

MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. EM FOLHAS DESTACADAS DE CAFEIEIRO

Alexandre Sandri CAPUCHO¹; Raphael J. N. RUFINO²; Eunize M. ZAMBOLIM^{2,3}; Eveline T. CAIXETA⁴, Antônio C. B. de OLIVEIRA⁵, Robson F. de ALMEIDA², Giovanni G. de BRITO², Laércio ZAMBOLIM³

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV)/Bioagro, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), 36.570-000, Viçosa-MG. E-mail: capucho@vicosa.ufv.br; ² UFV/BioCafé; ³ UFV/Departamento de Fitopatologia; ⁴ Embrapa Café; ⁵Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café 'Alcides Carvalho'(IAC)

Resumo:

Os estudos genéticos do cafeeiro e de *Hemileia vastatrix* são muitas vezes dificultados pela característica do fungo de multiplicar apenas nos tecidos da planta hospedeira. Assim, esse trabalho foi proposto com o objetivo de desenvolver um método de inoculação de *H. vastatrix* que permita estudar com segurança raças e a herança da resistência do cafeeiro à ferrugem. Para isso, utilizou-se a raça II de *H. vastatrix*, *C. arabica* 'Catuaí' como hospedeiro susceptível e a população segregante de cafeeiro UFV 2148-57 x H511-1. As inoculações foram feitas pela aplicação de 20 gotas de 5 µl de uredosporos na face inferior de folhas destacadas, no interior de gerbox. Após incubação e limpeza da face inferior da folha inoculada os gerbox foram transferidos para câmara com ambiente controlado. Foram feitas quatro avaliações, iniciadas aos 30 dias após a inoculação, com intervalo semanal. O método permitiu detectar genótipos resistentes e susceptíveis no material analisado, sendo que o controle 'Catuaí' apresentou grau de susceptibilidade máxima. O método não apresentou escape e permitiu analisar um grande número de genótipos com uma pequena quantidade de uredosporos. Possui ainda as vantagens de praticidade operacional, mão-de-obra e tempo reduzidos, menor gasto de tecido vegetal e redução da contaminação.

Palavras-Chave: *Hemileia vastatrix*, inoculação.

INOCULATION METHOD OF THE COFFEE RUST (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br). IN COFFEE TREE DETACHED LEAVES

Abstract: The most striking difficulty to do genetic studies involving the relation of coffee - *Hemileia vastatrix* is the absolute need of host cell. Therefore, the objective of this work was to evaluate a reliable method to inoculated *H. vastatrix* on coffee to study races and the inheritance resistance of coffee to leaf rust. For that, it was used the race II of *H. vastatrix*, *C. arabica* 'Catuaí', as the susceptible host, and the coffee segregant population UFV 2148-57 x H511-1. The inoculations were done by applying 20 drops of 5 µl of uredospores on the abaxial surface of detached leaves, maintained in the gearbox. After the incubation, the abaxial surfaces of the inoculated leaves were cleaned and the gearboxes were transferred to a controlled environment chamber. Four evaluations were done, initiated at 30 days after inoculation at weekly intervals. The method permitted to detect resistant and susceptible genotypes in the analyzed material and the control 'Catuaí' showed a maximum susceptibility index of disease. The procedure proved to be reliable and very sensitive; it allowed to analyze a labor, it is not time-consuming, requires a small amount of plant tissue and avoids contamination.

Key Words: *Hemileia vastatrix*, evaluation of the resistance.

Introdução

A ferrugem, desde a sua constatação no Brasil em 1970, continua sendo a principal doença do cafeeiro. Os sintomas da ferrugem podem ser observados na face inferior das folhas, onde ocorrem manchas com pústulas alaranjadas. A parte superior das folhas infectadas torna-se clorótica sobre a área das pústulas, tornando-se necrótica com o tempo. A ferrugem é causada por *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. um fungo biotrófico que necessita de tecidos saudios do hospedeiro para a sua multiplicação. Por isso, os estudos genéticos de *H. vastatrix* e de genótipos de cafeeiro com vistas a resistência, requerem inoculações periódicas dos uredosporos do fungo no hospedeiro. Esse processo é demorado e exige dedicação constante, o que torna o processo oneroso. Além disso, podem ocorrer escapes e contaminações entre raças do patógeno e outros fungos. Esse trabalho teve por objetivo desenvolver um método eficiente de inoculação de *H. vastatrix* que permitisse estudar com segurança raças e heranças da resistência.

