

## INDUTORES ABIÓTICOS NA GERMINAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE *HEMILEIA VASTATRIX*

Costa, B.H.G. Eng. Agrônomo, bolsista DTI 3 INCT-Café, UFLA brunohenriquegc@yahoo.com.br; Resende, M.L.V. Prof. Ph.D., coord. INCT-Café, UFLA; Fernandes, L.H.M, Msc. Fitopatologia, Syngenta; Pereira, L. M., Msc. Biotecnologia Vegetal, UFLA; Silva Junior, M.B, graduando agronomia, UFLA; Dias, H.C.B. graduando agronomia, UFLA; Toyota, M. Doutoranda Fitopatologia, UFLA, Ganan, N.I.C.H.S., graduando agronomia, UFLA.

O acibenzolar-S-metil (ASM, nome comercial Bion<sup>®</sup>), foi o primeiro indutor de resistência liberado para uso comercial (Lyon & Newton, 1997). Supõe-se que este composto desempenhe um papel semelhante ao do ácido salicílico na via de transdução do sinal levando à Resistência Sistêmica Adquirida – SAR e não possua atividade antifúngica direta (Yamaguchi, 1998). De forma análoga atuam os fosfitos, tendo ação indutora na resposta de defesa em plantas, no entanto podem inibir o crescimento micelial e a esporulação do patógeno. (Nemestothy & Guest, 1990; Panicker & Gangadharan, 1999; Jackson et al., 2000; Nojosa, 2003; Nojosa et al., 2005).

Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de ASM, fosfito de zinco e manganês e de um fungicida (ciproconazol + azoxystrobin) sobre a germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*, *in vitro* e observar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a germinação e o desenvolvimento do fungo na folha do cafeeiro.

Urediniósporos de *H. vastatrix* foram coletados a partir de lesões em folhas de cafeeiros naturalmente infectados, na região de Lavras, MG. Urediniósporos foram raspados das folhas com um pincel de cerdas macias e em seguida armazenados em dessecador à temperatura de 5°C e umidade relativa em torno de 50% (Zambolim & Chaves, 1974; Eskes, 1983; Abreu, 1988), até a realização do experimento *in vitro* e inoculação das mudas para estudo histopatológico.

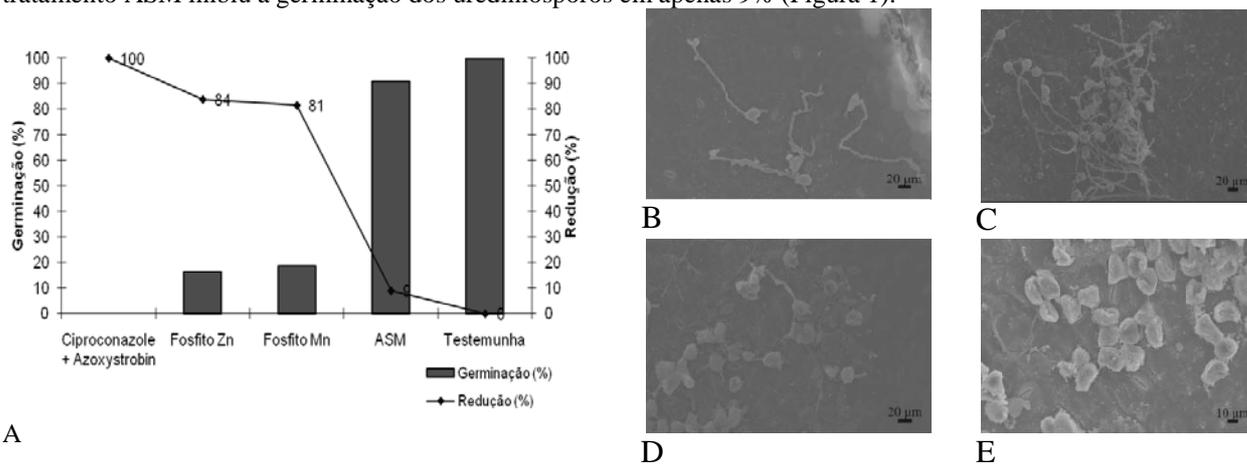
Os tratamentos utilizados foram: acibenzolar-S-metil ( $6,25 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), fosfito de zinco ( $5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ), fosfito de manganês ( $5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ciproconazol + azoxystrobin ( $1,25 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e testemunha absoluta, e para análise de MEV utilizou-se o fosfito que proporcionou maior inibição da germinação *in vitro*.

