

ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE AS INVERTASES DE CAFEEIROS ATACADOS POR *Hemileia vastatrix* *

PAULO DE CAMPOS TORRES DE CARVALHO **

RESUMO

No presente trabalho, que o autor considera exploratório, foram estudadas as invertases presentes em folhas de cafeeiros das variedades Geisha (SH_1SH_5) e Kent (SH_2SH_5), inoculados com as raças III (v_1v_5) e XXIV (v_2v_4) de *Hemileia vastatrix*. Devido ao genótipo do material utilizado as reações são opostas, ou seja, o cafeeiro Kent é resistente à raça III e suscetível à raça XXIV e o Geisha o contrário. Em cada par de folhas, uma foi inoculada e outra mantida como controle e a determinação das invertases foi feita aos 6 e 16 dias após a inoculação.

Os resultados preliminares obtidos mostraram que, independente da variedade de cafeeiro ou da raça de *Hemileia vastatrix*, nas combinações suscetíveis não houve alteração das invertases presentes, iguais às de plantas sadias, com o máximo de atividade em pH 4,5. Já nas combinações resistentes no 6.º dia após a inoculação houve o aparecimento de uma "invertase ácida pH 4,0", ausente tanto nas plantas sadias como nas combinações suscetíveis das mesmas variedades. O aparecimento da "invertase ácida pH 4,0" está relacionado com a diminuição do teor de sacarose nas folhas. Quanto ao significado desta "invertase ácida pH 4,0" na patogenese da ferrugem do cafeeiro, o autor aventa 3 hipóteses que poderiam ocorrer isolada ou simultaneamente.

1. A sacarose seria desviada para a formação de defesa, tais como fenóis, fitoalexinas e outras.
2. A sacarose seria desviada para outras partes da planta, num processo fisiológico semelhante ao das folhas em senectude.
3. Haveria um aumento da respiração e metabolismo dos tecidos doentes, com o implícito consumo da energia armazenada.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix*, desde o seu aparecimento epidêmico em 1970, constitui o problema fitopatológico mais importante para o Brasil. Desde aquela data, tem sido a doença estudada e a que tem recebido a maior somatória de pesquisas em nosso meio. Neste contexto, a compreensão do processo da pato-

* Entregue para publicação em 29/12/72.

** Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.

gênese e as suas implicações na fisiopatologia é vital, pois, fornecerá subsídios para a elucidação do mecanismo ou mecanismos de resistência, base para o desenvolvimento dos trabalhos de genética e melhoramento do cafeeiro resistente à ferrugem.

Como é premente a necessidade de informações neste campo, estamos apresentando no presente trabalho os resultados preliminares que obtivemos em pesquisas ainda em andamento. Assim, este trabalho que consideramos como exploratório, tem por objetivo principal o fornecimento de subsídios e a formulação de hipóteses de trabalho que, eventualmente, poderiam colaborar para um melhor equacionamento do problema.

Desde os trabalhos de ALLEN (1942) com o oídio dos cereais, numerosos pesquisadores têm-se dedicado ao metabolismo patológico dos hidratos de carbono. GOODMAN, KIRALY & ZAITLIN, (1967), consideram que os vários autores são coincidentes em que há um acúmulo inicial de açúcares totais e sacarose nos tecidos doentes, os quais são consumidos durante a esporulação das ferrugens, até atingirem níveis duas ou mais vezes menores que o encontrado nos tecidos sadios.

Por outro lado, conforme foi estudado por HATCH, SACHER & GLASZIOU (1963), HATCH & GLASZIOU (1963), SACHER, HATCH & GLASZIOU (1963), para a cana de açúcar e por PINTO RICARDO & REES (1970), para a cenoura, o mecanismo de acumulação e consumo da sacarose está diretamente relacionado com as invertases presentes. Nos dois casos, as invertases mais ácidas tendem a consumir a sacarose dos tecidos e o acúmulo somente ocorre na ausência daquelas invertases.

No entanto, na literatura que consultamos, não encontramos referência ao estudo das invertases em plantas doentes. No presente trabalho, que consideramos exploratório, procuramos estudar as invertases presentes em plantas inoculadas e não inoculadas, tanto em combinações suscetíveis como resistentes.

Desejamos ainda apresentar os nossos agradecimentos à Estação Agrônômica Nacional e ao Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal, em cujos laboratórios foram conduzidas as investigações.

MATERIAL E MÉTODOS

No quadro n.º 1, a seguir, são apresentadas as variedades de *Coffea arabica*, as raças de *Hemileia vastatrix* e o tipo de reação de cada combinação entre parasita e hospedeiro. Todo o material utilizado neste trabalho pertence à coleção do CIFC.

