



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX® NA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi*
CAPTADOS VIA COLETOR**

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX[®] NA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi*
CAPTADOS VIA COLETOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
Departamento de Agronomia da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Inês Cristina de Batista
Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Seiji Igarashi

Londrina
2012

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

I79v Ishikawa, Mayra Suemy.
Viabilidade técnica do Kit Quickstix® na identificação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* captados via coletor / Mayra Suemy Ishikawa. – Londrina, 2012.
41 f. : il.

Orientador: Inês Cristina de Batista Fonseca.
Coorientador: Seiji Igarashi.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Doenças e pragas – Teses. 2. Soja – Ferrugem asiática – Teses.
3. Fungos da ferrugem – Teses. I. Fonseca, Inês Cristina de Batista. II. Igarashi,
Seiji. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.4:633.34

MAYRA SUEMY ISHIKAWA

**VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX® NA IDENTIFICAÇÃO
DE ESPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi* CAPTADOS VIA
COLETOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
Departamento de Agronomia da Universidade
Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca
Orientadora
UEL - Londrina - Pr

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña
UEL - Londrina - Pr

Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Balan
UEM – Maringá - Pr

Londrina, 17 de Fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, pela força e saúde nesta caminhada.

À minha família, pelo apoio e incentivo de sempre, muitas vezes compreendendo minha ausência em momentos de intenso trabalho e estudo.

À Universidade Estadual de Londrina, que me acolheu, possibilitando meu crescimento profissional. À coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Agronomia e aos professores do Departamento, pela disponibilidade e prestatividade.

À Profa. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca, orientadora desta dissertação, por todo empenho, interesse, sabedoria, compreensão e exigência.

Ao Prof. Dr. Seiji Igarashi, co-orientador desta dissertação, por sua confiança, colaboração, incentivo, ensinamentos, sábias idéias, e, sobretudo, pela sua amizade e boa vontade sempre presentes.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Milenia Agrociências, pelo fornecimentos dos kits utilizados neste estudo.

Aos amigos e colegas, que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

ISHIKAWA, Mayra Suemy. **Viabilidade técnica do Kit Quickstix® na identificação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* captados via coletor.** 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

O coletor de esporos funciona como uma armadilha que captura os propágulos de fungos presentes no ar. Atualmente, a identificação de esporos da Ferrugem Asiática da Soja (causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sidow) coletados pelo coletor de esporos é feita através de varredura das lâminas em microscópio óptico comum. Este processo possibilita definir o momento inicial de flutuação de propágulos do patógeno, antes da ocorrência da infecção efetiva da planta e aparecimento dos primeiros sintomas, que já causariam danos. Porém, o processo descrito demanda certo tempo e mão de obra treinada para identificação correta dos esporos. Assim, a proposta deste trabalho foi testar a viabilidade técnica do uso do Kit QuickStix® para identificação de esporos de ferrugem asiática coletados via coletor “SIGA”, a fim de determinar a presença de esporos de *P. pachyrhizi*, com bom nível de confiabilidade e maior agilidade para planejar as estratégias de controle. O Kit QuickStix® para ferrugem em folhas de soja, desenvolvido e fabricado pela Envirologix e distribuído pela Milenia Agrociências, detecta a presença de Ferrugem Asiática da Soja nos estágios iniciais de infecção nas folhas. A solução tampão EB6 do Kit QuickStix® faz a extração de proteínas presente nos esporos e estruturas do patógeno, que reagem com anticorpos contidos nas tiras, determinando presença ou ausência de ferrugem na amostra. O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Foram testados diferentes números de esporos com quatro, oito e 12 gotas da solução EB6, com o objetivo de definir o menor número de esporos capaz de indicar a presença do patógeno através do kit bem como o volume adequado de solução extratora a ser utilizada. Também foi avaliada a intensidade da coloração do sinal indicativo de reação positiva e o tempo para sua ocorrência. Através da metodologia, o kit foi capaz de detectar pequenas quantidades de esporos (de 1 a 10). A proporção de resultados positivos aumentou conforme aumentou-se o número de esporos e diminuiu-se o número de gotas. A quantidade mais adequada de gotas de EB6 a ser utilizada foi quatro gotas, uma vez que apresentou maior quantidade de resultados positivos, para todas as classes de números de esporos. Não foi possível observar diferença entre o tempo para ocorrência dos resultados positivos para os diferentes tratamentos. A intensidade da linha de teste foi maior para as classes de maior número de esporos, para todas as quantidades de gotas utilizadas, porém, a diferença entre as quantidades de gotas só pode ser observada para a quantidade de 41 a 80 esporos.

Palavras – chave: Ferrugem asiática da soja. *Glycine max* (L.) Merril. Manejo da ferrugem asiática da soja. Armadilha de esporos.

ISHIKAWA, Mayra Suemy. **Technical feasibility of the QuickStix Kit® in identifying *Phakopsora pachyrhizi* spores captured by spore trap.** 2012. 42 p. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The spore trap acts as a trap that captures the fungal propagules in the air. Currently, the identification of spores of Asian Soybean Rust (caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow) captured by the collector is done by scanning the slides in optical microscope. This process enables you to define the initial moment of fluctuation of propagules of the pathogen, before the effective plant infection and first symptoms, which have caused damage to the plant. However, the process described demand some time and manpower trained for correct identification of the spores. Thus, the purpose of this study was to test the technical feasibility of using QuickStix Kit® for identification of soybean rust spores collected by "SIGA" collector, to determine the early presence of *P. pachyrhizi* spores, with a good level of reliability and more time to plan control strategies. The QuickStix Kit® for Asian Soybean Rust developed and manufactured by EnviroLogix and distributed by Milenia Agrosience, detects the presence of this disease in the early stages of infection on the leaves. The EB6 buffer solution of QuickStix Kit® extracts the proteins present in the fungal structures and spores, which reacts with antibodies in the strip, determining the presence or absence of Asian Soybean Rust in the sample. The study was conducted in the Laboratory of plant pathology at the State University of Londrina, PR. We tested different numbers of spores with four, eight and 12 drops of EB6, in order to define the fewest number of spores able to indicate the presence of the pathogen using the kit and the appropriate amount of drops to be used. We also analyzed the color intensity of the signal indicative of positive response and the time to its occurrence. Through the methodology, the kit was able to detect few number of spores. The proportion of positive results increases as the number of spores increases and decreased the number of drops. The most appropriate amount of drops of EB6 to be used was four drops, once presented the highest number of positive results for all classes of numbers of spores. No difference was found between the time of occurrence of positive results for the different treatments. The intensity of the test line was greater for classes with more spores, for all quantities of drops used, however, the difference between the amount of drops can only be observed for the amount 41-80 spores.

Key – words: Asian soybean rust. *Glycine max* (L.) Merrill. Management of asian soybean rust. Spore trap.

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Tabela 1** – Comparação entre a proporção de resultados positivos, para o número de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos 32
- Tabela 2** – Intervalo de confiança para e comparação entre a proporção de resultados positivos para as classes de número de esporos dentro de cada quantidade de gotas 33
- Tabela 3** – Comparação entre as quantidades de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos, para tempo de ocorrência dos resultados positivos, pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância 34
- Tabela 4** – Comparação entre as classes de número de esporos dentro do número de gotas da solução extratora utilizadas, para o tempo de ocorrência dos resultados positivos, pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância..... 35
- Tabela 5** – Comparação entre os postos médios das intensidades de linha de teste dos resultados positivos da quantidade de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos 36
- Tabela 6** – Comparação dos postos médios das intensidades de linha de teste dos resultados positivos, para as classes de número de esporos dentro de cada quantidade de gotas da solução extratora utilizadas 37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA	11
2.2 MANEJO DA DOENÇA.....	12
2.3 COLETOR DE ESPOROS	15
2.4 KIT QUICKSTIX® PARA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA	18
3 ARTIGO – VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX® NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i> CAPTADOS VIA COLETOR	24
3.1 RESUMO	25
3.2 ABSTRACT	26
3.3 INTRODUÇÃO	26
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie originária da Ásia, onde vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças às suas características nutritivas e industriais e à sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, seu cultivo se expandiu por todo o mundo, constituindo-se hoje numa das principais plantas cultivadas e a mais importante cultura de grãos do Brasil.

A produção brasileira do grão somou, na safra 2010/11, 75,32 milhões de toneladas, mantendo o ritmo de crescimento das últimas safras. Este volume é 9,7% ou 6,64 milhões de toneladas superior à produção obtida na safra 2009/10, quando foram colhidas 68,69 milhões de toneladas. O Estado do Paraná está entre os que apresentaram as maiores produtividades do País, em torno de 3.360 kg/ha. Na safra 2010/2011 a área cultivada de soja foi de 24,18 milhões de hectares, 3,0% ou 713,1 mil hectares superior à cultivada na safra passada (CONAB, 2011).

O Paraná, na safra de 2010/11, produziu 15,42 milhões de toneladas em 4,59 milhões de hectares, 9,6% e 2,4% superiores à safra passada, respectivamente (CONAB, 2011).

Um dos fatores que mais afetam a produtividade da cultura é a ocorrência de doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil, e esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura (TECNOLOGIAS, 2010). Dentre essas doenças, a importância da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, pode ser avaliada pela sua rápida expansão e pelo montante de perdas que tem causado.

