SEQUENCIA DE EVENTOS PRIMARIOS DO DESENVOLVIMENTO DE
HEMILEIA VASTATRIX EM FOLHAS DE CAFEEIRO COM SUSCETIBILIDADE
GENETICA, RESISTENCIA INDUZIDA OU RESISTENCIA GENETICA

ELZA MARIA FRIAS MARTINS

Bióloga

Orientador: Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo- Brasil

Setembro - 1988

M386s

Martins, Elza Maria Frias

Sequência de eventos primários no desenvolvimento de Hemileia vastratrix em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Piracicaba, 1988.

149p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Café - Doença 1. Café - Resistência à doença 3. Ferrugem do café 4. Fungo fitopatogênico I Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 633.73

SEQUENCIA DE EVENTOS PRIMÁRIOS DO DESENVOLVIMENTO DE
HEMILEIA VASTATRIX EM FOLHAS DE CAFEEIRO COM SUSCETIBILIDADE
GENÉTICA, RESISTENCIA INDUZIDA OU RESISTENCIA GENÉTICA

ELZA MARIA FRIAS MARTINS

Aprovada em: 14.10.88

Comissão julgadora:

Titulares

Prof. Dr. Eric Balmer	ESALQ/USP
Prof. Dr. Darcy Martins da Silva	ESALQ/USP
Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes	IB/CPA

Suplentes

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner	ESALQ/USP
Prof. Dr. Mário Barreto Figueiredo	IB/CPA

Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES
Orientador

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos

A Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, pela orientação, apoio e incentivo dispensados à realização deste trabalho.

Ao Dr. MARIO BARRETO FIGUEIREDO, da Seção de Micologia do IB e ao Prof. Dr. DARCI MARTINS DA SILVA, do Departamento de Química da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, pela revisão dos originais.

A LIDNEIA EILIEEN PUCCA, da Seção de Bioquímica Fitopatológica, pelo auxílio prestado na execução dos experimentos.

A ANA REGINA TEIXEIRA, ao MARCELO DE LUCCA FIGUEIREDO e ao CELSO BEZERRA DE JESUS, funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica, pelo auxílio na coleta de uredíniosporos da ferrugem e manutenção das plantas de café.

A Sra. EDITH MACKRODT, professora de línguas, e ao Prof. Dr. RALPH NICHOLSON, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Purdue, Indiana, USA, pela revisão do texto em inglês.

Ao RICARDO HARAKAWA, da Seção de Bioquímica Fitopatológica, e à Seção de Desenho pela confecção dos gráficos.

Ao SERGIO VIANA, da Seção de Microfotografia, pelo auxílio prestado na confecção das fotos das pranchas das microfotografias.

A Seção de Genética, do Instituto Agrônomo, e à Cooperativa de Garça, SP (GARCAFE), pelo fornecimento de sementes de cafeeiro.

A Seção de Doenças de Plantas Industriais, do Instituto Biológico, e à Seção de Microbiologia Fitotécnica, do Instituto Agrônomo, pelo fornecimento de mudas de cafeeiros dos clones diferenciais.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao "Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit, GmbH (GTZ) pelo auxílio financeiro prestado.

Aos demais colegas e funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

INDICE

	pag.
AGRADECIMENTOS -----	iii
LISTA DE FIGURAS E GRAFICOS -----	xii
LISTA DE TABELAS -----	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS -----	xxiii
LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS -----	xxv
RESUMO -----	xxvii
SUMMARY -----	xix
 1- INTRODUÇÃO -----	 1
 2- REVISÃO DE LITERATURA -----	 5
2.1- Histórico e Biologia do fungo <i>Hemileia</i> <i>vastatrix</i> -----	 5
2.2- Resistência genética de cafeeiros à ferrugem -----	 11
2.3- Histologia e citologia da interação planta-patôgeno -----	 13
2.4- Resistência induzida -----	18
 3- MATERIAIS E METODOS -----	 22
3.1- Fonte de material -----	22

3.1.1- Planta -----	22
3.1.2- Patôgeno -----	24
3.2- Preparo das folhas para indução de re- sistência ou inoculação do patôgeno -----	25
3.3- Obtenção da suspensão de uredíniosporos --	26
3.4- Inoculação do patôgeno -----	26
3.5- Avaliação da severidade de infecção -----	27
3.6- Determinação dos genes de virulência presentes no inóculo -----	28
3.7- Certificação da resistência do híbrido "Sarchimor" -----	29
3.8- Obtenção do indutor de resistência -----	29
3.9- Indução de resistência à <i>H.vastatrix</i> em cv. suscetível "Mundo Novo" -----	31
3.10- Avaliação da proteção induzida -----	32
3.11- Observação ao microscópio do desen- volvimento do fungo e resposta das células hospedeiras à colonização -----	33
3.11.1- Preparo das folhas, indução de resistência e inoculação do patôgeno -----	33

3.11.2- Estágios do fungo durante a prê-penetração -----	34
3.11.2.1- Coleta das amostras de folhas -----	34
3.11.2.2- Coloração do fungo ----	35
3.11.2.3- Observação ao mi- croscópio -----	35
3.11.3- Estágios do fungo pós-pene- tração -----	37
3.11.3.1- Coleta de amostras ----	37
3.11.3.2- Clarificação das amostras de folhas ----	37
3.11.3.3- Coloração do fungo ----	38
3.11.3.4- Observação ao mi- croscópio -----	39
3.11.4- Primeiros haustórios diferenciados em células epidérmicas do hospedeiro ---	42
3.11.4.1- Coleta de amostras -----	42
3.11.4.2- Evidenciação do fungo e coloração dos núcleos -----	42
3.11.4.3- Observação ao microscópio ----	43
3.11.5- Fotomicrografia -----	44
4- RESULTADOS -----	45

4.1- Genes de resistência presentes no inóculo de <i>H.vastatrix</i> -----	45
4.2- Certificação da resistência do híbrido "Sarchimor" -----	48
4.3- Indução de proteção em cafeeiros cv. "Mundo Novo" suscetível à <i>H.vastatrix</i> , por filtrado de fermento -----	48
4.4- Evidenciação do fungo <i>H.vastatrix</i> -----	51
4.4.1- Coloração com "dietanol" -----	51
4.4.2- Coloração com DAPI/sulfato de berberina -----	54
4.5- Desenvolvimento do fungo -----	57
4.5.1- Estágios de pré-penetração -----	57
4.5.2- Estágios de pós-penetração -----	57
4.5.2.1- Sítios de infecção apresentando hifa de penetração (HP) -----	57
4.5.2.2- Sítios de infecção apresentando vesícula sub-estomática (VSE) -----	61
4.5.2.3- Sítios de infecção apresentando 1 célula-mãe de haustório (1 CMH) --	66

4.5.2.4- Sítios de infecção apresentando 2 células- mãe de haustório (2 CMH) --	66
4.5.2.5- Sítios de infecção apresentando 3 células- mãe de haustório (3 CMH) --	71
4.5.2.6- Sítios de infecção apresentando 4 células- mãe de haustório (4 CMH) --	71
4.5.2.7- Sítios de infecção apresentando 5 células- mãe de haustório (5 CMH) --	76
4.5.2.8- Porcentagem de colônias abortadas -----	76
4.5.2.9- Número de sítios de infecção por cm ² -----	81
4.5.2.10- Comprimento da colônia ---	81
4.5.2.11- Sítios de infecção associados a células epidérmicas necrosadas do hospedeiro -----	85
4.5.2.11.1- Sítios de infecção sem células-mãe de haustório -----	85

4.5.2.11.2- Sítios de infecção apre- sentando cêlu- la(s)-mãe de haustório -----	89
4.5.2.12- Sítios de infecção associados a células mesofilicas necrosadas do hospedeiro -----	92
4.5.2.12.1- Sítios de infecção sem célula-mãe de haustório -----	93
4.5.3.12.2- Sítios de infecção apre- sentando cêlu- la(s)-mãe de haustório -----	93
4.5.2.13- Primeiros haustórios diferenciados nas cê- lulas epidêrmicas -----	98
5-DISCUSSÃO -----	108
5.1- Genes de virulência presentes no inócu- lo -----	108

5.2- Influência do hospedeiro nas fases de prê-penetração do fungo <i>H. vastatrix</i> -----	110
5.3- Influência do hospedeiro no desenvol- vimento do fungo após a penetração -----	113
5.3.1- Híbrido "Sarchimor" -----	114
5.3.2- Cultivar com resistência indu- zida (MN-R) -----	118
5.3.3- Cultivar "Mundo Novo" -----	120
5.4- Influência do hospedeiro na diferen- ciação dos primeiros haustórios em cê- lulas epidêrmicas -----	121
5.5- Alterações morfológicas da célula hos- pedeira correlacionadas com o desen- volvimento do fungo -----	124
6- CONCLUSÕES -----	131
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	134

LISTA DE FIGURAS E GRAFICOS

FIGURAS

pag.

1	Lesões cloróticas causadas pela infecção com <i>H.vastatrix</i> em folhas de cafeeiro cv. "Mundo" "Novo" com ou sem resistência induzida. -----	50
2	Estruturas de infecção de <i>H.vastatrix</i> evidenciadas com o fluorocromo dietanol. -----	52
3	Estruturas de infecção de <i>H.vastatrix</i> evidenciadas com o fluorocromo dietanol. -----	53
4	Formas da vesícula sub-estomática de <i>H.vastatrix</i> . -----	55
5	Estruturas de infecção de <i>H.vastatrix</i> evidenciadas com DAPI/sulfato de berberina. -----	56
6	Necrosamento de células de folhas de cafeeiro, associado à presença do fungo <i>H.vastatrix</i> . -----	86
7	Encapsulamento de haustórios de <i>H.vastatrix</i> . -----	107

GRAFICOS

- 1 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando hifa de penetração, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 60
- 2 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando vesicula sub-estomática, em cafeeiros com suscetibilidade genética resistência induzida ou resistência genética. ----- 63
- 3 Porcentagem de sitios de infecção, de *H.vastatrix*, apresentando 1 célula-mãe de haustório em cafeeiro com resistência ou suscetibilidade genética ou com resistência induzida. ----- 68
- 4 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 2 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 70

- 5 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 3 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 73
- 6 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 4 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 75
- 7 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 5 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 78
- 8 Histograma da porcentagem de colônias de *H.vastatrix* abortadas 288hs após a inoculação em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 80
- 9 Tamanho da colônia do fungo *H.vastatrix*, em cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 84

- 10 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência. ----- 88
- 11 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 91
- 12 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência. ----- 95
- 13 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 97

- 14 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 1 haustório em células epidêrmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 100
- 15 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 2 haustórios em células epidêrmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 102
- 16 Tamanho do haustório de *H.vastatrix*, diferenciado em células epidêrmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética resistência induzida ou resistência genética. ----- 104
- 17 Porcentagem de haustórios de *H.vastatrix*, encapsulados em células epidêrmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 106

LISTA DE TABELAS

Tabelas

pag.

