

# Teste de resistência ao *Uromyces appendiculatus* por meio da inoculação do patógeno em folhas destacadas do feijoeiro

Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Vilmar Antônio Ragagnin<sup>1</sup>, Demerson Arruda Sanglard<sup>1</sup>, Maurilio Alves Moreira<sup>1,2</sup> e Everaldo Gonçalves de Barros<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. \*Autor para correspondência: ebarros@ufv.br

**RESUMO.** É proposta uma nova metodologia para inoculação de *Uromyces appendiculatus* a fim de avaliar a resistência do feijoeiro à ferrugem. As linhagens Golden Gate Wax (gene *Ur-6*) e Ouro Negro (gene *Ur-ON*) foram cruzadas para a obtenção de uma população F<sub>2</sub>, que foi inoculada com a raça 29-3 de *U. appendiculatus*. Essa raça é incompatível com Ouro Negro e compatível com Golden Gate Wax. Folhas primárias das plantas F<sub>2</sub> foram destacadas dez dias após a semeadura e inoculadas por submersão em suspensão de inóculo. Posteriormente, cada folha foi transferida para uma placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada, e as placas foram, então, incubadas em BOD a 20°C, em regime de 12h de luz dia<sup>-1</sup>. A umidade no interior das placas foi mantida pela adição de 1,5 mL de água destilada em intervalos de três dias. Como controle, as folhas primárias remanescentes das plantas F<sub>2</sub>, no mesmo estágio de desenvolvimento, foram inoculadas utilizando o método convencional de inoculação. Ambos os procedimentos de inoculação foram eficientes para avaliar a reação do feijoeiro ao *U. appendiculatus*. Em ambos os métodos, a análise fenotípica da população F<sub>2</sub> confirmou a natureza monogênica dominante da resistência à ferrugem conferida pelo gene *Ur-ON*.

**Palavras-chave:** ferrugem do feijoeiro, método de inoculação, *Phaseolus vulgaris*, seleção para resistência.

**ABSTRACT.** Resistance test to *Uromyces appendiculatus* through pathogen inoculation in common bean detached leaves. A new methodology of inoculating *Uromyces appendiculatus* in tests aimed at evaluation of common bean resistance to rust is proposed. The common bean lines Golden Gate Wax (gene *Ur-6*) and Ouro Negro (gene *Ur-ON*) were crossed to obtain a F<sub>2</sub> population, which was inoculated with race 29-3 of *U. appendiculatus*. Race 29-3 is incompatible with 'Ouro Negro' and compatible with 'Golden Gate Wax'. Primary leaves of ten-days-old F<sub>2</sub> plants were detached and inoculated by immersion into an inoculum suspension. Immediately following immersion, each F<sub>2</sub> leaf was placed in a Petri dish containing a filter paper previously moistened with distilled water. These dishes were incubated in a BOD at 20°C, under a 12h daily light regime. The humidity in the dishes was maintained by addition of 1.5 mL of distilled water in filter paper, under a three days regime. As control, the remaining primary leaves of ten-days-old F<sub>2</sub> plants were inoculated using the conventional inoculation method. Both inoculation methods were efficient in evaluating the reaction of the common bean to *U. appendiculatus*. The resistance/susceptibility screening of the F<sub>2</sub> population confirmed the monogenic dominant nature of the rust resistance controlled by the *Ur-ON* gene in both methods.

**Key words:** common bean rust, inoculation method, *Phaseolus vulgaris*, resistance screening.

## Introdução

O fungo parasita obrigatório *Uromyces appendiculatus* F. Strauss (sin. *U. phaseoli* G. Winter), agente etiológico da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), está mundialmente distribuído. Contudo, a doença é favorecida nas regiões com temperaturas entre 17 e 27°C e umidade relativa do ar em torno de 95%. Por isso, as maiores perdas decorrentes desta enfermidade

ocorrem em regiões tropicais e subtropicais úmidas (McMILLAN et al., 2003). Este é o caso do Brasil, onde o *U. appendiculatus* representa um dos patógenos mais importantes do feijoeiro pelos sérios prejuízos que tem ocasionado (SOUZA et al., 2007).