No Brasil, desde sua detecção em 2000/2001, a doença alastrou em praticamente 100% da área de cultivo de soja (BALARDIN, 2006). Segundo o Boletim de Tecnologias de Produção de Soja – Paraná, 2005, editado pela EMBRAPA-Soja, as perdas na produtividade ocasionadas por essa doença variam de 10% a 80%. Estima-se que desde a sua primeira detecção até a safra de 2007/2008, a ferrugem asiática da soja tenha onerado o Brasil em mais de US\$ 10 bilhões, contabilizadas as perdas de produtividade e o custo para o controle da

doença (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2009).

Apesar da existência de cultivares resistentes à ferrugem asiática da soja, o controle químico ainda é, atualmente, a mais importante alternativa de controle da doença. A identificação do momento correto de início de aplicação de produtos destinados ao controle químico da ferrugem asiática da soja é de extrema importância para que ocorra um controle eficiente da doença.

Para auxiliar na definição desse momento, foram criados por diversas entidades vários tipos de programas tais como: programas “Syntinela”, “Consórcio Anti-ferrugem”, “S.O.S. Soja”, “Mini-lab”, “Radar”, “Aura in”, entre outros. No entanto, as aplicações de fungicidas feitas baseados em tais programas, em geral, vêm apresentando dificuldade no controle eficiente da ferrugem, pois essas aplicações estão sendo feitas após ter iniciado a infecção efetiva, necessitando maior número de aplicações por unidade de área.

Para melhorar o nível de eficiência de controle químico, a partir da safra 2003/04 vem sendo desenvolvido um programa na Universidade Estadual de Londrina (UEL), coordenado pelo Professor Seiji Igarashi. Esse programa, executado tanto em nível experimental como em lavouras comerciais da região, consiste na aplicação de fungicidas baseado no surgimento de primeiros esporos, utilizando-se o coletor de esporos Siga associado principalmente às condições climáticas e previsão de tempo.

O método atualmente utilizado para determinar a presença de esporos de ferrugem da soja no coletor Siga é através de observação ao microscópio óptico. Porém, essa metodologia pode apresentar dificuldade na identificação correta dos esporos pois na safra de verão muitas espécies cultivadas são atacadas por diferentes espécies de ferrugens, com esporos morfológicamente semelhantes.

Em fevereiro de 2009, a empresa multinacional Milenia Agrociências S/A apresentou um novo produto: o Kit QuickStix[®] para detecção da ferrugem asiática em folhas de soja. Este método é capaz de detectar a presença de ferrugem asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi* no campo em estágios iniciais de infecção.

Assim, surgiu a idéia de associar este método rápido de diagnóstico da ferrugem com o coletor de esporos Siga, substituindo assim a observação ao microscópio para identificação de esporos da ferrugem, otimizando o trabalho.

Portanto, este trabalho teve por objetivo testar a viabilidade do uso do Kit QuickStix[®] na identificação de esporos de *P. pachyrhizi* coletados via coletor SIGA visando a substituição do método tradicional de varredura ao microscópio óptico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow, é uma das doenças mais severas que incide na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill.], com danos variando de 10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (YORINORI et al., 2005).

Segundo Caldwell e Laing (2002), o inóculo chegou ao continente africano transportado por correntes aéreas. No continente Sul-americano foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1979, no município de Lavras (MG) (DESLANDES, 1979). No entanto, foi motivo de grande preocupação a partir da safra 2000/01, quando a doença foi identificada através de dois trabalhos de detecção da doença no Paraná, realizados por Yorinori et al. (2001) e Jaccoud Filho et al. (2001).

Na safra seguinte, 2001/02, o patógeno encontrava-se disseminado pelas principais regiões produtoras de soja do Brasil causando perdas na ordem de 112.000 t, equivalentes a US\$ 24,70 milhões e as perdas de rendimento variaram de 30% a 75% (YORINORI et al., 2002).

Segundo Godoy (2010), nos últimos anos, as perdas econômicas devido à ferrugem asiática da soja no Brasil, considerando a redução no rendimento de grãos e também o custo para o controle da doença, foram estimadas em US\$ 2 bilhões. O Consórcio Antiferrugem (2011), na última safra (2010/11) registrou 706 focos de ferrugem, sendo o Paraná o estado que apresentou maior número de registros (291).

A ocorrência da ferrugem asiática no Brasil, nas últimas safras comprovou o porquê este fungo é temido em todas as regiões onde ocorre. A importância da ferrugem no Brasil pode ser avaliada pela sua rápida expansão, virulência e pelo montante de perdas que tem causado, atingido níveis de redução de rendimento que frequentemente inviabilizam a colheita. No Brasil, os custos médios imputados ao controle de doença somam 8% do custo médio de produção (BEDIN et al., 2008).

As ocorrências foram epidêmicas na maioria das regiões relatadas, independente dos sistemas de semeadura, convencional ou plantio direto. A

explosão da doença justifica-se pelo seu ciclo curto, fechando em torno de 7 a 10 dias, quando as condições são favoráveis.

Os sintomas iniciais da doença consistem em pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura, que interferem no processo de fotossíntese das plantas. Na face inferior da folha podem-se observar Soros urediniais liberando os urediniósporos. As lesões tendem para o formato angular com 2 a 5 mm de diâmetro e, embora não seja comum, podem ocorrer nos pecíolos, vagens e caules (SINCLAIR; HARTMAN, 1999 apud OLIVEIRA; GODOY; MARTINS, 2005). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o peso final dos grãos (YANG et al., 1991). Segundo Bromfield (1984) as infecções no início do florescimento produzem elevados níveis de dano, afetando também o teor de proteína no grão.

Phakopsora pachyrhizi está adaptado a temperaturas que variam de 15°C a mais de 30°C e pode causar danos na cultura da soja em todas as regiões produtoras onde ocorra molhamento foliar por um período maior que seis horas (BROMFIELD, 1984). Porém, a doença ocorre com maior severidade, sob condições de prolongado período de molhamento foliar (10 a 12 horas) e temperaturas médias abaixo de 28°C, sendo a precipitação considerada o fator mais importante no progresso da doença nas condições de campo (DEL PONTE et al., 2006). As primeiras lesões são visíveis 4-5 dias após a inoculação e as primeiras frutificações (urédias) e esporulações aos 6-7 dias após a inoculação (YORINORI, 2004).

A magnitude do dano que o patógeno pode ocasionar depende do momento em que o mesmo incide na cultura, das condições climáticas favoráveis à sua multiplicação, da resistência/tolerância e do ciclo da cultivar utilizada (TOGNI, 2008), além do manejo cultural e fitotécnico da cultura e pelo conjunto de fatores relacionados ao controle químico (GASSEN, 2005). Segundo Balardin (2006), atualmente, o controle químico tem viabilizado o cultivo da soja na presença da ferrugem asiática, evitando reduções no rendimento.

2.2 MANEJO DA DOENÇA

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é ainda um grave problema no Brasil, podendo causar queda prematura das folhas e conseqüente redução de produtividade. Assim, constitui-se em um dos

principais problemas fitossanitários da cultura (JULIATTI et al., 2003 apud SANTOS et al., 2007).

Para reduzir o risco de danos à cultura, as estratégias de manejo recomendadas no Brasil para essa doença são: a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, a utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente e a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis (TECNOLOGIAS, 2010).

A resistência é um processo natural em que a planta é capaz de expressar respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que atuam de forma a impedir (resistência vertical) ou desacelerar (resistência parcial) o processo infeccioso (AGRIOS, 2005).

A obtenção de genótipos resistentes às principais doenças vem sendo um dos objetivos dos programas de melhoramento de qualquer cultura. No caso da soja, patógenos como o causador da ferrugem asiática, são preocupantes para o pleno desenvolvimento da cultura, necessitando de medidas de controle eficientes, uma vez que seus danos são tanto do aspecto quantitativo como qualitativo (YORINORI et al., 2005).

A recente incorporação de genes de resistência em cultivares comerciais resultou no lançamento de materiais como a soja Inox® e BRSGO 7560® (SOUZA et al., 2009), na região centro-oeste do Brasil. No entanto, a estabilidade dessa resistência é duvidosa, devido à grande variabilidade do patógeno. Dessa forma, a busca por genótipos com resistência parcial à ferrugem asiática ainda aparece como uma importante estratégia no controle da doença.

Devido à instabilidade dessa resistência vertical e ao baixo índice de utilização dessas cultivares em todo o país, bem como a inexistência de cultivares resistentes à todas as doenças, o controle químico tem sido a medida de controle mais viável no controle da ferrugem asiática. Santos et al. (2007) afirmam ainda que, dentre os métodos de controle, o único disponível, no momento, é o químico, por meio de fungicidas. O controle da ferrugem atualmente é baseado no uso de fungicidas do grupo dos triazóis e estrobilurinas.

As medidas de controle, principalmente o químico, dependem da identificação apropriada da doenças e dos seus agentes causais. Sem a

identificação apropriada da doença e do seu agente causal, as medidas de controle podem ser uma perda de tempo e dinheiro e podem conduzir a perdas maiores da cultura (DUARTE; BOA, 2005).

No Brasil, ainda há carência de informações, em nível de lavoura, em relação à época ideal de aplicação, à eficiência dos produtos e ao número de aplicações necessárias para um controle econômico da doença (REIS et al., 2007).

Como meio de remediação do patógeno adota-se o controle químico por meio da aplicação de solução fungicida. Para a determinação do momento ideal para a aplicação do fungicida devem-se realizar inspeções periódicas na lavoura de soja usando lupas de 10x a 20x de aumento, evitando, dessa forma, o falso diagnóstico. A confirmação do fungo é feita pela constatação no verso da folha (face abaxial), de saliências semelhantes a pequenas feridas, que correspondem à estrutura de reprodução do fungo (urédias). Por se tratar de uma doença que, geralmente, tem seu diagnóstico já na sua fase desenvolvida, através dos sintomas, implica em gastos e perdas de rentabilidade, acarretando prejuízos.