- 1 Reação de resistência dos clones diferenciadores aos urediniosporos de *H.vastatrix* coletados no cafezal da Fazenda Santa Elisa, Campinas, de cafeeiro cv. "Mundo Novo", naturalmente infectado. ----- 46
- 2 Severidade e frequência de infecção de clones diferenciadores inoculados com urediniosporos coletados de plantas *C.arabica* cv. "Mundo Novo" naturalmente infectadas (Campinas, SP). ----- 47
- 3 Indução de proteção contra *H.vastatrix* em folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo", por tratamento prévio com extrato de fermento. ----- 49
- 4 Influência do hospedeiro no desenvolvimento de estruturas primárias de infecção de *H.vastatrix* no estágio de pré-penetração. ----- 58

5	Porcentagem de sítios de infecção de <i>H.vastatrix</i> , apresentando hifa de penetração, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. -----	59
6	Porcentagem de sítios de infecção de <i>H.vastatrix</i> , apresentando vesícula sub-estomática, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. -----	62
7	Porcentagem dos diferentes tipos de vesículas sub-estomáticas de <i>H.vastatrix</i> , 24hs após a inoculação. -----	64
8	Porcentagem dos diferentes tipos de vesículas sub-estomáticas de <i>H.vastatrix</i> , 36hs após a inoculação. -----	65
9	Porcentagem de sítios de infecção de <i>H.vastatrix</i> , apresentando 1 célula-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética . -----	67

- 10 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 2 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 69
- 11 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 3 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 72
- 12 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 4 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 74
- 13 Porcentagem de sitios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 5 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 77

- 14 Porcentagem de colônias de *H.vastatrix* abortadas 288h após a inoculação em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 79
- 15 Número de sítios de infecção de *H.vastatrix* por cm² de folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 82
- 16 Tamanho da colônia de *H.vastatrix* em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 83
- 17 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 87

- 18 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 90
- 19 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 94
- 20 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. ----- 96
- 21 Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 1 haustório diferenciado em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, re-

22	Porcentagem de sítios de infecção de <i>H.vastatrix</i> , apresentando 2 haustórios diferenciados em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. -----	101
23	Tamanho do haustório de <i>H.vastatrix</i> diferenciado em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. -----	103
24	Porcentagem de haustórios de <i>H.vastatrix</i> , encapsulados em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.. -----	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ap	-----	apressório
AE	-----	abertura estomatal
AH	-----	àrea do haustório
BDR	-----	República Federal da Alemanha
BG	-----	filtro de cristal azul ("blau Glass")
BP	-----	filtro de passagem de banda de onda de luz de transmissão
C	-----	comprimento
ca.	-----	cerca
CE	-----	célula epidérmica
CEN	-----	célula epidérmica necrosada
CIFC	-----	Centro de Investigações de Ferrugens do Cafeeiro
CMH	-----	célula-mãe de haustório
CMN	-----	célula mesofilica necrosada
DAPI	-----	4'6 diamino-2-fenilindol
E	-----	estômato
Es	-----	espessamento
f1	-----	"fleck"
GARCAFE	-----	Cooperativa dos cafeicultores de Garça
H	-----	haustório
HBO	-----	lâmpada de vapor de mercúrio à alta pressão
HI	-----	hifa de infecção
HMC	-----	haustorial mother cell
HP	-----	hifa de penetração
i	-----	ímune

IBC	-----	Instituto Brasileiro do Café
KG	-----	filtro anti-calorífico ("kalt Glass")
L	-----	largura
LCMP	-----	Linhagem, Campinas, Moococa, Pindorama
LP	-----	filtro de passagem de banda larga
MN	-----	Mundo Novo
MN-R	-----	Mundo Novo com resistência induzida
mu	-----	milimicron
N	-----	núcleo
P	-----	pESCOço do haustório
PBS	-----	tampão de fosfato de Na, 0,1M pH 7,2
R	-----	resistente
RKP	-----	filtro de reflexão de passagem de banda estreita
S	-----	suscetível
Sch	-----	Sarchimor
Se	-----	septo
SI	-----	sítio de infecção
t	-----	tumefação
TRIS	-----	tris hidróxi-amino-metano
um	-----	micrometro
U	-----	urediniosporos
UV	-----	luz ultra violeta
VSE	-----	vesícula sub-estomática

LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS

NOME CIENTIFICO	NOME VULGAR
<i>Avena sativa</i> L.	aveia
<i>Coffea arabica</i> L.	café
<i>Coffea canephora</i> Pearson	café
<i>Cucumis sativus</i> L.	pepino
<i>Hordeum vulgare</i> L.	cevada
<i>Linum usitatissimum</i> L.	linho
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijão
<i>Saccharum officinarum</i> L.	cana de açúcar
<i>Triticum aestivum</i> L.	trigo
<i>Vigna sinensis</i> (Torner) Savi	feijão "caupi"

Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn

Bacillus thuringiensis Berliner

Cladosporium cucumerinum Ell. et Arth.

Colletotrichum lagenarum (Pass.) Ell. et Halst.

Erysiphe graminis de Candolle f.sp. *tritici* Em. Marchal

Hemileia vastatrix Berkeley et Broome

Melampsora lini (Ehrenb.) Lev.

Puccinia coronata Cda. f.sp. *avena* Fraser et Ledingham

Puccinia graminis Pers. f.sp. *tritici* Eriks. E. Henn.

Saccharomyces cerevisiae Meyen

Uromyces phaseoli (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.

Uromyces phaseoli (Pers.) Wint. var. *vignae* (Barcl.)

Arth.

Verticillium hemileiae Bouriquet (= *Verticillium*

lecani Zimm.)

SEQUENCIA DE EVENTOS PRIMARIOS DO DESENVOLVIMENTO DE
HEMILEIA VASTATRIX EM FOLHAS DE CAFEEIRO COM SUSCETIBILIDADE
GENETICA, RESISTENCIA INDUZIDA OU RESISTENCIA GENETICA

Autoria: ELZA MARIA FRIAS MARTINS

Orientador: Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

RESUMO

O desenvolvimento do fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., raça II predominantemente, foi observado ao microscópio de epifluorescência, até 288hs após a inoculação em *Coffea arabica* cv. "Mundo Novo" com ou sem resistência induzida pela aplicação prévia de extrato de fermento (MN-R e MN, respectivamente), e no híbrido "Sarchimor" (Sch).

O fungo se desenvolveu de forma semelhante nas três interações estudadas, até a diferenciação de vesícula sub-estomática que ocorreu entre 24 e 36hs após a inoculação.

A expressão da incompatibilidade entre cafeeiro e ferrugem nas interações Sch X raça II e MN-R X raça II foi detectada ao microscópio 48-72hs após a inoculação do fungo, quando a inibição do desenvolvimento do fungo pôde ser notada. A grande maioria das colônias foi abortada após a formação de vesícula sub-estomática, no estágio de 1 célula-mãe de haustório (1 CMH) em Sch e 2 CMH em MN-R.

Na interação Sch X raça II, 192hs após a inoculação do fungo, ca. de 50% das colônias apresentavam-se associadas a células epidérmicas ou mesofilicas com sinais de necrosamento. As estruturas do fungo nas colônias abortadas exibiam uma auto-fluorescência amarela semelhante a das células necrosadas do hospedeiro que as circundavam. Nessa interação, aparentemente a morte do fungo precedeu a reação de necrosamento das células hospedeiras.

Na interação MN-R X raça II, 80% das colônias não puderam mais ser visualizadas pelas técnicas utilizadas, 72hs após a inoculação do fungo, sugerindo ter ocorrido profundas alterações nas estruturas do fungo que não foram acompanhadas de reação de necrosamento das células hospedeiras.

Em todas as três interações estudadas, a maioria das primeiras CMH diferenciou haustório em célula epidérmica entre 48 e 72hs após a inoculação. Na combinação incompatível Sch X raça II os primeiros haustórios mostraram um crescimento reduzido, e 96hs após a inoculação a grande maioria apresentou-se encapsulada em um espessamento, que aparentemente se desenvolve a partir da parede celular do hospedeiro.

Os resultados obtidos sugerem que a expressão de resistência em Sch ocorre mais rapidamente do que em MN-R, e através de mecanismos distintos.

SEQUENCE OF PRIMARY EVENTS OF *HEMILEIA VASTATRIX* DEVELOPMENT
IN COFFEE PLANTS WITH GENETIC SUSCEPTIBILITY, INDUCED
RESISTANCE OR GENETIC RESISTANCE

Author: ELZA MARIA FRIAS MARTINS

Adviser: WALKYRIA BUENO DE CARMARGO MORAES

SUMMARY

Development of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., predominantly race II, on coffee leaves was observed by epifluorescence microscopy for 288hs from the time of inoculation of plants. Three types of plants were used, *Coffea arabica* cv. "Mundo" Novo" (MN), "Mundo Novo" plants that had previously been induced to express resistance by prior treatment with yeast filtrate (MN-R), and the coffee hybrid of *C. arabica* X *C. canephora*, "Sarchimor" (Sch) .

Fungal growth was similar in the three interactions studied up to the time of substomatal vesicle differentiation, which occurred between 24 and 36hs after inoculation.

The expression of incompatibility in Sch X race II and MN-R X race II interactions was detected 48-72hs after inoculation, when inhibition of fungus development was observed. The majority of colonies was

xxx

aborted after substomatal vesicle differentiation. In Sch this occurred at 1 haustorial mother cell (HMC) stage whereas in MN-R colony abortion occurred at the 2HMC stage.

In the Sch X race II interaction, 192hs after fungus inoculation, 50% of the colonies were associated with necrotic host cells of the epidermis or of the mesophyll. Fungus structures of the aborted colonies were collapsed, and exhibited a yellow auto-fluorescence like the surrounding necrotic host cells. In hybrid Sch, death of the fungus apparently occurred before the necrosis of the host cells.

In the MN-R X race II interaction, 80% of the colonies could not be visualized by 72hs after inoculation. This suggested that profound alterations must have occurred in the fungus even though necrosis of host cells did not occur in these infection sites.

In all three interactions studied, the majority of the first HMCs differentiated one haustorium in the epidermal cell. In the Sch X race II combination, the first haustorium had reduced growth and the majority was enveloped by a sheath which appeared to grow up from the host cell wall.

The results suggest that the resistance expression in Sch occurred earlier than in MN-R and through a different mechanism(s).

1-INTRODUÇÃO

O fungo *Hemileia vastatrix* BERKELEY ET BROOME, causador da "ferrugem alaranjada do cafeeiro", pertencente a ordem Uredinales, família Pucciniaceae, foi descrito pela primeira vez por BERKELEY em 1869, no Ceilão, sobre folhas de cafeeiros. Sendo um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*, acredita-se que tenha surgido na região de origem do café, Lago Vitória (Uganda e Kenia) e Etiópia.

Atualmente, o fungo encontra-se presente na maioria das regiões cafeeiras do mundo, com mais de 30 raças já identificadas (BECKER, 1979; RODRIGUES, 1984 e 1985; SCHIEBER e ZENTMEYER, 1984). Os primeiros trabalhos sobre identificação de raças foram realizados por MAYNE em 1932, e as primeiras raças identificadas receberam posterior denominação de raças I, II, VII. As raças mais amplamente distribuídas são: I, II, III e XV, estando a raça II presente em 34 dos 37 países cafeicultores; a I, em 18; a III, em 14 e a XV, em 8 (RODRIGUES, 1984).

Quatorze das raças identificadas são virulentas à espécie de café de maior importância econômica, *Coffea arabica* L. Os cafeeiros Arábica, originários da Etiópia e Sudão, perfazem 75% da cafeicultura mundial. A espécie *Coffea canephora* Pierre, comercialmente conhecida como Robusta, mostrou ser resistente à maioria das raças

fisiológicas do fungo e atualmente ocupa o segundo lugar em importância econômica na cafeicultura mundial, constituindo 25% da produção exportável de café (MATIELLO et alii, 1985).

No Continente Americano, a ferrugem foi constatada, pela primeira vez, no Brasil, em Itabuna, BA, por MEDEIROS em janeiro de 1970, e, atualmente, encontra-se estabelecida em pelo menos 12 países: Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia, na América do Sul; Nicaragua, El Salvador, Honduras e Guatemala, na América Central e México, na América do Norte (SCHIEBER e ZENTMEYER, 1984).

No Brasil, atualmente, a ferrugem atinge todas as regiões cafeicultoras e a maioria dos cultivares comercialmente explorados são suscetíveis à raça II que é predominante dentre as já identificadas neste país (ESKES, 1983). Segundo estudos promovidos pelo Instituto Brasileiro do Café (IBC), a produção pode sofrer quebras de 20 a 30% devido à incidência de ferrugem em plantações sem tratamento químico ou com tratamento efetuado de forma incorreta (MATIELLO et alii, 1985).

Fungicidas cúpricos ou sistêmicos orgânicos como Triadimefon (Bayleton), Pyracarbolid (Seracol) e Propiconazole, aplicados 3 a 4 vezes por ano, podem

controlar a ferrugem, porém representam 10 a 20% do custo total da produção (MATIELLO et alii, 1985).

Ao lado da possibilidade de se controlar a ferrugem do cafeeiro através da utilização de cultivares com resistência horizontal associada a resistência vertical (BERGAMIM FILHO, 1976; CARVALHO, 1982), existe a perspectiva promissora do controle da doença pela indução de resistência em plantas suscetíveis através da aplicação de indutores capazes de promover proteção sistêmica e persistente (MORAES et alii, 1974; BERETTA et alii, 1976; ROVERATTI et alii, 1987).

O aumento da eficiência e diminuição dos custos dos métodos de controle das doenças estão em grande parte relacionados com o conhecimento dos princípios fundamentais da relação planta-patôgeno. A resposta de uma planta a um patôgeno é altamente individualizada e localizada primariamente nas células diretamente invadidas, diferindo dessa forma, dos animais superiores que possuem um sistema altamente especializado, que rotineiramente reconhece entidades estranhas e a elas responde de uma maneira previsível e uniforme. Estudos cito- e histológicos da interação planta-patôgeno são extremamente úteis para localizar no tempo e no espaço os fenômenos que devem ser bioquimicamente estudados para elucidar o mecanismo de

resistência que impossibilita o desenvolvimento do patógeno em combinações incompatíveis.