O uso de cultivares resistentes para o controle de doenças como a ferrugem é um dos métodos mais vantajosos sob o ponto de vista econômico e ambiental. Porém, a alta variabilidade apresentada

por *U. appendiculatus* dificulta o trabalho dos melhoristas. A introgressão simultânea (piramidação) de distintos genes de resistência (R) em uma mesma linhagem é apontada como uma estratégia viável e eficiente para a obtenção de cultivares com resistência durável e de amplo espectro (KELLY et al., 2003). Porém, sua execução tem sido difícil, ou mesmo impraticável, quando são utilizadas apenas as metodologias convencionais de inoculação para a seleção dos genótipos promissores. Para viabilizar a piramidação, a metodologia de inoculação adotada deve permitir a discriminação precisa entre os genes R contidos em uma mesma planta, com base na compatibilidade diferencial por eles apresentada frente aos distintos genótipos do patógeno. Além disso, deve ser prática, de fácil condução, e proporcionar um diagnóstico rápido e confiável sobre a natureza da interação planta-patógeno.

Os métodos atualmente usados para a inoculação de *U. appendiculatus* não permitem uma detecção acurada dos sintomas específicos incitados por diferentes patótipos do fungo quando da identificação de genótipos portadores de diferentes genes R (FALEIRO et al., 2003). Além disso, demandam infra-estrutura onerosa, como casa-de-vegetação e câmaras de nevoeiro, e o processo, como um todo, ainda é bastante moroso.

Alguns programas de melhoramento usam marcadores moleculares, principalmente os do DNA, para monitorar a piramidação de genes R em linhagens elites (KELLY et al., 2003; RAGAGNIN et al., 2009). Porém, em muitos casos, os alelos de interesse ainda não possuem marcas identificadas.

Testes preliminares indicam que o uso de folhas destacadas de plantas hospedeiras para a inoculação de patógenos pode ser uma alternativa viável (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2001), inclusive para inoculações com *U. appendiculatus* (RIOS et al., 2001). O propósito deste trabalho foi testar uma nova metodologia de inoculação para avaliar a resistência do feijoeiro ao fungo *U. appendiculatus*, utilizando folhas primárias destacadas das plantas e a manutenção destas *in vitro*.

## Material e métodos

As linhagens de feijoeiro Golden Gate Wax (GG Wax) e Ouro Negro (ON), fontes de resistência à ferrugem, portadoras dos genes *Ur-6* e *Ur-ON*, respectivamente, foram utilizadas como genitores em cruzamentos artificiais para a obtenção de uma população  $F_2$ . A população gerada foi avaliada quanto à reação a um isolado monopustular de

*U. appendiculatus* pertencente à raça 29-3, segundo caracterização de Souza et al. (2007). GG Wax é suscetível ao referido patótipo, e ON, resistente. Sementes de ON e de US Pinto 111, testemunha suscetível, foram obtidas junto ao Banco Ativo de Germoplasma do Feijoeiro do Bioagro/UFV (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). As sementes de GG Wax foram fornecidas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia.

Os cruzamentos artificiais foram realizados em casa-de-vegetação. A natureza híbrida das sementes  $F_1$  foi confirmada fenotipicamente (cor de flor). A partir destas, 217 sementes  $F_2$  foram obtidas. Além das sementes  $F_2$ , quatro sementes de cada genitor e de US Pinto 111 foram semeadas em bandejas plásticas (60 x 40 x 10 cm) contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, a qual foi adubada no momento do preparo com o fertilizante NPK 4-14-8 (5 kg m<sup>-3</sup>). Todas as plantas  $F_2$ , os genitores e a testemunha suscetível foram inoculados com o isolado da raça 29-3 de *U. appendiculatus*, utilizando a nova metodologia de inoculação, proposta neste trabalho, e a metodologia convencional, descrita em detalhes por Faleiro et al. (2000) e Souza et al. (2007).

