

VIABILIDADE DE UREDOSPOROS DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) SOB DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO *IN VITRO*

Alexandre S. CAPUCHO¹; Antônio F. de SOUZA²; Eunize M. ZAMBOLIM^{1,2}; Eveline T. CAIXETA^{1,3}, Raphael J. N. RUFINO¹, Júlio C. BARBOSA¹, Samuel M. ALVARENGA, Laércio ZAMBOLIM²

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV)/Bioagro, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), 36.570-000, Viçosa-MG. E-mail: capucho@vicoso.ufv.br; ² UFV/Departamento de Fitopatologia; ³ Embrapa Café.

Resumo:

Este trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade e infectividade de uredosporos de *H. vastatrix* por diferentes métodos de preservação. Os tratamentos consistiram no armazenamento dos uredosporos sob diferentes temperaturas: 1) 4 °C com 50% de umidade relativa; 2) 4 °C após liofilização; 3) –80 °C; 4) –20 °C; 5) –80 °C após congelamento em nitrogênio líquido. Utilizou-se no experimento uredosporos da raça II de *H. vastatrix*. A viabilidade dos uredosporos foi avaliada, pela contagem do número de uredosporos germinados em meio ágar-água a 2%. Para isso, foi espalhada uma suspensão de uredosporos (2 mg/ml), correspondente a cada tratamento, em placas de Petri que foram incubadas por 20-24 horas, a 22 °C, e na ausência de luz. Simultaneamente, cada suspensão de esporos foi inoculada em folhas destacadas de *Coffea arabica* ‘Catuaí’, mantidas por 50 dias na mesma temperatura e fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro. Os resultados mostraram que os tratamentos 3 e 5 foram os mais eficientes na preservação, mantendo a viabilidade dos uredosporos em 38% e 42%, respectivamente, oito meses após a montagem dos testes. Inoculações em folhas destacadas mostraram que o tratamento 3 foi o mais eficiente na manutenção da infectividade pelo número de lesões esporuladas.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*, viabilidade de uredosporos, métodos de preservação.

VIABILITY OF UREDOSPORES OF COFFEE LEAF RUST (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) BY DIFFERENT METHODS OF PRESERVATION *IN VITRO*

Abstract:

The goal of the present work was to evaluate the viability and infectiveness of *H. vastatrix* uredosporos by different preservation methods. The treatments consisted of uredosporos storage under different temperatures: 1) 4°C with 50% of relative humidity; 2) 4°C after lyophilization; 3) –80°C; 4) –20°C; 5) –80°C after freezing in liquid nitrogen. The *H. vastatrix* race II was used in the assay. The uredosporos viability was evaluated, by counting the number of germinated uredosporos in agar-water medium at 2%. For that, we spread uredosporos suspension (2 mg/ml), corresponding to each treatment, in *Petri* dishes, which were incubated for 20-24 hours, at 22°C, in the dark. Simultaneously, each uredospore suspension was inoculated in *Coffea arabica* ‘Catuaí’ detached leaves, maintained for 50 days at the same temperature and 12 hours of light and dark photoperiod. The results showed that the treatments 3 and 5 were the most efficient in the preservation, maintaining the uredosporos viability 38% and 42% respectively for eight months. Inoculations in detached leaves showed that the treatment 3 was the most efficient in the maintenance of infectiveness of the uredosporos by the number of sporulated lesions.

Key words: *Hemileia vastatrix*, uredosporos viability, preservation methods.

Introdução

A ferrugem do cafeeiro é causada por *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., um patógeno biotrófico, que requer um hospedeiro vivo para sua sobrevivência. Assim, a falta de um método eficiente de preservação dos uredosporos do fungo, *in vitro*, por um longo período de tempo, é uma barreira para os estudos da fisiologia, genética e patogenicidade de *H. vastatrix*. As formas atualmente utilizadas na preservação de uredosporos são: 1) inoculações em plantas hospedeiras. Neste caso são necessárias re-inoculações freqüentes, pelo fato das lesões induzirem a queda das folhas; 2) manutenção a 4 °C com 50% de umidade relativa. Este método mantém a viabilidade do fungo por um período máximo de três meses, e requer por isso, re-inoculações freqüentes. Esses dois métodos além de trabalhosos podem acarretar em contaminações dos isolados ou das raças fisiológicas devido às periodicidades das inoculações. 3) Manutenção em Nitrogênio líquido. Esse método é dispendioso por requerer a reposição do nível de nitrogênio no ideal.