O objetivo do presente trabalho é estabelecer temporalmente as fases primárias características do desenvolvimento do fungo *H.vastatrix* em combinações com compatibilidades diversas e determinar as mudanças morfológicas que ocorrem nas células hospedeiras associadas a essas fases, a fim de se estabelecer os eventos primários significativos que traduzem a expressão do mecanismo de resistência de cafeeiros à ferrugem.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Histórico e Biologia do fungo *Hemileia vastatrix*

O fungo da ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro foi descrito pela primeira vez pelo inglês BERKELEY em 1869. Contando com a colaboração de BROOME, o autor determinou que a amostra de folhas provenientes de Maldusima, a ele enviado por Thwaites, do Royal Botanical Gardens de Paradenya (Ceilão), estava contaminada por um fungo pertencente a um novo gênero da família Pucciniaceae, ao qual denominou *Hemileia*, fazendo referência aos esporos que possuem uma metade lisa, da parede celular ornamentada. A espécie, denominou *H.vastatrix*, prevendo a rápida e devastadora disseminação do fungo.

O fungo *H.vastatrix*, segundo descrição de BERKELEY (1869), se caracteriza " por formar pequenas manchas brancas orbiculares na superfície inferior da folha, constituída de diminutos tufo de fitas flexuosas encimadas por esporos sub-reniformes, presos obliquamente pela base e externamente rugosos com papilas tipo verrugas e lisos na porção voltada para o floco. A porção superior da folha acima da mancha assemelha-se a queimadura".

Apesar de uma das denominações para a doença causada por *H.vastatrix* ser "ferrugem alaranjada das folhas

do cafeeiro", há relatos na literatura de infecção causada pelo fungo em frutos de *Coffea liberica* L. (THIRUMALACHAR e NARASINHAM, 1947) , em pecíolos de folhas (GOPALKRISHNAN, 1951) e em cotilêdones de plântulas no estágio "orelha-de-onça" (THIRUMALACHAR e NARASINHAM, 1947). Porém contituem casos bastante excepcionais, sendo ainda mais raro ocorrer frutificação do fungo que não na superfície das folhas. (RAYNER, 1972).

WARD (1882) realizou minuciosos estudos sobre o desenvolvimento de *H.vastatrix* em folhas de Arábica, suscetível. Segundo o autor, o fungo apresenta um micélio intercelular constituído de hifas septadas, de diâmetro semelhante ao do tubo germinativo, que se ramificam irregularmente entre as células do parênquima lacunoso e paliçádico. Na extremidade de algumas ramificações encontram-se os haustórios. Estes possuem um longo pescoço rígido que penetra a parede celular do hospedeiro e, na porção distal, um corpo ovóide ou piriforme suspenso na cavidade celular e envolto por uma matrix não bem definida. Muitas vezes, as hifas se reúnem em tufo e se projetam através do estômato e, externamente produzem dois tipos de esporos: uredíniosporos e teliosporos. Os uredíniosporos germinados podem apresentar de 2 a 5 tubos germinativos, sendo o mais frequente 3 em pontos equidistantes. Na extremidade do tubo germinativo ocorre a diferenciação de

uma vesícula sacular ovóide ou piriforme, usualmente sobre um estômato.

A maioria dessas informações foram confirmadas, mais tarde, por outros pesquisadores (RAZAFINDRAMAMBA, 1958; RAYNER, 1972).

RAJENDREN (1968) acrescentou às informações já existentes o fato de que a hifa de penetração após atravessar o ostíolo do estômato diferencia-se em vesícula sub-estomática, e que as hifas do micélio intercelular, antes de invadirem as células hospedeiras, diferenciam-se em células-mãe de haustório. Essas células possuem um septo que as separam do restante da hifa e uma estrutura tipo-disco na zona de contacto com a célula hospedeira. O autor forneceu outras informações adicionais como as de que as células-guarda são geralmente as primeiras a serem invadidas pelos haustórios, e que os haustórios podem se apresentar em pelo menos oito formas diferentes: esférica, campanular, discóide, discóide com a base bifurcada, cordiforme, floriforme, verrugosa, ou irregular.

A vesícula sub-estomática, segundo SACCAS e CHARPENTIER (1971), é globosa ou amebóide e dela se origina a hifa primária que por sua vez se ramifica intensamente preenchendo a cavidade sub-estomática. Essa descrição da vesícula sub-estomática não coincide com a relatada por RIJO

e RODRIGUES (1978). Segundo estes autores, a hifa de penetração se bifurca na câmara sub-estomática, tomando a forma de âncora. De cada uma das ramificações da âncora se diferencia uma hifa que se desenvolve em direção à célula subsidiária, e nela diferencia um haustório.

Informações detalhadas sobre as dimensões e diferenciações do talo uredinial e dos soros de *H. vastatrix* foram fornecidas por MacCAIN e HENNEN (1984). Segundo os autores, em uma lesão esporulante pode-se distinguir pelo menos três tipos de hifas no micélio intercelular: (1)- as hifas pioneiras, muito delgadas (3,5 a 4,5 μ m de diâmetro), com poucos septos, poucas ramificações e poucos haustórios (1 haustório por 10 células hospedeiras), que ocorrem na periferia das lesões, somente no parênquima lacunoso; (2)- as hifas nutritivas (ou alimentadoras) mais grossas (4,7 a 6,2 μ m de diâmetro), com muitos septos, muitas ramificações e muitos haustórios (6 a 7 haustórios por 10 células hospedeiras), e que são encontradas na região central do sorus uredinial tanto no parênquima lacunoso como no parênquima paliádico; e (3)- as hifas corredoras que unem um protossoro a outro, e que são pouco septadas e sem haustórios. Os autores salientaram que uma lesão inteira é consequência da expansão radial de um talo, e que pode ser arbitrariamente, dividida em zonas concêntricas. Uma zona mais externa composta somente de hifas pioneiras, seguida de

outra zona contendo uma mistura de hifas pioneiras e de hifas nutritivas, uma terceira somente com hifas nutritivas com muitos haustórios, mais centralmente localizada, uma quarta zona formada de protossoros e hifas corredoras, outra de soros imaturos, uma sexta zona onde se encontram os soros maduros e mais internamente uma zona com soros senescentes.

Sobre a patogênese do fungo, WARD (1881) observou que na presença de água, oxigênio e alta temperatura os urediniosporos de *H.vastatrix* germinam, na epiderme inferior de folhas de *C.arabica* suscetível, em 8 hs, diferenciam apressórios sobre estômatos em 12 a 14 hs. A penetração pelo estômato ocorre dentro de 48hs, e, no terceiro dia após a inoculação, o micêlio já se encontra desenvolvido entre as células mesofilicas. Ao redor de quatorze dias após a inoculação, o autor observou o aparecimento de manchas cloróticas na superfície inferior da folha, e a produção de esporos ao redor do vigésimo quinto dia após a inoculação. O período de incubação e esporulação do fungo foi observado ser dependente, além das condições ambientais, da idade da folha e do cultivar de cafeeiro. Este fato foi confirmado por outros pesquisadores como RAYNER (1961); ESKES (1983).

SACCAS e CHARPENTIER (1971), estudaram o desenvolvimento do fungo *H.vastatrix* em discos de folhas de *C.canephora* cv. *robusta* (segundo os autores descrito apenas como *C.robusta*) através do exame, ao microscópio ótico de

campo claro, de cortes tangenciais e transversais. Os autores lograram determinar que: (1)- os uredíniosporos não germinam sincronicamente, sendo que a porcentagem de uredíniosporos germinados varia de 15-35% em 3-4hs após a inoculação até 50-85% em 6-8hs após a inoculação; (2)- a diferenciação em apressório inicia-se ao redor de 6-8hs após a inoculação, e segundo os autores, os tubos germinativos com apressório possuem tropismo positivo que os direciona para a abertura estomática; (3)- ao redor de 14hs da inoculação já ocorre formação de várias hifas secundárias incolores a partir da hifa primária, as quais preenchem a cavidade sub-estomática; (4)- cerca de um dia após a inoculação, o micélio já se encontra ocupando os espaços intercelulares do parênquima lacunoso contendo numerosos haustórios dentro das células mesofilicas; (5)- o micélio só alcança o parênquima paliçádico no terceiro dia após a inoculação, quando as células subsidiárias, as primeiras a serem invadidas por haustório, mostram ligeiras alterações no citoplasma; (6)- ao redor de 6-8 dias após a inoculação, as células subsidiárias apresentam o núcleo hipertrofiado, e o citoplasma com coloração marrom condensado e com um grande vacúolo; (7)- ao redor do décimo dia após a inoculação, o parênquima lacunoso já completamente invadido pelo micélio do fungo mostra profundas alterações.

RIJO e RODRIGUES (1978), examinando pedaços de folhas de *C.arabica* inoculadas com *H.vastatrix*, em microscópio ótico de campo claro, após a descoloração dos fragmentos das folhas e coloração do fungo com azul de algodão-lactofenol, observaram que, ao terceiro dia de infecção, a hifa de penetração que atravessa o ostiolo do estômato se bifurca na câmara sub-estomática tomando a forma de âncora. De cada uma das bifurcações se diferencia uma hifa que se dirige para uma das células subsidiárias na qual há formação de um haustório. No quinto dia após a inoculação, o micélio intercelular atinge o tecido paliçádico e no vigésimo dia, Soros urediniospóricos afloram pelo ostiolo do estômato.

2.2- Resistência genética de cafeeiro à ferrugem

Desde o primeiro surto de ferrugem em cafezais na ilha de Ceilão, em 1868, muitos foram os esforços para se descobrir fontes de resistência à *H.vastatrix*. Em 1870, na região de Coorg, Índia, foi encontrado um cultivar de Arábica sem sintomas de ferrugem, apesar de situado em um cafezal fortemente atacado pela ferrugem. Porém, após curto período de tempo, esse cultivar passou a ser afetado pelo fungo, o mesmo sucedendo com o cultivar Kent, encontrado em 1911, pelo agricultor L.P.KENT, em um cafezal de Doddengooda, Mysore, Índia (BETTENCOURT, 1981).

As primeiras informações sobre a hereditariedade da resistência de cafeeiros à ferrugem foram obtidas por MAYNE (1932) quando logrou determinar a existência de dois fatores que conferiam resistência a 3 raças fisiológicas do fungo. Mais tarde NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT (1967), BETTENCOURT e NORONHA-WAGNER (1971), BETTENCOURT (1984) concluíram que as combinações de pelo menos 9 fatores de resistência (S_{H1} a S_{H9}), aos quais se aplica a teoria de gene a gene de FLOR (1955), são responsáveis pela resistência à mais de 30 raças fisiológicas do fungo.

Numa cultura, o termo **resistência** na realidade descreve diferentes graus de suscetibilidade envolvendo diferentes graus de crescimento do fungo e distintas respostas do hospedeiro. Esses diferentes graus de resistência são normalmente reconhecidos por sintomas tais como tamanho das lesões e presença ou não de sinais de necrose (STAKMAN e HARRAR, 1957).

Através da observação dos sintomas externos, o Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC, Oeiras, Portugal) adota para a determinação do grau de resistência, de cafeeiros à ferrugem, a escala de tipos de reação descrita por OLIVEIRA (1954, 1955a,b,c,d, 1957). A escala consiste de : <i> (imune), <f1> ("flecks"), <;> (pontuações necróticas), <T> (pequena tumefação), <o> (clorose), <1> (raros urediniossoros), <2> (lesões

pequenas ou médias), <3> (lesões médias ou grandes), <4> (lesões grandes) e <x> (reação heterogênea) (OLIVEIRA, 1955c). ESKES (1983) propôs a adoção da escala internacional de MacNEAL et alii (1971) que compreende tipos de reação de 0 a 9. Segundo BETTENCOURT (1981), são considerados resistentes os cultivares que apresentam tipos de reação inferiores ao <2> adotando-se a escala OLIVEIRA (1955c). ESKES (1983) definiu como resistentes os cultivares que apresentem tipos de reação de <1> a <3> pela escala de MacNEAL et alii (1971).

2.3- Histologia e citologia da interação planta-patôgeno

Os diferentes tipos de reação de resistência tem sido estudados do ponto de vista genético, bioquímico e histológico com o objetivo de se esclarecer os mecanismos pelos quais o hospedeiro é capaz de restringir ou retardar o desenvolvimento do patôgeno. Na literatura existe um grande volume de informações sobre os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que acompanham a expressão de resistência do hospedeiro, mas a natureza desse mecanismo é em geral desconhecida (HEATH, 1982b).

