

Viabilidade técnica do kit QuickStix™ na identificação de *Phakopsora pachyrhizi* capturados com coletor de esporos

Technical feasibility of the QuickStix kit™ in identifying *Phakopsora pachyrhizi* captured by the spores collector

Mayra Suemy Ishikawa^{1*}, Seiji Igarashi¹, Inês Cristina de Batista Fonseca¹

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência do uso do kit QuickStix™ para a identificação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, coletados por meio de um coletor SIGA. O kit QuickStix® é capaz de detectar a presença de *Phakopsora pachyrhizi* nos estágios iniciais da infecção foliar, determinando a presença ou ausência do patógeno na amostra. Ele captura propágulos de fungos presentes no ar, que são identificados ou quantificados por varredura de lâminas em microscópio óptico comum. Foram testados diferentes números de esporos com 4, 8 e 12 gotas da solução extratora. Para os resultados positivos, foram avaliados a intensidade da linha de teste e o tempo para sua ocorrência. O kit foi capaz de detectar pequenas quantidades de esporos, sendo que a proporção de resultados positivos foi diretamente proporcional ao número de esporos e inversamente proporcional ao total de gotas. A porção adequada de gotas da solução extratora foi de quatro, pois apresentou mais resultados positivos para todas as classes dos números de esporos. Não foi possível observar uma diferença entre o tempo para a ocorrência dos resultados positivos aos diferentes tratamentos. A intensidade da linha de teste foi superior para as classes com mais esporos.

PALAVRAS-CHAVE: ferrugem asiática da soja; *Glycine max.*; manejo; armadilha de esporos.

ABSTRACT: The aim of this study was to test the efficiency of QuickStix™ kit use for identification of *Phakopsora pachyrhizi* spores, which are the causal agents of Asian soybean rust, collected by “SIGA” spores collector. This kit is capable of detecting the presence of *Phakopsora pachyrhizi* in the early stages of leaf infection by determining the presence or absence of pathogen in the sample. It captures propagules of fungi present in the air that are identified or quantified by scanning blades in ordinary optical microscope. Different numbers of spores were tested with 4, 8 and 12 drops of extraction solution. For positive results, intensity of the test line and time for its occurrence were evaluated. The kit was able to detect small amounts of spores and the proportion of positive results was directly proportional to the number of spores and inversely proportional to the amount of drops. The proper portion of drops of extraction solution was four, as it showed more positive results for all classes of numbers of spores. No difference was found between the time to occurrence of positive results for the different treatments. The intensity of the test line was higher for classes with larger numbers of spores.

KEYWORDS: Asian soybean rust; *Glycine max.*; management; spore trap.

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina (PR), Brasil.

*Autor correspondente: maishikawa@gmail.com

Recebido em: 09/02/2013. Aceito em: 08/10/2014

INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma espécie originária da Ásia, local em que vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças às suas características nutritivas e industriais e adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, teve seu cultivo expandido por todo o mundo, sendo considerada uma das principais plantas produzidas e a mais importante cultura de grãos do Brasil (MEDICE *et al.*, 2007).

Um dos fatores que afetam a produtividade da cultura é a ocorrência de doenças. Aproximadamente 40 enfermidades 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 (EMBRAPA, 2010). Dentre tais 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 (YORINORI *et al.*, 2004).

No Brasil, a ferrugem asiática foi identificada pela primeira vez no final da safra 2000/2001 e, na seguinte (2001/2002), o patógeno encontrava-se disseminado pelas principais regiões produtoras de soja do Brasil, causando danos na ordem de 112.000 t, equivalentes a US\$ 24,70 milhões. 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). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o peso final dos grãos (YANG *et al.*, 1991). Em cultivares suscetíveis e com alta incidência da doença, as lesões de ferrugem asiática podem causar crestamento foliar, assemelhando-se àquela de *Cercospora* (SILVA, 2007). Para reduzir o risco de danos à cultura, as estratégias de manejo recomendadas para essa doença são: utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada; eliminação das plantas de soja voluntárias e ausência do cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário; monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura; aplicação de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente e uso de cultivares resistentes, quando disponíveis (EMBRAPA, 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 citaram o controle químico como o principal método de controle