Nas inoculações pela nova metodologia, com o auxílio de uma tesoura previamente esterilizada em álcool, uma das folhas primárias das plantas testadas foi excisada quando apresentava, aproximadamente, 2/3 do seu desenvolvimento completo, aos dez dias após a semeadura. Posteriormente, foi imersa em uma suspensão de inóculo, com concentração de  $2,0 \times 10^4$  uredosporos mL<sup>-1</sup> de água destilada contendo 0,05% de Tween 20. Logo a seguir, as folhas foram transferidas individualmente para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo papel de filtro previamente umedecido com 3,0 mL de água destilada. Essas placas foram, então, incubadas em BOD a 20°C, em períodos de 12h de luz dia<sup>-1</sup> (Phillips® TLT 20W/75RS), com incidência de, aproximadamente, 28  $\mu$ moles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Em intervalos de três dias a partir da inoculação, foram adicionados 1,5 mL de água destilada no papel de filtro de cada placa de Petri, até a avaliação dos sintomas da doença. Com isso, foi possível manter alta a umidade no interior das placas.

Como controle, as folhas primárias remanescentes, no mesmo estágio de desenvolvimento, foram inoculadas utilizando o método convencional. Para esse fim, o inóculo ( $2,0 \times 10^4$  uredosporos mL<sup>-1</sup>) foi aplicado em ambas as superfícies foliares, com auxílio de um atomizador manual do tipo De Vilbiss n° 15, acionado por

compressor elétrico. Após esse procedimento, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $> 95\%$ ), onde permaneceram por 48h, em períodos de 12h de luz  $\text{dia}^{-1}$ . Posteriormente, foram transferidas para casa-de-vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram até o surgimento dos sintomas da ferrugem.

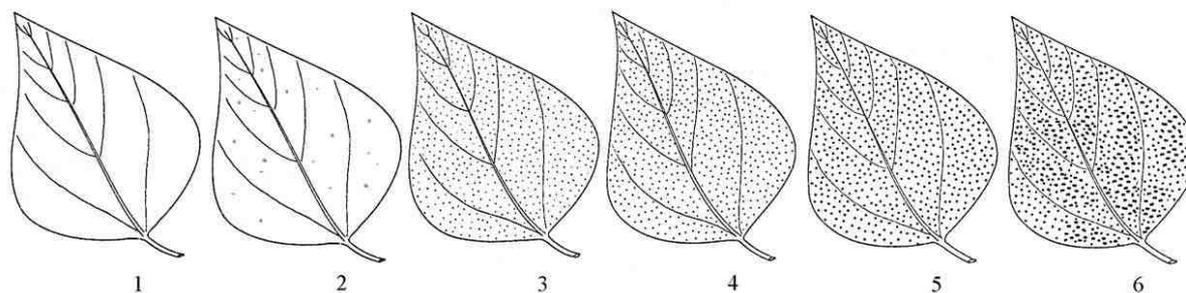
A avaliação dos graus de reação à doença foi realizada quando se completou o período de latência, ou seja, quando aproximadamente 50% das pústulas já apresentavam esporulação. Isso ocorreu de 10 a 14 dias após a inoculação. Em todos os casos, foram observadas, visualmente, as lesões em ambas as faces das folhas inoculadas. Foi utilizada uma escala com seis graus de reação, na qual o grau 1 (um) é atribuído às plantas sem sintomas visíveis e o grau 6 (seis), às severamente doentes. Como auxílio nas observações, foi usada uma escala diagramática desenvolvida pelo CIAT (Figura 1). Plantas que apresentaram graus de 1 a 3 (ausência de pústulas, manchas necróticas sem esporulação ou pústulas esporulando com diâmetro  $< 300 \mu\text{m}$ )

foram consideradas resistentes. Aquelas que apresentaram grau 4 ou maior (pústulas esporulando com diâmetro de  $300 \mu\text{m}$  ou superior) foram classificadas suscetíveis.