O teste de germinação foi realizado em placas de petri de 6 cm de diâmetro, contendo 10 mL de meio ágar-água 2%. Os tratamentos foram depositados nas placas sobre o meio, mais 50 $\mu$ L da suspensão de  $1,5 \times 10^3$  urediniósporos de *H. vastatrix* por mL e espalhados utilizando a alça de Drigalski. As placas foram mantidas em BOD a 25°C, por 12 horas, no escuro. A germinação dos urediniósporos foi paralisada com solução de lactoglicerol para posterior contagem. A porcentagem de germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* foi avaliada em microscópio de luz, considerando esporos germinados aqueles cujo tubo germinativo fosse maior que seu comprimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 12 repetições, sendo cada repetição constituída de um quadrante da placa, onde foram avaliados 50 urediniósporos. Para o estudo histopatológico de folhas destacadas de cafeeiro inoculadas com *H. vastatrix* foram utilizadas mudas de café com seis meses de idade, cultivadas em bandejas com substrato Plantmax<sup>®</sup>. Vinte e quatro horas após pulverização dos tratamentos seis folhas de cada muda foram coletadas e acomodadas em bandejas de plástico desinfestadas com álcool 70%. As bandejas continham no fundo uma esponja de látex em lâmina, umedecida com água destilada e coberta com papel alumínio perfurado, para permitir a passagem da umidade. Em seguida, foram desenhados seis círculos de 1 cm de diâmetro com caneta de marca permanente na superfície abaxial de cada folha, onde foram depositados 30 $\mu$ L de suspensão de  $1,5 \times 10^3$  urediniósporos mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente e colocadas em câmara de crescimento, a 25°C, até o final das coletas. Os tempos de coletas foram 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação. Cortes circulares de 5 mm de diâmetro foram realizados com bisturi, dentro de cada círculo marcado nas folhas inoculadas e estes fragmentos colocados em microtubos de 1,5mL contendo fixador (Karnovsky's modificado) e em seguida armazenado em geladeira a 4°C, para posterior observação em MEV.

Após o material ter sido imerso em solução fixadora (Karnovsky's modificado) pH 7,2, por um período de no mínimo 24 horas, 8 fragmentos de cada tratamento foram colocadas em solução tampão de cacodilato 0,05M e lavados 3 vezes, durante 10 minutos. Posteriormente, transferiu-se as secções para solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água por 1 hora, lavadas em água destilada por 3 vezes e desidratadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por três vezes. Após essa desidratação, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens foram geradas e registradas digitalmente, havendo diversas imagens para cada amostra nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 12.

### Resultados e conclusões

Foi possível observar que os tratamentos: fungicida, fosfito de zinco e fosfito de manganés inibiram a germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*, levando a uma redução de 100%, 84% e 81%, respectivamente. O tratamento ASM inibiu a germinação dos urediniósporos em apenas 9% (Figura 1).



**Figura 1.** A: efeito de fungicida, fosfitos e ASM na germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* em teste *in vitro*. Tratamentos: acibenzolar-S-metil ( $6,25 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ), ciproconazol + azoxystrobin ( $1,25 \text{ mL L}^{-1}$ ), fosfito de zinco ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ), fosfito de manganés ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e testemunha (água). Eletromicrografia de varredura de folhas de caféiro 120h após inoculação, B: testemunha, C: acibenzolar-S-metil ( $6,25 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ), D: fosfito de zinco ( $5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e E: ciproconazol + azoxystrobin ( $1,25 \text{ mL L}^{-1}$ ).

Em ensaio com microscopia eletrônica de varredura, observou-se a ação direta do produto à base de fosfito na germinação e desenvolvimento dos urediniósporos de *H. vastatrix*, evidenciando seu caráter fungitóxico. O mesmo foi observado para o fungicida ciproconazol + azoxystrobin, enquanto o tratamento com ASM não influenciou na germinação dos urediniósporos.

Os resultados obtidos tanto para o ensaio *in vitro* quanto para o de microscopia eletrônica de varredura foram concordantes, contudo, com o segundo pode-se evidenciar os eventos iniciais da patogênese, perfazendo uma excelente ferramenta para o estudo do modo de ação dos produtos testados.

### Concluiu-se que

Fungicida (ciproconazol + azoxystrobin), fosfito de zinco e fosfito de manganés inibiram a germinação e desenvolvimento de urediniósporos de *H. vastatrix* enquanto o acibenzolar – S – metil não apresentou efeito na germinação dos urediniósporos do fungo.