quando a doença já está presente na lavoura. Para que esta abordagem apresente sua máxima eficiência, deve ser aplicada de forma preventiva ou logo que ocorram os primeiros sintomas. Portanto, para determinação do momento ideal à aplicação do fungicida, devem-se realizar inspeções periódicas na lavoura. A ferrugem asiática apresenta desenvolvimento rápido, sendo que a detecção dos sintomas nos estádios iniciais é difícil, tornando-se possível apenas com o auxílio de lupa ou do apoio de um laboratório para diagnóstico de doenças. Informações da pesquisa indicam que a ferrugem da soja só é detectada, a olho nu, a partir de uma severidade de 5%, sendo este nível muito elevado e arriscado para se iniciar o controle químico (AZEVEDO *et al.*, 2004). Coletores ou armadilhas de esporos podem auxiliar o monitoramento do patógeno, detectando a presença de propágulos do fungo no ar, via pela qual são disseminados a longas distâncias, antes da efetiva infecção das plantas. Atualmente, há uma variação significativa nos tipos de armadilhas de esporos e nos métodos usados para capturar e identificá-los (JACKSON; BAYLISS, 2011).

Visando à agilidade, praticidade e confiabilidade na identificação da ferrugem asiática da soja em lavouras comerciais, a empresa Envirologix desenvolveu, por meio de técnicas imunológicas, o *kit* QuickStix™: processo que detecta a presença de *P. pachyrhizi* em folhas de soja, complementando as inspeções visuais por meio de lupas.

Tal instrumento é capaz de localizar a presença do patógeno nos estágios iniciais da infecção, que vão desde as lesões cloróticas (antes da formação de pústulas) até o desenvolvimento de pústulas imaturas. Isto é possível porque o *kit* detecta antígenos presentes nos urediniosporos, teliósporos e micélio de *P. pachyrhizi* (ENVIROLOGIX, 2008). Outras vantagens do teste são a simplicidade, normalmente exigindo pouca ou nenhuma preparação de amostra ou reagente, e o tempo, levando poucos minutos para obter o resultado (cerca de 10 minutos).

Este trabalho teve por objetivo testar a viabilidade do uso do *kit* QuickStix™ na identificação dos esporos de *P. pachyrhizi* coletados via coletor SIGA, visando à substituição do método tradicional de varredura ao microscópio óptico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (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 (IGARASHI *et al.*, 2014), estilete, pinça e *kit* QuickStix™.

O coletor de esporos SIGA retém os propágulos capturados do ar, em fita adesiva de dupla face fixa à uma lâmina de microscopia. A identificação dos esporos coletados por estes equipamentos é feita pela varredura das lâminas em microscópio óptico, necessitando de mão de obra treinada para a correta identificação dos esporos de *P. pachyrhizi*, tornando-se uma das grandes dificuldades para sua utilização no campo.

Para comprovar isso, foram realizados exames em tecido foliar apresentando lesões iniciais de ferrugem asiática, 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* Berk & Broome), trigo (por *Puccinia triticina* Erikss.), trevo (por *Puccinia oxalidis* Dietel & Ellis), corda-de-violão (por *Puccinia crassipes* Berk. & M.A. Curtis), entre outros, além daqueles com outras doenças que atacam a cultura de soja, como mancha púrpura e crestamento foliar [(causados por *Cercospora kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardner)], míldio da soja [(causado por *Peronospora manshurica* (Naumov) Syd.)] e oídio [(causado por *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam.)].

As primeiras análises foram realizadas com esporos removidos da face abaxial de folhas contendo pústulas de ferrugem. Milhares deles foram colocados no minitubo, macerados com o pistilo e testados com a tira, a qual contém dois anticorpos em posições definidas. Numa delas são depositados os primários que reagem contra o antígeno, no caso *P. pachyrhizi* (região teste); na outra, são posicionados os anticorpos secundários que contêm marcadores (nanopartículas de ouro) reagentes contra os primários, tornando visível a reação (região controle) (SACOMANO, 2014).

O próximo passo foi testar se os esporos aderidos na fita adesiva de dupla face poderiam apresentar a mesma reação. A fita utilizada neste trabalho foi da marca Adelbras, transparente, composta de filme de polipropileno biorientado, coberto com adesivo à base de água em ambos os lados. Para realizar o referido exame, o coletor de esporos 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 (tipo *Eppendorf*), e a amostra foi submetida ao teste após a adição do reagente e maceração com o pistilo plástico.

Os próximos foram realizados para determinar a quantidade mínima de esporos necessários para estabelecer a presença da ferrugem, pois esses dados são de fundamental importância a fim de validar o uso do *kit* com o coletor, uma vez que, normalmente no início da liberação e do transporte dos esporos, o número de esporos é reduzido.