Portanto, o monitoramento da doença e sua identificação nos estágios iniciais são essenciais para o controle eficiente. Sua identificação é uma das principais dificuldades a campo, pois existem outras doenças com sintomatologia semelhante e também porque, no início, os sintomas da ferrugem são bastante discretos, passando despercebidos ao monitoramento superficial.

A proteção química realizada preventivamente, aliada às estratégias de manejo durante a fase crítica da cultura, possibilita redução consistente no dano relativo à ferrugem asiática da soja. Fungicidas aplicados de forma preventiva tem se destacado como a estratégia mais eficaz no controle desta doença (AZEVEDO, 2001; HARTMAN et al., 1991). Soares et al. (2004) citam ainda o controle químico como principal método de controle quando a doença já está instalada na lavoura.

No Brasil, a média de número de aplicações de fungicida por hectare para controle da ferrugem asiática da soja varia de região para região, e, segundo Bedin et al. (2008) essa aplicação deverá ser realizada durante os estádios R1 e R3 (início ao final do florescimento), e o objetivo é proteger a soja contra ferrugem e outras doenças que poderão interferir na produtividade e que ocorrem na mesma fase (antracnose, mancha alva, mela e oídio entre outras).

2.3 COLETOR DE ESPOROS

Coletores ou armadilhas de esporos são amplamente utilizados em patologia vegetal. Potencialmente podem ser usados para determinar a extensão geográfica da incursão de um patógeno de plantas, para acompanhar sua disseminação, e até para declarar uma área livre de determinado patógeno, seguindo um programa de erradicação (JACKSON; BAYLISS, 2011).

Segundo Melzer e Berton (1989), existem vários tipos de coletores de esporos, usualmente utilizados em programas de alertas fitossanitários, sendo largamente utilizados em todo o mundo, para o controle das seguintes doenças: sarna da macieira (causada por *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.); míldio da videra (agente causal *Plasmopora viticola* (Berk et Curt.) Berl. et de Toni); ferrugem do cafeeiro (agente causal *Hemileia vastatrix* Bert. et BR.); míldio do lúpulo (agente causal *Peronospora humili* (Miyabe et Takochashi); míldio do tabaco (agente causal *Peronospora tabacina* Adam.); requeima da batata (agente causal *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.).

O Sistema de Alerta para o Controle da Sarna da Macieira constitui um bom exemplo de alerta fitossanitário. Esse sistema é baseado na Tabela de Mills, criada em 1951, por Mills e Laplante.

A Tabela de Mills consiste no cruzamento de dados climáticos e de flutuação de esporos indicando a necessidade ou não de aplicação de fungicidas, o que resulta num alerta para o controle da sarna da macieira. Este trabalho permitiu que as pulverizações contra a sarna da macieira fossem feitas não somente baseadas na fenologia da planta e de forma preventiva, mas observando-se o desenvolvimento do patógeno em relação às condições climáticas, o que permitiu reduzir de 3 a 4 vezes o número de aplicações.

A ideia da utilização de um coletor de esporos, como mais uma ferramenta para determinar o melhor momento de controle da ferrugem asiática (causada por *P. pachyrhizi*) da soja, data de uma experiência realizada por Igarashi et al. (1986), um ano após o primeiro relato de “brusone” ocorrendo em trigo. Igarashi buscava na época, uma alternativa de identificação precoce da estrutura da *Pyricularia grisea* presente no ar, associado às condições climáticas para poder efetuar o controle químico preventivo da doença. Até então, o controle químico da “brusone” do trigo era efetuado após o surgimento de primeiros sintomas, o que

interferiria na eficiência do controle. Com a utilização de coletor de esporos, pode-se identificar o melhor momento para aplicação de fungicidas antes que a doença cause danos expressivos à cultura.

Para complementar o monitoramento via coletor de esporos, foi ainda desenvolvido pela equipe do professor Seiji Igarashi, um manual multimídia contendo fotos dos sintomas e esporos das principais ferrugens de ocorrência na região, tanto em culturas anuais, perenes, frutíferas, ornamentais e plantas voluntárias, a fim de facilitar a diferenciação entre os esporos que possam estar presentes durante a leitura das lâminas. Além disso, um equipamento denominado “Sigatest” também foi desenvolvido com o objetivo de auxiliar na calibragem dos pulverizadores, indicando se o produto está atingindo o terço inferior das plantas, local onde inicia-se a epidemia da ferrugem asiática da soja, devido às condições mais propícias ao desenvolvimento do seu agente causal.

Segundo recomendações da Embrapa (TECNOLOGIAS, 2010), o controle químico recomendado para a cultura da soja consiste, quando não preventiva, na aplicação de fungicida logo após o surgimento de primeiros sintomas, portanto, aplicação “curativa”. No entanto, os fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, são na maioria produtos eminentemente preventivos. Conseqüentemente, quando aplicado após o surgimento de primeiros sintomas, a tendência é de ocorrer uma redução significativa da eficiência de controle, principalmente em função do estresse causado.

O método de avaliação da doença baseado na sintomatologia só permite visualizar os sintomas quando já existe certo nível de infecção, considerando que o surgimento das primeiras lesões pode ocorrer após um período de incubação de 7 dias e a urédia forma-se de 9 a 10 dias após a infecção da folha (BALARDIN, 2002). Infecções recentes não são visíveis a olho nu, portanto, a avaliação visual pode estar subestimando o real nível de incidência da doença. Assim, deve-se considerar incidência de 5% quando do aparecimento dos primeiros sintomas da doença (REUNIÃO, 2006).

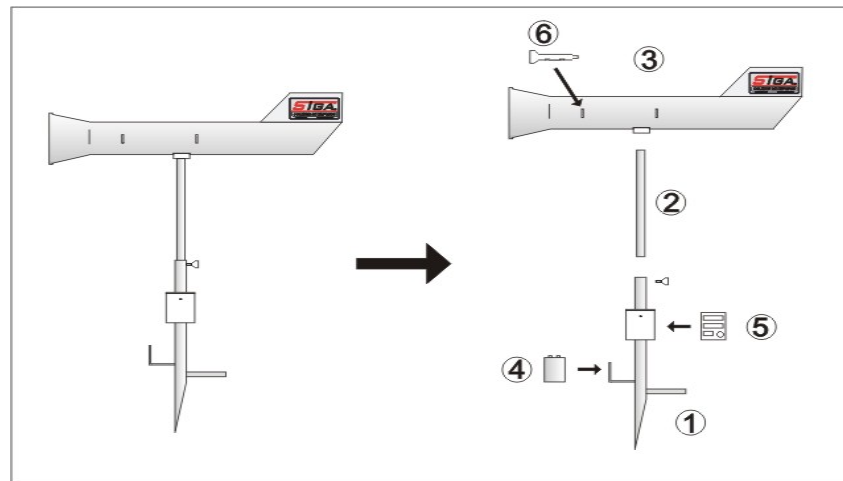
A constatação da chegada de esporos é de fundamental importância do ponto de vista epidemiológico. De acordo com Agrios (2005), para que ocorra a doença é necessário que haja uma interação entre os três componentes da doença que é freqüentemente chamado de triângulo da doença, em que, cada vértice do triângulo representa um dos três componentes, quais sejam: H = hospedeiro, ou

seja, fonte nutritiva preferencial do patógeno; P = patógeno ou agente causal de doença biótica ou parasitária e, A = ambiente, conjunto de fatores edafo-climáticos que envolvem o patógeno e o hospedeiro.

Portanto, a presença de esporos no ar não significa necessidade imediata de aplicação de fungicida, mas sim, indica apenas perigo de infecção e necessidade de iniciar o monitoramento climático.

O coletor de esporos “SIGA” é esquematizado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema do coletor de esporos Siga. 1–base do coletor; 2–haste de sustentação; 3–coletor de esporos; 4–bateria; 5–termo higrômetro; 6– suporte de lâminas.



No suporte de lâminas é colocada uma lâmina de microscopia com fita adesiva transparente de face dupla, onde os esporos ficam aderidos. Estas lâminas são analisadas ao microscópio óptico, onde se faz a identificação e quantificação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* e de outros fungos. Porém, esse processo de identificação demanda certo tempo e pessoal devidamente treinado para diferenciação das espécies de ferrugens, o que resulta na demora do envio dos resultados.

Segundo Melzer e Berton (1989), a eficiência de um sistema de alerta depende essencialmente da rapidez com que, após a obtenção dos dados, é repassada a informação aos produtores sobre a necessidade de ser feito um tratamento da doença.

2.4 KIT QUICKSTIX[®] PARA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

A capacidade de detectar e identificar com precisão um organismo potencialmente patogênico é fundamental para o diagnóstico e gestão de doenças de plantas. Os métodos convencionais para detectar patógenos de plantas muitas vezes envolve a interpretação dos sintomas e a identificação morfológica, geralmente seguidas de isolamento e cultivo do organismo e, às vezes, caracterização com base em testes de patogenicidade (SINGLETON; MIHAIL; RUSH, 1992).