QUADRO N.º 1 — Variedades de *C. arabica*, raças de *H. vastatrix* e tipos de reação.

<i>Coffea arabica</i>			
H. vastatrix	Variedade	: Geisha	Kent
	Genótipo	: SH ₁ SH ₅	SH ₂ SH ₅
	Grupo	: C	D
Genótipo	raça	Tipos de reação*	
V ₂ V ₄	III	Suscetível (tipo 4)	Resistente (flecks)
V ₁ V ₅	XXIV	Resistente (flecks)	Suscetível (tipo 4)

* Determinado conforme a escala de sintomas estabelecida por Branquinho de Oliveira e Rodrigues (1961).

Devido ao genótipo do material utilizado, as reações são opostas, ou seja, o cafeeiro Kent é resistente à raça III e suscetível à raça XXIV, enquanto que a variedade Geisha tem reação oposta.

Os cafeeiros foram inoculados pelo método usual no CIFC (Branquinho de Oliveira e Rodrigues, 1961), sendo as plantas mantidas em câmara úmida com luz difusa por 48 horas e a seguir em casa de vegetação. Em cada par de folhas, uma foi inoculada e outra mantida como contrôlo. A determinação da atividade das invertases foi feita aos 6 e 16 dias após a inoculação. Para cada combinação empregamos 2 pares de folhas, com 2 repetições cada, num total de 4 determinações.

Para a determinação da atividade das invertases, foi empregado o seguinte método, baseado em Pinto Ricardo e Rees (1970).

a) **Colheita:** as folhas foram colhidas sempre às 16 horas. A seguir, pesadas e lavadas com água desionizada. Após enxutas com papel absorvente, foram colocadas em congelador à temperatura de -23°C durante toda a noite.

b) **Extração:** em temperatura de 4°C, as folhas foram mace-radas em almofariz, com a adição de 6 ml da solução seguinte:

tampão fosfato 0,1 M com pH 7,5	25 ml
cisteína	100 mg
FeCl ₃ (15 mg em 25 ml de água)	2,5 ml

Após a maceração, o extrato foi transferido para tubo dialisador e colocado para dialisar durante 15 horas em tampão fosfato 0,02 M com pH 7,0, com agitação e sempre mantido à temperatura de 4°C. Após a diálise, o volume do extrato foi completado para 12 ml.

c) **Incubação:** feita em banho Maria a 30°C, com agitação e durante 1 hora. Em cada tubo foi colocado 1,9 ml de tampão 0,1 M, 0,1 de solução contendo 25 mg de sacarose e 0,5 ml do extrato. Foram usados tampões com pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,5 e 6,5. Em cada determinação foram feitos tubos controles sem a adição de sacarose e a atividade das invertases foi calculada pela diferença entre os tubos com e sem sacarose.

d) **Determinação dos redutores:** imediatamente após terminada a incubação, adicionava-se 0,3 ml de solução saturada de acetato de chumbo para a inativação dos enzimas. A seguir, adicionava-se 0,7 ml de solução saturada de fosfato dissódico e centrifugava-se para a eliminação do precipitado. Retirava-se 1 ml do sobrenadante e determinava-se os açúcares redutores pelo método de Soomugy-Nelson (1944).

Para a determinação da atividade das invertases nos uredosporos de *H. vastatrix*, eles foram colocados para germinar em água desionizada, na concentração de 1 mg de uredosporos para 1 ml de água. Após 15 horas, fazia-se a incubação com a mesma técnica anteriormente descrita para tecidos.

Com a raça XXIV, determinou-se também a atividade das invertases na matrix hidrosolúvel que envolve os uredosporos. Para tanto, 20 mg de uredosporos foram suspensos em 5 ml de água desionizada, agitados durante 5 minutos e filtrados em filtro milipore, membrana 0,02 micras. O filtrado foi incubado com a mesma técnica, já descrita.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados nos quadros de n.ºs 2 e 4, a seguir.

QUADRO N.º 2 — Atividade das invertases em combinações suscetíveis e resistentes nas variedades Geisha e Kent, aos 6 dias após a inoculação, expressos em mg de sacarose por mg de peso verde.

Tratamento	pH das Soluções Tampão				
	3,5	4,0	4,5	5,5	6,5
Variedade Geisha					
Inoculado raça III	4,25	5,29	6,30	5,45	5,40
Controle raça III	3,28	4,13	4,80	3,56	1,55
Inoculado raça XXIV	5,54	6,22	6,13	4,42	2,63
Controle raça XXIV	2,12	2,52	3,49	1,48	1,48
Variedade Kent					
Inoculado raça III	8,14	8,78	8,51	5,51	2,73
Controle raça III	6,22	6,54	6,54	5,04	2,51
Inoculado raça XXIV	5,23	7,04	8,85	5,57	4,43
Controle raça XXIV	6,25	8,17	8,78	6,03	3,18

QUADRO N.º 3 — Atividade das invertases em combinações suscetíveis e resistentes, nas variedades Geisha e Kent, aos 16 dias após a inoculação, expressos em mg de sacarose por mg de peso verde.

