

Eventos dos Processos de Pré-Penetração, Penetração e Colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em Foliolos de Soja

Elisandra B. Zambenedetti Magnani*, Eduardo Alves & Dejânia V. Araújo

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil, e-mail: ealves@ufla.br

Autor para correspondência: Eduardo Alves

ZAMBENEDETTI MAGNANI, E.B., ALVES, E. & ARAÚJO, D.V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. Fitopatologia Brasileira 32:156-160. 2007.

RESUMO

Técnicas de Microscopia de luz e eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para acompanhar o desenvolvimento de *Phakopsora pachyrhizi* desde a inoculação de urediniosporos até a formação de soros uredinais em folíolos de soja. Gotas com 50 µL de suspensão com 3×10^4 urediniosporos.mL⁻¹ foram depositadas sobre folíolos destacados de sete cultivares e duas PIs (PI 230970 e PI459025), que foram acondicionados em bandejas e incubados em BOD a 23 ± 2 °C. Foram retiradas amostras em tempos de 4 a 240h após a inoculação (h.a.i.). Amostras foram submetidas ao clareamento em ácido acético/etanol absoluto (1:1, v/v), e a preparação para MEV. Nas PI 429025 e PI 230970 observou-se as mais baixas porcentagens de germinação de urediniosporos (20 a 35 %) e formação de apressórios (11 a 23,5 %), respectivamente. Nestes genótipos, a formação de apressório iniciou-se com 6 horas, enquanto nos demais, com 4 horas. Na cultivar BRS 154 observou-se a maior porcentagem de germinação (85,5 %) e maior porcentagem de formação de apressórios (66,5 %). Nas outras cultivares, as taxas de germinação encontradas variaram de 42 a 73,5 % e as de formação de apressório de 21,5 a 60,5 %. Em MEV foi possível observar vários dos eventos de pré e pós-penetração os quais apresentaram diferenças, em relação às informações já observadas na literatura.

Palavras-chave adicionais: Ferrugem asiática da soja, *Glycine max*, ultra-estrutura.

ABSTRACT

Events of pre-penetration, penetration and colonization processes by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaflets

Light (LE) and scanning electron microscopy (SEM) were used to study the development of *Phakopsora pachyrhizi* from urediniospore germination to colonization on soybean. Drops of 50 µL of a spore suspension (3×10^4 urediniospores.mL⁻¹) were inoculated on detached leaflets of seven cultivars, besides the genotypes PI 230970 and PI 459025. After inoculation, leaflets were stored in BOD at $23 \pm 2 \pm 2$ °C for incubation. Samples were taken from four to 240 hours after the inoculation (h.a.i.), submitted to the process of fixation for scanning electron microscopy (SEM) and decolorized into a solution of absolute ethanol/acetic acid (1:1, v/v). In decolorized samples differences were observed among cultivars in percentage of germination, appressorium formation and consequently in the penetration. On PI 429025 the lowest percentage of germinated urediniospores (20%) and of appressoria formation (11 %) was observed, and the cultivar BRS 154 presented a higher percentage of both germination (85.5 %) and appressoria formation (66.5 %). Among other cultivars the percentage of germination was from 42% to 73.5 % and from 21.5 to 60.5 % for appressoria formation. Several events in the colonization process observed by SEM were different from those in the literature.

Additional keywords: Asian soybean rust, *Glycine max*, ultrastructure.