A obtenção de inóculo isento de contaminações, em quantidades suficientes, e em boas condições de germinação, é necessário para a caracterização do fungo para programas de melhoramento do cafeeiro. Assim, o acondicionamento dos uredosporos em boas condições torna-se necessário para manutenção de sua viabilidade, eliminar a possibilidade de contaminações por inoculações periódicas e assegurar a integridade genética do isolado ou raça do fungo.

O objetivo deste trabalho foi encontrar um método de preservação capaz de manter a viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix* por um longo período de tempo, de fácil utilização e baixo custo.

Material e métodos

O ensaio foi realizado no BioCafé (Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro), localizado no BIOAGRO (Núcleo de Biotecnologia aplicado a Agricultura) na UFV, Viçosa-MG. Os uredosporos de *H. vastatrix* foram obtidos pela inoculação da raça II do patógeno em *Coffea excelsa*, cedida pelo Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC-Portugal). A raça II foi escolhida por ser a predominante nos cafezais brasileiros, e a hospedeira *C. excelsa*, por ser extremamente susceptível a raça II e por apresentar grande área foliar, proporcionando a obtenção rápida de grandes quantidades de inóculo (Figura 1). Os uredosporos foram coletados diretamente das folhas de *C. excelsa* com o auxílio de cápsulas de gelatina e distribuídos, na quantidade de 4 mg cada, em ampolas de vidro que foram vedadas com auxílio de um maçarico. Para cada tratamento foram reservadas 12 ampolas.

Os tratamentos consistiram no armazenamento dos uredosporos sob as seguintes condições de temperaturas: 1) 4 °C com 50% de umidade relativa; 2) Liofilização e manutenção a 4 °C; 3) -80 °C; 4) -20 °C; 5) Congelamento instantâneo com nitrogênio líquido e manutenção a -80 °C. No tratamento 1, a temperatura de 4 °C foi obtida pelo acondicionamento das doze ampolas em dessecadores, mantidos em refrigerador. A umidade relativa de 50%, dentro dos dessecadores, foi obtida pela adição de solução de ácido sulfúrico na concentração de 32,6% (v/v) (Romeiro, 1971; Zambolim, 1973; Zambolim & Chaves, 1974). Este tratamento foi usado como testemunha, em virtude do seu atual uso, como método de preservação. No tratamento 2, as doze ampolas contendo os uredosporos, foram devidamente identificadas e colocadas abertas no liofilizador para a liofilização. Logo após o tratamento, as ampolas foram vedadas em bico de Bunsen e acondicionadas em refrigerador a 4 °C. No tratamento 3, as doze ampolas, contendo os uredosporos, foram vedadas em bico de Bunsen, colocadas em um Becker e tratadas com nitrogênio líquido. Os uredosporos congelados foram imediatamente armazenados em ultrafreezer (-80 °C). No tratamento 4, as ampolas foram vedadas em bico de Bunsen, colocadas em um Becker, e armazenadas a -20 °C e no 5, foram imediatamente armazenadas a -80 °C.

As avaliações foram realizadas a cada trinta dias. Os tratamentos que mantiveram os uredosporos sob condições de baixas temperaturas (2, 3, 4, 5), foram submetidos a choque térmico por 15 minutos a 40 °C, para quebra de dormência.

A concentração de uredosporos utilizada no teste de germinação foi de uma suspensão de 2 mg/ml de água destilada. Para avaliar a viabilidade dos uredosporos adotou-se a metodologia descrita por Shein & Rotem (1965) com algumas adaptações. Cerca de 300µl da suspensão foi espalhada na superfície de placa de Petri, contendo ágar-água a 2%, com o auxílio de uma alça de drigalsky, sem a adição de espalhante. Foram utilizadas duas placas por tratamento, sendo cada placa dividida em quatro campos. As placas foram incubadas por 20 a 24 horas a 22 °C, na ausência de luz. Após esse período procedeu-se à contagem dos uredosporos com o auxílio do microscópio óptico Carl Zeiss. Foram contados de 50 a 70 uredosporos germinados e não germinados por campo (Figura 2), totalizando 200 a 280 uredosporos por repetição.

A porcentagem de germinação foi obtida pela fórmula: % de Germinação = $(n^{\circ} \text{ uredosporos germinados} / n^{\circ} \text{ uredosporos totais}) \times 100$. A viabilidade de cada tratamento foi constituída pela média dos oito campos das respectivas placas.