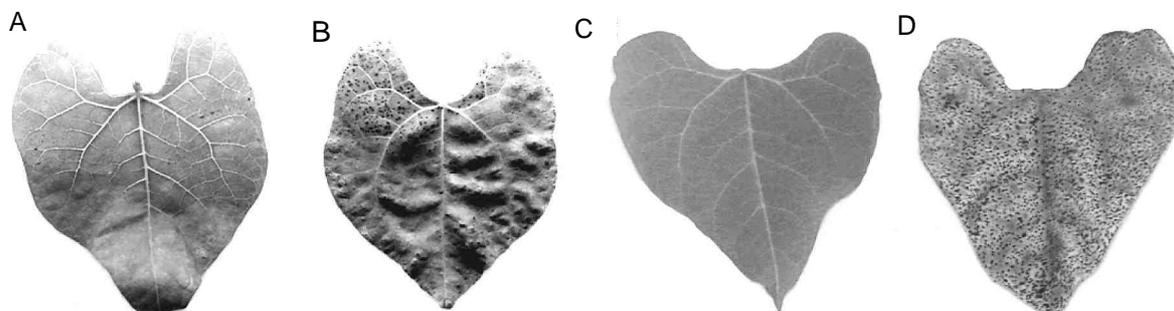
Os dados obtidos nas avaliações foram submetidos ao teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), para determinar a eficiência dos dois métodos de inoculação em detectar a segregação do gene *Ur-ON* na população  $F_2$  derivada do cruzamento GG Wax x ON. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

### Resultados e discussão

As plantas das linhagens ON (*Ur-ON*) e GG Wax (*Ur-6*) apresentaram reações de resistência e suscetibilidade, respectivamente, quando inoculadas utilizando os dois métodos de inoculação (Figura 2). Coerência nos resultados obtidos com base em ambos os métodos também foi observada no diagnóstico da reação de suscetibilidade apresentada pela testemunha suscetível US Pinto 111.



**Figura 1.** Escala diagramática usada como auxílio na avaliação dos sintomas da ferrugem do feijoeiro (CIAT, Cali, Colômbia). Escala: 1- ausência de pústulas (imune), 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro  $< 300 \mu\text{m}$ , 4- pústulas esporulando com diâmetro de  $300 \mu\text{m}$  a  $499 \mu\text{m}$ , 5- pústulas esporulando com diâmetro de  $500 \mu\text{m}$  a  $800 \mu\text{m}$ , e 6- pústulas esporulando com diâmetro  $> 800 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Sintomas de ferrugem, causados pela raça 29-3 de *Uromyces appendiculatus*, observados em folhas primárias destacadas das linhagens de feijoeiro Ouro Negro (A e C) e Golden Gate Wax (B e D), quando inoculadas utilizando o novo método (A e B) e o método convencional (C e D).

A hipótese de segregação monogênica da resistência ao isolado monopustular da raça 29-3 de *U. appendiculatus* na população F<sub>2</sub> foi confirmada pelos dados obtidos com os dois métodos de inoculação. O índice de coincidência de plantas F<sub>2</sub> que apresentaram mesma reação quando inoculadas utilizando ambos os métodos foi de 97,58%, para plantas resistentes, e de 92,86%, para plantas suscetíveis (Tabela 1). Portanto, é possível afirmar que o novo método de inoculação de *U. appendiculatus* em folhas destacadas do feijoeiro, proposto neste trabalho, foi eficiente para identificar as plantas F<sub>2</sub> contendo alelos de resistência para o loco *Ur-ON*.

**Tabela 1.** Reação à raça 29-3 de *Uromyces appendiculatus* apresentada por plantas F<sub>2</sub>, provenientes do cruzamento entre as linhagens de feijoeiro Ouro Negro (gene *Ur-ON*) e Golden Gate Wax (gene *Ur-6*), quando inoculadas por dois métodos distintos.