Estudos histológicos têm em geral revelado que na maioria das interações, a resistência de hospedeiros à ferrugens não se expressa antes da penetração do fungo (SKIPP e SAMBORSKY, 1974; HEATH, 1974; TANI et alii, 1976;

NIKS, 1982; MARTINS et alii, 1985a). A maioria das pesquisas demonstra que a inibição do desenvolvimento de ferrugens em cultivares resistentes pode ocorrer durante o processo de penetração (ALLEN, 1923; HEAGLE e MOORE, 1970; KOCHMAN e BROWN, 1975); durante o crescimento da hifa de infecção (RODRIGUES et alii, 1975; TANI et alii, 1975a) ou após a formação dos primeiros haustórios (LITTLEFIELD e ARONSON, 1969; HEATH, 1971 e 1972; LITTLEFIELD, 1973; RIJO e RODRIGUES, 1978; PRUSKY et alii, 1980).

A resposta de resistência do hospedeiro, antes da formação do primeiro haustório do fungo, tem poucos exemplos documentados. Pode ocorrer o colapso de células mesofilicas próximas à hifa de infecção, como em folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) infectada por *Puccinia graminis* (Pers.) f.sp. *tritici* Eriks. et E.Henn. (MARTIN et alii, 1977); depósitos de material eletronicamente opaco ao longo da parede das células do mesófilo adjacentes à hifa de infecção, como em folhas de aveia (*Avena sativa* L.) infectadas por *Puccinia coronata* Cda. f.sp. *avenae* Fraser et Ledingham (ONOE et alii, 1976). Algumas das respostas do hospedeiro que acompanham a inibição do desenvolvimento do fungo nessa fase são respostas características ao ferimento, como: depósito de calose em células mesofilicas adjacentes à hifa de infecção como em folhas de feijão caupi (*Vigna sinensis* (Torner) Savi.) infectadas por *Uromyces phaseoli*

(Pers.) Wint. var. *vignae* (Barcl.) Arth. (HEATH e HEATH, 1971); células subsidiárias necrosadas adjacentes à hifa de infecção, como em folhas de trigo infectadas por *P.graminis* f.sp. *tritici* (ALLEN, 1926), e, folhas de cafeeiro (*C.arabica*) infectadas por *H.vastatrix* (MARTINS et alii, 1985a).

Após a formação do primeiro haustório, a resposta mais comum de um hospedeiro incompatível é o necrosamento da célula hospedeira invadida pelo haustório (LITTLEFIELD e ARONSON, 1969; HEATH, 1971; SKIPP e SAMBORSKY, 1974; MENDGEN, 1978; MARES, 1979; ROHRINGER et alii, 1979; NIKS, 1982; HEATH, 1982b). Essas células necrosadas do hospedeiro apresentam-se ao microscópio ótico com cor marrom e ao microscópio de fluorescência com cor amarela fuorescente, e mostram um acúmulo de substâncias tipo ligninas (fenois) e de calose (B 1-3 glucana) (TIBURZY et alii, 1983; FERNANDEZ e HEATH, 1985; REISENER e TIBURZY, 1986).

Apesar do necrosamento da célula invadida pelo primeiro haustório ser uma das respostas mais comuns de resistência, esse fato não ocorre em muitas das interações extremamente incompatíveis (OGLE e BROWN, 1971). Foi demonstrado por HEATH (1971) que no cv. "Queen Anne" de feijão caupi (*V.sinensis*) somente 50% dos sítios de infecção de *U.phaseoli* var. *vignae* apresentam necrosamento das células hospedeiras invadidas pelo primeiro haustório; e que

a maioria dos primeiros haustórios são encapsulados pelo plasmalema da célula hospedeira impregnado de substâncias de origem fosfolipídica, polissacarídica (calose), etc.

Quanto ao aspecto histopatológico da resistência de cafeeiros à *H.vastatrix* muito poucos são os estudos realizados. Em 1972, RIJO observou, ao microscópio ótico de campo claro, cortes de folhas de *C.arabica* e *C.canephora* inoculadas com uma raça fisiológica de ferrugem que induz reação de resistência tipo <T> (tumefação). Através da coloração com hematoxilina fêrrica e carmin acético verificou que, no sétimo dia após a inoculação, a tumefação (<t>) se caracteriza por um aumento do volume das células do parênquima lacunoso ao redor do micélio do fungo o qual possui poucos haustórios. Essas células tornam-se irregulares, comprimidas e não apresentam mais espaço celular entre elas.

Segundo RIJO e RODRIGUES (1978), nas associações incompatíveis de *H.vastatrix*, caracterizadas por expressões fenotípicas do tipo "fleck" clorótico (<fl>), o crescimento do fungo pode cessar na fase de âncora (vesícula sub-estomática) ou após um desenvolvimento reduzido do micélio até a segunda ou terceira camada do parênquima lacunoso, formando poucos haustórios aos seis dias após a inoculação.

Quanto à reação tipo imune (<i>) em folhas de *C.arabica* inoculadas com *H.vastatrix*, RIJO et alii (1982) observaram que as células epidérmicas numa área de 100um ao redor do sitio de infecção apresentam o citoplasma granulado e a parede celular espessada. O fungo tem seu desenvolvimento inibido, as vezes, após a formação do apressório, outras vezes, após a formação da âncora.

BENAC (1981) observou ao microscópio ótico e eletrônico as modificações histológicas e citológicas que o desenvolvimento de *H.vastatrix* (raça II) provoca em folhas suscetíveis de *C.arabica* (grupo fisiológico E). As análises foram feitas em lesões de ferrugem após 1 mês da inoculação do fungo nas folhas. O autor constatou que as alterações histológicas são bastante sutis e se constituem apenas no afastamento das células do hospedeiro devido ao crescimento do micélio, o, que muitas vezes, resulta na deformação das mesmas. No entanto, muitas são as modificações que se manifestam ao nível citológico tais como: (1)- diminuição do número e tamanho dos cloroplastos no parênquima lacunoso; (2)- diminuição do tamanho dos vacúolos, que apresentam granulações de cor amarelo vivo, (provavelmente compostos fenólicos); (3)- a formação de uma papila no interior da parede celular do hospedeiro na zona de penetração do haustório, fato já anteriormente constatado por outros

autores como KITAJIMA (1972), SILVA e NOGUEIRA (1977), RIJO e SARGENT (1974).

Estudos quantitativos da patogênese de *H.vastatrix*, raça I, em combinações compatíveis (*C.arabica* cv. "Mundo Novo" X raça I, e, *C.arabica* cv. IAC-1122 X raça I) e em interações incompatíveis (*C.arabica* cv. "Dilla Alghe" X raça I, e, o híbrido "Híbrido de Timor" X raça I) revelaram que o genotipo dos cafeeiros não afeta o desenvolvimento do fungo antes da penetração e que, no sexto dia após a inoculação, apenas 10-44% das colônias na combinação compatível têm sucesso na infecção, apresentando mais de 5 células-mãe de haustório. Nesse período de tempo todas as colônias nos cultivares resistentes ("Dilla Alghe" e "Híbrido de Timor") já se encontram necrosadas. Aos 15 dias após a inoculação, 99 e 60% das colônias mortas nas combinações incompatíveis, "Híbrido de Timor" e "Dilla Alghe" respectivamente, encontram-se associadas a células necrosadas na epiderme e no mesófilo, apresentando auto-fluorescência amarela (MARTINS et alii, 1985a).

2.4- Resistência induzida

Resistência ou suscetibilidade não são termos absolutos, considerando-se que uma mesma planta pode se apresentar suscetível ou resistente a um mesmo patógeno, ou

a uma mesma raça dependendo do seu estágio de crescimento, da qualidade ou intensidade de iluminação a que está submetida, da temperatura, da umidade relativa do meio ambiente, ou do nível de fertilização que recebe (KUC, 1987). Segundo o mesmo autor, esse fato indica que todas as plantas, com raras exceções, devem possuir informação(ões) genética(s) para resistência a todos os patógenos, e, é da habilidade do patógeno em induzir a expressão dessa(s) informação(s) genética(s) que resulta na interação incompatível.

De acordo com muitos autores, microorganismos ou seus metabolitos e certos agentes físicos estressantes são capazes de afetar o estado de resistência ou suscetibilidade das plantas, sensibilizando-as ou protegendo-as sistemicamente contra doenças causadas por fungos facultativos ou biotróficos, por bactérias e por vírus. (YARWOOD, 1956; CHAMBERLAIN, 1972; STERMER e HAMMERSCHMIDT, 1984; KUC, 1983 e 1987).

Foi demonstrado que é possível induzir resistência a *H.vastatrix* por tratamento prévio a inoculação do patógeno com filtrado de suspensão aquosa de uredíniosporos da ferrugem do café (MORAES et alii, 1976; BERETTA et alii, 1977), com fungos ou bactérias não patogênicas ao cafeeiro (MARTINS et alii, 1985b), com filtrado de fermento (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen) (MARTINS et alii, 1986) ou

com *Bacillus thuringiensis* Berliner (ROVERATTI et alii, 1988)

A resistência induzida de plantas às doenças envolve uma sensibilização da planta para que esta possa responder prontamente à infecção através de múltiplos mecanismos de defesa característicos da interação. Foi determinado que em pepino (*Cucumis sativus* L.) com resistência induzida, 95% dos sítios de infecção de *Colletotrichum lagenarum* (Pass.) Ell. et Halst. são abortados logo após a diferenciação em apressório, enquanto que no cv. "Calypso", com resistência genética, apenas 35% dos sítios são abortados nessa fase (RICHMOND et alii, 1979). Entretanto, nas interações de pepino e *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth., nem a germinação e nem a penetração do fungo são afetadas em cv. suscetível imunizado sistemicamente ou em cv. geneticamente resistente (HAMMERSCHMIDT e KUC, 1982).

Em cvs suscetíveis de trigo (*T. aestivum* cv. "Caribo) e cevada (*Hordeum vulgare* L. cv. "Aramir) com resistência induzida, através do tratamento prévio com metabolitos de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, foi determinado que a inibição do desenvolvimento de *Erysiphe graminis* de Candolle f.sp. *tritici* Em. Marchal ocorre após a formação do primeiro haustório. A indução de resistência não afetou nem a germinação, nem a formação de apressórios,

porém reduziu de 50% o número de haustórios primários. Nem a estrutura, forma, tamanho, ou número de apêndices dos primeiros haustórios foram afetados pelo tratamento. Porém, no cv. com resistência induzida, 41 a 60% dos primeiros haustório apresentaram a membrana extrahaustorial bastante espessada. Segundo os autores, esse espessamento da matriz ocasionaria um transporte deficiente de nutrientes da planta para o fungo, justificando a redução do crescimento da colônia quando comparado ao controle (STENZEL et alii, 1985).

A alteração no estado de suscetibilidade da planta, além de constituir uma promissora perspectiva de controle alternativo de doenças, é um artifício bastante útil para os estudos dos eventos determinantes da incompatibilidade de uma interação. TANI et alii (1975a e 1975b) estudando as interações *A.sativa* cv. "Shokan I" X *P.coronata* f.sp. *avenae*, raça 226 (avirulenta) e raça 203 (virulenta), determinaram que a raça avirulenta (226) induz resistência no cv. "Shokan I" à raça virulenta (raça 203) 8 a 12 hs após a inoculação. Os eventos determinantes da incompatibilidade da interação ocorrem nos espaços intercelulares antes da diferenciação do primeiro haustório, e só então a planta se torna resistente à raça virulenta (raça 203).

3- MATERIAIS E METODOS

3.1- Fonte de Material

3.1.1- Planta

Foram utilizadas nos experimentos plantas de:

(1) *C. arabica* cv. "Mundo Novo", LCMP 376-4, portadoras do gene de resistência S_{H5} , pertencentes ao grupo fisiológico E, o qual é suscetível à maioria das raças de ferrugem de café, incluindo as mais comuns, II e I (CARVALHO, 1967 ; BETTENCOURT, 1981);

(2) "Sarchimor" IAC-1669-31 (CIFC H-361/4), híbrido segregante tetraploide do cruzamento de "Híbrido de Timor" (CIFC 832/2) e "Villa Sarchi" (CIFC 971/10), portadoras dos genes de resistência S_{H6} e S_{H7} , e pertencentes ao grupo fisiológico A, o qual é resistente à todas as raças de ferrugem do café (BETTENCOURT, 1984)..

(3) *C. arabica* cv. "Geisha" (CIFC 87/1), portadoras dos genes de resistência S_{H1} e S_{H5} , e pertencentes ao grupo fisiológico C, o qual é suscetível à todas as raças fisiológicas de *H. vastatrix* portadoras dos genes de virulência v_1 e v_5 (BETTENCOURT, 1981).

(4) *C. arabica* cv. "D.Kent"1/6 (CIFC 32/1), portadoras dos genes de resistência S_{H2} e S_{H5} , pertencentes ao grupo fisiológico D, o qual é suscetível à todas as raças

fisiológicas de *H.vastatrix* portadoras dos genes de virulência v_2 e v_5 (BETTENCOURT, 1981).