Embora estes métodos sejam fundamentais para o diagnóstico, a precisão e a confiabilidade dependem de perícia taxonômica qualificada. Além disso, o isolamento e cultivo de organismos torna o diagnóstico demorado e trabalhoso e, essa técnica só pode ser aplicada para organismo capazes de ser cultivados in vitro. Este último aspecto é uma séria limitação da aplicabilidade destas técnicas pois, possivelmente menos do que 1% dos microrganismos em uma amostra ambiental podem ser cultivadas in vitro (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Mais recentemente desenvolvidos, métodos que são baseados em abordagens moleculares são cada vez mais utilizada para detectar e identificar os patógenos de plantas. Estes incluem técnicas imunológicas (ou sorológicas) e técnicas baseadas em ácido nucleico. Em comparação com ensaios convencionais, estas técnicas são mais adequados para análises de rotina, uma vez que são geralmente mais rápidas, mais específicas, mais sensíveis e mais precisas, e podem ser realizadas e interpretadas por pessoas sem experiência taxonômica.

Portanto, a falha em identificar adequadamente patógenos de plantas baseada em técnicas morfológicas levou ao desenvolvimento das abordagens moleculares e, cada vez mais, os laboratórios de diagnóstico vêm buscando métodos de rotina rápidos que fornecem identificação confiável e sensível, além de detecção e quantificação precisa de patógenos de plantas (LIEVENS; THOMMA, 2005).

Neste contexto, a Envirologix desenvolveu, através de técnicas imunológicas, o Kit QuickStix[®], ferramenta que detecta precocemente a presença de ferrugem asiática em folhas de soja. Tal kit é importado e comercializado pela Milênia Agrociências.

Uma vez que essa metodologia é nova no mercado, e ainda não existem trabalhos sobre o assunto, as informações a seguir foram retiradas do catálogo de instruções para utilização do kit, inserido na embalagem do produto, bem como do site da empresa e trabalhos de validação para comercialização do teste.

A Envirologix é uma empresa especializada no desenvolvimento de kits de diagnóstico baseados na tecnologia de imunoenaios. Nos imunoenaios, anticorpos específicos são criados para detectar proteínas alvos e marcadores de transgênicos. São capazes de detectar OGMs na lavoura ou em grãos, micotoxinas em lavouras e em grãos, patógenos em plantas, toxinas de algas na água, bolores e suas toxinas em ambientes internos e resíduos de pesticidas em água, solo e alimentos.

O Kit QuickStix[®] para ferrugem asiática da soja é o único dispositivo de fluxo lateral disponível para detecção do fungo da ferrugem. O kit de diagnóstico tem sido testado em campo na África do Sul, Brasil, Argentina e Estados Unidos em folhas de soja infectadas, e fornece resultado qualitativo (presença/ausência) do patógeno.

De acordo com Serra (2011), testes de fluxo lateral são simples dispositivos destinados a detectar a presença (ou ausência) de um alvo em uma amostra (matriz). Mais comumente estes testes são usados para diagnósticos médicos (por exemplo, teste de gravidez), mas, recentemente, eles começaram a ser amplamente utilizados em análise de contaminantes em alimentos e água.

O tempo para obter o resultado do teste é um fator-chave para estes produtos. Os testes levam poucos minutos para indicar o resultado. Outra principal vantagem deste formato de teste em comparação com outros imunoenaios é a simplicidade, normalmente exigindo pouca ou nenhuma preparação de amostra ou reagente.

Produzidos em forma de tiras, os testes de fluxo lateral são uma forma de imunoenamo em que a amostra flui ao longo de um substrato sólido por ação capilar. Após a amostra ser submetida ao teste, ela encontra um reagente de cor que se mistura e transita pelo substrato encontrando linhas ou zonas pré-tratadas com um anticorpo ou antígeno. Dependendo do alvo presente na amostra, o reagente colorido pode vincular-se à linha de teste. A maioria dos testes são destinados a operar puramente de forma qualitativa, no entanto, é possível medir a

intensidade da linha de teste para determinar a quantidade do alvo presente na amostra.

O Kit QuickStix[®] para ferrugem em soja diagnostica a presença no campo da ferrugem asiática em folhas de soja causadas pela *Phakopsora pachyrhizi*. As tiras são capazes de detectar a presença do patógeno precocemente nos estágios iniciais da infecção que vão desde as lesões cloróticas (antes da formação das pústulas) até a formação de pústulas imaturas (sem a liberação dos esporos). Durante este período, é muito difícil a diferenciação dos sintomas da ferrugem de outras doenças causadas por bactérias, vírus ou fungos e/ou danos causados por insetos. Durante estudos com inoculação controlada, este kit detectou a presença de ferrugem antes mesmo do aparecimento dos sintomas visuais. Isto é possível porque o kit detecta a presença de antígenos presentes nos urediniósporos, teliósporos e micélio de *Phakopsora pachyrhizi*.

Segundo manual de instruções contido no kit, o teste detecta a presença de ferrugem na soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, e não reage de forma cruzada com outras infecções de ferrugem causadas por espécies dos gêneros *Uromyces* e *Puccinia*. O teste é um excelente complemento às inspeções visuais através de lupas.

Hoyos et al. ([20__]), ao estudarem a especificidade e sensibilidade do QuickStix para ferrugem em folhas de soja, observaram uma sensibilidade do produto em detectar a presença de *P. pachyrhizi* em amostra contendo de 500 a 1000 esporos/mL. Além disso, não detectou reação cruzada com outros quatro patógenos que causam doenças comuns em soja e que poderiam ter seus sintomas confundidos com os da ferrugem: *Cercospora sojina* (mancha “olho-de-rã”), *Cercospora kikuchii* (agente causal da mancha púrpura da semente e crestamento foliar), *Septoria glycines* (agente causal da mancha parda), e *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (agente causal da pústula bacteriana).

Embora os níveis de contaminação no campo sofram ampla variação dependendo das condições ambientais, em estudos de inoculação controlada, o kit detectou a presença da ferrugem asiática mesmo antes do aparecimento dos sintomas visíveis. O teste fornece resposta qualitativa: presente/ ausente. O método é rápido, preciso e fácil de usar por qualquer pessoa e todos os materiais necessários estão incluídos no kit.

Atualmente, além da identificação de *P. pachyrhizi* em folhas de soja, o kit vem sendo utilizado para comprovação de hospedeiros alternativos do patógeno, como em estudo realizado por Bradley et al. (2010), onde fez o primeiro relato de ferrugem asiática da soja, causada por *P. pachyrhizi*, ocorrendo em kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*), em Illinois. Neste relato, os autores utilizaram o kit como uma das ferramentas para comprovar que o patógeno presente nas plantas de kudzu era realmente o causador da ferrugem asiática da soja.

O kit é composto por tiras QuickStix[®] contidas em tubos dessecantes, minitubos de coleta descartáveis com tampa, pistilos plásticos descartáveis para maceração das folhas e frasco conta-gotas de EB6 Solução tampão de Extração, como mostrado na Figura 2.

O procedimento de utilização do kit começa com uma amostra composta pela solução tampão de extração e o tecido foliar suspeito. A extremidade inicial da tira é revestida por um anticorpo primário + marcadores de ouro. Quando submetida a uma amostra positiva contendo proteínas alvo, as mesmas se ligam ao anticorpo primário. A linha de teste é revestida por um anticorpo de captura que reage com a ligação formada anteriormente. O anticorpo de captura fica ligado à proteína alvo e libera o anticorpo primário. A captura da proteína alvo forma uma linha vermelha indicativa de resultado positivo. Para verificar a viabilidade da tira, uma linha de controle ao final da tira é revestida por anti-anticorpo ao qual se ligam os anticorpos primários livres, formando a linha de controle, uma segunda linha vermelha indicativa da validade do resultado (Figura 3).

Figura 2 – Componentes do Kit QuickStix[®] para ferrugem em folhas de soja. 1-tubo dessecante; 2-fitas Quickstix[®]; 3-mini tubo de coleta; 4-solução tampão EB6; 5-pistilo.



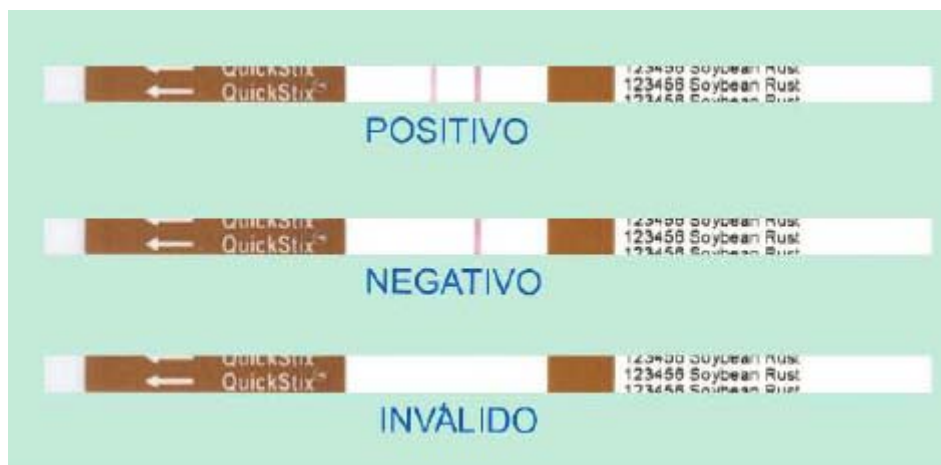
O preparo das amostras deve seguir os seguintes passos:

1. Coleta do tecido foliar suspeito fechando a tampa do minitubo de coleta sobre a região da folha infeccionada recortando um disco do tecido foliar suspeito
2. Maceração do tecido girando o pistilo plástico dentro do minitubo de coleta.
3. Adição de 12 gotas de Solução Tampão de Extração dentro do minitubo utilizando o conta-gotas do frasco da solução tampão. Continuar o processo de maceração do tecido foliar por 20-30 segundos ou até que o tecido foliar esteja bem macerado.
4. Inserir a tira dentro do minitubo de coleta. A amostra deverá fluir na tira.
5. Aguardar 10 minutos de reação da tira para iniciar a interpretação do resultado. Desta forma, resultados de amostras positivas serão mais facilmente constatados.

