

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE *Uromyces appendiculatus*  
(PERS.) UNG. EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)  
PARA AVALIAÇÃO DE COMPONENTES MONOCÍCLICOS DA RESISTÊNCIA<sup>1</sup>

M.S.N. Galvão <sup>2</sup>

J.O.M. Menten <sup>3</sup>

## INTRODUÇÃO

O feijão é um dos alimentos básicos da população brasileira, de alto teor proteico e de grande importância econômica. Nos últimos anos, a produção brasileira de feijão não tem sido suficiente para atender à demanda nacional. Uma das principais razões da baixa produtividade é a incidência de um grande número de doenças (VIEIRA, 1983).

A ferrugem é uma das principais doenças que afetam o feijoeiro, provocando sérias perdas na produção. É de ocorrência comum em todas as regiões, com intensidade variável. Temperaturas moderadas (17° a 27°C) e alta umidade relativa são condições favoráveis para o desenvolvimento da ferrugem (VIEIRA, 1983).

O agente causal, *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. é um parasito obrigatório, cujo ciclo de vida se dá num só hospedeiro. Pertence à classe dos Basidiomycetos e à ordem Uredinales.

O principal agente de disseminação é o vento, embora o contato de homens, animais e implementos agrícolas também contribuam para a sua disseminação (KIMATI, 1980).

<sup>1</sup> Trabalho apresentado no IV Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Taubaté - SP, 1984 e no I Congresso Interno de Iniciação Científica, Piracicaba-SP, 1985.

<sup>2</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, bolsista da FAPESP.

<sup>3</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP, bolsista do

O processo de infecção se dá pelo eciosporo ou uredosporo que produz tubo germinativo, estabelecendo um contato físico com os bordos do estômato. O fungo desenvolve hifas de infecção e haustórios à medida que invade intracelularmente o tecido do hospedeiro, até que forma uma pústula jovem. Aos 10-15 dias esta pústula torna-se madura, os uredosporos desprendem-se e são disseminados (SCHWARTZ & GÁLVEZ, 1980).

Os sintomas característicos iniciam-se nas folhas como pequenas manchas amarelas, puntiformes, levemente salientes, que se rompem quando as frutificações do fungo amadurecem, formando, assim, os soros. Estes, quando produzem uredosporos, apresentam uma coloração pardo-avermelhada ferruginosa (KIMATI, 1980). Em infecções severas, as folhas tornam-se amarelas, secam e caem. A ferrugem manifesta-se principalmente nas folhas, mas pode atingir as vagens e, mais raramente, as hastes (VIEIRA, 1983).

Para o controle da ferrugem recomenda-se medidas como práticas culturais, aplicação de fungicidas e uso de variedades resistentes (KIMATI, 1980).

O uso de variedades resistentes constitui um dos mais importantes meios de controle, mas encontra obstáculos na alta mutabilidade vertical do patógeno. O surgimento de novas raças pode limitar a vida útil de variedades lançadas como resistentes (MENTEN, 1980; VIEIRA, 1983).

Um dos métodos mais utilizados pelos melhoristas é a introdução de genes específicos de resistência às raças, ou seja, a utilização da chamada resistência vertical (VIEIRA, 1983). Ela está condicionada por poucos genes e tem valor transitório, pois com o surgimento de nova raça, a variedade resistente a certas raças pode tornar-se suscetível (VIEIRA, 1972).

A resistência horizontal ou não-específica é mais estável. Está sob o controle de muitos genes. Na resistência horizontal, a variedade é igualmente resistente a todas as raças. Ela envolve mecanismos que estão além da capacidade do patógeno vencer (VIEIRA, 1972; BERGAMIN F. & KIMATI, 1978).

A resistência horizontal atua reduzindo o desenvolvimento da doença durante o ciclo de cultivo, ou seja, reduz a taxa de aumento da população do patógeno sobre o

A variabilidade genética aliada às resistências horizontal e vertical é extremamente importante para o controle dos patógenos e suas raças. Impede ataques devastadores da doença e cria um efeito estabilizador (VIEIRA, 1972). É necessário também considerar a integração desse sistema com outras medidas de controle, como a aplicação de produtos químicos e práticas culturais (SCHWARTZ & GÁLVEZ, 1980).