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência do hospedeiro, ocorre em nível celular, tanto do lado do patógeno como da planta hospedeira. Para *Phakopsora apoda* (Har. & Pat.) Mains, um fungo causador de ferrugem com comportamento semelhante a *P. pachyrhizi* foi observado que a penetração ocorre diretamente através da cutícula com preferência para a formação de apressórios nas junções das células da epiderme (Adendorff & Rijkenberg, 2000). No caso de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.

em soja, alguns estudos sobre o processo de infecção do patógeno e resistência da planta foram realizados (Bonde *et al.*, 1976; Koch *et al.*, 1983). Estes estudos mostraram que ao contrário da maioria dos agentes etiológicos de ferrugens, a *P. pachyrhizi* apresenta penetração direta sobre a cutícula com a formação de apressório. A penetração ocorre após seis horas e uma vez dentro da célula da epiderme o peg de penetração expande para formar a vesícula epidermal e logo depois a hifa de penetração que atravessa a célula da epiderme e emerge no espaço intercelular no mesófilo. Quanto à resistência Bonde *et al.* (2006) verificaram diferenças de comportamento entre os vários genótipos de soja testados com relação ao surgimento das lesões, número de soros uredinais por lesão, permitindo assim classificar os genótipos quanto à resistência. Entretanto, muitos aspectos

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras, 2005.

*Endereço Atual: Departamento de Agronomia, Universidade do Estado de Mato Grosso, CEP 78300-000, Tangará da Serra MT, Brasil

da resistência e dos eventos da infecção continuam sem esclarecimentos, principalmente na interação *P. pachyrhizi*-soja, no Brasil. Dessa forma, o objetivo neste estudo foi avaliar, por meio da microscopia de luz e eletrônica de varredura, os eventos de pré-penetração e penetração que levam ao estabelecimento de relações parasíticas e fatores que podem levar ao desenvolvimento da resistência parcial de alguns genótipos de soja ao agente da ferrugem.

Foram utilizadas sete cultivares de soja, quais sejam: Uirapuru e BRS 134 com ciclo tardio; Pintado, BRS 154 e BRS 215 com ciclo médio; FT 2 de ciclo precoce e BRS 231 de ciclo semiprecoce e duas PIs, a PI 230970 e PI459025 com gene de resistência *Rpp2* e *Rpp4*, respectivamente (Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986).

Sementes destes genótipos foram semeadas em vasos de plástico com 5 kg da mistura de terra, areia e esterco (2:1:2) deixando-se quatro plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até atingirem o estágio vegetativo V3. Foram coletados folíolos centrais da segunda folha trifoliolada de cada cultivar. Estes foram levados para o laboratório e lavados. Em seguida foram secos e acomodados em bandejas de plástico desinfetadas com álcool (92,6%). No fundo das bandejas, foram colocadas duas folhas de papel 'germitest' umedecidas com água destilada e cobertas com papel alumínio perfurado, de modo a permitir o contato direto dos pecíolos com o papel umedecido (Barguil, 2004). Posteriormente, foram desenhados quatro discos de 0,5cm de diâmetro com uma caneta de marca permanente na face abaxial dos folíolos a serem inoculados, a fim de facilitar os estudos de microscopia. No centro de cada círculo foi colocada uma gota de 50µL de suspensão de 3×10^4 urediniósporos.mL⁻¹ de *P. pachyrhizi*, proveniente da EMBRAPA Soja Londrina-PR e multiplicados sobre a cultivar BRS 154, em casa-de-vegetação em Lavras MG. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente para manter a umidade e colocadas em câmara de crescimento com temperatura de 23 ± 2 °C.

Após quatro horas, foram coletadas as primeiras amostras de cada cultivar. Para tanto, os círculos nos quais haviam sido depositadas as gotas com a suspensão de esporos, foram cortados com um bisturi e colocados em microtubos de 1,5mL contendo solução fixativa Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2) e em seguida, armazenados em geladeira por no mínimo 24 horas. As demais coletas foram realizadas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 240 horas após a inoculação. Foram também coletadas para análise, amostras de folíolos com pústulas já desenvolvidas, de plantas das mesmas cultivares que se encontravam em casa-de-vegetação.