O desenvolvimento da linha de controle indica o correto funcionamento da tira. Caso a tira não desenvolva a linha de controle, a mesma deverá ser descartada e deverá ser utilizada uma nova tira. Se for desenvolvida a linha de teste e a linha de controle o resultado deve ser interpretado como positivo (qualquer linha rosa visível deve ser considerado um resultado positivo); se a linha

de teste não for observada após 10 minutos, mas for desenvolvida a linha de controle, o resultado deverá ser interpretado como negativo para a amostra testada. Exemplos de possíveis resultados são demonstrados na Figura 3.

Figura 3 – Possíveis resultados a serem interpretados na tira.



Ao fazer uma análise de custo-benefício da utilização deste kit no monitoramento de ferrugem asiática da soja na Argentina, supondo dois cenários diferentes, Delafosse (2006) concluiu que os benefícios econômicos derivados do diagnóstico através do kit seriam várias vezes maior do que os custos associados à ele.

No mesmo estudo, o autor ainda afirma que, na cadeia agro-industrial, os principais, e que serão mais diretamente beneficiados por este método são os agentes das redes de assistência técnica, as empresas que oferecem serviços de aplicação de fungicidas e os próprios produtores de soja.

3 ARTIGO

**VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX® NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS
DE *Phakopsora pachyrhizi* CAPTADOS VIA COLETOR**

VIABILIDADE TÉCNICA DO KIT QUICKSTIX® NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE *Phakopsora pachyrhizi* CAPTADOS VIA COLETOR

3.1 RESUMO

O coletor de esporos funciona como uma armadilha que captura os propágulos de fungos presentes no ar. Atualmente, a identificação de esporos da Ferrugem Asiática da Soja (causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sidow) coletados pelo coletor de esporos é feita através de varredura das lâminas em microscópio óptico comum. Este processo possibilita definir o momento inicial de flutuação de propágulos do patógeno, antes da ocorrência da infecção efetiva da planta e aparecimento dos primeiros sintomas, que já causariam danos. Porém, o processo descrito demanda certo tempo e mão de obra treinada para identificação correta dos esporos. Assim, a proposta deste trabalho foi testar a viabilidade técnica do uso do Kit QuickStix® para identificação de esporos de ferrugem asiática coletados via coletor “SIGA”, a fim de determinar a presença de esporos de *P. pachyrhizi*, com bom nível de confiabilidade e maior agilidade para planejar as estratégias de controle. O Kit QuickStix® para ferrugem em folhas de soja, desenvolvido e fabricado pela Envirologix e distribuído pela Milenia Agrociências, detecta a presença de Ferrugem Asiática da Soja nos estágios iniciais de infecção nas folhas. A solução tampão EB6 do Kit QuickStix® faz a extração de proteínas presente nos esporos e estruturas do patógeno, que reagem com anticorpos contidos nas tiras, determinando presença ou ausência de ferrugem na amostra. O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Foram testados diferentes números de esporos com quatro, oito e 12 gotas da solução EB6, com o objetivo de definir o menor número de esporos capaz de indicar a presença do patógeno através do kit bem como o volume adequado de solução extratora a ser utilizada. Também foi avaliada a intensidade da coloração do sinal indicativo de reação positiva e o tempo para sua ocorrência. Através da metodologia, o kit foi capaz de detectar pequenas quantidades de esporos (de 1 a 10). A proporção de resultados positivos aumentou conforme aumentou-se o número de esporos e diminuiu-se o número de gotas. A quantidade mais adequada de gotas de EB6 a ser utilizada foi quatro gotas, uma vez que apresentou maior quantidade de resultados positivos, para todas as classes de números de esporos. Não foi possível observar diferença entre o tempo para ocorrência dos resultados positivos para os diferentes tratamentos. A intensidade da linha de teste foi maior para as classes de maior número de esporos, para todas as quantidades de gotas utilizadas, porém, a diferença entre as quantidades de gotas só pode ser observada para a quantidade de 41 a 80 esporos.

Palavras – chave: Ferrugem asiática da soja. *Glycine max* (L.) merril. Manejo da ferrugem asiática da soja. Armadilha de esporos.

TECHNICAL FEASIBILITY OF THE QUICKSTIX KIT® IN IDENTIFYING *Phakopsora pachyrhizi* SPORES CAPTURED BY THE COLLECTOR

3.2 ABSTRACT

The spore trap acts as a trap that captures the fungal propagules in the air. Currently, the identification of spores of Asian Soybean Rust (caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow) captured by the collector is done by scanning the slides in optical microscope. This process enables you to define the initial moment of fluctuation of propagules of the pathogen, before the effective plant infection and first symptoms, which have caused damage to the plant. However, the process described demand some time and manpower trained for correct identification of the spores. Thus, the purpose of this study was to test the technical feasibility of using QuickStix Kit® for identification of soybean rust spores collected by "SIGA" collector, to determine the early presence of *P. pachyrhizi* spores, with a good level of reliability and more time to plan control strategies. The QuickStix Kit® for Asian Soybean Rust developed and manufactured by EnviroLogix and distributed by Milenia Agroscience, detects the presence of this disease in the early stages of infection on the leaves. The EB6 buffer solution of QuickStix Kit® extracts the proteins present in the fungal structures and spores, which reacts with antibodies in the strip, determining the presence or absence of Asian Soybean Rust in the sample. The study was conducted in the Laboratory of plant pathology at the State University of Londrina, PR. We tested different numbers of spores with four, eight and 12 drops of EB6, in order to define the fewest number of spores able to indicate the presence of the pathogen using the kit and the appropriate amount of drops to be used. We also analyzed the color intensity of the signal indicative of positive response and the time to its occurrence. Through the methodology, the kit was able to detect few number of spores. The proportion of positive results increases as the number of spores increases and decreased the number of drops. The most appropriate amount of drops of EB6 to be used was four drops, once presented the highest number of positive results for all classes of numbers of spores. No difference was found between the time of occurrence of positive results for the different treatments. The intensity of the test line was greater for classes with more spores, for all quantities of drops used, however, the difference between the amount of drops can only be observed for the amount 41-80 spores.

Key – words: Asian soybean rust. *Glycine max* (L.) merrill. Management of asian soybean rust. Spore trap.

3.3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie originária da Ásia, onde vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças às suas características nutritivas e industriais e à sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, seu cultivo se expandiu por todo o mundo, constituindo-se hoje

numa das principais plantas cultivadas e a mais importante cultura de grãos do Brasil.

Um dos fatores que mais afetam a produtividade da cultura é a ocorrência de doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil, e esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura (TECNOLOGIAS, 2010). Dentre essas doenças, a importância da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, pode ser avaliada pela sua rápida expansão e pelo montante de perdas que tem causado.

No Brasil, a ferrugem asiática foi identificada pela primeira vez no final da safra 2000/01, e na safra seguinte, 2001/02, o patógeno encontrava-se disseminado pelas principais regiões produtoras de soja do Brasil causando perdas na ordem de 112.000 t, equivalentes a US\$ 24,70 milhões e as perdas de rendimento variaram de 30% a 75% (YORINORI et al., 2002).

Os sintomas iniciais da doença consistem em pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura, que interferem no processo de fotossíntese das plantas. Na face inferior da folha podem-se observar Soros uredinais liberando os urediniosporos. As lesões tendem para o formato angular com 2 a 5 mm de diâmetro e, embora não seja comum, podem ocorrer nos pecíolos, vagens e caules (SINCLAIR; HARTMAN, 1999 apud OLIVEIRA; GODOY; MARTINS, 2005). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o peso final dos grãos (YANG et al., 1991).

Para reduzir o risco de danos à cultura, as estratégias de manejo recomendadas no Brasil para essa doença são: a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, a utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente e a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis (TECNOLOGIAS, 2010).

Para Santos et al. (2007) dentre os métodos de controle, o único disponível, no momento, é o químico, por meio de fungicidas. Soares et al. (2004) também citam o controle químico como principal método de controle quando a doença já está instalada na lavoura. Para que o controle químico apresente sua máxima eficiência, deve ser aplicado de forma preventiva, ou logo que ocorram os

primeiros sintomas, portanto, para determinação do momento ideal para a aplicação do fungicida devem-se realizar inspeções periódicas na lavoura.

Coletores ou armadilhas de esporos podem auxiliar o monitoramento da doença, detectando a presença de propágulos do fungo no ar, via pela qual são disseminados a longas distâncias. No coletor utilizado neste trabalho, os propágulos presentes no ar ficam aderidos à uma fita adesiva de dupla face aderida à uma lâmina de microscopia. A identificação dos esporos coletados por estes equipamentos é feita através da varredura dessas lâminas ao microscópio óptico, portanto, necessita de mão-de-obra treinada para a correta identificação dos esporos de *P. pachyrhizi*, tornando-se uma das grandes dificuldades na sua utilização no campo.