Reação	Método de inoculação		(N+C) <sup>a</sup>	IC (%) <sup>b</sup>
	Novo (N)	Convencional (C)		
Resistente (R)	161	165	161	97,58
Suscetível (S)	56	52	52	92,86
Frequência esperada	3(R):1(S) <sup>c</sup>	3(R):1(S)		
$\chi^2$	0,0752	0,1244		
P (%) <sup>d</sup>	78,38	72,43		

<sup>a</sup>Número de plantas F<sub>2</sub> que apresentaram mesma reação quando inoculadas pelos dois métodos; <sup>b</sup>Índice de coincidência em porcentagem: IC = [(N+C)+total<sub>RS</sub>].100; <sup>c</sup>Frequência esperada para a segregação de um único loco, com relação intra-alelica de dominância completa, em uma população F<sub>2</sub> obtida a partir do cruzamento entre genitores homocigotos; <sup>d</sup>Probabilidade em porcentagem.

É importante salientar que o novo método permitiu a avaliação mais precoce dos graus de reação à doença, aos dez dias após a inoculação, comparado ao método convencional (14 dias após a inoculação), o que o torna mais dinâmico.

Outra observação relevante foi que o isolado de *U. appendiculatus* utilizado nas inoculações apresentou maior agressividade, definida como a fecundidade do patógeno, ou seja, o número médio de esporos produzidos por pústula (RIBEIRO do VALE et al., 2001), quando inoculado com o método convencional (Figura 2). Com isso, sugere-se que este método seja o mais adequado para realizar a multiplicação dos uredosporos do fungo quando da manutenção de sua micoteca. Já o novo método representa uma promissora ferramenta disponível aos programas de melhoramento para ser usada nas análises da interação planta-patógeno, durante estudos de herança, testes de alelismo, e na seleção de genótipos superiores quanto à resistência ao fungo *U. appendiculatus*, etapa fundamental para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à ferrugem.

Apesar de vários métodos de inoculação de fungos fitopatogênicos já terem sido desenvolvidos, além do fato de alguns deles serem amplamente

utilizados, para o novo método de inoculação de *U. appendiculatus* proposto neste trabalho destacam-se as seguintes características: a facilidade de adoção, o dinamismo do método, a disponibilidade de infraestrutura básica adequada na maioria dos laboratórios e a confiabilidade nos resultados obtidos. Faleiro et al. (2000; 2003) avaliaram a reação da cultivar ON a isolados de *U. appendiculatus* e demonstraram que inoculações simultâneas ou sequenciais pelo método convencional podem levar a erros na avaliação dos sintomas específicos causados por diferentes patótipos do fungo. Neste caso, o uso do novo método conferiria maior confiabilidade aos resultados.

Segundo Bigirimana e Höfte (2001), nos trabalhos disponíveis na literatura sobre o uso de folhas destacadas de plantas hospedeiras em estudos envolvendo fungos patogênicos, após a inoculação, as folhas são cultivadas em soluções de sacarose, ágar, ou em outras soluções nutrientes convencionais, geralmente acrescidas de benzimidazol ou acetidina. Isso torna a metodologia onerosa quando comparada à proposta neste estudo. Além disso, os procedimentos de inoculação utilizados são muito morosos e trabalhosos. Em outros casos, a aplicação do inóculo é realizada por meio de um pincel. Isto representa uma tarefa pouco dinâmica quando se considera a execução de experimentos que visam avaliar a reação de um grande número de plantas (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2001), uma realidade na rotina dos programas de melhoramento cujos objetivos incluem a resistência a patógenos (RAGAGNIN et al., 2009). Além disso, com o uso dos vários métodos já desenvolvidos, há preocupação com a segurança quanto à não-disseminação de raças não-incidentes na região onde os experimentos estão sendo realizados. No método aqui proposto, elimina-se esta possibilidade, pois a manipulação do patógeno se restringe ao laboratório e todo o processo é desenvolvido em placas de Petri, desde a inoculação até a avaliação dos sintomas da doença.