Tratamento	pH das Soluções Tampão				
	3,5	4,0	4,5	5,5	6,5
Variedade Geisha					
Inoculado raça III	3,05	4,09	4,84	3,05	1,06
Controle raça III	4,13	5,38	6,69	5,36	3,41
Inoculado raça XXIV	3,86	4,25	4,55	2,99	1,85
Controle raça XXIV					
Variedade Kent					
Inoculado raça III	5,10	5,53	6,26	3,75	1,60
Controle raça III	3,91	4,83	4,99	3,39	1,44
Inoculado raça XXIV	4,89	6,24	6,54	4,46	1,78
Controle raça XXIV	3,32	3,73	4,52	3,42	1,84

QUADRO N.º 4 — Atividade das invertases em uredosporos germinados das raças III e XXIV de *Hemileia vastatrix*.

H .Vastatrix	pH das Soluções Tampão				
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
Raça III	4,2	8,2	9,6	8,2	4,4
Raça XXIV	4,6	7,4	6,0	8,0	9,4
Matrix raça XXIV	2,0	2,4	3,5	7,3	10,9

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No estudo das invertases, o método mais frequentemente utilizado é o da determinação da sua atividade em diferentes pH, visto que cada invertase apresenta uma curva de atividade característica, com a variação do pH. PINTO RICARDO & REES (1970), trabalhando com invertases da cenoura, determinaram uma ácida e outra alcalina, com atividade e funções definidas. HATCH & al, HATCH & GLASZIOU (1963), trabalhando em cana de açúcar e utilizando o mesmo método, determinaram duas invertases, uma neutra e outra ácida. Em trabalhos posteriores, os mesmos autores (1963) relacionaram a atividade dessas invertases com o mecanismo de acumulação da sacarose, concluindo que somente há acúmulo nos tecidos maduros quando prevalece a invertase neutra. Nos tecidos jovens, em que há prevalência da invertase ácida, a sacarose nunca se acumula. SACHER, HATCH & GLASZIOU (1963) verificaram que na cana de açúcar existe um sistema de indução das invertases, que é controlado pelas auxinas, sistema esse que está associado ao desaparecimento da sacarose acumulada nos tecidos parenquimatosos.

Todos esses trabalhos citados foram sempre efetuados com plantas saudáveis. Na literatura que consultamos, não encontramos referências às pesquisas sobre invertases em plantas doentes. Em contraposição, no referente ao nível de sacarose em tecidos doentes, existem várias referências.

Durante a fase inicial da colonização, INMAN (1962, 1965) aceita que há uma acumulação de sacarose nos tecidos doentes, havendo uma diminuição drástica no nível de sacarose a partir do início da esporulação. Carvalho e Antunes, em trabalho ainda não publicado, obtiveram resultados semelhantes para a ferrugem do cafeeiro, trabalhando com plantas suscetíveis. Já com plantas resistentes que,