Com o objetivo de determinar o número de urediniósporos germinados e apressórios formados foi utilizada a técnica de clareamento. Para cada genótipos, foram utilizados quatro fragmentos do material, imerso em solução fixativa, coletados seis horas após a inoculação. As amostras foram submetidas ao clareamento, em uma mistura de ácido acético 100% e etanol absoluto (1:1, v/v) de acordo com a metodologia de Ryan & Clare (1974), modificada, como segue: os pedaços dos folíolos foram colocados, com a superfície inoculada para cima, em placas de

Petri de plástico contendo duas folhas de papel de filtro umedecido com a solução. Depois de 48 horas, os pedaços descolorados foram então retirados e colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água para retirar o excesso do agente clarificante, permanecendo por um período de 30 min. Em seguida, os pedaços foram colocados em lâminas para microscopia, as quais foram coradas com azul de algodão. Em seguida, avaliaram-se as porcentagens de germinação e de formação de apressórios em cada cultivar em microscópio de luz.

A preparação e a observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Após o material ser imerso em solução fixativa (Karnovsky modificado), cinco fragmentos de cada cultivar e de cada tempo de coleta foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,05M por três vezes de 10 min. Em seguida, o material foi transferido para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por uma hora, depois lavados em água destilada por três vezes e subsequentemente desidratados em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, uma vez de 10 min. cada e 100 % por três vezes de 10 min.). Após a desidratação o material foi levado ao aparelho de ponto crítico e em seguida montados em suportes de alumínio, cobertos com uma película de papel alumínio, com fita de carbono dupla face, cobertos com uma camada de ouro e observados em MEV LEO Evo 40. As imagens geradas foram registradas digitalmente, a aumentos variáveis a 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm.

Depois da primeira observação em MEV, amostras que apresentavam esporos germinados com formação de apressórios das cultivares BRS154 e FT 2, foram separadas e, com uma fita dupla face (3M), a epiderme foi retirada com o intuito de observar como ocorre a penetração e o desenvolvimento do fungo dentro do tecido. Após serem retiradas, as amostras foram montadas novamente em "stubs", cobertas com ouro e em seguida, observadas em MEV.

Com o objetivo de remover os apressórios formados nos pontos de penetração, observar o orifício provocado pelo *peg* e confirmar o local de penetração da hifa nas células epidérmicas, amostras com 48 horas de todos as cultivares, depois de fixadas, foram colocadas em tampão cacodilato em Becker e levadas ao aparelho sonificador ULTRASONIC CLEAR (Odontobras) e sonicadas com frequência de 40 Khz por 20 minutos.

No material com clareamento não foi verificada diferença em relação à formação do tubo germinativo, entretanto, houve diferenças entre as cultivares na porcentagem de germinação, na formação de apressórios e, conseqüentemente, na penetração, como pode ser observado na Tabela 1. Os genótipos PI 230970 e PI 459025 apresentaram baixa porcentagem de urediniósporos germinados e baixa porcentagem de formação de apressórios. Nestes genótipos a formação de apressório começou seis horas após a inoculação, enquanto que, nos demais cultivares esta ocorreu quatro horas após a inoculação. Estes genótipos apresentam genes de resistência *Rpp2* e *Rpp4*, respectivamente (Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986). Pelo observado, essa resistência parece se expressar já na fase de pré-penetração,

retardando assim o início do aparecimento das lesões. Esses resultados são compatíveis com os resultados encontrados por Zambenedetti (2005), em casa-de-vegetação, que mostrou que *P. pachyrhizi* começou esporular mais tarde em PI 459025 em relação às outras cultivares e apresentou menor porcentagem de área afetada ao final do experimento. Bonde *et al.* (2006) também mostraram a maior resistência destes genótipos.