O novo método de inoculação proposto no presente trabalho mostrou ser eficiente para avaliar a interação *U. appendiculatus*-feijoeiro e, também, mais dinâmico, quando comparado ao método convencional usado como referência. Além da aplicação do inóculo ter sido realizada pela submersão das folhas na suspensão de uredosporos, tornando o processo mais rápido, a avaliação da doença foi mais precoce, aos dez dias após a inoculação. Adicionalmente, o método alternativo possui ainda a vantagem de permitir que uma única planta seja testada simultaneamente frente a distintos

isolados ou raças do patógeno, ou mesmo por patógenos distintos, e que mesmo assim possa produzir sementes em quantidade e com qualidade sanitária adequadas.

Outras vantagens seriam: o menor custo do processo de inoculação, uma vez que este poderá ser conduzido somente no laboratório e usando uma infra-estrutura básica, e a maior segurança quanto à não-disseminação da doença, principalmente em se tratando de inoculações com raças não-incidentes na região onde os experimentos estão sendo conduzidos.

A metodologia de inoculação aqui proposta está sendo utilizada pelo nosso grupo de pesquisa em um programa de piramidação de genes de resistência a doenças do feijoeiro, com ênfase para ferrugem, antracnose e mancha-angular. O novo método também poderá ser útil para a classificação de raças fisiológicas do fungo *U. appendiculatus*, por proporcionar maior agilidade e dinamismo durante a execução das inoculações para a avaliação da resistência/suscetibilidade das variedades diferenciadoras. Contudo, a avaliação da eficiência deste método para outras combinações raça-cultivar e outros genes de resistência se faz necessária antes do seu uso ser generalizado ou amplamente indicado, uma vez que a resposta pode não ser tão fidedigna como a apresentada neste estudo.

### Conclusão

A metodologia de inoculação do fungo *U. appendiculatus* proposta neste trabalho, que utiliza folhas primárias destacadas das plantas e a manutenção destas *in vitro*, é eficiente para avaliar a resistência do feijoeiro ao patógeno. Nas condições estabelecidas neste estudo, o uso da nova metodologia proporciona um rápido surgimento dos sintomas da ferrugem, comparado ao método convencional usado como controle, o que possibilita a avaliação mais precoce da doença. Entretanto, no método convencional, o patógeno apresenta maior agressividade.

### Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro. O primeiro autor registra agradecimento ao CNPq, pela concessão das bolsas de mestrado e doutorado.

### Referências

- BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Bean anthracnose: inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7-8, p. 403-408, 2001.
- CRUZ, C. D. **Genes Vol. I - Estatística experimental e matrizes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; VINHADELLI, W. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijoeiro-comum Ouro Negro. **Revista Ceres**, v. 47, n. 272, p. 375-382, 2000.
- FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2003.
- KELLY, J. D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular-marker assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2, p. 135-154, 2003.
- McMILLAN, M. S.; SCHWARTZ, H. F.; OTTO, K. L. Sexual stage development of *Uromyces appendiculatus* and its potential use for disease resistance screening of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1133-1138, 2003.
- RAGAGNIN, V. A.; SOUZA, T. L. P. O.; SANGLARD, D. A.; ARRUDA, K. M. A.; COSTA, M. R.; ALZATE-MARIN, A. L.; CARNEIRO, J. E. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leaf spot and rust. **Plant Breeding**, v. 128, n. 2, p. 156-163, 2009.
- RIBEIRO do VALE, F. X.; PARLEVLIT, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.
- RIOS, G. P.; ANDRADE, E. M.; COSTA, J. L. S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 128-133, 2001.
- SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; SANGLARD, D. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Identification of races of selected isolates of *Uromyces appendiculatus* from Minas Gerais (Brazil) based on the new international classification system. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 104-109, 2007.

Received on September 6, 2007.

Accepted on March 17, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.