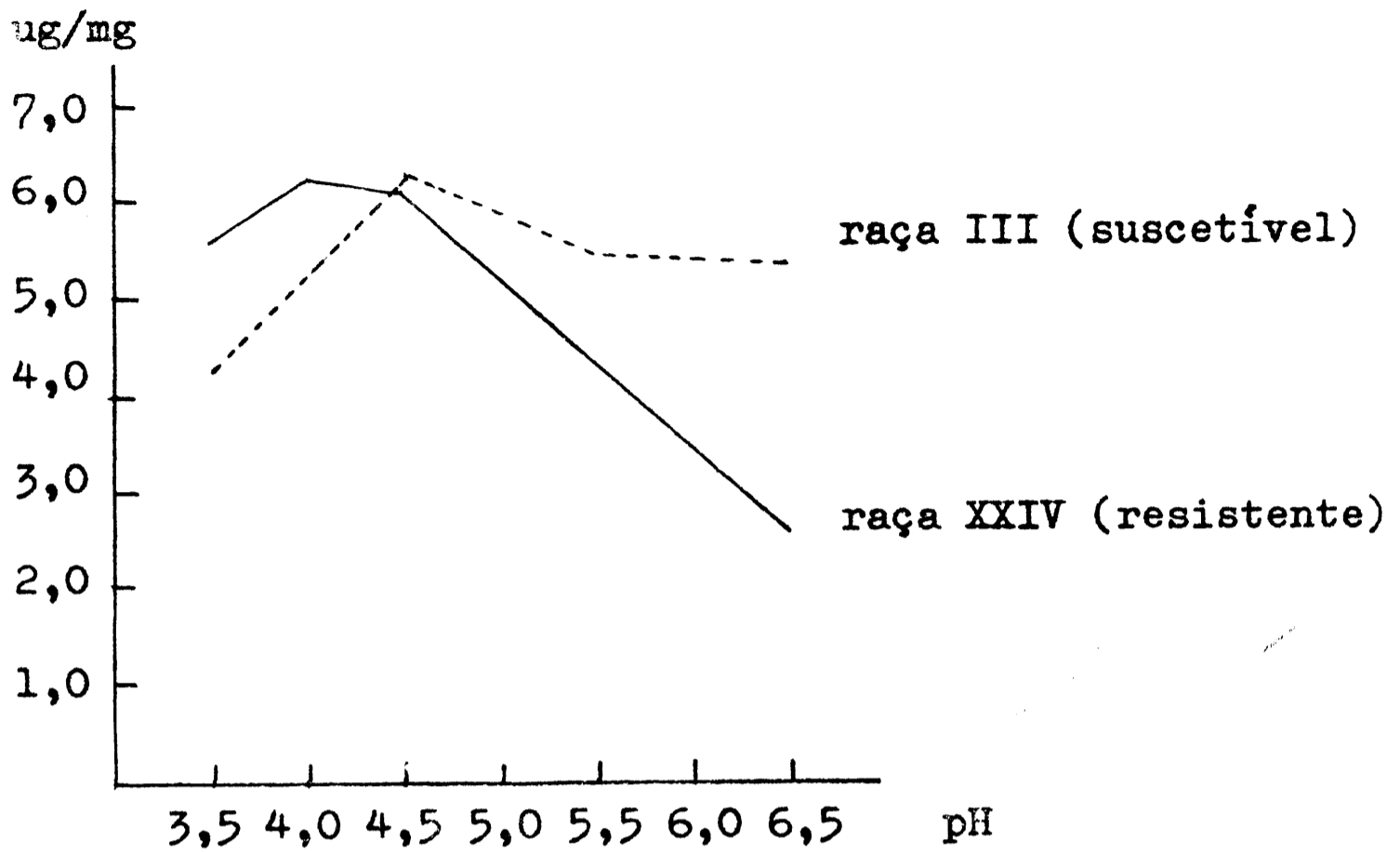


Gráfico n.º 1 — Geisha inoculada com as raças III (suscetível) e XXIV (resistente)