A cultivar Pintado apresentou 55 % de urediniósporos germinados e 27,5 % de apressórios formados (Tabela 1). Apesar de ser considerado um cultivar suscetível, essa menor porcentagem de germinação e formação de apressórios pode estar relacionada com o fato desse cultivar ter apresentado uma grande quantidade de cera na folha (Figura 1A). Isso pode ter interferido na germinação dos urediniósporos, pois o patógeno precisa de água para germinar e formar apressório. Essa barreira física proporcionada pela presença da camada de cera impede a formação do filme de água na superfície da folha dificultando germinação e, conseqüentemente, a penetração. Este fato pode também ser comprovado na cultivar FT 2, que apresentou menor quantidade de cera nas folhas (Figura 1B) e maior porcentagem de urediniósporos germinados e apressórios formados, ficando atrás apenas da cultivar BRS 154 a qual apresentou maior porcentagem de germinação (85,5%) e maior porcentagem de formação de apressórios (66,5%).

Observou-se em MEV, que amostras das cultivares Pintado e Uirapuru e das PIs 230970 e PI 459025 coletadas com seis h.p.i apresentavam menor número de esporos na superfície, mesmo tendo sido inoculados com a mesma concentração utilizada nos outros genótipos. Provavelmente os urediniósporos não germinados não ficam aderidos ao tecido do hospedeiro e, durante o processo de preparação das amostras para a MEV, estes são removidos. Este fato concorda com os resultados obtidos na avaliação dos espécimes submetidos ao clareamento, que mostram que esses cultivares apresentaram menor quantidade de esporos germinados.

TABELA 1. Germinação e formação de apressórios de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* sobre folíolos de diferentes genótipos de soja, seis horas após a inoculação

Cultivar	Germinação (%)*	Formação de apressórios (%)*
PI 459025	20,0 e	11,0 d
PI 230970	35,0 d	23,5 c
Uirapuru	42,0 d	36,5 c
Pintado	55,0 c	27,5 c
BRS 134	58,0 c	21,5 c
BRS 231	59,5 c	25,0 c
BRS 215	61,0 c	39,0 b
FT 2	73,5 b	60,5 a
BRS 154	85,5 a	66,0 a
CV (%)	11.4	10.5

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

Em todas as cultivares observadas quatro horas após a inoculação, os esporos já haviam germinado. Em alguns cultivares, os apressórios já estavam formados, muitos deles atingiram tamanho próximo ao do urediniósporo (Figuras 2A-C). O tubo germinativo foi formado em qualquer lugar na superfície do hospedeiro. Entretanto, apesar da aparente ausência de orientação no crescimento dos tubos germinativos, a formação dos apressórios foi verificada apenas nas junções das células epidérmicas (Figuras 2A-F). A predominância de apressórios formados nas junções de células epidérmicas ocorre comumente em outros gêneros fúngicos (Murray & Maxwell, 1975; Gold & Mendgen, 1984; Aveling *et al.*, 1994; Araújo & Matsuoka, 2004) e em *P. apoda* (Adendorff & Rijkenberg, 2000). Portanto, esta tendência geral dos patógenos formarem apressórios nas junções das células, independentemente da espécie vegetal, pode significar que os estímulos para a formação de apressórios nessas espécies sejam as diferenças da topografia foliar e as flutuações de nutrientes