Material e Métodos

Para o estudo, utilizou-se a raça II de *H. vastatrix*, *C. arabica* 'Catuaí' como controle e a população segregante, resultante do cruzamento do genótipo 2148-57 (*C. arabica*) com H511-1, este derivado do Híbrido de Timor UFV 443-3. Antes da montagem do teste, os uredosporos da raça II foram multiplicados por inoculação nas superfícies abaxiais dos segundos e terceiros pares de folhas de mudas de cafeeiro cv. Catuaí. Para a multiplicação os uredosporos foram espalhados nas folhas com um pincel de pêlo de camelo e, em seguida, as folhas foram levemente aspergidas com água destilada. As plantas foram mantidas no escuro, a 22°C e UR 90% por 72 horas, e a seguir foram transferidas para uma câmara de 22 °C

e fotoperíodo de 12 horas. Os uredosporos foram coletados e acondicionados em ampolas de vidro vedadas com algodão. As ampolas foram colocadas dentro de um dessecador, com umidade relativa interna em torno de 50%, em geladeira (Zambolim & Chaves, 1974). Antes da inoculação, a viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix* foi testada pelo teste de germinação em meio ágar-água a 2%, utilizando o método de Shein & Rotem (1965), modificado por Zambolim & Chaves (1974). Somente os uredosporos com viabilidade superior a 20% foram considerados adequados para os testes de inoculação. O inóculo para os testes de inoculação foi preparado pela adição inicial de 1 ml de água destilada em um tubo de eppendorf, contendo 4 mg dos uredosporos de *H. vastatrix*. Após uma ligeira homogeneização da amostra num vórtex, foi adicionado mais 1 ml de água no tubo. Durante todo o processo de inoculação, o inóculo foi submetido a várias homogeneizações para ser mantido em suspensão. Para inoculação foram utilizadas folhas de 50 genótipos da população segregante, destacadas e jovens, porém totalmente desenvolvidas. As folhas destacadas foram selecionadas de mudas de genótipos que apresentavam boas condições sanitárias, sob condições de telado. Após serem cuidadosamente lavadas em água corrente e secadas em papel de filtro, as folhas foram colocadas com a face abaxial voltada para cima sob uma tela e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox. Após esse preparo, as inoculações foram feitas pela aplicação de 20 gotas de 5 µl do inóculo, com auxílio de uma micropipeta, na face inferior das folhas destacadas. Após a inoculação os gerbox foram deixados por 48 horas à temperatura de 22±2 °C na ausência de luz. Após esse período, foi feita uma limpeza cuidadosa, com auxílio de algodão, da superfície abaxial das folhas, tomando o cuidado para não causar ferimentos. Esse processo teve por finalidade a retirada dos uredosporos que não penetraram na folha e evitar contaminações por fungos parasitas de *Hemileia vastatrix* que pudessem prejudicar as avaliações futuras. A seguir os gerbox foram transferidos para câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, e temperatura de 22±2 °C. Até o início das avaliações foram realizadas verificações periódicas das folhas no interior dos gerbox para a identificação de sinais de ataque de pragas ou doenças, principalmente de ferrugem. A avaliações foram iniciadas aos 30 dias após a inoculação, coincidindo com o início do surgimento dos sinais do fungo no controle. Foram feitas quatro avaliações espaçadas por um período de sete dias. Os índices de esporulação foram analisados pela escala de Tamayo (1988), Figura 1. Nesta escala, as notas 1, 2 e 3 correspondem à reação de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix*, e as notas 4, 5 e 6, a reações de susceptibilidade. Nota 1: ausência de sintomas; nota 2: lesões cloróticas pequenas; nota 3: lesões cloróticas grandes; nota 4: lesões cloróticas grandes com pequena esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredosporos; nota 5: lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% da área clorótica e nota 6: lesões com esporulação ocupando mais de 50% de sua área.