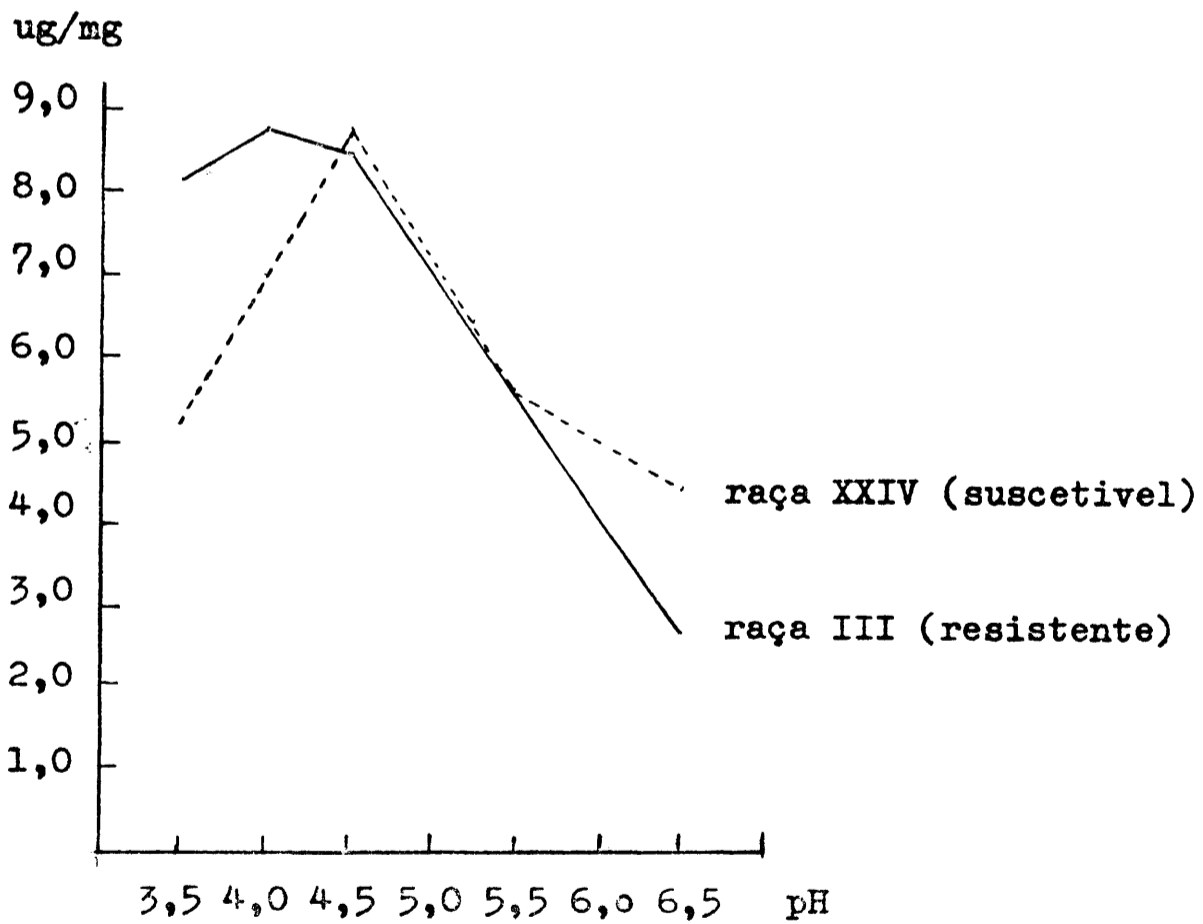


Gráfico n.º 2 — Kent inoculado com as raças III (resistente) e XXIV (susceptível)

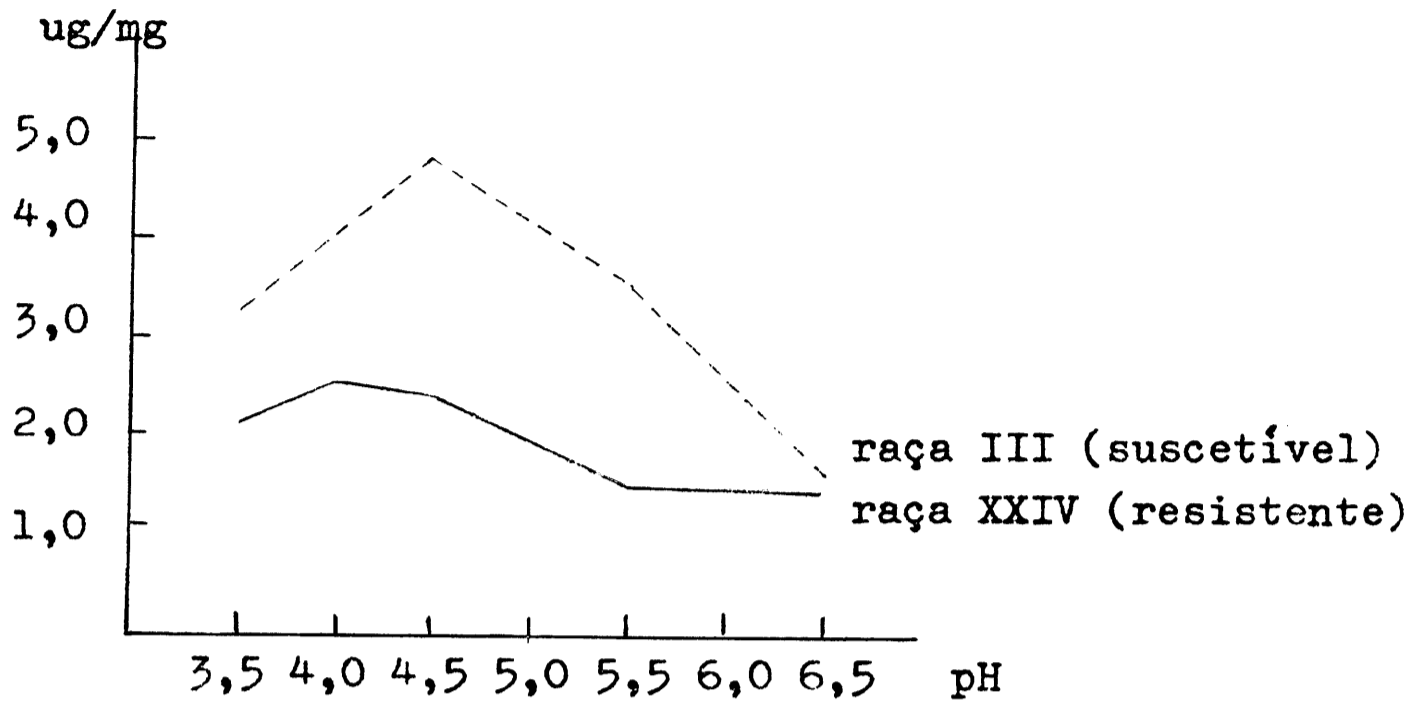


Gráfico n.º 3 — Folhas controle da variedade Geisha inoculadas com a raça III (suscetível) e XXIV (resistente)