Visando a agilidade, praticidade e confiabilidade na identificação da ferrugem asiática da soja no campo, a empresa americana Enviroligix desenvolveu, através de técnicas imunológicas, o Kit QuickStix[®], processo que detecta rapidamente presença de ferrugem asiática em folhas de soja, tornando-se um excelente complemento às inspeções visuais através de lupas.

O Kit QuickStix é capaz de detectar a presença do patógeno nos estágios iniciais da infecção que vão desde as lesões cloróticas (antes da formação das pústulas) até a formação de pústulas imaturas. Isto é possível porque o kit detecta a presença de antígenos presentes nos urediniósporos, teliósporos e micélio de *Phakopsora pachyrhizi*. Outras vantagens do teste são a simplicidade, normalmente exigindo pouca ou nenhuma preparação de amostra ou reagente, e o tempo, levando poucos minutos para desenvolver o resultado.

Portanto, este trabalho teve por objetivo testar a viabilidade do uso do Kit QuickStix[®] na identificação de esporos de *P. pachyrhizi* coletados via coletor SIGA visando a substituição do método tradicional de varredura ao microscópio óptico.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia da UEL, no município de Londrina, Paraná.

Para a realização do trabalho, os seguintes materiais foram

utilizados: lâmina de microscopia, fita adesiva dupla face, microscópio óptico comum, microscópio estereoscópio, coletor de esporos Siga, estilete, pinça, e o Kit QuickStix®.

Primeiramente, a fim de comprovar a eficiência do teste, foram realizados testes em tecido foliar apresentando lesões iniciais de ferrugem asiática da soja, seguindo-se o protocolo do kit.

Para comprovar a especificidade do kit foram realizados testes com ferrugens de outras espécies de plantas, como café (causada por *Hemileia vastatrix*), trigo (causada por *Puccinia triticina*), trevo (causada por *Puccinia oxalidis*) corda-de-viola (causada por *Puccinia crassipes*), entre outros, além de testes com outras doenças que atacam a cultura de soja, como mancha púrpura e crestamento foliar (causados por *Cercospora kikuchii*), míldio da soja (causado por *Peronospora manshurica*) e oídio (causado por *Microsphaera diffusa*).

Os primeiros testes foram feitos através de varredura dos esporos da face abaxial de folhas contendo pústulas de ferrugem asiática da soja. Uma grande quantidade de esporos foi colocada no minitubo, macerados com o pistilo e testados com a tira.

O próximo passo foi testar se os esporos aderidos na fita adesiva de face dupla poderiam apresentar a mesma reação, o que indicaria a possibilidade de aliar o uso do kit ao coletor de esporo. A fita adesiva utilizada neste trabalho foi da marca Adelbras, transparente, composta de filme de polipropileno bi-orientado coberto com adesivo à base de água de ambos os lados.

Para realizar o referido teste, o coletor de esporo foi instalado em casa de vegetação, previamente semeada com soja apresentando elevada infecção de ferrugem asiática. As lâminas retiradas do coletor foram analisadas ao microscópio óptico para confirmação da presença de esporos. A fita adesiva foi retirada da lâmina e colocada no minitubo e a amostra submetida ao teste após a adição do reagente e maceração com o pistilo.

Os próximos testes foram realizados para definir a quantidade mínima de esporos necessários para determinar a presença da ferrugem, pois esses dados são de fundamental importância para a adaptação do uso do kit com o coletor; uma vez que, normalmente no início da flutuação de esporos o coletor tem detectado número reduzido de esporos.

Para tanto, duas tiras de fita adesiva de dupla face de 0,9 cm de

largura e 5 cm de comprimento foram colocadas paralelamente a lâmina que seria acoplada ao coletor. Cada fita foi subdividida em áreas de aproximadamente 1 cm² (quadrantes). A fim de capturar número reduzido de esporos, as lâminas foram retiradas do coletor após pequeno período de tempo, aproximadamente de uma hora, e submetidas a análise microscópica, para quantificar o número de esporos em cada quadrante, para assim testar a solução extratora com diferentes números de esporos aderidos à lâmina. Assim, cada um dos quadrantes foi retirado com o auxílio de estilete e, aderido ao pistilo com a face contendo os esporos exposta, colocado no minitubo contendo quatro, oito ou 12 gotas da solução extratora (0,144 mL, 0,293 mL e 0,441 mL, respectivamente) . Foi realizado um atrito entre a fita adesiva contendo os esporos e a parede interna do minitubo, com o objetivo de romper as estruturas do fungo para liberação das proteínas-alvo. Para os resultados positivos foram analisados o tempo para ocorrência da reação e a intensidade da coloração da linha de teste. O tempo decorrido até ser possível visualizar o resultado positivo foi classificado em dois intervalos: até 5 minutos e acima de 5 minutos.

Devido à inviabilidade de manipulação da quantidade de esporos a ser coletada e a dificuldade de obtenção de repetições do mesmo número, os mesmos foram separados em 5 classes: C1 (de 1 a 10 esporos); C2 (de 11 a 20 esporos); C3 (de 21 a 40 esporos); C4 (de 41 a 80 esporos); e C5 (acima de 80 esporos). A avaliação da intensidade da coloração da linha de teste foi feita por comparação visual utilizando-se uma escala confeccionada com 3 intensidades.

Para cada interação (classe de número de esporos X número de gotas da solução extratora), foram feitas 20 repetições, a fim de obter maior confiabilidade dos resultados. Os dados de presença/ausência (positivo/negativo), bem como o tempo decorrido para ocorrência dos resultados positivos foram submetidos ao teste Qui-quadrado para estudar a associação entre tratamento (classe ou número de gotas) e resposta (positivo/negativo ou até 5 minutos/acima de 5 minutos); e os dados de nota para intensidade da linha de teste para resultados positivos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A especificidade do kit para o fungo *P. pachyrhizi* foi comprovada através de testes feitos com outros fungos fitopatogênicos de ocorrência na cultura

da soja, como mancha púrpura e crestamento foliar (agente causal *Cercospora kikuchii*), míldio da soja (agente causal *Peronospora manshurica*) e oídio (agente causal *Microsphaera diffusa*), bem como com outras espécies de ferrugens de outras culturas, como café (agente causal *Hemileia vastatrix*), trigo (agente causal *Puccinia triticina*), trevo (agente causal *Puccinia oxalidis*) corda-de-viola (agente causal *Puccinia crassipes*). Para estes testes os resultados foram negativos, não sendo possível visualizar a linha de teste, somente a linha de controle indicativa da validade dos testes.

Hoyos et al. ([20__]) e Delafosse (2006) comprovaram também a eficiência e especificidade do kit. Os primeiros salientam ainda, como benefício do diagnóstico precoce, a antecipação do preparo logístico do controle químico.

Os primeiros testes com esporos de ferrugem asiática da soja coletados por varredura da face abaxial das folhas comprovaram a eficácia do kit, uma vez que os resultados foram positivos, e a resposta rápida e de fácil visualização.

Os testes prévios com a utilização de fita adesiva dupla face indicaram a não interferência da mesma na resposta do kit à presença de *P. pachyrhizi*. Assim, os testes posteriores foram realizados.

De acordo com o teste de Qui-quadrado realizado para verificar o efeito do número de gotas da solução extratora em cada classe de número de esporos (Tabela 1), houve efeito significativo somente nas classes C2 (11 a 20 esporos), C3 (21 a 40 esporos) e C4 (41 a 80 esporos). Para a classe C2, a proporção de resultados positivos foi significativamente maior quando utilizaram-se quatro gotas da solução. A proporção de resultados positivos diminuiu conforme aumentou-se o número de gotas da solução extratora, sendo a menor proporção encontrada quando utilizou-se 12 gotas. Para as classes C3 e C4 observa-se superioridade significativa entre as proporções somente de quatro gotas em relação à 12 gotas, não sendo possível observar diferença significativa entre quatro e oito gotas, e entre oito e 12 gotas. Nas demais classes, C1 e C5, não houve diferença significativa, mas o p-valor muito próximo à significância indica superioridade da maior proporção, que seria utilizando-se quatro gotas. Portanto, as melhores respostas foram obtidas utilizando quatro gotas da solução extratora, e, mesmo quando não foi possível observar efeito do número de gotas utilizadas, recomenda-se utilização de quatro gotas, devido à tendência de apresentar mais resultados

positivos, e, além, disso, economia de solução.

Tabela 1 – Comparação entre a proporção de resultados positivos, para o número de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos.

Esporos	Gotas	Positivos n=20	% Positivos	X ²	p-valor
C1 ⁽¹⁾	4	9	45	5,2841	0,0712
	8	4	20		
	12	3	15		
C2	4	17	85 A ⁽²⁾	29,76	< 0,0001
	8	8	40 B		
	12	0	0 C		
C3	4	15	75 A	12,5253	0,0019
	8	8	40 AB		
	12	4	20 B		
C4	4	19	95 A	6,8944	0,0318
	8	15	75 AB		
	12	12	60 B		
C5	4	19	95	5,625	0,0601
	8	16	80		
	12	13	65		

⁽¹⁾ C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos.

⁽²⁾ valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Qui-quadrado, a 5% de significância.

Na Tabela 2, ao compararmos, dentro de cada número de gotas da solução extratora, a proporção de resultados positivos das diferentes classes de números de esporos, os resultados indicam que, para as 3 quantidades de gotas utilizadas (quatro, oito e 12), a proporção de resultados positivos aumenta conforme aumenta-se o número de esporos.