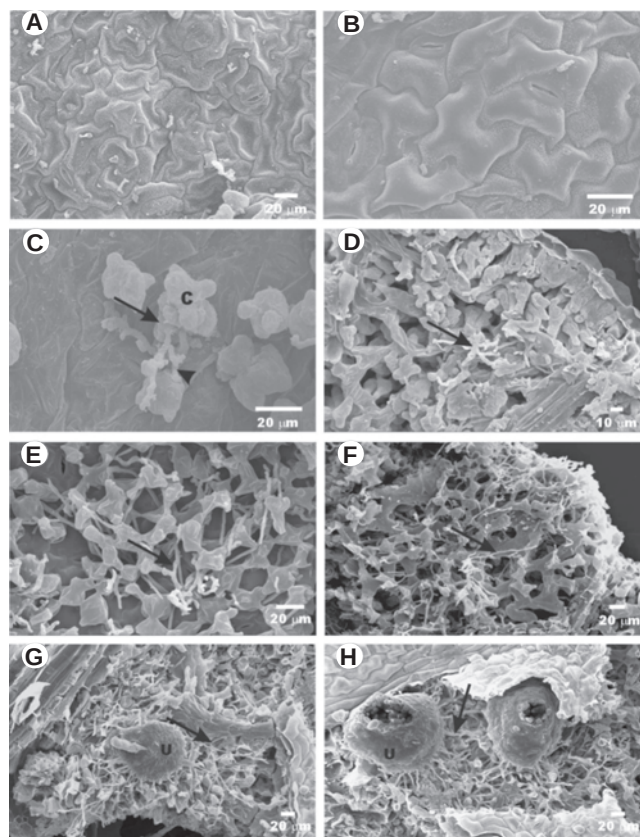


FIG. 1 - Eletromicrografia de varredura em folíolos de soja inoculados com *P. pachyrhizi*. **A.** Cultivar pintado com grande quantidade de cera no folíolo. **B.** Cultivar FT 2 com baixa quantidade de cera no folíolo. **C.** Visão interna da epiderme mostrando vesícula transepidermal (seta), hifas primárias (cabeça de seta) e célula do parênquima esponjoso (**C**) (48 h.p.i). **D.** e **E.** Hifas do fungo desenvolvendo dentro do tecido da folha do hospedeiro (48 h.p.i e 72 h.p.i). **F.** Hifas do fungo ramificando e ocupando ampla área do tecido do hospedeiro (96 h.p.i). **G.** Início da formação dos soros uredinais 10 dias após a inoculação. **H.** Hifas do fungo.

no microambiente das junções celulares (Araújo & Matsuoka, 2004). Trabalho realizado por Koch & Hoppe (1988) com o fungo *P. pachyrhizi* em lâminas revestidas com membrana artificial mostrou que houve maior quantidade de formação de apressórios nas partes de maior declive nas lâminas. Outro fato observado é que alguns apressórios eram sésseis e os tubos germinativos atingiram tamanhos variados de 9 a 143 µm (Figuras 2A-D). Observou-se que urediniósporos com tubos germinativos longos, acima de 50 µm, não formavam apressórios e, quando isso ocorria, o apressório era pequeno (Figuras 2B-D). Quando os tubos germinativos apresentavam-se curtos, os apressórios tiveram tamanho igual ou superior aos dos urediniósporos de origem (Figuras 2A-C). Variação no tamanho do tubo germinativo e do apressório em *P. pachyrhizi* foi também observada por Bonde *et al.* (1976) e Koch *et al.* (1983) que afirmaram que este fato está diretamente relacionado com o modo de penetração usado pelo fungo que pode ser direta ou indireta. Entretanto, tal fato confirma que os urediniósporos que formam tubos germinativos menores têm maiores chances de penetrar nas células do hospedeiro como, também afirmado por McLean & Byth (1980). Hunt (1983) explica que o tubo germinativo curto reduz a quantidade de energia endógena gasta com o crescimento e, desta forma, esta energia poderá ser utilizada na penetração das células. Considerando que o crescimento do tubo germinativo pode ser influenciado por características das folhas, e quanto maiores forem estes, menores serão as chances de penetração é possível que se tenha diferenças de resistência entre os genótipos no que se refere ao tamanho médio do tubo germinativo, porém tal não pôde ser avaliada neste trabalho.

Quanto à penetração observou-se que os *pegs* se formaram na base dos apressórios, e em todas as cultivares avaliadas a penetração ocorreu sempre na junção das células da epiderme (Figuras 2E-F). Esses resultados são contrários aos apresentados por Bonde *et al.* (1976) e Koch *et al.* (1983) que afirmam que o fungo *P. pachyrhizi* penetra diretamente no hospedeiro através da cutícula na região central da célula e não nas junções, mas são semelhantes aos verificados por Adendorff & Rijkenberg (2000) para *P. apoda*. Verificou-se também uma baixa penetração pelos estômatos e, quando isso ocorreu, não foi observada a formação de apressórios (Figura 2G). Outro fator importante observado foi a menor quantidade de cera na superfície da folha, ao redor do local aonde os apressórios foram formados. Esse fato foi observado também por Adendorff & Rijkenberg (2000) com o patógeno *Phakopsora apoda* e corresponde ao local onde o apressório se fixou.