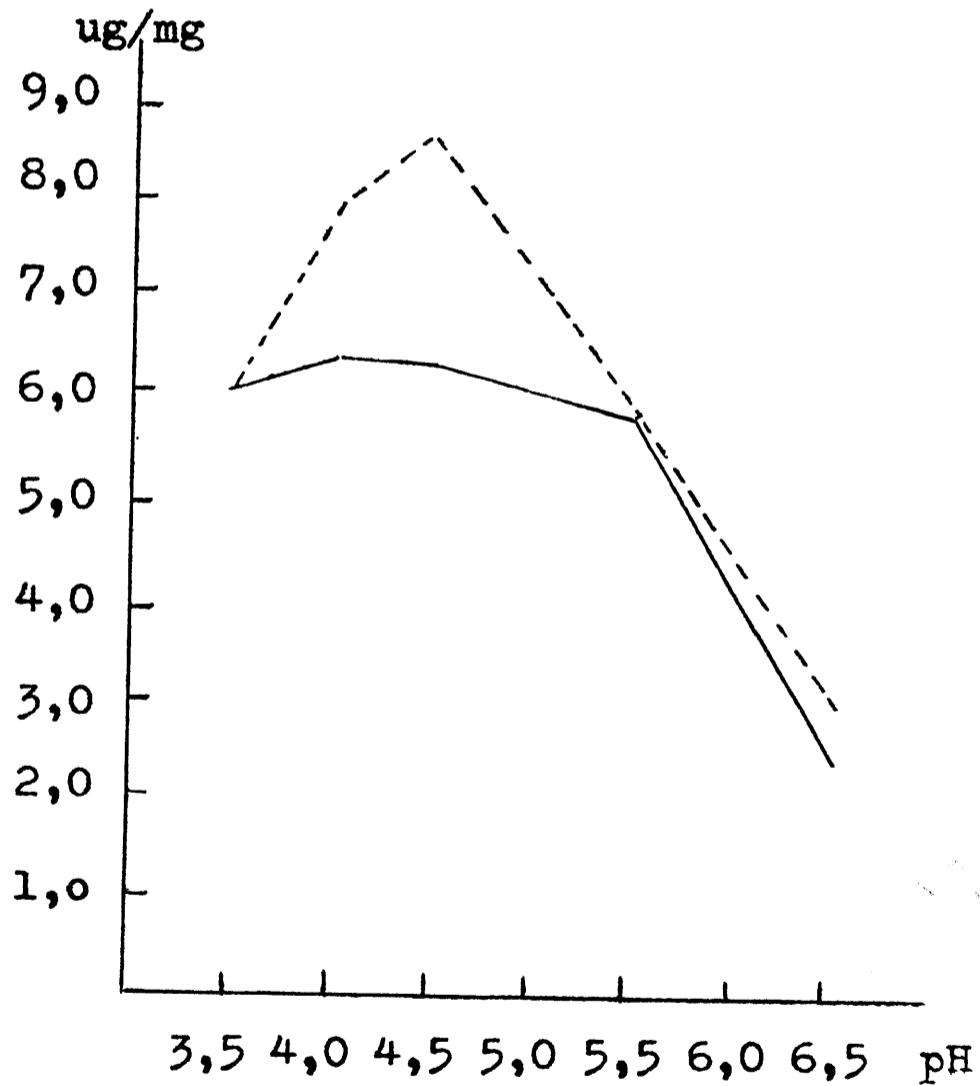


Gráfico n.º 4 — Folhas controle da variedade Kent inoculadas com a raça III (resistente) e XXIV (suscetível)

quando inoculadas, produzem sintomas do tipo flecks, verificaram que 8 dias após a inoculação, o teor de sacarose nas folhas é muito menor que nas plantas sadias ou nas suscetíveis inoculadas. No entanto, 40 dias após a inoculação, quando há uma esporulação abundante, o teor de sacarose nas folhas suscetíveis é aproximadamente 1/3 do encontrado nas folhas sadias, sugerindo haver uma correlação entre o consumo de sacarose e produção de esporos.