(5) *C.arabica* cv. S.288-23 (CIFC 33/1), portadoras dos genes de resistência S_{H3} e S_{H5} , pertencentes ao grupo fisiológico G, o qual é suscetível à todas as raças fisiológicas de *H.vastatrix* portadoras dos genes de virulência v_3 e v_5 (BETTENCOURT, 1981)

(6) *C.arabica* cv. " S4 Agaro" (CIFC 110/5), portadoras dos genes de resistência S_{H4} e S_{H5} , pertencentes ao grupo fisiológico J, o qual é suscetível à todas as raças fisiológicas de *H.vastatrix* portadoras dos genes de virulência v_4 e v_5 (BETTENCOURT, 1981).

As sementes de *C.arabica* cv. "Mundo Novo" e do híbrido "Sarchimor" foram obtidas da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, SP, e, da Cooperativa dos Cafeicultores de Garça (GARCAFE), SP. A semeadura foi feita em areia contida em germinadores (110 X 80 X 60cm) com tampa de vidro, onde permaneceram à temperatura ambiente até o aparecimento da folha primária (estágio "orelha-de-onça"). As plântulas foram então transplantadas para sacos plásticos de 11cm de diâmetro por 20cm de altura contendo terra vegetal/ estêrco de galinha/ superfosfato simples/ calcário calcítico e cloreto de potássio (250 l/ 2,5 l/ 1.250g/ 250g/ 250g) (v/v/p/p/p). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura ambiente, até atingirem 8 pares de

folhas ($\pm$ 1 ano de idade), recebendo adubação mensal por irrigação com solução de sulfato de amônio/ superfosfato simples e cloreto de potássio (250g/ 500g/ 100g em 100 l de água (p/p/p/v) para 3.000 mudas).

As plantas dos clones diferenciadas: "Geisha", "D.Kent"1/6, "S 4 Agaro" e "S.288-23", obtidas por propagação vegetativa de ramos ortotrópicos, foram gentilmente cedidas pela Seção de Doenças de Plantas Industriais do Instituto Biológico, Campinas, SP e pela Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas, SP, e, transplantadas nos terrenos da sede do Instituto Biológico em São Paulo. As plantas foram adubadas a cada 4 meses com sulfato de amônio/ superfosfato simples/ cloreto de potássio e esterco de galinha (20g/ 5g/ 20g/ 300g (p/p/p/p) por cova).

Das plantas de café, foram utilizadas apenas as folhas do segundo par, considerando como primeiro par as folhas logo abaixo da gema apical.

3.1.2- Patógeno

Urediniosporos de *H.vastatrix* foram coletados de folhas de plantas de *C.arabica* cv. "Mundo Novo" naturalmente infectadas, no cafezal da Fazenda "Santa Eliza" do Instituto Agronômico de Campinas. Para a coleta dos urediniosporos foram selecionadas as lesões sem sinais

macroscópicos de necrose ou da presença do hiperparasita *Verticillium hemileiae* Bouriquet (= *Verticillium lecanii* Zimm.)

Com auxílio de um tubo de polietileno os uredíniosporos foram cuidadosamente recolhidos das lesões, e peneirados em peneira Granutest com malhas de 0,149mm, para eliminar impurezas. Os uredíniosporos foram acondicionados em criotubos (100mg/ tubo) e conservados em nitrogênio líquido (- 196°C).

3.2-Preparo das folhas para indução de resistência ou inoculação do patógeno.

As folhas do segundo par, de plantas do cv. "Mundo Novo", do híbrido "Sarchimor" e dos clones diferenciais "Geisha", "D.Kent"1/6, S.288-23 e "S4 Agaro", foram destacadas, lavadas cuidadosamente em água corrente, água bidestilada e enxugadas com algodão hidrófilo. A superfície inferior das folhas foi aspergida com água bidestilada com o auxílio de um aspersor de vidro utilizando-se nitrogênio como gás propelente. As folhas foram, então, acondicionadas em câmaras úmidas constituídas de caixas plásticas com tampa de vidro transparente (65 x 44 x 20cm).

As câmaras foram preparadas desinfetando superficialmente as caixas plásticas com etanol comercial e lavando-as com água corrente seguida de água bidestilada. O

fundo das caixas foi forrado com espuma plástica de nylon de 4cm de espessura revestida de papel xarope. Em cada caixa foram vertidos 2 l de água bidestilada fervente e as caixas foram imediatamente tampadas com o vidro transparente. Após resfriamento das caixas, as folhas de cafeeiro foram dispostas sobre o papel xarope, com a superfície inferior voltada para cima. Em cada caixa foram colocadas até 30 folhas. As caixas permaneceram durante 72hs, salvo exceção, a $\pm 24^{\circ}\text{C}$, umidade relativa superior a 95%, fotoperíodo de 12hs e iluminação de ca de 1.200 lux. Após esse período de tempo as folhas foram enxugadas com algodão antes da inoculação com o patógeno.

3.3- Obtenção da suspensão de uredíniosporos

Os uredíniosporos retirados do nitrogénio líquido foram submetidos a um choque térmico por 10min pela imersão dos criotubos fechados contendo os uredíniosporos em água aquecida a 40°C . Em seguida, os uredíniosporos foram suspensos em agar-água 0,1%, na concentração de 4mg/ml. A suspensão foi submetida à agitação por 30min em placa agitadora magnética e à ultra-som, 50 Hertz por 30seg (Sonorex RK 103, Bandelin, W.Germany).

3.4- Inoculação do patógeno

A suspensão de uredíniosporos recém-preparada, como descrito no item 3.3, foi aspergida na superfície

inferior (abaxial) das folhas, após terem sido preparadas como descrito no item 3.2. Para distribuição do inóculo foi utilizado um aspersor de vidro, e como agente propulsor o gás nitrogênio (N₂), numa pressão de 0,25 bars. A suspensão foi aspergida a 40cm de distância da folha por 4 seg em cada folha, na tentativa de se manter o mais homogênia possível a quantidade e a dispersão dos uredíniosporos na superfície inferior da folha.

Após inoculação, as folhas foram dispostas novamente nas caixas de plástico com a superfície inferior voltada para cima. As caixas foram mantidas a $\pm 24^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa superior a 95% e no escuro. Após 48hs, as folhas foram viradas de forma que a superfície inferior que contém os estômatos ficasse voltada para baixo em contacto com o papel umedecido, e permaneceram em fotoperíodo de 12hs com iluminação de ca. de 1.200 lux, nas mesmas condições de temperatura e umidade.

3.5- Avaliação da severidade de infecção

A severidade de infecção foi avaliada através do número médio de lesões por cm², logo após o aparecimento dos sintomas.

Foi considerada como lesão cada mancha clorótica individualizada. Para auxiliar a visualização das lesões,

cada folha analisada foi submersa em água, iluminada com luz incidente e observada com lente de aumento (ca. de 2X).

A severidade de infecção (SI) foi calculada através da fórmula:

$$SI = \frac{\text{nº de lesões por folha}}{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}$$

Para o cálculo da área foliar foram pesadas individualmente as figuras recortadas da xerocópia de cada folha, cujo número de lesões tinha sido previamente avaliado. Do papel da xerocópia foram também recortados três quadrados de 3X3cm (9cm² de área), pesados e determinada a média aritmética dos pesos obtidos. A área de cada folha foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{área foliar (cm}^2\text{)} = \frac{9\text{cm}^2 \times \text{peso (g) da xerocópia da folha}}{\text{média dos pesos (g) dos quadrados de 9cm}^2\text{}}$$

3.6- Determinação dos genes de virulência presentes no inóculo

Para tal, 10 folhas do segundo par de cada um dos clones diferenciais "Geisha", "D.Kent"1/6, S.288-23 e "S 4 Agaro", 10 folhas do cv. "Mundo Novo" e 10 folhas do

híbrido "Sarchimor", foram preparadas como descrito no item 3.2, e inoculadas com suspensão de uredíniosporos de *H.vastatrix* como descrito nos itens 3.3 e 3.4. Após o aparecimento de lesões esporulantes no cv. "Mundo Novo" foi determinado o tipo de reação de resistência segundo o sistema de OLIVEIRA (1955c) e avaliada a severidade de infecção como descrito no item 3.5.

3.7- Certificação da resistência do híbrido "Sarchimor".

Quando as plantas de cafeeiro atingiram o estágio de 6 pares de folhas, 300 plantas do híbrido "Sarchimor" e 5 do cv. "Mundo Novo" foram numeradas, e, as folhas do segundo par foram destacadas e etiquetadas com o respectivo número da planta. As folhas após terem sido preparadas como descrito no item 3.2, foram inoculadas com suspensão de uredíniosporos de *H.vastatrix* como descrito nos itens 3.3 e 3.4. Após o aparecimento de sintomas no cv. suscetível "Mundo Novo", todas as folhas, dos dois cultivares, foram observadas com uma lente de aumento (2X). Para auxiliar a observação as folhas foram submersas em água e iluminadas com luz incidente.

3.8- Obtenção do indutor de resistência

Como indutor de resistência foi utilizado o filtrado de suspensão de células liofilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* preparado segundo a técnica descrita

por Hahn et al. (1978). Para tal, 25mg de células liofilizadas de fermento (extrato de levedura da Difco) foram dissolvidos em 125ml de água bidestilada e em seguida procedeu-se à precipitação dos polissacarídeos com etanol 80% (v/v). Após 4 dias em repouso na geladeira ($\pm 6^{\circ}\text{C}$) para decantação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 125ml de água bidestilada. Repetiu-se a operação de precipitação como acima descrito, e o sedimento novamente foi ressuspendido em 100ml de água bidestilada. A suspensão foi, então, dialisada pelo período de 7 dias, na geladeira, contra água bidestilada trocada diariamente. Foram utilizados como membrana de diálise tubos de membrana Spectrapor (Spectrum Medical Industries, Inc. 60916 Terminal Annex, Los Angeles 90054) com vol/cm de 3,2ml, espessura da membrana seca de 0,0012mm, e com capacidade de exclusão de moléculas de 6.000 a 8.000 daltons. A fração não dialisável, retida no interior da membrana, foi submetida à filtração em membrana Millipore 0,8 μ (Millipore Co USA), a fim de se remover qualquer precipitado formado.

Após a filtração foi determinado o equivalente de manose por ml de filtrado através do método de antrona segundo Dishe (1982). Assim, foi adicionado à 0,5ml de filtrado de fermento 1ml de antrona 2% em ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente e em seguida aquecida em banho de água fervente (100°C) por

16min. Após resfriamento, foi determinada a absorbância no comprimento de onda de 625nm, em um espectrofotômetro Pye Unicam SPB-400 UV/VIS. Através da curva padrão construída a partir das absorbâncias obtidas para soluções de manose comercial de concentrações variando entre 15 a 50ug/ml, foi determinado o equivalente de ug de manose por ml de filtrado. Em seguida o filtrado de fermento foi diluído com água bidestilada até a concentração de 800 equivalentes de ug de manose por ml.

3.9- Indução de resistência à *H.vastatrix* em cv. suscetível "Mundo Novo"

Para cada uma das cinco repetições foram utilizadas 75 plantas de cafeeiro cv. "Mundo Novo", das quais 65 foram usadas para observação do desenvolvimento do fungo ao microscópio e das respostas das células hospedeiras à colonização, e 10 utilizadas para a avaliação da porcentagem de proteção induzida.

Uma das folhas do segundo par foi destacada de cada planta, em seguida lavada, enxugada e aspergida, na superfície inferior, com o indutor (filtrado de fermento na concentração de 800 equivalentes de ug de manose por ml). O indutor foi aplicado com o auxílio de um aspersor de vidro utilizando-se o gás nitrogênio como agente propulsor, numa pressão de 0,25 bars, durante 4seg em cada folha

(aproximadamente 0,5ml de filtrado de fermento por folha). Essas folhas, que receberam a denominação de MN-R, foram dispostas em caixas de plástico com a superfície inferior voltada para cima, e, permaneceram por 72hs à 24°C, umidade relativa superior a 95%, fotoperíodo de 12hs e iluminação de ca. de 1.200 lux. Após esse período de tempo, as folhas foram enxugadas com algodão antes da inoculação com o patógeno.

A outra folha do segundo par, que recebeu a denominação de MN, foi também destacada e preparada como descrito no item 3.2.

