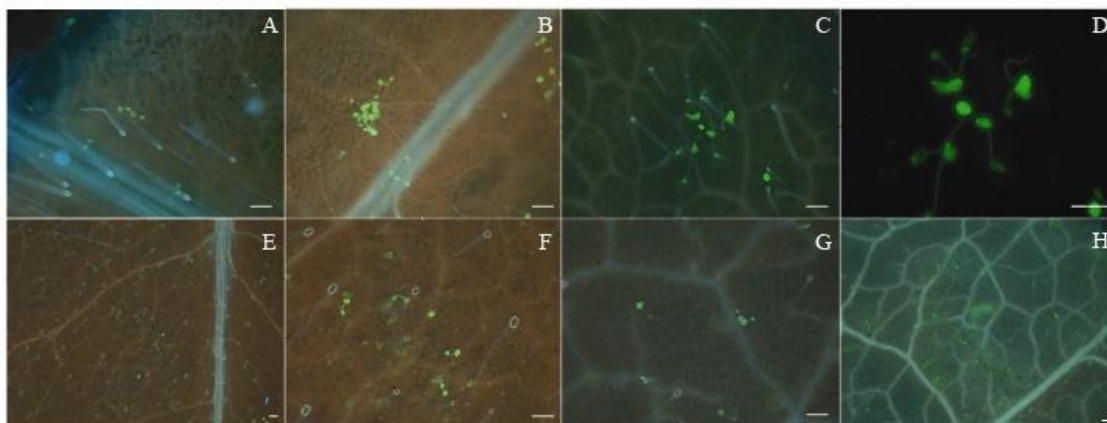


Figura 4. Análise microscópica das reações dos genótipos de leguminosas imunes ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* aos 7 e 10 DAI. **(A)** *Crotalaria ochroleuca* C0-2 7 DAI, **(B)** *Crotalaria ochroleuca* C0-2 10 DAI, **(C)** *Crotalaria spectabilis* CE-0062 7 DAI, **(D)** *Crotalaria spectabilis* CE-0062 10 DAI, **(E)** *Crotalaria juncea* CJ-0071 7 DAI, **(F)** *Crotalaria juncea* CJ-0071 10 DAI, **(G)** *Pueraria phaseoloides* PU-0132-5 7 DAI, **(H)** *Pueraria phaseoloides* PU-0132-5 10 DAI.

Em puerária observou-se um aumento do número de lesões no tecido foliar ao longo do tempo com notas 3 e 4 para os tempos de 7 e 10 DAI, respectivamente (Figuras 3G e 3H). Já na planta PU-0132-5, observou-se a presença de esporos germinados sem haver colonização do tecido foliar aos 7 e 10 DAI (Figura 4G e 4H). Esses resultados confirmam que o fenótipo de imunidade observado não ocorreu devido ao escape durante a inoculação e enfatizam a existência de variabilidade genética para resistência ao isolado PPUFV02 dentro do acesso PU-0132. Portanto, é possível a realização de estudos adicionais visando o desenvolvimento de populações segregantes para determinar a herança da resistência do acesso PU-0132.

4. CONCLUSÕES

- Os dois acessos CAL-0041 e CAL-0042 de Calopogônio eo acesso SP-0052 de soja perene foram uniformemente suscetíveis ao isolado PPUFV02.
- Os acessos CJ-0071 de *Crotalaria juncea*, CS e CE-0062 de *Crotalaria spectabilis* foram imunes ao isolado PPUFV02.
- Alto nível de resistência ao isolado PPUFV02, com a ocorrência de pontos necróticos, foi observada nos acessos CO-1, CO-2 e CO-0081 de *Crotalaria ochroleuca*.
- Plantas resistentes e suscetíveis ao isolado foram identificadas no acesso PU-0132 de *Pueraria phaseoloides*, o que permitirá o desenvolvimento de populações segregantes para estudos da herança da resistência.
- As análises fenotípicas macroscópicas foram confirmadas pelas análises microscópicas, demonstrando também a eficiência da inoculação e avaliação macroscópica.
- Confirmou-se que a soja perene pode ser uma importante fonte de inóculo de *P. pachyrhizi* no campo, dado a sua elevada suscetibilidade ao patógeno.
- *Pueraria phaseoloides* também pode ser uma fonte de inóculo de *P. pachyrhizi* no campo, pois algumas plantas do acesso PU-0132 permitiram a esporulação do patógeno.