A manifestação da resistência horizontal está condicionada pela atuação de diversos parâmetros como: frequência de infecção, período latente e produção de esporos (incluindo tamanho ou tipo de lesão, produção de esporos por lesão e período infeccioso). A frequência de infecção é medida pelo número de pústulas provenientes de uma quantidade conhecida de inóculo, indicando não apenas resistência à penetração, mas também à colonização. O período latente é medido pelo tempo entre a inoculação e a produção de esporos (MENTEN, 1980).

O presente trabalho teve como objetivos: estudar o efeito da concentração de esporos na suspensão de inóculo e do tempo em câmara úmida no período latente e frequência de infecção de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., linhagem Rosinha 4D2); estudar o efeito do período de pré-tratamento dos esporos na suspensão de inóculo e do regime luminoso durante a incubação no período latente e frequência de infecção de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., linhagem Rosinha 4D2).

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação e laboratório da Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

Primeiramente, fez-se a coleta de material infectado no campo, seguindo-se a purificação do agente causal da ferrugem, mediante a obtenção de isolados monopustulares. Cada pústula foi espalhada em uma folha primária de feijoeiro. Da infecção que se verificou na folha, tomou-se outra pústula, repetindo-se o processo até

que as pústulas se mostrassem homogêneas quando, então, considerou-se a amostra pura.

Seguiu-se, então, a multiplicação de esporos. Foram feitas várias inoculações. Os vasos foram mantidos em câmara úmida por 48 horas, a temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas, na câmara de crescimento.

Para a avaliação do período de incubação e concentração de inóculo foram preparadas suspensões de esporos com diferentes concentrações em solução de Tween 80 a 0,02%. A contagem foi feita em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). Obteve-se uma solução bem concentrada a partir da qual foi feita uma diluição em série, obtendo-se as seguintes concentrações:  $2 \times 10^4$ ,  $20 \times 10^4$ ,  $50 \times 10^4$  e  $100 \times 10^4$ . As inoculações foram feitas por aspersão utilizando-se pulverizador manual. Foram utilizados três vasos para cada concentração, sendo cada um submetido a diferentes períodos de câmara úmida (15, 24 e 48 horas). A partir do aparecimento da 1ª pústula (cerca de 7 a 8 dias) foi feita a contagem do número de pústulas em cada folha primária, duas vezes ao dia, até a estabilização das mesmas. Foram feitas 4 repetições, para cada tratamento.

Foram analisados os parâmetros: período latente e frequência de infecção. Considerou-se a frequência de infecção como o número total de pústulas existentes em 4 folhas primárias de feijoeiro, depois da estabilização. E para o período latente, o tempo decorrido da inoculação até o aparecimento de 50% das pústulas (MENTEN, 1980).

Para o estudo do efeito do período de pré-tratamento dos esporos na suspensão de inóculo e do regime luminoso durante a incubação no período latente e frequência de infecção, empregou-se suspensões de  $2 \times 10^4$  esporos/ml e período de incubação de 48 horas. Metade da solução de inóculo permaneceu por 1 hora sem ser utilizada, enquanto a outra metade, imediatamente após o preparo da suspensão, foi utilizada para as inoculações. Para cada um dos tratamentos empregaram-se diferentes regimes luminosos (12 horas claro/12 horas escuro e escuro contínuo). Foram feitas as contagens do número de pústulas e verificados os parâmetros período latente e frequência de infecção; foram feitas 3 repetições para cada tratamento.

Para cada experimento foi realizada a análise de variância dos dados obtidos, de acordo com o delineamento experimental de blocos ao acaso, esquema fatorial, visando verificar a significância estatística do efeito de variações metodológicas sobre os parâmetros: período latente (P.L.) e frequência de infecção (F.I.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos resultados obtidos estão apresentados nos quadros I a IV.

O quadro I mostra o efeito da concentração de esporos na suspensão de inóculo e do tempo de câmara úmida sobre o parâmetro P.L.. Observa-se que não ocorreram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, tanto para diferentes concentrações, como para diferentes períodos de câmara úmida. A interação concentração de esporos e período de câmara úmida não foi significativa.

O quadro II mostra o efeito da concentração de esporos na suspensão de inóculo e do tempo de câmara úmida na F.I.. Analisando-se os resultados obtidos, nota-se que o coeficiente de variação foi bastante elevado (C.V. = 139,98%). As variações da F.I. nos diferentes períodos de câmara úmida não foram significativas ao nível de 5% de probabilidade. Entretanto, um aumento na concentração de esporos provocou variações significativas na F.I. ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. As médias de F.I. para concentração apresentada no quadro foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. A interação não foi significativa.