3.10- Avaliação da porcentagem de proteção induzida

Para cada uma das cinco repetições foram utilizadas 10 folhas de MN e 10 folhas de MN-R (itens 3.2 e 3.9, respectivamente). Após 72hs da aplicação da água bidestilada em MN e do indutor em MN-R, a superfície inferior das folhas foi enxugada com algodão e em seguida aspergida com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito nos itens 3.3 e 3.4. Após o aparecimento dos sintomas no cv. suscetível MN, foi determinada a severidade de infecção como descrito no item 3.5. A resistência induzida foi expressa como porcentagem de proteção (%P) calculada através da seguinte fórmula:

$$(SI \text{ em MN} - SI \text{ em MN-R}) \times 100$$

$$\%P = \frac{\quad}{\quad}$$

(SI em MN)

SI = severidade de infecção (número médio de lesões por cm^2 de folha).

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno.

3.11- Observação ao microscópio do desenvolvimento do fungo e resposta das células hospedeiras à colonização

3.11.1- Preparo das folhas, indução de resistência e inoculação do patógeno

Para cada uma das três repetições foram utilizadas 75 plantas de 8 pares de folhas do cafeeiro cv. "Mundo Novo" e 75 do híbrido "Sarchimor".

Das plantas do cv. "Mundo Novo" foi retirada uma das folhas do segundo par, as quais foram tratadas com o indutor como descrito no item 3.9 (MN-R). A outra folha do segundo par, de cada uma das plantas, foi também destacada e preparada como descrito no item 3.2 (MN).

Das plantas do híbrido "Sarchimor" foi retirada uma das folhas do segundo par, de cada uma das plantas, as quais foram preparadas como descrito no item 3.2 (Sch).

As folhas de MN, MN-R e Sch foram inoculadas com uma suspensão de *H. vastatrix* como descrito nos itens 3.3 e 3.4.

3.11.2- Estágios do fungo prè-penetração

3.11.2.1- Coleta das amostras de folhas

De 5 folhas de MN, MN-R e Sch, 12hs após a inoculação com o fungo, foram retirados 20 discos de folhas de 0,5cm de diâmetro, sendo 2 de cada lado da nervura central, um na metade superior e o outro na metade inferior da folha. Os discos de folhas foram retirados com auxílio de um furador de papel. Cada lote de 20 discos, correspondentes a cada um dos tratamentos, foi disposto em uma lâmina para microscopia mantendo-se a superfície inferior da folha, a qual contém os uredíniosporos, voltada para cima. Foi usado lactofenol como fixador e ao mesmo tempo como bloqueador do desenvolvimento do fungo. A solução de lactofenol foi preparada com iguais volumes de fenol, ácido láctico e glicerina (v/v/v)).

3.11.2.2- Coloração do fungo

Os discos de folhas permaneceram em lactofenol por 10min e então a solução foi removida com o auxílio de um papel de filtro. Em seguida, as amostras foram lavadas com solução tampão TRIS/HCl 0,1M pH 8,5. A solução tampão foi gotejada sobre os discos de folhas e igualmente removida com o auxílio de um papel de filtro. Os discos foram, então, cobertos com gotas do fluorocromo dietanol (sal sódico de 4, 4'-bis (2- dietanol - amino - 4 - (3 - sulfofenilamino- 5 - tio- zinil - (6) - amino) - estilbeno - 2, 2' - ácido dissulfônico; UVITEX, CIBA GEIGY AG, Basel, Suíça) 0.25% na mesma solução tampão. Após 5seg na presença do fluorocromo a solução foi removida com papel de filtro e as amostras foram lavadas com a solução tampão; em seguida foi gotejada glicerina 50% nos discos de folhas, e após 5min a solução foi trocada por glicerina 100% para observação ao microscópio.

3.11.2.3- Observação ao microscópio

As amostras de folhas foram observadas em microscópio modelo Orthoplan da Leitz (Wetzlar BDR) equipado com lâmpada de filamento de halogênio de 100W e 12W, filtro anticalorífico KG-1, filtro supressor de luz vermelha BG 38, filtro excitador de luz UV e violeta BP 355-425, espelho

divisor de feixes cromáticos RKP 455 e filtro ocluser LP 460.

Sob aumento de 250X (objetiva 25X, ocular 10X) foram observados 100 uredíniosporos, em cada 4 discos dos 20 presentes por lâmina, e calculada a porcentagem de germinação média das 5 réplicas.

Para o cálculo da porcentagem de diferenciação em apressório foram observados 100 uredíniosporos germinados, em cada 4 discos dos 20 presentes em uma lâmina, perfazendo no total 5 réplicas.

O cálculo da porcentagem de apressório sobre estômato foi estimada observando-se 100 apressórios em cada 4 discos dos 20 presentes em cada lâmina, portanto com cinco réplicas.

A frequência da ocorrência de tentativas de penetração do fungo foi estimada pela porcentagem de estômatos ocupados por apressórios. Para tal, foi determinado inicialmente o número médio de estômatos por cm^2 , no cv. "Mundo Novo" e no híbrido "Sarchimor", contando-se os estômatos de uma área de $0,0415\text{mm}^2$ de folha, com auxílio de uma ocular micrométrica com aumento de 400X (40 X 10). Em seguida foi calculado o número médio de apressórios sobre estômatos por cm^2 , contando-se os

apressórios sobre estômatos por uma área de $0,0199\text{cm}^2$ de folha (discos de folha de $0,5\text{cm}$ de diâmetro).

E através da fórmula abaixo, foi calculada a porcentagem de estômatos ocupados por apressórios.

$$\% \text{ de E/A} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de apressórios sobre estômatos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de estômatos}}$$

E/A = Estômato ocupado por apressório

3.11.3- Estágios do fungo pós-penetração

3.11.3.1- Coleta de amostras

As amostras de folhas de MN, MN-R e Sch foram coletadas 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192 e 288hs após a inoculação do fungo. De cada 5 folhas de MN, MN-R e Sch foram retiradas amostras como descrito no item 3.11.2.1

3.11.3.2- Clarificação das amostras de folhas

Cada lote de 20 discos de folhas, correspondente a cada um dos tratamentos, foi mergulhado em 10ml de lactofenol/ etanol fervente. (2/1, v/v) em um tubo de ensaio fechado com tampa de rosca. Os tubos de ensaio fechados foram deixados em banho de água fervente até completa remoção da clorofila dos discos de folhas (5 a 10min). Com auxílio de uma pipeta Pasteur o lactofenol/etanol, contendo

clorofila, foi retirado, e substituído por outros 10ml de lactofenol/etanol na mesma relação volumétrica.

3.11.3.3- Coloração do fungo

Cada lote de 20 discos de folhas clarificadas, foi transferido para uma placa de Petri de 3,5cm de diâmetro e submetido à coloração com dietanol segundo método descrito por TIBURZY et alii. (1983). Assim, os discos de folhas foram primeiramente lavados com etanol 50%, em seguida permaneceram por 10min, duas vezes, em etanol 50% contendo ácido ascórbico 0,2% para re-hidratação gradativa da folha. Com a finalidade de auxiliar a ligação das moléculas do fluorocromo às de polissacarídeo da parede celular do fungo, os discos de folhas permaneceram por 15min em solução 0,5N de NaOH por duas vezes. Após três lavagens subsequentes com água bidestilada, os discos permaneceram por 30min em solução tampão TRIS/HCl 0,1M pH 8,5 antes da coloração com o fluorocromo dietanol 0,25% na mesma solução tampão, por 5min. As amostras de folhas foram então lavadas com água bidestilada quatro vezes, permanecendo, cada vez, 15min em contacto com a água. Em seguida, os discos de folhas foram novamente desidratados permanecendo 30min em glicerina 50% e depois pelo menos 12hs em glicerina 100%. Os discos de folhas em cada uma das soluções permaneceram sob agitação constante (150 rotações por minuto) e sob vácuo (64cm de Hg) para facilitar a penetração destas no interior do tecido da

folha. A remoção de cada uma das soluções foi feita sempre com o auxílio de uma pipeta Pasteur ligada a vácuo (38cm de Hg).

Cada lote de 20 discos de folhas foi montado em glicerina 100% sobre uma lâmina para microscopia. Antes da colocação da laminula, os discos de folhas foram posicionados de forma que a superfície inferior da folha ficasse voltada para cima. Para tal, os discos foram observados sob microscópio ótico de luz de transmissão, com aumento de 250X. A superfície inferior foi reconhecida pela presença dos estômatos.

3.11.3.4- Observação ao microscópio

As amostras de folhas foram observadas sob aumento de 252X (objetiva 40X, ocular 6,3X) em microscópio Orthoplan da Leitz equipado com sistema ótico de fluorescência descrito no item 3.11.2.3, utilizando lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 200W como fonte luminosa. A visualização de algumas estruturas do fungo e das células hospedeira foi, muitas vezes, auxiliada por luz branca transmitida (lâmpada de filamento de halogênio, 110W 12V).

De cada 20 discos de folhas, correspondentes a cada um dos tratamentos, em cada horário citado no item 3.11.3.1, foram observados ca. de 200 sítios de infecção. Foi considerado como sítio de infecção o uredíniosporo

germinado apresentando apressório diferenciado sobre estômato. Os sítios de infecção foram classificados segundo o estágio de desenvolvimento do fungo. Foram consideradas colônias abortadas os sítios de infecção onde as estruturas do fungo apresentaram-se colapsadas, sem afinidade pelo fluorocromo e com auto-fluorescência amarela. As células do hospedeiro no local do sítio de infecção foram consideradas necrosadas quando apresentaram-se com auto-fluorescência amarela na parede celular e no conteúdo protoplasmático colapsado. A partir dessas observações foram calculadas:

(1)- a porcentagem de sítios de infecção apresentando:

- (a) hifa de penetração (HP)
- (b) vesícula sub estomática (VSE)
- (c) 1 célula-mãe de haustório (1 CMH)
- (d) 2 células-mãe de haustório (2 CMH)
- (e) 3 células-mãe de haustório (3 CMH)
- (f) 4 células-mãe de haustório (4 CMH)
- (g) 5 ou mais células-mãe de haustório (5 CMH)

(2)- a porcentagem de sítios de infecção apresentando as estruturas acima relacionadas, associados a células epidérmicas necrosadas

(3)- porcentagem de sítios de infecção apresentando as estruturas acima relacionadas e associados a células mesofilicas necrosadas

(4) - a porcentagem do aparecimento das diferentes formas de vesícula sub estomática

(5) - porcentagem de colônias abortadas.

O número médio de sítios de infecção por cm^2 foi calculado contando-se o número de apressórios sobre estômatos por disco de folhas de 0.5cm de diâmetro (10 discos para cada tratamento, nos diferentes horários citados no item 3.11.3.1) e utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\begin{array}{lcl} \text{n}^\circ \text{ de apressórios por disco de folha} & & \\ \text{n}^\circ \text{ de sítios de } = & \text{-----} & \\ \text{infecção} & & \text{área do disco de folha (0,0199cm}^2\text{)} \end{array}$$

Foi determinado o tamanho médio dos sítios de infecção apenas nos horários de 36, 48, 72 e 96hs após a inoculação do fungo, medindo-se a maior extensão do desenvolvimento do micélio com o auxílio de uma ocular micrométrica no aumento de 250X (objetiva 25X, ocular 10X). Para cada tratamento, a cada horário, foram medidos 30 sítios de infecção.

3.11.4- Primeiros haustórios diferenciados nas células epidérmicas do hospedeiro

3.11.4.1- Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de folhas de MN, MN-R e Sch 36, 48, 72 e 96hs após a inoculação com o fungo. De cada 5 folhas foram destacados 20 fragmentos de epiderme inferior, 2 de cada lado da nervura central, um na metade superior e um na metade inferior da folha. Para tal, a superfície das folhas foi enxugada sob corrente de ar à temperatura ambiente e, em seguida, as folhas foram submetidas à vácuo (64cm de Hg) por 30min, para facilitar o despreendimento da epiderme. Os fragmentos de epiderme foram retirados com o auxílio de uma pinça e imediatamente submersos em solução fixadora (etanol/formoldeído/ácido acético; 6/3/1, v/v/v) onde permaneceram por 72hs.

3.11.4.2- Evidenciação do fungo e coloração dos núcleos

Após remoção da solução fixadora por sucção com auxílio de uma pipeta Pasteur conectada ao vácuo (38cm de Hg), os fragmentos da epiderme foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS). A coloração do fungo e dos núcleos foi conseguida imergindo os fragmentos da epiderme em solução 0,01M de 4'6 diamidino-2 fenilindol (DAPI) em PBS e sulfato de berberina 0,25mM na mesma solução tampão (50:1, v/v). Após 72hs, imediatamente antes da

observação ao microscópio, a solução corante foi removida por sucção com uma pipeta Pasteur e vácuo brando, e as amostras foram lavadas com PBS. Após permanecerem 15min em glicerina 50% os fragmentos da epiderme foram montados em glicerina 100%.