Quando utilizou-se quatro e oito gotas nota-se diferença significativa somente entre as classes C1 e C4, e C1 e C5 de número de esporos. Já para 12 gotas nota-se diferença significativa entre a classe C2 (que não apresentou nenhum resultado positivo) e as classes C4 e C5, com maiores proporções de positivos. Ainda para 12 gotas, as classes C1, C2 e C3 não diferem entre si, sendo essas 3 classes as que apresentaram menor proporção de resultados positivos, 15% para C1, 0% para C2 e 20% para C3. As classes C4 e C5 apresentaram maior proporção de resultados positivos, porém, a classe C4, que apresentou 60% de positivos não

diferiu da classe C3, que apresentou 20%.

Tabela 2 – Intervalo de confiança para e comparação entre a proporção de resultados positivos para as classes de número de esporos dentro de cada quantidade de gotas.

Gotas	Esporos	Positivos n=20	% Positivos	Limites de Confiança (95%)		X ²	p-valor
				Inferior	Superior		
4	C1 ⁽¹⁾	9	45 B ⁽²⁾	23,1%	68,5%	20,74	0,0004
	C2	17	85 AB	62,1%	96,8%		
	C3	15	75 AB	50,9%	91,3%		
	C4	19	95 A	75,1%	99,9%		
	C5	19	95 A	75,1%	99,9%		
8	C1	4	20 B	5,7%	43,7%	20,97	0,0003
	C2	8	40 AB	19,1%	63,9%		
	C3	8	40 AB	19,1%	63,9%		
	C4	15	75 A	50,9%	91,3%		
	C5	16	80 A	56,3%	94,3%		
12	C1	3	15 C	3,2%	37,9%	30,61	<0,0001
	C2	0	0 C				
	C3	4	20 BC	5,7%	43,7%		
	C4	12	60 AB	36,1%	80,9%		
	C5	13	65 A	40,8%	84,6%		

⁽¹⁾C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos. ⁽²⁾ valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Qui-quadrado, a 5% de significância.

A utilização de quatro gotas apresentou maior proporção de resultados positivos, variando entre 45 e 95%, enquanto para oito e 12 gotas as variações foram de 20 a 80% e 0 a 65%, respectivamente. As classes C4 e C5 em combinação com quatro gotas da solução extratora apresentaram as maiores proporções de resultados positivos, com um intervalo de confiança de 75,1 a 99,9%; isso significa que, com 95% de confiança, 75,1 a 99,9% das amostras compostas por mais de 40 esporos e quatro gotas da solução extratora serão positivas.

Ao submeter diferentes concentrações de esporos de *P. pachyrhizi* aos anticorpos do teste de fluxo lateral, Hoyos et al. ([20__]), notou um bom nível de detecção entre 500 a 1000 esporos/mL. Já no presente estudo, em que 12, oito e quatro gotas da solução tampão de extração correspondem a 0,441 mL, 0,293mL e 0,144 mL, respectivamente, as maiores concentrações testadas foram de 284,7 a 555,5 esporos/mL e acima de 555,5 esporos/mL (classe C4 e C5 de número de esporos, respectivamente, com utilização de quatro gotas); e as menores

concentrações foram de 2,3 a 22,3 esporos/mL, correspondentes à classe C1 de número de esporos e 12 gotas da solução extratora. Esses resultados indicam que o teste pode ser mais sensível do que se pensava, pois obteve-se bom nível de detecção nas maiores concentrações testadas, aproximadamente metade do intervalo detectado em estudos do autor.

Na avaliação do tempo para ocorrência dos resultados positivos, 95,7% dos resultados ocorreram em menos de cinco minutos, com uma média de 2,85 minutos. Os demais resultados positivos ocorreram em mais de cinco minutos, em uma média de seis minutos. Realizando o teste de qui-quadrado sobre esses dados não foi possível notar diferenças entre as proporções de resultados ocorridos em menos ou mais de cinco minutos, para o número de gotas dentro de cada classe de número de esporos (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre as quantidades de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos, para tempo de ocorrência dos resultados positivos, pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.

Esporos	Gotas	Positivos n=20	≤ 5 min ⁽²⁾	% ≤ 5 min	X ²	p-valor
C1 ⁽¹⁾	4	9	8	88,89	1,7778	0,4111
	8	4	4	100		
	12	3	2	66,67		
C2	4	17	15	88,24	0,0028	0,9579
	8	8	7	87,5		
	12	0	0	0		
C3	4	15	15	100	5,9712	0,0505
	8	8	8	100		
	12	4	3	75		
C4	4	19	18	94,74	1,4526	0,4837
	8	15	15	100		
	12	12	12	100		
C5	4	19	19	100		
	8	16	16	100		
	12	13	13	100		

⁽¹⁾ C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos. ⁽²⁾ Apresentaram resultado positivo em até cinco minutos;

Para a classe C3, o p-valor não foi significativo mas ficou muito próximo da significância, indicando maior proporção de resultados positivos ocorridos em menos de cinco minutos utilizando-se quatro e oito gotas da solução

extratora em relação à utilização de 12 gotas.

Ao comparar as classes de número de esporos dentro dos números de gotas da solução extratora, também não foi possível notar diferenças significativas, apesar do p-valor ter sido significativo para 12 gotas (Tabela 4). Nesta situação, o p-valor indica superioridade de proporções de resultados ocorridos em até 5 minutos das classes C4 e C5.

Tabela 4 – Comparação entre as classes de número de esporos dentro do número de gotas da solução extratora utilizadas, para o tempo de ocorrência dos resultados positivos, pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.

Gotas	Esporos	Positivos	≤ 5 min ⁽²⁾	% ≤ 5 min	X²	p-valor
4	C1 ⁽¹⁾	9	8	88,89	4,088	0,3942
	C2	17	15	88,24		
	C3	15	15	100		
	C4	19	18	94,74		
	C5	19	19	100		
8	C1	4	4	100	5,4825	0,2413
	C2	8	7	87,5		
	C3	8	8	100		
	C4	15	15	100		
	C5	16	16	100		
12	C1	3	2	66,67	7,8222	0,0498
	C2	-	-	-		
	C3	4	3	75		
	C4	12	12	100		
	C5	13	13	100		

⁽¹⁾ C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos. ⁽²⁾ Apresentaram resultado positivo em até cinco minutos;

A partir destes dados, recomenda-se a interpretação dos resultados após, pelo menos, seis minutos da submissão da amostra ao teste, devido à este ser o maior tempo observado para ocorrência da reação positiva.

Para os resultados positivos também foi avaliado a intensidade da linha de teste observada, de acordo com uma escala de três intensidades de coloração. A partir dos resultados comparando os postos médios dos números de gotas dentro de cada classe de número de esporos (Tabela 5), nota-se diferença significativa somente para a classe C4, quando o posto médio para quatro gotas foi superior aos postos médios para oito e 12 gotas, que não diferiram entre si. Esse resultado mostra que, na classe C4, utilizando-se quatro gotas, observa-se maior intensidade da coloração da linha de teste, o que não foi possível observar para as

outras classes de número de esporos.

Tabela 5 – Comparação entre os postos médios das intensidades de linha de teste dos resultados positivos da quantidade de gotas da solução extratora utilizadas dentro de cada classe de número de esporos.

Esporos	Gotas	Frequência			Mediana	Posto médio	(p) Kruskal-Wallis
		1	2	3			
C1 ⁽¹⁾	4	6	3	0	1	0,4346	
	8	4	0	0	1		
	12	2	1	0	1		
C2	4	11	6	0	1	0,775	
	8	6	1	1	1		
	12	0	0	0			
C3	4	9	6	0	1	0,0729	
	8	7	1	0	1		
	12	1	2	1	2		
C4	4	2	13	4	2	33,16 A ⁽²⁾	<0,0001
	8	12	2	1	1	17,33 B	
	12	10	2	0	1	15,92 B	
C5	4	2	11	6	2	0,6999	
	8	3	8	5	2		
	12	3	7	3	2		

⁽¹⁾ C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos. ⁽²⁾ valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Já quando comparamos as classes de números de esporos dentro de cada número de gotas da solução extratora (Tabela 6), observamos diferenças significativas para ambas as quantidades de gotas utilizadas. Quando utilizou-se quatro gotas, os postos médios progrediram à medida que aumentava-se o número de esporos. As classes C4 e C5, com maior quantidade de esporos, apresentaram maior posto médio e não diferiram entre si, sendo possível observar maior intensidade da coloração da linha de teste. Por outro lado, a classe C4 não diferiu da C3, que não diferiu da C2 e C1.

Com a utilização de 8 gotas, a classe C5 novamente apresentou maior posto médio, mas não diferiu da classe C2. As classes C1, C2, C3 e C4 também não diferiram entre si.

Com a utilização de 12 gotas, a classe C5 apresentou maior posto médio que C4, mas não diferiu de C1, C2 e C3.

Tabela 6 – Comparação dos postos médios das intensidades de linha de teste dos resultados positivos, para as classes de número de esporos dentro de cada quantidade de gotas da solução extratora utilizadas.