No quadro III pode-se observar o efeito do pré-tratamento dos esporos na suspensão de inóculo e de diferentes regimes luminosos durante a incubação, sobre o P.L.. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que o P.L. não foi afetado significativamente quando submetido ao pré-tratamento dos esporos por 1 hora na própria suspensão de esporos. Observa-se, no entanto, uma variação significativa do P.L. ao nível de 1% para os diferentes regimes luminosos. A interação pré-tratamento e luminosidade não foi significativa, indicando que o comportamento de um fator independe do outro.

QUADRO 1 - Efeito da concentração de esporos na suspensão de inóculo e do tempo em câmara úmida no período latente (dias) de *Uromyces appendiculatus* em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Rosinha 4D2. Piracicaba, 1983.

Concentração de esporos (x 10 <sup>4</sup> )	Tempo em câmara úmida (horas)		Média
	15	24	
2	8,00*a**	7,22.a	7,29 a
20	7,22 a	7,24 a	7,35 a
50	6,88 a	7,26 a	7,18 a
100	7,02 a	7,27 a	7,15 a
Média	7,28 a	7,25 a	7,21 a

\*Média de 4 repetições.

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (C.V. = 7,93%).

QUADRO 11 - Efeito da concentração de esporos na suspensão de inóculo e do tempo em câmara úmida na frequência de infecção (número de pústulas por folha primária) de *Uromyces appendiculatus* em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Rosinha 402. Piracicaba, 1983.

Concentração de esporos (x 10 <sup>4</sup> )	Tempo de Câmara Úmida (horas)		Média
	15	24	
2	0,75*	3,00	1,00
20	17,00	12,00	18,00
50	52,25	28,25	49,50
100	94,00	64,75	136,25
Média	41,00a	27,00a	51,19a

\*Médias de 4 repetições.

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = 139,98%; DMS = 61,52 (5%).

QUADRO III - Efeito do período de pré-tratamento dos esporos na suspensão de inóculo e de luminosidade durante a incubação no período latente de *Uromyces apendiculatus* (Pers.) Ung. em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Rosinha 402. Piracicaba, 1984.

Período de pré-tratamento (horas)	Luminosidade durante incubação (48h)		Média
	12 h claro/ 12 h escuro	Escuro contínuo	
0	8,13*	8,57	8,35 a**
1	8,27	8,60	8,44a
Média	8,20b	8,59a	

Média de 3 repetições

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 1,39%.

A análise de variância dos dados apresentados no quadro IV, mostrou, através do teste F, o efeito significativo ao nível de 5% do período de pré-tratamento dos esporos na F.I.. Verificou-se um aumento de F.I. quando os esporos foram deixados por 1 hora na própria suspensão. Entretanto, constata-se que diferentes regimes luminosos não afetaram a F.I.. A interação dos dois fatores não foi significativa.

O aumento verificado na F.I. pelo pré-tratamento de esporos deve-se, possivelmente, à exudação de auto-inibidores pelos esporos. Segundo ALLEN (1955), uredosporos da ferrugem contêm compostos que impedem a germinação, exceto quando removidos, usualmente pela flutuação em água. MACKON *et alii* (1970) isolaram e identificaram dois inibidores da germinação de suspensões de esporos de ferrugem em água, os quais têm propriedades auto-inibidoras.

Segundo MUSUMECI *et alii* (1973), metabólitos produzidos por uredosporos de diversas ferrugens podem agir como inibidores da germinação e desenvolvimento desses esporos. Esse fenômeno é denominado de auto-inibição. MUSUMECI *et alii* (1973) verificaram que aumentando-se a concentração dos esporos de *Hemileia vastatrix* Bark *et* Br. usados para ensaio de germinação, de 1 mg/ml para 4 mg/ml, suprimiu-se quase completamente a germinação, o que indica que os uredosporos de ferrugem continham um auto-inibidor que pode ser extraído pela lavagem dos esporos com água.

## CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos conclui-se que:

1 - Diferentes períodos de câmara úmida não afetaram os parâmetros: período latente e frequência de infecção;

2 - A frequência de infecção foi maior quanto mais elevada a concentração de esporos, embora o período latente não tenha sido afetado por essa variável;

3 - Diferentes regimes de luz não afetaram a frequência de infecção. Entretanto, o regime "escuro" con-

QUADRO IV - Efeito do período de pré-tratamento dos esporos na suspensão de inóculo e da luminosidade durante a incubação na frequência de infecção (número de pústula por folha primária) de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung. em folhas primárias de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Rosinha 402. Piracicaba, 1984.