3.11.4.3- Observação ao microscópio

Os fragmentos da epiderme foram observados em aumento de 252X como descrito no item 3.11.2.4. De cada 20 fragmentos, correspondentes a cada um dos tratamentos, em cada um dos horários citados no item 3.11.4.1. foram observados ca. de 100 sítios de infecção. A partir dessas observações foram calculadas:

(1)- a porcentagem de sítios de infecção com 1 haustório

(2)- a porcentagem de sítios de infecção com 2 haustórios

(3)- a porcentagem de haustórios encapsulados, isto é, envoltos por precipitado do protoplasma do hospedeiro que se apresentava com auto-fluorescência amarela.

Foi determinado o tamanho médio dos haustórios com auxílio de uma ocular micrométrica, em aumento de 1.000X (objetiva 100X, ocular 10X). Foram observados 30 haustórios para cada um dos tratamentos em cada horário citado no item 3.11.4.1 medindo-se a maior e a menor dimensões, as quais

foram consideradas como comprimento (C) e largura (L), respectivamente. A área do haustório (AH) foi calculada pela fórmula: $AH = C \times L$.

3.1.5- Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas com uma câmara Leitz VARIO-ORTHOMAT de formato pequeno (24 x 36mm com fator 0,32), ocular VARIO (5X a 12,5X) e fotômetro automático, acoplados ao microscópio Orthoplan da Leitz.

Os filmes utilizados foram: (1) Ektachrome EXP 400 ASAS, "daylight"; e (2) Fujichrome 400 ASAS, "daylight".

4- RESULTADOS

4.1- Genes de resistência presentes no inóculo de *H.vastatrix*

Pela reação de suscetibilidade apresentada pelos cv. portadores de genes de resistência $S_{H1}S_{H1}$ $S_{H5}S_{H5}$, $S_{H2}S_{H2}$ $S_{H5}S_{H5}$ e $S_{H5}S_{H5}$ (Tabela 1), pode-se inferir que no inóculo de uredíniosporos de *H.vastatrix* estava(m) presente(s) raça(s) fisiológica(s) com genes de virulência v_5 , v_2 e v_1 , segundo a lei da complementariedade de genes de resistência e de virulência .

A severidade e frequência de infecção (Tabela 2) foi bem maior no cv. com gene de resistência S_{H5} do que nos com genes de resistência $S_{H1}S_{H5}$ e $S_{H2}S_{H5}$.

Tabela 1- Reação de resistência dos clones diferenciadores aos urediniosporos de H.vastatrix coletados no cafezal da Fazenda Santa Elisa, Campinas, de cafeeiro cv. "Mundo Novo, naturalmente infectado.

Clones dife- renciadores	Grupo fisio- lógico	Genes resis- tência	Tipo de reação de resistência
"Geisha" CIFC 87/1	C	S _{H1} S _{H5}	3-4 (S)
"D.Kent" 1/6 CIFC 32/1	D	S _{H2} S _{H5}	3-4 (S)
"S.288-23" CIFC 33/1	G	S _{H3} S _{H5}	i (R)
"S 4 Agaro" CIFC 110/5	J	S _{H4} S _{H5}	f1 (R)
"Mundo Novo" LCMP 376-2	E	S _{H5}	3-4 (S)
"Sarchimor" CIFC H-361/4	A	S _{H6}	i (R)

i =imune, nenhum sintoma visível a olho nu; f1 ="fleck", minúsculos pontos cloróticos visíveis somente com lente de aumento; S = reação de suscetibilidade; R = reação de resistência.

Tabela 2- Severidade e frequência de infecção de clones diferenciadores inoculados com uredíniosporos de H.vastatrix coletados de plantas C.arabica cv. "Mundo Novo" naturalmente infectadas (Campinas, SP).

Clones diferenciadores	nº de lesões/ cm²	% de folhas com lesões
"Geisha" CIFIC 87/1	2,2±0,3 ^a	76,6± 8,8 ^a
"D.Kent" 1/6 CIFIC 32/1	0,9±0,6 ^a	63,3±11,9 ^a
"S.288-23 CIFIC 33/1	0,0	0,0
"S 4 Agaro" CIFIC 110/5	0,0	0,0
"Mundo Novo" LCMP 376-2	13,3±0,8 ^b	93,3± 6,6 ^a
"Sarchimor" CIFIC H-361/4	0,0	0,0

Média de 5 repetições com 10 réplicas cada (± erro padrão).
Médias com mesma letra, em fileiras verticais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

4.2- Certificação da resistência do híbrido "Sarchimor"

Pequenas lesões foram observadas nas folhas do cv. "Mundo Novo" e em 6 dos 300 pares de folhas do híbrido "Sarchimor", aos 18 dias após a inoculação com o fungo. Ocorreu esporulação abundante, tanto nas lesões das folhas do cv. "Mundo Novo" como nas dos 6 pares de folhas do híbrido "Sarchimor", aos 23 dias da inoculação. As plantas de "Sarchimor" correspondentes aos pares de folhas com reação de suscetibilidade foram descartadas. Os outros 293 pares de folhas de "Sarchimor" não apresentaram nenhum sintoma visível ao olho nu (tipo de reação <i>, segundo sistema de D'Oliveira, 1954-1957).

4.3- Indução de proteção em cafeeiros cv. "Mundo Novo" suscetível à *H.vastatrix*, por filtrado de fermento

Os dados da Tabela 3 demonstram que o cafeeiro cv. "Mundo Novo" tratado previamente com filtrado de fermento, na concentração de 800 equivalentes de ug de manose por ml, apresentou um aumento de resistência à *H.vastatrix* da ordem de 83% (Figura 1).

Tabela 3- Indução de proteção contra H.vastatrix em folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo", por tratamento prèvio com filtrado de fermento.

Parâmetro	Tratamento	
	Contrôle	Induzida
% de folhas com lesões	90,0 $\pm$ 8,2 ^a	53,3 $\pm$ 5,4 ^a
nº de lesões/ folha	296,0 $\pm$ 39,8 ^b	46,9 $\pm$ 20,2 ^a
àrea foliar (cm ²)	31,1 $\pm$ 5,7 ^a	31,0 $\pm$ 5,9 ^a
nº de lesões/ cm ²	11,0 $\pm$ 4,1 ^b	1,4 $\pm$ 0,4 ^a
% de proteção	-----	83,0 $\pm$ 6,3

Média de 5 repetições com 10 réplicas cada ($\pm$ erro padrão).
 Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Figura 1: Lesões cloróticas de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" com ou sem resistência induzida

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patôgeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patôgeno.

4.4- Evidenciação do fungo *H.vastatrix*

4.4.1- Coloração com dietanol

Empregando-se a coloração com dietanol, todas as estruturas do fungo coraram-se em azul brilhante intenso fluorescente, enquanto que as células do hospedeiro permaneceram sem coloração. Os urediniosporos fluoresceram mais intensamente do que todas as outras estruturas do fungo. Os tubos germinativos, apressórios e vesículas sub-estomáticas apresentaram semelhante intensidade de cor, enquanto as extremidades distais das células-mãe de haustório apresentaram-se mais brilhante e bastante conspícuas. A coloração do micélio intercelular foi fraca, e os haustórios apenas esporadicamente apresentaram fluorescência (Figuras 2 e 3).

Pela fluorocromação foi possível observar (Figuras 2 e 3) que os urediniosporos na superfície inferior da folha ao germinarem desenvolveram um ou mais tubos germinativos, geralmente três, porém, na maioria das vezes, apenas um deles continuou a crescer atingindo comprimentos variáveis. O ápice do tubo germinativo mais desenvolvido diferenciou-se em apressório separando-se deste por meio de um septo.

Figura 2: Estruturas de infecção de *H. vastatrix* evidenciadas com o fluorocromo dietanol

- a)- urediniosporo (U) não germinado próximo ao estômato (E);
 b)- urediniosporo (U) apresentando tubo germinativo (TG) e apressório (Ap), com septo (Se), sobre a abertura estomatal (AE);
 c)- Hifa de penetração (HP) e vesícula sub-estomática (VSE) na cavidade sub-estomática;
 d)- sítio de infecção com uma célula-mãe de haustório (CMH), caracterizada pela presença de septo (Se), de espessamento no ápice (Es) e do poro (P) que representa o diâmetro do pescoço do haustório.

Figura 3: Estruturas de infecção de *H. vastatrix* evidenciadas com o fluorocromo dietanol

- a)- sitio de infecção apresentando hifa de penetração (HP) e 2 células-mãe de haustório (CMH) caracterizadas pelo espessamento no ápice (Es);
 b)- sitio de infecção apresentando 3 CMH caracterizadas pelo espessamento no ápice (Es) e pelo poro (P), que representa o diâmetro do pescoço do haustório;
 c)- sitio de infecção apresentando 4 CMH (Se= septo);
 d)- sitio de infecção apresentando mais de 5 CMH.

Cerca de 65% dos apressórios formaram-se sobre estômatos, e através do ostiolo destes, desenvolveram a hifa de penetração indo atingir a câmara sub-estomática onde alargando-se, diferenciaram-se em vesícula sub-estomática. Foram observados pelo menos cinco diferentes formatos de vesícula sub-estomática: (1) esférico, (2) em forma de gancho (uniramificado), (3) em forma de âncora (bi-ramificado), (4) tripartido (âncora com três braços), e (5) tetrapartido (âncora com quatro braços) (Figura 4). De cada braço da vesícula sub-estomática desenvolveu-se uma curta hifa de infecção e no seu ápice, voltado geralmente para a célula subsidiária, foi delimitada a célula-mãe de haustório por um septo. A partir desta, invadindo a célula hospedeira, foi diferenciado o primeiro haustório, após o que outras hifas de infecção são diferenciadas a partir da vesícula sub-estomática, geralmente, em direção às células mesofilicas.

4.4.2- Coloração com DAPI/sulfato de berberina

Todas as estruturas do fungo com conteúdo citoplasmático, excetuando-se os haustórios, apresentaram-se com fluorescência amarela intensa característico do sulfato de berberina que se liga a ácidos ribonuclêicos. Os haustórios e núcleos das células hospedeiras fuoresceram em azul pálido, cor característica do 4'6 diamino-2-fenilindol (DAPI), que se liga à ácidos desoxiribonuclêicos (Figura 5).

Figura 4: Formas de vesícula sub-estomática de *H. vastatrix*

- a)- esférica;
- b)- uni-ramificada;
- c)- forma de âncora com a hifa de penetração (HP) entre os dois braços da vesícula;
- d)- tripartida;
- e)- tetrapartida.

Figura 5: Estruturas de infecção de *H. vastatrix* evidenciadas com DAPI/sulfato de berberina

- a)- sítio de infecção apresentando haustório (H)diferenciado na célula subsidiária (N= núcleo da célula hospedeira, P= pescoço do haustório e (CMH)= célula-mãe de haustório);
- b)- sítio de infecção apresentando vesícula-sub estomática tetrapartida.

4.5- Desenvolvimento do fungo

4.5.1- Estágios de pré-penetração

Nas três interações de cafeeiro-ferrugem : MN (compatível), MN-R (com resistência induzida) e Sch (incompatível) a porcentagem de germinação dos uredíniosporos foi ao redor de 23-25%, a porcentagem de diferenciação de tubos germinativos em apressórios foi da ordem de 50-54% e a porcentagem de apressórios diferenciados sobre estômatos ca. de 61-66%. Não houve tampouco, diferença significativa na porcentagem de estômatos ocupados por apressório (0,29-0,31%) nos três tipos de interações estudadas. (Tabela 4).

4.5.2- Estágios de pós-penetração

4.5.2.1- Sítios de infecção apresentando hifa de penetração (HP).

Como pode ser observado na Tabela 5 e Gráfico 1, a diferenciação em HP não foi afetada pelo mecanismo de resistência do híbrido "Sarchimor" (Sch) ou, do cv. "Mundo Novo" (MN-R) com proteção induzida através da aplicação de filtrado de fermento. Pode-se observar também que a maioria dos apressórios sobre estômatos se diferenciou em hifas de penetração às 24hs após a inoculação (67 a 73%). As maiores porcentagens de sítios de infecção apresentando HP ocorreram após 36hs da inoculação (ca. de 90%).

Tabela 4- Influência do hospedeiro no desenvolvimento de estruturas primárias de infecção de H. vastatrix no estágio de pré-penetração.