Face a esses resultados, no presente trabalho, determinou-se a atividade das invertases em combinações suscetíveis e resistentes de **C. arabica** à **H. vastatrix**. Uma folha de cada par foi inoculada e a atividade das invertases foi determinada 6 dias depois da inoculação, tanto nas folhas inoculadas como nas de controle. O gráfico n.º 1 representa a atividade das invertases na variedade Geisha. Examinando-se curva da combinação suscetível (Geisha inoculada com a raça III), observa-se claramente o máximo de atividade em pH 4,5 para ambas as folhas. Nesta mesma curva, para a folha inoculada, em pH 6,5, pode-se notar o efeito da invertase dos uredosporos de **H. vastatrix**, ausente na folha controle, (gráfico n.º 3). Já na curva da combinação resistente (Geisha inoculada com a raça XXIV) o máximo de atividade foi observado em pH 4,0. A comparação dessas curvas permite a caracterização, para o caso da combinação resistente, de uma "invertase ácida pH 4,0", ausente tanto na planta sadia como na combinação suscetível.

O gráfico n.º 2 é semelhante ao de número 1, exceto que refere-se à variedade Kent. Nesta variedade, que tem reação oposta à variedade Geisha, verificou-se também que, na combinação suscetível, está presente a invertase pH 4,5, enquanto que na combinação resistente, há o aparecimento da "invertase ácida pH 4,0". Esta última invertase é comum às duas combinações resistentes, independentemente da variedade de cafeeiro ou raça de **H. vastatrix**. Por outro lado, na combinação suscetível, encontramos sempre a invertase menos ácida, pH 4,5. Tanto no caso da variedade Kent, como na Geisha, na combinação suscetível, nota-se a atividade da invertase dos uredosporos de **H. vastatrix** em pH 6,5.

Por outro lado, nos gráficos de n.ºs 3 e 4, apresentamos os resultados obtidos nas folhas controle, ou seja, as folhas do mesmo par mas que não foram inoculadas. O exame desses gráficos indica que nelas aparecem as mesmas invertases que observadas na folha inoculada, exceção feita para as invertases dos uredosporos de **Hemileia** e que são observáveis em pH 6,5. Este resultado sugere que a inoculação da "invertase ácida pH 4,0" parece ser resultante de um processo sistêmico, sendo viável uma hipótese de trabalho que o relacionasse com o sistema hormonal. Esta hipótese, ainda não pesquisada, deverá ser objeto de futuras pesquisas.

Estes resultados sugerem que o aparecimento dessa "invertase ácida pH 4,0" está diretamente relacionada com o decréscimo no teor de sacarose nas folhas no início da patogenese, conforme foi verificado nas combinações resistentes. E, por outro lado, a constância no aparecimento da "invertase ácida pH 4,0" nas combinações resistentes, deverá estar associada ao mecanismo de resistência da planta.

Quanto ao significado real da "invertase ácida pH 4,0" na patogênese da ferrugem do cafeeiro, podemos aventar 3 hipóteses, que poderiam ocorrer isolada ou simultaneamente.

1. A sacarose seria desviada para a formação de substâncias de defesa, tais como fenóis, fitoalexinas e outras.
2. A sacarose seria desviada para outras partes da planta, num processo fisiológico semelhante ao das folhas em senectude.
3. Haveria um aumento da respiração e metabolismo dos tecidos doentes, com o implícito consumo da energia armazenada.

Em qualquer destas 3 hipóteses, a sua significação para a patogênese poderia estar relacionada também com a diminuição do substrato respirável e conseqüente deficit energético para o patógeno. GAUMAN (1950) considera o conteúdo nutricional dos tecidos como um fator de resistência e SCHIPPER & MIROCHA (1969) trabalhando com a ferrugem do feijoeiro durante a fase de penetração sugerem que a energia disponível para o parasita desempenha um papel muito importante e seria mesmo um elemento a ser considerado no mecanismo de resistência.

Como as pesquisas ainda se encontram no terreno das hipóteses, é evidente que somente a experimentação poderá esclarecer a sua viabilidade, donde a necessidade de maiores pesquisas sobre o assunto.

Ainda precisamos considerar que os trabalhos de SACHER, HATCH & GLASZIOU (1963), para a cana de açúcar evidenciaram que um sistema de auxinas induz ao aparecimento das invertases ácidas, que aqueles autores consideraram a responsável pela não acumulação de sacarose. GOODMAN, KIRALY & ZAITLIN (1967) e ALLEN (1964), consideram que o metabolismo hormonal é geralmente alterado como conseqüência da patogênese, em grande número de doenças, inclusive nas ferrugens. No entanto, consideram que as informações atualmente existentes sobre as conseqüências dessas alterações, ainda são insuficientes para conclusões. LIZETTE CARDOSO (1970) na CIFC, estudando a histopatologia dos tecidos de cafeeiro com ferrugem, determinou hipertrofia celular nas plantas

resistentes com sintomas de flecks, o que, segundo o nosso entender, poderia pressupor uma alteração hormonal nos tecidos, hipótese de trabalho que deverá ser desenvolvida em futuras pesquisas.