A partir de 24 horas após a inoculação, os urediniósporos que formaram apressórios começaram a murchar. Isso indica que o conteúdo celular dos mesmos foi transferido para o tubo germinativo. O mesmo foi observado nos apressórios 48 horas após a inoculação (Figura 2H). Nesse período o *peg* de penetração já havia atravessado as células da epiderme (Figuras 1C -D).

Uma vez dentro da célula epidermal, o *peg* de penetração se expandiu formando uma vesícula e, as hifas primárias começaram a se formar e a colonizar os espaços intercelulares

do parênquima esponjoso e no tecido do mesófilo (Figuras 1C -D). Com 72 e 96 h.a.i, as hifas secundárias já haviam se desenvolvido por todo o parênquima esponjoso do limbo foliar do hospedeiro como se pode observar nas Figuras 1E-F.

A maturação dos soros uredinais e o conseqüente início da produção de urediniósporos ocorrem entre o sexto e o décimo segundo dia após a inoculação como observado por Zambenedetti (2005), nas plantas que estavam em vasos em casa-de-vegetação. No entanto, nas condições em que este experimento foi realizado (fungo inoculado em folhas destacadas e acomodadas em bandejas), a produção de urediniósporos não foi observada. No décimo dia, foi constatado apenas o início da formação de soros uredinais em alguns das cultivares avaliadas. (Figura 1G). Isso pode estar relacionado com a baixa atividade metabólica presente em folhas destacadas, sendo o fungo *P. pachyrhizi* um parasita obrigatório, este necessita de atividade plena do hospedeiro para se desenvolver com todo o seu potencial. Constatou-se que uma grande área em volta dos