Resultados e Discussão

Os dados referentes às reações da população segregante inoculada com a raça II de *H. vastatrix* encontram-se no Quadro 1. Na progênie segregante analisada, o teste de inoculação detectou 41 genótipos resistentes e 9 susceptíveis. O controle positivo ('Catuai') apresentou, dentro do esperado, grau de susceptibilidade máximo (nota 6).

O método de inoculação de suspensão de uredosporos em folhas destacadas apresenta uma série de vantagens em relação a outros métodos tradicionais. A principal delas é a ausência de escape, avaliada pela razão de infecção, que nos genótipos susceptíveis foi igual a um (Figura 2, Quadro 1). Esse fato pode ser explicado pelo uso de micropipeta, que proporciona uma distribuição mais homogênea dos uredosporos na folha.

O método permite analisar um grande número de amostras com uma pequena quantidade de uredosporos. Ou seja, com apenas 1 ml de suspensão de 2 mg de uredosporos é possível avaliar 10 genótipos. Essa quantidade é muito inferior àquela utilizada pelo método de disco de folha, ou seja, aproximadamente 1 mg de uredosporos por disco (Caixeta et al, 2003). No método do disco são necessários 16 discos e 16 mg de uredosporos para avaliar apenas um genótipo. No método em discussão, com a mesma quantidade de uredosporos é possível analisar 160 genótipos diferentes.

O método apresenta outras vantagens, como uma maior praticidade operacional, por eliminar a mão-de-obra e o tempo gasto na confecção dos discos de folhas. Além disso, apresenta economia no uso de tecido vegetal, uma vez que, com uma única folha, que comportam mais de 20 repetições, é possível avaliar um genótipo. Pelo método de disco são necessárias 2 a 3 folhas para a confecção de 20 discos e a avaliação de apenas um genótipo.

A realização da limpeza após o período de incubação facilita as avaliações, evitando confundir os uredosporos da inoculação com os das lesões oriundas da infecção do patógeno. Além disso, reduz a infecção causada por *Verticillium hemileia*, um hiperparasita das pústulas de ferrugem, cuja presença interfere na avaliação das pústulas de ferrugem.

A técnica que utiliza a suspensão de uredosporos em folhas destacadas de cafeeiro têm se mostrado também eficiente nos estudos de caracterização de raças (dados não mostrados) fisiológicas do patógeno.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que a técnica proposta mostrou-se eficaz para trabalhos com *H. vastatrix*. O método de inoculação apresenta praticidade operacional aliada a uma distribuição homogênea de uredosporos na folha, uma razão de infecção aproximadamente igual a um. As quantidades de uredosporos e material vegetal para as inoculações são mínimas. O método não apresenta escape e permite analisar um grande número de genótipos com uma pequena quantidade de uredosporos.

Referências Bibliográficas

- Caixeta, E.T.; Rufino, R.J.N.; Oliveira, A.C.B.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, E.M.; Zambolim, L. **Caracterização da resistência genética do Híbrido de Timor à ferrugem do cafeeiro**. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Porto Seguro-BA, 2003.
- Shein, R.D. & Rotem, J. Temperature and humidity effects on uredospore viability. *Mycology*, Volume 57, 397-403, 1965.
- Tamayo, P.J. **Resistência de Progênies de Catimor a Oito Raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.** 1988. 64p. Tese M.S. -UFV, Viçosa, MG.
- Zambolim, L. & Chaves, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. *Experientiae*, p. 151-184. 1974.

Anexos



Figura 1: Índice de esporulação para a avaliação da resistência de cafeeiros à *H. vastatrix* (TAMAYO et al.1988).