Para tanto, duas tiras de fita adesiva de dupla face de 0,9 cm de largura e 5 cm de comprimento foram colocadas paralelamente sobre a lâmina que seria acoplada ao coletor. Cada uma foi subdividida em áreas de aproximadamente 1 cm² (quadrantes).

Com o intuito de capturar número reduzido de esporos, as lâminas foram expostas por um curto período, aproximadamente de uma hora, e analisadas ao microscópio, quantificando os esporos em cada quadrante, para assim testar a solução extratora com seus diferentes números aderidos à lâmina. Assim, cada um dos quadrantes foi retirado da lâmina com o auxílio de estilete e aderido ao pistilo com a face contendo os esporos para o exterior. O pistilo foi posicionado no minitubo com 4, 8 ou 12 gotas da solução extratora (0,144, 0,293 e 0,441 mL, respectivamente). A fita adesiva foi friccionada na parede interna do minitubo, com o objetivo de romper as estruturas do fungo para a liberação das proteínas-alvo da reação. Para os resultados positivos, foram analisados o tempo para ocorrência da reação e a intensidade da coloração da linha de teste. O período decorrido até ser possível visualizar o resultado positivo foi classificado em dois intervalos: até cinco minutos e acima disso e a intensidade da coloração da linha de teste foi feita visualmente, em uma escala de 1 a 3, da mais fraca à mais forte, respectivamente.

Devido à dificuldade de manipulação da quantidade de esporos a ser coletada e da obtenção de repetições do mesmo número, o número de esporos foi separado em cinco classes: C1 (de 1 a 10); C2 (de 11 a 20); C3 (de 21 a 40); C4 (de 41 a 80) e C5 (acima de 80).

Para cada interação (classe de número de *esporos* versus número de gotas da solução extratora), foram realizadas 20 repetições, a fim de se obter maior confiabilidade dos resultados. Os dados de presença/ausência (positivo/negativo), bem como o tempo decorrido para a obtenção dos resultados positivos, foram submetidos ao teste do qui-quadrado para determinar 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 aplicados no teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A especificidade do *kit* para o fungo *P. pachyrhizi* foi comprovada por meio de testes com outros fungos fitopatogênicos de ocorrência na cultura da soja, bem como com outras espécies daqueles causadores de ferrugens, os quais apresentaram resultados negativos, não sendo possível visualizar a linha de teste, somente a de controle.

HOYOS *et al.* (s.d.) e DELAFOSSE (2006) comprovaram também a eficiência e a especificidade do *kit*. Os primeiros autores salientam ainda, como benefício do diagnóstico precoce, a racionalização do momento da primeira aplicação de fungicida visando ao controle da ferrugem.

Os primeiros testes com esporos de *P. pachyrhizi* retirados da face abaxial das folhas atestaram a eficácia do *kit*, uma vez que os resultados foram positivos, e a resposta foi rápida e de fácil visualização.

Exames prévios com a utilização de fita adesiva dupla face indicaram não haver interferência dela na reação do *kit* à presença de *P. pachyrhizi*. Assim, os testes posteriores foram realizados.

De acordo com o teste do qui-quadrado aplicado 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, C3 e C4. Para a C2, a proporção de resultados positivos foi um pouco 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. Para C3 e C4, observa-se superioridade significativa entre as proporções somente de quatro gotas em relação à 12, não sendo possível observar diferença entre quatro e oito gotas, e entre 8 e 12 gotas. Nas demais classes, C1 e C5, não houve variação significativa, mas o valor p muito próximo à significância indica superioridade da maior proporção, que seria utilizando-se quatro gotas. Portanto, as melhores respostas

foram obtidas aplicando-se quatro gotas da solução extratora e, mesmo quando não foi possível observar efeito do número de gotas utilizadas, recomenda-se o uso de quatro, devido à tendência de apresentar mais resultados positivos e, além, disso, haver economia de solução.

Na Tabela 2, ao compararmos, dentro de cada número de gotas da solução extratora, a proporção de resultados positivos das diferentes classes dos números de esporos, os dados indicam que, para as três quantidades de gotas utilizadas (4, 8 e 12), a proporção de resultados positivos se eleva conforme aumenta-se o número de esporos. Quando aplicaram-se quatro e oito gotas, notou-se diferença significativa somente entre as classes C1 e C4, e C1 e C5 do número de esporos. Já para 12 gotas, observou-se diferença significativa entre a classe C2 (que não apresentou nenhum resultado positivo) e as C4 e C5, com maiores proporções de positivos. Ainda, C1, C2 e C3 não diferem entre si, sendo as três que apresentaram menor proporção de resultados positivos, 15% para C1, 0% para C2 e 20% para C3. As classes C4 e C5 obtiveram maior proporção de resultados positivos, porém a C4, que apresentou 60% de positivos, não diferiu da C3, com 20%.