SUMMARY

PRELIMINARY STUDIES ON THE INVERTASES OF COFFEE PLANTS INFECTED BY *Hemileia vastatrix*

The present research, considered exploratory by the Author, was done in order to study leaf invertases of two coffee varieties, Geisha (SH₁SH₅) and Kent SH₂SH₅) inoculated with races III (v1v5) and XXIV (v2v4) of *Hemileia vastatrix*. The Geisha coffee is susceptible to race III and resistant to race XXIV, while Kent coffee has opposite reactions. In each pair of leaves, one was inoculated and the other was kept as control. Determinations of the invertases were made at 6 and 16 days after inoculation.

The preliminary results showed that in the susceptible combinations there was no changes in the invertases, that were the same as in the healthy plants, with the maximum of activity at pH 4.5. In the resistant combinations, however, it was found an "acid invertase pH 4.0" on the 6th day after inoculations. This invertase was absent in both healthy and infected plants of the same varieties. The occurrence on the "acid invertase pH 4.0" is related to the decrease in the sucrose content of the leaves.

The Author suggest three hypothesis that could explain a relation of this "acid invertase pH 4.0" with the coffee rust pathogenesis. These hypothesis, which could occur alone or simultaneously are:

- 1) The sucrose would be deviated to the formation of defense substances, such as phenols, phytoalexins and others.
- 2) The sucrose would be deviated to others parts of the plant, in a physiological process similar to that of the leaves in senescence.
- 3) There would be an increase in the respiration and metabolism of the infected tissues, with the implicit consumption of the stored energy.

LITERATURA CITADA

1. ALLEN, P. J. 1942 — Changes in metabolism of wheat leaves induced by infection with powdery mildew. *Am. J. Botany* 29:425-435.
2. ALLEN, P. J. 1964 — Physiological aspects of fungus diseases of plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 5:225-248.

3. ANTUNES, I. R. e P. C. T. CARVALHO, 1972 — Dissertação para M. S. no Departamento de Fitopatologia da ESALQ.
4. BRANQUINHO DE OLIVEIRA, A. e C. J. RODRIGUES, 1961 — O problema das ferrugens do cafeeiro. *Rev. Café Português*, 25:89-133.
5. GAÜMAN, E. 1950. — Principles of Plant Infection. Crosby Lockwood & Son Ltd. London. 543 pp.
6. GOODMAN, R. N., Z. KIRALY e M. ZAITLIN, 1967. — The biochemistry and Physiology of infections plant disease. D. Van Nostrand Company Inc. 354 pp.
7. HATCH, M. D. e K. T. GLASZIOU, 1963 — Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content & growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments. *Plant Physiology* 38:344-348.
8. HATCH, M. D., J. A. SACHER e K. T. GLASZIOU, 1963 — Sugar accumulation cycle in sugar cane. I. Studies on Enzymes of the cycle. *Plant Physiology* 38:338-343.
9. INMAN, R. E. 1962 — Disease development, disease intensity and carbohydrate levels in rusted bean plants. *Phytopathology* 52:1207-1211.
10. INMAN, R. E. 1965 — Quantitative sugar changes in barley infected with a facultative parasite.
11. NORONHA WAGNER e A. J. BITTENCOURT, 1967 — Genetic study of the resistance of *Coffea* spp to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Can. J. Bot.* 45:2821-2031.
12. PINTO RICARDO, G. P. P. e T. A. P. REES, 1970 — Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* 9:239-247.
13. SACHER, J. A., M. D. HATCH e K. T. GLASZIOU, 1963 — Sugar accumulation cycle in sugar cane. III Physical and metabolic aspect of cycle in immature storage tissues. *Plant Physiology* 38:348-354.
14. SCHIPPER A. L. e C. J. MIROCHA, 1969 — The histochemistry of starch depletion and accumulation in bean leaves at rust infection sites. *Phytopathology* 59:1416-1422.
15. SOMOGYI, M. 1945 — A new reagent for determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 160:61-68.
16. SYAMANANDA, R. e R. C. STAPLES, 1963 — The carbohydrate content of rusted corn leaves. *Boyce Thomps. Inst. Pl. Res.* 22:1-8.
17. LIZETTE CARDOSO — Comunicação feita ao CIFC, em relatório ainda não publicado.