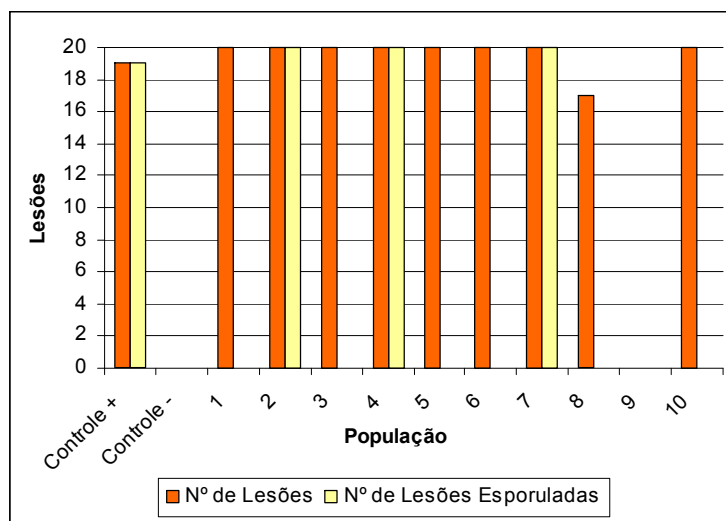


Figura 2: Ausência de escape observada nos genótipos susceptíveis (2, 4, 7) e no controle positivo, analisados pela seguinte fórmula: $Razão\ de\ infecção = \frac{n^\circ\ Lesões\ Esporuladas}{n^\circ\ Lesões\ Totais}$

Quadro 1: Reação da população segregante (2148-57 x H511-1) inoculada com a raça II de *H. vastatrix*.
(PL-período latente; PG-período de geração; NL-número de lesões; NLE-número de lesões esporuladas).

POPULAÇÃO SEGREGANTE	ÍNDICE DE ESPORULAÇÃO DATA DAS AVALIAÇÕES				PL	PG	NL	NLE
	29/11/04	06/12/04	13/12/04	20/12/04				
UFV 2148-57 x H511-1								
Controle (+)	4	4	5	6	20	33	19	19
Controle (-)	1	1	1	1	0	0	0	0
1	2	3	3	3	14	0	20	0
2	4	4	5	6	13	29	20	20
3	2	3	3	3	18	0	20	0
4	3	4	4	6	14	33	20	20
5	2	2	2	3	29	0	20	0
6	3	3	3	3	18	0	20	0
7	3	3	4	6	14	41	20	20
8	2	2	3	3	25	0	17	0
9	1	1	1	1	0	0	0	0
10	3	3	3	3	14	0	20	0
11	4	4	5	6	14	29	20	20
12	3	3	3	3	13	0	20	0
13	4	4	4	6	14	29	20	20
14	3	3	3	3	28	0	20	0
15	2	2	2	3	28	0	20	0
16	2	3	3	3	18	0	20	0
17	2	3	3	3	18	0	20	0
18	3	3	3	3	28	0	20	0
19	3	4	4	6	14	33	20	20
20	2	3	3	3	23	0	20	0
21	2	3	3	3	14	0	20	0
22	4	4	4	6	14	29	20	20
23	2	2	3	3	18	0	20	0
24	4	4	5	6	13	29	20	20
25	1	1	2	2	38	0	5	0
26	3	3	3	3	14	0	20	0
27	3	3	3	3	14	0	20	0
28	3	3	3	3	14	0	20	0
29	2	3	3	3	18	0	20	0
30	2	3	3	3	18	0	20	0
31	1	1	2	2	41	0	12	0
32	2	3	3	3	14	0	20	0
33	3	3	3	3	28	0	20	0
34	1	1	1	1	0	0	0	0
35	2	3	4	6	23	40	20	20
36	2	2	3	3	20	0	20	0
37	2	3	3	3	28	0	20	0
38	1	2	2	2	33	0	20	0
39	2	3	3	3	25	0	20	0
40	3	3	3	3	18	0	20	0
41	2	3	3	3	15	0	20	0
42	1	1	1	1	0	0	0	0
43	2	3	3	3	25	0	20	0
44	1	2	2	2	30	0	20	0
45	2	3	3	3	18	0	20	0
46	2	3	3	3	14	0	20	0
47	1	1	1	1	0	0	0	0
48	2	3	3	3	18	0	20	0
49	3	3	3	3	28	0	20	0
50	1	1	2	3	38	0	20	0