Para verificar a infectividade dos uredosporos, parte da suspensão utilizada nos testes de germinação foi inoculada em folhas destacadas de *C. arabica* 'Catuaí'. A inoculação foi feita utilizando o método de folha destacada. Este método consiste na inoculação de folhas destacadas de cafeeiro, colocadas sob uma tela e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox. Cada folha de 'Catuaí', foi inoculada na face abaxial com vinte gotas, de 5µl cada, de suspensão de uredosporos. Foram feitas duas repetições por tratamento. As avaliações foram feitas 50 dias após as inoculações e consistiram na contagem do número de lesões esporuladas por folha. A infectividade resultante de cada tratamento foi obtida pela média das lesões esporuladas por tratamento (Figura 3).

Resultados e Discussão

Os tratamentos 3 e 5 apresentaram diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey, em comparação aos demais tratamentos, 120 dias após o início dos testes (Quadro 1). Esses dois tratamentos foram os mais eficientes na preservação da viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix*, que se mantiveram viáveis numa taxa superior a 40% aos 240 dias após o início dos testes. Nos demais tratamentos, nas mesmas condições do ensaio, a capacidade de germinação dos uredosporos foi mantida acima de 20% até os 75 dias, porém a viabilidade completa foi perdida aos 150 dias (Figura 4, Quadro 1).

A infectividade dos uredosporos em todos os tratamentos foi inicialmente elevada, condizendo com a alta taxa de germinação inicial (Figura 4, Quadro 1). Ao longo do tempo, a infectividade dos uredosporos decresceu gradativamente, com exceção do tratamento 3, onde o número de lesões foi acima de 15 aos 210 dias após o início dos testes (Figura 4). Neste tratamento e no 5, a porcentagem de germinação se manteve acima de 40% aos 8 meses após a montagem do experimento. A elevada taxa de infecção, obtida apenas no tratamento 3, pode ser explicado por uma melhor preservação da integridade dos uredosporos devido ao tratamento prévio com nitrogênio líquido.

Conclusão

O resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o tratamento prévio de uredosporos com nitrogênio líquido e o seu imediato armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi a forma mais eficiente de preservação de *H. vastatrix in vitro*. A germinação dos uredosporos foi em torno de 40 % por esse método após 8 meses de preservação. O método, além de diminuir as chances de contaminações de isolados e raças de *H. vastatrix*, apresenta a vantagem de redução de mão-de-obra com inoculações, menor gasto com material vegetal, redução de espaço físico em câmaras de crescimento aclimatizadas, ser de fácil utilização e baixo custo.

Referências Bibliográficas

- Shein, R.D. & Rotem, J. (1965). Temperature and humidity effects on uredospore viability. **Mycology**, Volume 57, 397-403.
- Zambolim, L. (1973), **Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth.** Tese M.S.-UFV, Viçosa, M.G., 52pp.
- 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 phaseoli typica* Arth. **Experientiae**, p. 151-184. 1974.
- Romeiro, R. (1971). **Germinação e poder infectivo dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. mantidos sobre diferentes produtos vegetais e o suscetível.** Tese de M.S.-UFV, Viçosa, M.G., 41pp.

Anexos

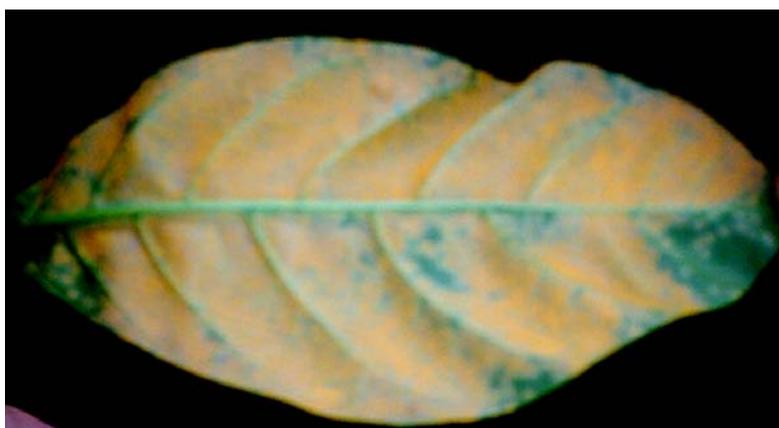


Figura 1 - Folha de *Coffea excelsa* com abundante esporulação



Figura 2 - Uredosporos da ferrugem (*H. vastatrix*) germinados e não germinados em microscopia de luz.