A utilização de quatro gotas obteve maior proporção de resultados positivos, variando entre 45 e 95%, enquanto que, para 8 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

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	χ^2	Valor p
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 do χ^2 a 5% de significância.

por mais de 40 esporos e quatro gotas da solução extratora serão positivas.

Ao submeter diferentes concentrações de esporos de *P. pachyrrhizi* aos anticorpos do teste de fluxo lateral, Hoyos *et al.* (20s.d.) notaram um bom nível de detecção entre 500 a 1.000 esporos/mL. Já no presente estudo, em que 12, 8 e 4 gotas da solução tampão de extração correspondem a 0,441, 0,293 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 foram de 2,3 a 22,3 esporos/mL, correspondentes à classe C1 do 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 um bom nível de detecção nas maiores concentrações analisadas, aproximadamente metade do intervalo detectado em estudos do autor.

Na avaliação do tempo para processar a reação, 95,7% dos resultados ocorreram em menos de cinco minutos, com uma média de 2,85 minutos. As demais conclusões positivas ocorreram em mais de cinco minutos, em uma média de seis. Realizando o teste do qui-quadrado sobre esses dados, não foi possível detectar diferenças entre as proporções de resultados ocorridos em menos ou mais de cinco minutos, para o número de gotas dentro de cada classe da quantidade de esporos (Tabela 3). Para a C3, o valor p não foi significativo, mas ficou muito próximo da significância, indicando uma

superior proporção de resultados positivos ocorridos em menos de cinco minutos com quatro e oito gotas da solução extratora em relação à utilização de 12. Ao comparar as classes do número de esporos dentro daqueles de gotas da solução extratora, também não foi possível notar diferenças significativas, apesar do valor p ter sido significativo para 12 gotas (Tabela 4). Nesta situação, o valor p indica superioridade da proporções de resultados ocorridos em até 5 minutos das classes C4 e C5. A partir de tais dados, recomenda-se a interpretação dos resultados após, pelo menos, seis minutos da submissão da amostra ao teste, devido a este ser o maior tempo observado para a ocorrência da reação positiva.

Para os resultados positivos também foi avaliada 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 médios para 8 e 12 gotas, que não diferiram entre si. Esse resultado mostra que, em C4, utilizando-se quatro gotas, observa-se maior intensidade da coloração da linha de teste, o que não foi possível para as outras classes de número de esporos.

Já quando se comparam as classes de números dos esporos dentro de cada número de gotas da solução extratora (Tabela 6), foram vistas diferenças significativas para ambas as quantidades de gotas utilizadas. Ao aplicarem-se quatro gotas,

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

Gotas	Esporos	Positivos (n=20)	% de positivos	Limites de confiança (95%)		χ^2	Valor p
				Inferior (%)	Superior (%)		
4	C1 ⁽¹⁾	9	45 B ⁽²⁾	23,10	68,50	20,74	0,0004
	C2	17	85 AB	62,10	96,80		
	C3	15	75 AB	50,90	91,30		
	C4	19	95 A	75,10	99,90		
	C5	19	95 A	75,10	99,90		
8	C1	4	20 B	5,70	43,70	20,97	0,0003
	C2	8	40 AB	19,10	63,90		
	C3	8	40 AB	19,10	63,90		
	C4	15	75 A	50,90	91,30		
	C5	16	80 A	56,30	94,30		
12	C1	3	15 C	3,20	37,90	30,61	< 0,0001
	C2	0	0 C				
	C3	4	20 BC	5,70	43,70		
	C4	12	60 AB	36,10	80,90		
	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 do χ^2 a 5% de significância.

os postos médios progrediram à medida que aumentava-se o número de esporos. As classes C4 e C5, com maior quantidade, 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 oito gotas, a C5 novamente apresentou maior posto médio, mas não teve variação da classe C2. C1, C2, C3 e C4 também não tiveram

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 do qui-quadrado a 5% de significância.

Esporos	Gotas	Positivos (n=20)	≤ 5 minutos ⁽²⁾	% ≤ 5 minutos	χ^2	Valor p
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.

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

Gotas	Esporos	Positivos	≤ 5 minutos ⁽²⁾	% ≤ 5 minutos	χ^2	Valor p
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.

diferenças entre si. Com a utilização de 12 gotas, a classe C5 apresentou maior posto médio do que a C4, mas sem variação das C1, C2 e C3. A partir desses resultados, nota-se que,

com a utilização de quatro gotas, foi evidente o aumento da intensidade da linha de teste conforme o aumento do número de esporos. Esse fato corrobora com SERRA (2011), o

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	Valor 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.