Período de Pré-tratamento (horas)	Luminosidade durante incubação (48 h)		Média
	12h claro/ 12h escuro	Escuro contínuo	
0	73,67*	72,33	73,00a**
1	138,33	128,67	133,50 b
Média	106,00a	100,50a	

\*Média de 3 repetições.

\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (C.V. = 21,3%).

tata pelo aumento do período latente em relação ao regime luminoso 12 horas claro / 12 horas escuro;

4 - O pré-tratamento dos esporos provocou um aumento na frequência de infecção; no entanto, não afetou o período latente.

## RESUMO

O uso de cultivares resistentes destaca-se como uma medida simples e econômica de controle da ferrugem do feijoeiro. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de variações metodológicas de inoculação sobre os parâmetros período latente (P.L.) e frequência de infecção (F.I.), importantes componentes monocíclicos da resistência horizontal (R.H.). Verificou-se que quanto maior a concentração de esporos na suspensão de inóculo, maior foi a F.I.; entretanto, esta variável não afetou significativamente o P.L.. Períodos de inoculação entre 15 e 48 horas não afetaram significativamente a F.I. e o P.L.. Empregando-se suspensões de  $2 \times 10^4$  esporos / ml e período de incubação de 48 horas, verificou-se que ao se deixar os esporos por 1 hora na própria suspensão de inóculo houve um aumento da F.I.; entretanto, o P.L. não foi afetado significativamente. Regimes de luz (12h claro/12h escuro) durante a incubação provocou uma diminuição do P.L. em relação ao escuro contínuo; a F.I. não foi afetada pelos diferentes regimes de luz.

## SUMMARY

INOCULATION METHODOLOGY OF *Uromyces appendiculatus* (PERS.) UNG. ON COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) FOR EVALUATION OF MONOCYCLIC COMPONENTS OF THE RESISTANCE

The use of resistant cultivars is a simple and economic measure of bean rust control. The objectives of this experiment was to verify the effect of variation in the methodology of inoculation on the parameter latent period (L.P.) and frequency of infection (F.I.), important monocyclic components of horizontal resistance. It

was shown that greater concentrations of spores in the inoculating suspension increase F.I. values, without significantly affecting the L.P.. Periods of incubation for between and 15 and 48 hours didn't significantly affect the L.P. and F.I.

Using suspensions of  $2 \times 10^4$  spores/ml and an incubation period of 48 hours, it was found that leaving the spores for an hour in the inoculating suspension previous to inoculation produced an increase in the F.I., although the L.P. wasn't affected significantly. Different patterns of illumination during incubation (12 h light/12 h dark and continuous dark) didn't affect the F.I.; the "continuous dark" regime however caused an increase in the L.P..

#### LITERATURA CITADA

- ALLEN, P.J., 1955. The role of a self-inhibitor in the germination of rust uredospores. **Phytopathology** 45: 259-268.
- BERGAMIN Fº, A. & H. KIMATI, 1978. Variedades Resistentes. In: GALLI, F. Coord. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**, São Paulo, Ed. Agron. Ceres Ltda., Vol. 1, p.297-324.
- KIMATI, H., 1980. Doenças do Feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L.. In: GALLI, F. Coord. **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**, 2a. Ed., São Paulo, Ed. Agron. Ceres Ltda., Cap. 19, p.217-218.
- MACKON, V. et alii, 1970. Self-inhibitor of bean rust uredospores: methyl, 3,4-dimethocycinnante. **Science** 170(3957): 539-540.
- MENTEN, J.O.M., 1980. **Avaliação de resistência horizontal e vertical e de tolerância do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung**, Tese de Doutorado, Piracicaba, USP, 213p.
- MUSEMUCI, M.R. et alii, 1973. Evidência de um auto-inibidor da germinação nos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Bark et Br. **O Biológico** 39(7): 171-173.
- SCHWARTZ, H.F. & G.E. GÁLVEZ, 1980. **Problemas de producción del frijol**, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colômbia. 424n.

- VIEIRA, C., 1972. Resistência horizontal às doenças e diversidade genética no melhoramento do feijoeiro no Brasil. **Rev. Ceres**, Viçosa, 19: 261-279.
- VIEIRA, C., 1983. **Doenças e pragas do feijoeiro**, Viçosa. Empresa Universitária, UFV, 231p.