5. REFERÊNCIAS

- ABIOVE. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=importancia-economica-e-social&area=NC0yLTI=>>. Acessado em: 24 de abril de 2017.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. A. Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultora brasileira. **Circular Técnica 11, Embrapa Agropecuária Oeste**, p. 1-11, 2002.
- APROSOJA BRASIL. A HISTÓRIA DA SOJA. Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/>>. Acessado em: 01 de maio de 2017.
- AYLIFFE, M.; SAMASIVAM K., P.; FEECHAN, A.; DRY, I.; SHUMANN, U.; MING-BO, W.; PRYOR, A.; EVANS, LAGUDAH. A simple method for comaring fungal biomass in infected plant tissues. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n.6, p.658-667, 2013.
- BARROS, H. B.; SEDIYAMA, T.; REIS, M. S.; CECON, P. R. Efeito do número de aplicações de fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.2, p. 239-245, 2008.
- BATISTA, C E. A. **Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BEZERRA, A. R. G. et al. Importância Econômica. In: SEDIYAMA, T et al. (Ed.); Soja do plantio à colheita. Viçosa – MG: Ed. UFV, 2015. p. 9-26.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: EMBRAPA CNPSo, **Documentos, 21**, 1987. 61 p.
- BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S.; KINGSOLVER, C. H. Virulence and aggressiveness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates causing soybean rust. **Phytopathology**, v. 70, n. 1, p. 17-21, 1980a.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254-255, 1980b.

CONAB-SÉRIES HISTÓRICAS. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_11_16_04_32_sojaserie_hist.xls>. Acessado em: 22 de maio de 2017.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM – AGENTE CAUSAL. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/#/conteudos/view/6>>. Acessado em: 01 de maio de 2017.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM – SINTOMAS DA DOENÇA. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/#/conteudos/view/7>>. Acessado em 01 de maio de 2017.

EMBRAPA SOJA. HISTÓRIA DA SOJA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia>>. Acessado em: 24 de abril de 2017.

EMBRAPA SOJA. VAZIO SANITÁRIO E CALENDARIZAÇÃO DA SEMEADURA DA SOJA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/ferrugem/vaziosanitariocalendarizacaosemeadura>>. Acessado em: 07 de junho de 2017.

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

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.; VIEIRA, L. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, n. 4, p.545-553, 2008.

GODOY, C. V.; ULTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; ANDRADE JR., C. R.; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FAVERO, F.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.;

JUNIOR, J. D.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; VOLF, M. R.; DEBORTOLI, M. P.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MADALOSSO, T.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica 119, EMBRAPA SOJA**, p. 1-6, 2016.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationship among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237-239, 1983.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. **Documentos Embrapa, 256**. 2014.

JORGE, V. R. **Diversidade molecular de *Phakopsora pachyrhizium* genótipos de soja com diferentes genes de resistência à ferrugem**. 2013. 32 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.

KAWASHIMA, C.G.; GUIMARÃES, G.A.; NOGUEIRA, S.R.; MACLEAN, D.; COOK, D.R.; STEUERNAGEL, B.; BAEK, J.; BOUVIOKOS, C.; V. MELO, B.D.; TRISTÃO, G.; DE OLIVEIRA, J.C.; RAUSCHER, G.; MITTAL, S.; PANICHELLI, L.; JOHNSON, E.; IYER, G.; TABOR, G.; WULLF., B.B.; RAIRDAN, G.J., BROGLIE, K.E., WU, G., VAN ESSE, P.H.; JONES, J.D.; BROMMONSCHENKEL, A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 661–665, 2016.

KIM, K.S. et al. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.125, p. 1339–1352, 2012.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v.125, p. 133–142, 2012.

MATSUO, É. et al. Manejo de Doenças. In: SEDYAMA, T. et al. (Ed.); Soja do plantio à colheita. Viçosa – MG: Ed. UFV, 2015. p. 288-309.

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

MILES, M. R.; BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; BERNER, D. K.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Characterizing Resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean. **Plant Disease**, v.95, p. 577-581, 2011.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and confirmation of the ‘Hyuuga’ red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, n. 2, v. 47, p. 829-834, 2006.

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v. 89, n. 7, p. 774, 2005.

SINCLAIR, J.B. & HARTMAN, G.L. Soybean diseases. In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (Eds.) **Compendium of soybean diseases**. 4 ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 1999. pp.3-4.

SLAMINKO, T. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; BONDE, M. R.; HARTMAN, G. L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 767-771, 2008.

SOARES, R. M.; RUBIN, S. A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA – REGIÃO CENTRAL DO
BRASIL 2014. Disponível
em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95489/1/SP-16-online.pdf>>.
Acessado em: 27 de abril de 2017.

YORINORI, J. T.; LAZAROTTO, J. J. Situação da ferrugem asiática da soja no
Brasil e na América do Sul. **Documentos Embrapa**, **236**. 2004.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L.
M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES-JUNIOR, J.
Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001
to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 4, p. 675-677, 2005.