Gotas	Esporos	Frequência			Mediana	Posto médio	(p) Kruskal-Wallis
		1	2	3			
4	C1 ⁽¹⁾	6	3	0	1	27 C ⁽²⁾	<0,0001
	C2	11	6	0	1	27,68 C	
	C3	9	6	0	1	29,3 BC	
	C4	2	13	4	2	51,53 AB	
	C5	2	11	6	2	54,1 A	
8	C1	4	0	0	1	16,5 B	0,0007
	C2	6	1	1	1	23,19 AB	
	C3	7	1	0	1	19,25 B	
	C4	12	2	1	1	21,53 B	
	C5	3	8	5	2	37,34 A	
12	C1	2	1	0	1	13,17 AB	0,0132
	C2	0	0	0	-	-	
	C3	1	2	1	2	21 AB	
	C4	10	2	0	1	10,83 B	
	C5	3	7	3	2	21,12 A	

⁽¹⁾ C1: 1 a 10 esporos; C2: 11 a 20 esporos; C3: 21 a 40 esporos; C4: 41 a 80 esporos; C5: acima de 80 esporos. ⁽²⁾ valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

A partir desses resultados nota-se que, com a utilização de quatro gotas, fica evidente o aumento da intensidade da linha de teste conforme o aumento do número de esporos. Esse fato corrobora com Serra (2011), que diz que, apesar de o dispositivo de fluxo lateral ser um teste qualitativo, é possível medir a intensidade da linha de teste para determinar a quantidade do alvo na amostra.

Porém, com a utilização de 8 gotas ou mais, essa progressão da intensidade não fica clara, e há oscilação da intensidade da coloração da linha de teste com relação ao aumento do número de esporos.

Assim, a partir dos resultados apresentados e discutidos, confirma-se a viabilidade técnica do uso do Kit QuickStix[®] para ferrugem em soja, na identificação de esporos de *P. pachyrhizi* coletados via coletor de esporos. Para tanto, recomenda-se a utilização de quatro gotas da solução extratora. A quantidade de quatro gotas foi superior em relação às proporções de resultados positivos, bem como tempo para ocorrência e intensidade da linha de teste para os resultados positivos, e, uma vez que é desconhecido o número de esporos a ser submetido ao teste, todas as classes de número de esporos estudadas responderam melhor ou

indiferente com a utilização dessa quantidade.

Em relação ao tempo para ocorrência dos resultados positivos, a partir dos dados observados, pode-se admitir uma diminuição do tempo para interpretação dos resultados de 10 minutos (indicado no protocolo original do produto) para 7 minutos, pois o maior tempo observado foi de 6 minutos.

Quanto à intensidade da coloração da linha de teste, apesar das oscilações observadas para oito e 12 gotas, podemos considerar que a intensidade aumenta conforme aumenta-se o número de esporos, pois, uma vez que recomendado o uso de quatro gotas, para esta situação este fato é evidente.

No entanto, apesar de considerado viável para a identificação de esporos de ferrugem asiática da soja coletados via coletor de esporos, segundo Delafosse (2006), o kit não foi desenvolvido para substituir outros métodos convencionais de monitoramento, sendo uma ferramenta adicional e complementar ao diagnóstico de ferrugem asiática da soja, e o resultado deve ser interpretado no contexto de outras informações obtidas em campo e laboratório.

3.6 CONCLUSÕES

O Kit QuickStix[®] para ferrugem em folhas de soja é viável para a identificação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* captados pelo coletor. Para tanto, indica-se a utilização de quatro gotas da solução tampão de extração EB6 no procedimento.

O tempo para ocorrência dos resultados positivos não varia entre os tratamentos, sendo indicado um tempo de sete minutos para interpretação dos resultados.

A variação da intensidade da linha de teste para os resultados positivos com utilização de quatro gotas é proporcional ao número de esporos testados, servindo de parâmetro para deduzir a quantidade de esporos presentes na amostra, uma vez que o teste é qualitativo.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v.59, n.1. p.143-169, 1995.
- AZEVEDO, L. A. S. **Proteção Integrada de Plantas com Fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo, 2001. 230 p.
- BALARDIN, R. S. **Doenças da soja**. Santa Maria: Ed. Autor, 2002. 107 p.
- BALARDIN, R. S. Bases para o manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). In: CONGRESSO DE SOJA DEL MERCOSUL, 3., 2006. Santa Fe. Argentina. Disponível em: <<http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=10313&publi=&idSec=11&id2=10314>>. Acesso em: 08 out. 2008
- BEDIN, C. et al. Técnicas disponíveis para o controle da Ferrugem Asiática na cultura da soja. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça - SP, ano VII, n.13, jun 2008.
- BRADLEY, C. A. et al. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* on Kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*) in Illinois. **Plant Disease**, n.4,v. 94, p. 477, abr. 2010.
- BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. 1984. 63f. Monografia. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 1984.
- CALDWELL, P.; LAING, M. **Soybean rust – a new disease on the move**. 2002. Disponível em: <<http://www.saspp.org/archived/tablesoybeanrust>>.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**. Safra 2010/2011. Décimo segundo levantamento. Setembro/2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_19_09_49_47_boletim_setembro-2011..pdf>. Acesso em: 14 Set. 2011.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Ferrugem em números**. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/?page_id=698>. Acesso em: 19 set 2011.
- CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Custo ferrugem asiática da soja**. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/?Conhe%E7a_a%26nbsp%3Bferrugem%26nbsp%3B:Tabela_de_custo>. Acesso em: 27 jun 2009.
- DEL PONTE, E. M. et al. Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **The American Phytopathology Society**. v.96, n.7, p.797-803. 2006.

DELAFOSSÉ, R. M. **Development of a new method for the early detection of soybean rust in Argentina**. Secretariat of Science, Technology and Innovative Production. Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A. nov. 2006.

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

DI MAURO, A. O. T. et al. Ganho genético por seleção em linhagens de soja. **Revista Ceres**, v.17, n.270, p.135-144, 2000.

DUARTE, V.; BOA, E. Enfoques usados na diagnose de doenças de plantas. **RAPP**, v.13, p. 31-48, 2005.

ENVIROLOGIX. **Kit QuickStix para ferrugem em folhas de soja**. Catalogo AS 107 LTXP. 2008. Disponível em: <<http://envirologix.com/artman/publish/index.shtml>>. Acesso em: 25 março 2009.

FERREIRA, M. C. **Aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja e interações com diferentes arranjos espaciais da cultura**. 2009. Dissertação (mestrado em agronomia). Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo/RS. 2009.

GASSEN, F. R. **Doenças foliares em Soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora Ltda, 2005.

GODOY, C. V. Situação atual, perspectivas e desafios no manejo da ferrugem asiática da soja. **Tropical plant pathology**, Brasília: Brazilian Phytopathological Society, v.34 (Suplemento), p. 10-12, ago. 2010.

GODOY, C. V. et al. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**. v.34, n.1, jan/fev. 2009.

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

HOYOS, G. et al. **A Monoclonal-based Lateral Flow Device for the Early and Reliable Field Detection of *Phakopsora pachyrhizi***. [S.l.: s.n., 20__]. Disponível em: <http://www.envirologix.com/artman/publish/article_217.shtml>. Acesso em: out. 2009.

IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* sp. em trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.11, n.2, p.351, jun 1986.

JACKSON, S. L.; BAYLISS, K. L. Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. **Plant Pathology**, v.60, p. 801-810, out. 2011.

- JACCOUD FILHO, D. S. et al. Ocorrência da Ferrugem da Soja na Região dos Campos Gerais do Paraná. In: RESUMOS. REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina, p. 109, 2001.
- KIMATI, H.; FILHO BERGAMIN, A.; CAMARGO, L. E. A. et al. **Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.
- LIEVENS, B.; THOMMA, B. P. H. J. Recent Developments in Pathogen Detection Arrays: Implications for Fungal Plant Pathogens and Use in Practice. **Phytopathology**, v.95, n.12, p.1374-1380, dez. 2005.
- MELZER, R.; BERTON, O. **Sistema de alerta para o controle da sarna da macieira**. Florianópolis: Empasc, 1989. v.1. 75 p.
- NAVARINI, L. et al. Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) na cultura da soja. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.182-186, 2007.
- OLIVEIRA, A. C. B. de.; GODOY, C. V. ; MARTINS, M. C. Avaliação da tolerância de cultivares de soja à ferrugem asiática no oeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.6, p. 658-662, 2005.
- REIS, E. F. et al. Controle químico da Ferrugem Asiática da soja na região sul do Paraná. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.8, n.3, p.319-323, 2007.
- REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2006/2007**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 237 p.
- SANTOS, J. A. et al. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.443-447, mar. 2007.
- SERRA, J. M. **Lateral flow based solutions**. In: X Workshop MRAMA. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, nov. 2011.
- SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH C.M., **Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi**. Minnesota, USA. APS Press, 1992. 266p.
- SOARES, R. M. et al. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p. 1245-1247. 2004.
- SOUZA, P.I.M. et al. BRSGO 7560: Primeira cultivar de soja resistente à ferrugem asiática indicada pela embrapa e parceiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5., 2009; MERCOSOJA, 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009.
- TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA - REGIÃO CENTRAL DO BRASIL 2011. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, out. 2010. 255 p.

TOGNI, D.A.J. **Contribuição do tratamento de sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) com fungicidas no manejo da ferrugem asiática.** 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

YANG X.B. et al. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v.81, p.1420-1426, 1991.

YORINORI, J. T.; MOREL, W. ; FERNANDEZ, F. T. P. **Epidemia de ferrugem da soja no Paraguai e na costa oeste do Paraná, em 2001.** In: REUNIAO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIAO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.117-118. (Embrapa Soja. Documentos, 157).

YORINORI, J.T. et al. **Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2002, Foz do Iguaçú, Anais. Foz do Iguaçú, 2002. p. 94.

YORINORI, J.T. **Ferrugem da soja: panorama geral.** In: Proceedings. III Congresso Brasileiro de Soja, p. 1299-1307, 2004.

YORINORI, J.T. et al. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.6, p. 675-677, jun. 2005.