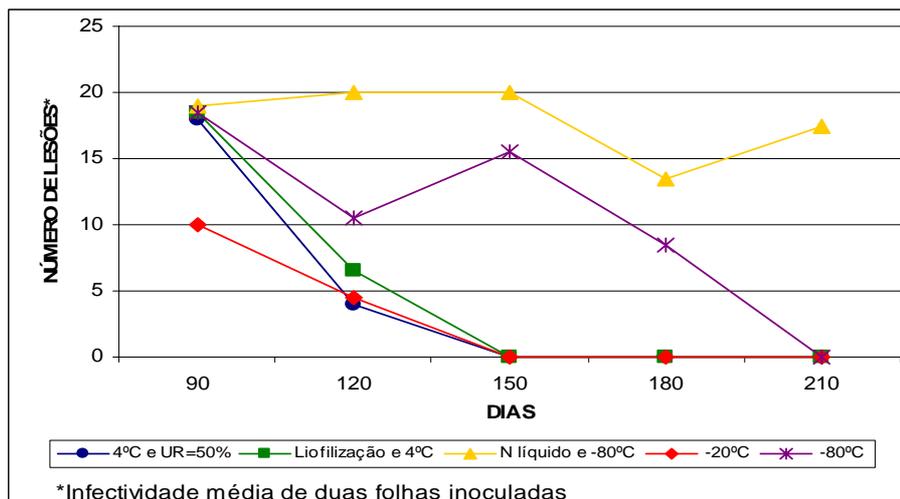


Figura 3 - Infectividade dos uredosporos de *H. vastatrix* Berk. et Br. com o tempo de preservação *in vitro*

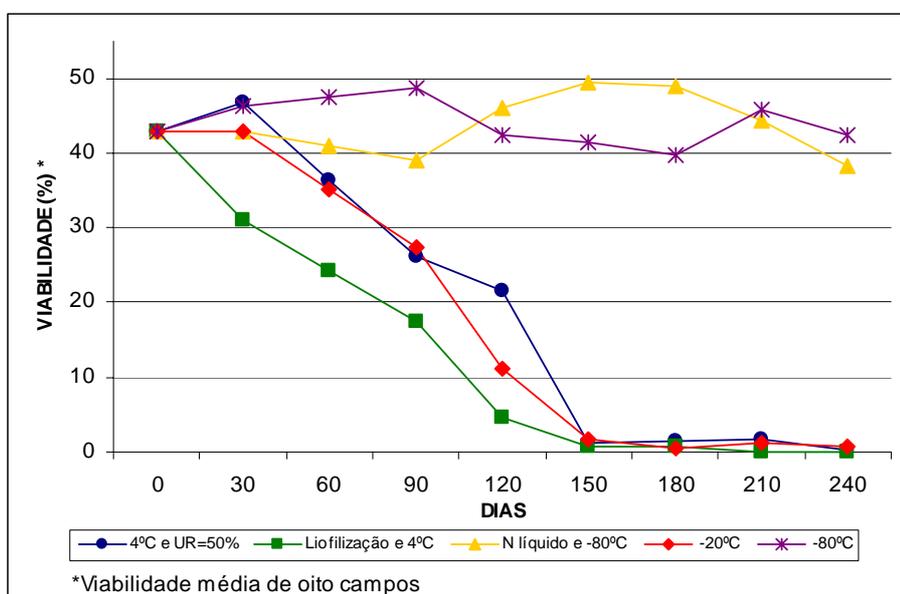


Figura 4- Viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix* com o tempo de preservação *in vitro*.

Quadro 1- Viabilidade dos uredosporos de *H. vastatrix* Berk. et Br. em função dos diferentes tratamentos.

Tratamento	Viabilidade média (%)							
	30 DAT*	60 DAT	90 DAT	120 DAT	150 DAT	180 DAT	210 DAT	240 DAT
1	46.70 a**	36.40 c	26.10 a	21.60 b	1.25 c	1.55 c	1.70 b	0.15 b
2	30.90 a	24.10 e	17.40 a	4.85 b	0.00 c	0.25 c	0.00 b	0.00 b
3	42.80 a	40.90 b	39.15 a	45.90 a	49.50 a	49.00 a	44.25 a	38.25 a
4	42.85 a	35.00 d	27.30 a	11.10 b	1.50 c	0.50 c	0.35 b	0.75 b
5	46.35 a	47.39 a	48.65 a	42.40 a	42.15 b	39.75 b	45.75 a	42.50 a
C.V.(%)	9.60	1.21	22.10	11.41	6.16	7.76	6.73	24.8

*DAT (Dias após o tratamento)

**Média de 2 repetições: Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra na vertical não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Legenda: Tratamento 1) 4 °C com 50% de umidade relativa; 2) Liofilização e manutenção a 4 °C; 3) -80 °C; 4) -20 °C; 5) Congelamento com nitrogênio líquido e manutenção a -80 °C