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 utilizada.

Gotas	Esporos	Frequência			Mediana	Posto médio	Valor 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.

qual afirmou 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 oito gotas ou mais, essa progressão não fica clara, e há oscilação da intensidade da coloração da linha de teste com relação ao aumento do número de esporos. Os ensaios confirmam a viabilidade técnica do uso do *kit* QuickStix™ para identificação dos esporos de *P. pachyrhizi* coletados via coletor de esporos. Para tanto, recomenda-se a utilização de quatro gotas da solução extratora, a qual foi superior em relação às proporções de resultados positivos, bem como tempo para ocorrência e intensidade da linha de teste para os resultados positivos. 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 diferente com a utilização dessa quantidade.

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

Quanto à intensidade da coloração da linha de teste, apesar das oscilações observadas para 8 e 12 gotas, podemos considerar que ela aumenta conforme o número de esporos se eleva, 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 *P. pachyrhizi* capturados 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. Este resultado deve ser interpretado no contexto de outras informações obtidas em campo e laboratório.

AGRADECIMENTOS

A autora Mayra S. Ishikawa agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, L.A.S.; JULIATTI, F.C.; BALARDIN, R.S.; SILVA, O.C.DA. *Programa Syntinela*: monitoramento da dispersão de *Phakopsora pachyrhizi* e alerta contra a ferrugem asiática da soja. Campinas: Emopi Gráfica e Editora, 2004. 24p. (Boletim técnico).
- DELAFOSSÉ, R.M. *Development of a new method for the early detection of soybean rust in Argentina*. Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A., 2006. 4p. (Exploratory Study PSA O21/06). Disponível em: <<http://envirologix.com/library/informesummaryenglish2.pdf>>. Acesso em: jun. 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Embrapa Soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Tecnologias de Produção de Soja – Região Central Do Brasil 2011*. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. 255p. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/download/Sistema_Producao14_VE.pdf>. Acesso em: jun. 2011.
- ENVIROLOGIX. *Kit QuickStix para Ferrugem em Folhas de Soja*. Envirologix, 2008. 4p. (Número do Catálogo AS 107 LTXP). Disponível em: <<http://www.envirologix.com/library/as107tinsertportuguese.pdf>>. Acesso em: mar. 2010.
- HOYOS, G.; GOW, B.; LAWTON, J.; LARKIN, K.; GODDARD, T.; OLAYA, G. *A monoclonal-based lateral flow device for the early and reliable field detection of Phakopsora pachyrhizi*. Envirologix; Syngenta Crop Protection. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/infocenter/topic/soybeanrust/2007/posters/18.pdf>>. Acesso em: out. 2010.
- IGARASHI, W.T.; SILVA, M.A.A.; IGARASHI, S.; ABI SAAB, O.J.G.; FRANÇA, J.A. Duração e porcentagem de molhamento foliar determinados pelo espaçamento entrelinhas, e influência sobre a ferrugem asiática da soja. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.40, n.2, p.123-127, 2014.
- JACKSON, S.L.; BAYLISS, K.L. Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology*, Londres, v.60, n.6, p.801-810, 2011.
- MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO JÚNIOR, R.G.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.31, n.1, p.83-90, 2007.
- SACOMANO, R.T. Anticorpos combatem pragas no campo. *Revista Pesquisa FAPESP*, São Paulo, Edição 222, ago. 2014. Entrevista concedida a Evanildo da Silveira.
- SANTOS, J.A.; JULIATTI, F.C.; SANTOS, V.A.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C.; HAMAWAK, I.O.T. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.3, p.443-447, 2007.
- SERRA, J.M. Lateral flow based solutions. In: WORKSHOP MRAMA, X., 2011, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, 2011.
- SILVA, D.A.S. *Resistência parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja*. 2007. 61p. Dissertação (Mestrado – Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. Soybean rust. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. *Compendium of soybean diseases*. 4th.ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999, p. 25-26.

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

YANG, X.B.; TSCHANTZ, A.T.; DOWLER, W.; WANG, T.C. Development of yield models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, v.81, p.1420-1426, 1991.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; FERNANDEZ, P.F.T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, PR. *Resumos*. Foz do Iguaçu: 2002.p.94.

YORINORI, J.T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. *Ferrugem "asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle*. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 36p. (Documentos, 247). Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/alerta/documento247.pdf>>. Acesso em: jul. 2010.