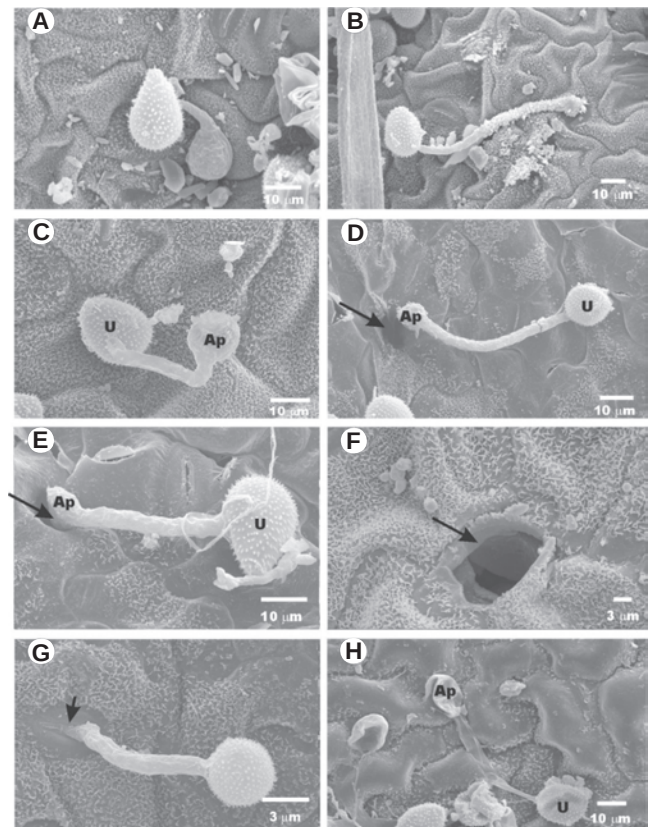


FIG. 2 - Eletromicrografia de varredura em folíolos de soja inoculados com *P. pachyrhizi*. **A, e C.** Tubo germinativo curto com apressório de tamanho semelhante ao do esporo, formado na junção de células epidérmicas. **B.** Tubo germinativo longo com apressório pequeno. **D.** Tubo germinativo com apressório e o orifício de penetração. **E.** Apressório e o *peg* de penetração penetrando nas junções das células da epiderme. **F.** Orifício formado pela hifa de penetração (*peg*) do fungo. **G.** Penetração do fungo por estômato sem a formação de apressório. **H.** Urediniósporo, tubo germinativo e apressório murchos (48 h.p.i). U= urediniósporo, Ap= Apressório.

soros uredinais apresentava-se com alta concentração de hifas (Figuras 1G-H) indicando que a área afetada é muito maior do que a visualizada externamente.

Os resultados apresentados nesse trabalho trouxeram algumas contribuições que poderão direcionar novos estudos e indicar caminhos para os programas de melhoramento da soja visado à resistência a *P. pachyrhizi* e ao manejo da doença. Uma destas contribuições está relacionada ao genótipo PI 459025 que mostrou ser mais resistente à infecção inicial por *P. pachyrhizi* quando comparado aos demais genótipos testados. Outra importante contribuição está relacionada à camada de cera como uma barreira física importante, devendo ser levada em consideração no melhoramento genético, visando a obtenção de cultivares resistentes. Por fim, pode-se constatar que a penetração direta, pelas junções das células da epiderme, foi a principal via utilizada por *P. pachyrhizi*, sendo este um fato ainda não documentado para este patossistema.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a pesquisadora Dra. Cláudia Vieira Godoy da EMBRAPA Soja pelo fornecimento de material vegetal. A primeira autora agradece ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENDORFF, R. & RIJKENBERG, F.H.J. Direct penetration from urediospores of *Phakopsora apoda*. *Mycological Research* 104:317-324. 2000.
- ARAÚJO, J.C.A. & MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* em tomateiros resistentes e suscetíveis. *Fitopatologia Brasileira* 29:268-275. 2004.
- AVELING, T.A.S., SNYAMAN, H.G. & RINJKENBERG, F.H.J. Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. *Canadian Journal of Botany* 72:1164-1170. 1994.
- BARGUIL, B.M. Indução de resistência e reação de cultivares de *Coffea arabica* L. a *Phoma costarricensis* Echandi. Dissertação de Mestrado. Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2004.
- BONDE, M.R., MELCHING, J.S. & BROMFIELD, K.R. Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. *Phytopathology* 66:1290-1294. 1976.
- GOLD, R.E. & MENDGEN, K. Cytology of basidiospore germination, penetration and early colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. *Canadian Journal of Botany* 62:1989-2002. 1984.
- HARTWING, E.E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science* 26:1135-1136. 1986.
- HARTWING, E.E. & BROMFIELD, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybean. *Crop Science* 23:237-239. 1983.
- HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredospores. *Transactions of the British Mycological Society* 51:103-112. 1983.
- KOCH, E., EBRAHIN-NESBAT, F. & HOPPE, H.H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. *Journal of Phytopathology* 106:302-320. 1983.
- KOCH, E. & HOPPE, H.H. Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. *Journal of Phytopathology* 122:232-244. 1988.
- MCLEAN, R.J. & BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* 31:951-956. 1980.
- MURRAY, G.M. & MAXWELL, D.P. Penetration of *Zea mays* by *Helminthosporium carbonum*. *Canadian Journal of Botany* 53:2872-2883. 1975.
- RYAN, C.C. & CLARE, B.G. Coating of leaf surfaces with agarose to retain fungal inoculum in situ for staining. *Stain Technology* 49:15-18. 1974.
- ZAMBENEDETTI, E.B. Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultra-estruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Dissertação de Mestrado. Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 2005.

Recebido 27 Junho 2006 - Aceito 26 Fevereiro 2007 - FB 6016