Evento	Hospedeiro		
	MN	MN-R	Sch
% de germinação	23,3 $\pm$ 0,8 ^a	24,3 $\pm$ 1,7 ^a	25,0 $\pm$ 1,9 ^a
% de tubos germinativos com apressórios	54,1 $\pm$ 3,2 ^a	52,2 $\pm$ 2,8 ^a	50,5 $\pm$ 3,7 ^a
% de apressório sobre estômato	66,7 $\pm$ 0,8 ^a	61,9 $\pm$ 3,0 ^a	64,7 $\pm$ 2,4 ^a
% de estômatos com apressório	0,29 $\pm$ 0,05 ^a	0,30 $\pm$ 0,03 ^a	0,31 $\pm$ 0,04 ^a

MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Tabela 5- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando hifa de penetração, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com HP em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	73,0 $\pm$ 1,7 ^a	73,3 $\pm$ 2,4 ^a	67,6 $\pm$ 2,5 ^a
36	94,6 $\pm$ 1,6 ^a	94,1 $\pm$ 2,8 ^a	93,8 $\pm$ 1,6 ^a
48	92,6 $\pm$ 1,3 ^a	91,1 $\pm$ 1,2 ^a	89,6 $\pm$ 1,8 ^a
72	90,4 $\pm$ 2,1 ^a	93,1 $\pm$ 2,3 ^a	91,0 $\pm$ 2,8 ^a
96	90,1 $\pm$ 2,1 ^a	90,3 $\pm$ 1,7 ^a	87,5 $\pm$ 3,2 ^a
144	96,4 $\pm$ 1,6 ^a	93,4 $\pm$ 2,5 ^a	86,4 $\pm$ 2,2 ^a
192	91,1 $\pm$ 1,6 ^a	87,7 $\pm$ 2,4 ^a	91,8 $\pm$ 1,8 ^a
288	89,5 $\pm$ 1,4 ^a	89,3 $\pm$ 2,2 ^a	89,0 $\pm$ 1,5 ^a

=====

HP= hifa de penetração; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 1: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando hifa de penetração, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

HP= hifa de penetração, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.2- Sítios de infecção apresentando vesícula sub-estomática (VSE).

Nas três interações (MN, MN-R e Sch) o fungo desenvolveu-se igualmente até a diferenciação em VSE. Apenas 28 a 37% dos apressórios sobre estômato chegaram a diferenciar-se em VSE, 24hs após a inoculação. Porém após 36hs da inoculação essa porcentagem atingiu o máximo de 86 a 91% (Tabela 6 e Gráfico 2).

Dos diferentes formatos apresentados pela VSE o mais comumente encontrado foi o da âncora bi-ramificada (Tabelas 7 e 8).

Tabela 6- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando vesícula sub-estomática, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com VSE em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	28,0 $\pm$ 1,9 ^a	37,6 $\pm$ 3,1 ^a	33,1 $\pm$ 2,7 ^{ab}
36	89,3 $\pm$ 1,9 ^a	90,4 $\pm$ 1,8 ^a	86,3 $\pm$ 1,4 ^a
48	88,5 $\pm$ 2,1 ^a	88,4 $\pm$ 1,2 ^a	85,2 $\pm$ 2,3 ^a
72	88,3 $\pm$ 2,9 ^a	91,5 $\pm$ 2,0 ^a	89,8 $\pm$ 2,0 ^a
96	86,0 $\pm$ 3,1 ^a	88,5 $\pm$ 1,8 ^a	83,0 $\pm$ 2,4 ^a
144	91,3 $\pm$ 1,3 ^b	89,2 $\pm$ 0,9 ^b	81,0 $\pm$ 2,2 ^a
192	87,9 $\pm$ 1,5 ^a	79,6 $\pm$ 2,0 ^a	86,7 $\pm$ 1,4 ^a
288	86,3 $\pm$ 1,4 ^a	80,3 $\pm$ 3,4 ^a	82,7 $\pm$ 1,6 ^a

=====

VSE= vesícula sub-estomática; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 2: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando vesícula sub-estomática, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

VSE= sesícula sub-estomática, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 7- Porcentagem dos diferentes tipos de vesículas sub-estomáticas de H.vastatrix 24hs após a inoculação.

Formato da VSE	% de sitios de infecção com VSE em		
inoculação	MN	MN-R	Sch
esférico	36,2±2,5 ^b	21,9±1,6 ^a	28,6±3,2 ^{ab}
de gancho	29,4±2,6 ^a	22,7±2,2 ^a	27,2±3,8 ^a
de âncora	26,5±1,6 ^a	44,0±2,8 ^b	37,5±2,8 ^b
tripartido	7,8±1,9 ^a	7,7±1,2 ^a	6,0±2,6 ^a
tetrapartido	0,0	4,6±2,0 ^a	1,5±1,1 ^a

VSE= vesícula sub-estomática; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Tabela 8- Porcentagem dos diferentes tipos de vesículas sub-estomáticas de H.vastatrix, 36hs após a inoculação.

Formato da VSE	% de sitios de infecção com VSE em		
inoculação	MN	MN-R	Sch
esférico	5,1 $\pm$ 0,8 ^b	2,2 $\pm$ 0,2 ^a	5,7 $\pm$ 1,3 ^b
de gancho	4,3 $\pm$ 2,7 ^a	7,2 $\pm$ 1,6 ^a	8,0 $\pm$ 1,9 ^a
de âncora	63,2 $\pm$ 4,0 ^a	77,4 $\pm$ 3,3 ^b	67,2 $\pm$ 1,0 ^a
tripartido	20,6 $\pm$ 3,2 ^a	12,5 $\pm$ 1,3 ^a	13,5 $\pm$ 0,7 ^a
tetrapartido	6,8 $\pm$ 1,8 ^a	5,2 $\pm$ 0,2 ^a	5,5 $\pm$ 1,4 ^a

VSE= vesícula sub-estomática; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

4.5.2.3- Sítios de infecção apresentando 1 célula-mãe de haustório (1 CMH).

Os primeiros sítios de infecção apresentando 1 CMH foram observados 36hs após a inoculação nas três combinações estudadas. As maiores porcentagens de sítios de infecção contendo 1 CMH ocorreram após 72hs da inoculação. Na combinação incompatível (Sch), 48hs após a inoculação, a redução de sítios de infecção nesse estágio foi da ordem de 44,4% em relação ao cv. MN, e 20%, 72hs após a inoculação. Na combinação MN-R X *H.vastatrix*, a porcentagem de sítios de infecção com 1 CMH foi semelhante à apresentada em MN, até 144hs após a inoculação, com uma redução significativa após esse horário (Tabela 9 e Gráfico 3).

4.5.2.4- Sítios de infecção apresentando 2 células-mãe de haustório (2 CMH).

Nas três combinações, o aparecimento de sítios de infecção com 2 CMH ocorreu, simultaneamente, 36hs após a inoculação, atingindo os valores mais elevados após 72hs da inoculação. No híbrido Sch, o número de sítios de infecção que chegaram a atingir o estágio de 2 CMH foi da ordem de 50% menor do que em MN. Esse bloqueio no desenvolvimento do fungo ocorreu 48hs após a inoculação. No cv. MN-R, o número de sítios de infecção apresentando 2 CMH foi ligeiramente inferior ao de MN. (Tabela 10 e Gráfico 4).

Tabela 9- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando 1 célula-mãe de haustório em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 1 CMH em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	0,0	0,0	0,0
36	9,0 $\pm$ 1,6	7,2 $\pm$ 1,2 ^a	7,6 $\pm$ 1,2 ^a
48	61,0 $\pm$ 3,7 ^a	53,5 $\pm$ 2,9 ^a	33,9 $\pm$ 0,4 ^b
72	77,8 $\pm$ 2,0 ^a	75,2 $\pm$ 2,6 ^a	63,6 $\pm$ 0,7 ^b
96	77,1 $\pm$ 2,7 ^a	79,6 $\pm$ 0,9 ^a	66,4 $\pm$ 3,1 ^b
144	85,4 $\pm$ 2,2 ^a	79,3 $\pm$ 3,3 ^a	61,3 $\pm$ 1,7 ^b
192	79,1 $\pm$ 1,4 ^a	67,3 $\pm$ 1,3 ^b	63,1 $\pm$ 2,8 ^b
288	78,2 $\pm$ 1,4 ^a	47,4 $\pm$ 2,0 ^c	61,9 $\pm$ 2,0 ^b
=====			

CMH= célula-mãe de haustório; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 3: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 1 célula-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 10- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando 2 células-mãe de haustório em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 2 CMH em			
horas após			

inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	0,0	0,0	0,0
36	0,6 $\pm$ 0,4 ^a	0,5 $\pm$ 0,4 ^a	0,8 $\pm$ 0,4 ^a
48	27,4 $\pm$ 3,9 ^a	25,8 $\pm$ 3,3 ^a	10,8 $\pm$ 0,6 ^b
72	45,9 $\pm$ 3,7 ^a	41,7 $\pm$ 2,2 ^a	29,1 $\pm$ 2,7 ^b
96	68,5 $\pm$ 0,6 ^a	56,7 $\pm$ 2,6 ^b	30,6 $\pm$ 0,8 ^c
144	76,4 $\pm$ 1,7 ^a	67,7 $\pm$ 3,3 ^b	25,6 $\pm$ 1,2 ^c
192	74,2 $\pm$ 2,0 ^a	57,4 $\pm$ 3,2 ^b	38,0 $\pm$ 0,7 ^c
288	75,1 $\pm$ 0,7 ^a	44,4 $\pm$ 0,4 ^b	38,2 $\pm$ 1,4 ^c
=====			

CMH= célula-mãe de haustório; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 4: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 2 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.5- Sítios de infecção apresentando 3 células-mãe de haustório (3 CMH).

Os primeiros sítios de infecção apresentando 3 CMH foram observados 48hs após a inoculação, sendo que somente após 192hs as porcentagens de colônias nesse estágio atingiram valores máximos nas três combinações estudadas. No híbrido Sch, a porcentagem de sítios de infecção nesse estágio foi 70-80% menor do que no cv. suscetível (MN), enquanto que no cv com resistência induzida (MN-R), foi apenas ao redor de 30% menor do que em MN. (Tabela 11 e Gráfico 5)

4.5.2.6 - Sítios de infecção apresentando 4 células-mãe de haustório (4 CMH).

Os primeiros sítios de infecção apresentando 4 CMH foram observados 72-96hs após a inoculação e as maiores porcentagens de colônias nesse estágio ocorreram após 192hs da inoculação nas três combinações. A porcentagem de sítios de infecção com 4 CMH foi cerca de 85-95% menor no híbrido Sch do que no cv. MN, e, no cv. com resistência induzida (MN-R) foi 35-45% menor do que em MN. (Tabela 12 e Gráfico 6).

Tabela 11- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando 3 células-mãe de haustório em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 3 CMH em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,3±0,3 ^a	0,4±0,2 ^a	0,0
72	6,0±2,0 ^a	8,5±5,7 ^a	1,6±0,3 ^b
96	29,8±1,0 ^a	17,3±0,7 ^b	5,1±0,4 ^c
144	36,0±2,7 ^a	35,7±2,0	5,1±0,5 ^b
192	67,6±2,6 ^a	44,6±2,0 ^b	22,1±0,8 ^c
288	66,1±0,9 ^a	43,5±2,4 ^b	20,3±0,4 ^c
=====			

CMH= célula-mãe de haustório; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 5: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 3 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 12- Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando 4 células-mãe de haustório em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 4 CMH em			
horas após			

inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	0,0
72	0,7±0,4 ^a	0,0	0,2±0,2 ^a
96	8,8±0,3 ^a	1,6±0,7 ^b	1,0±0,5 ^b
144	16,4±0,8 ^a	15,2±0,1 ^a	0,7±0,5 ^b
192	58,4±0,3 ^a	36,9±1,3 ^b	9,4±0,5 ^c
288	59,9±2,1 ^a	32,6±1,2 ^b	7,8±1,3 ^c
=====			

CMH= célula-mãe de haustório; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 6: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 4 células-mãe de haustório, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.7- Sítios de infecção apresentando 5 células-mãe de haustório (5 CMH).

Somente ao redor de 96-144hs após a inoculação, foram observados os primeiros sítios de infecção com 5 CMH no cv. suscetível MN (0,3%). Nas três combinações, as maiores porcentagens de colônias nesse estágio ocorreram após 192hs da inoculação, porém em Sch foi 91-93% menor que do em MN e no cv. com resistência induzida 30-45% menor do que em MN. (Tabela 13 e Gráfico 7).

4.5.2.8- Porcentagem de colônias abortadas

Foi observado que, 288hs (12 dias) após a inoculação, 100% das colônias foram abortadas no híbrido Sch, 67,2% no cv com resistência induzida MN-R e 41,6% no cv. suscetível MN. Como pode ser observado na Tabela 14 e Gráfico 8, cerca de 6% das colônias foram abortadas logo após a diferenciação em apressório de forma semelhante nas três combinações. Assim, igualmente em MN, MN-R e Sch, cerca de 5-8% foram abortadas no estágio de hifa de penetração (HP). Na interação incompatível, a maioria das colônias foram abortadas logo após a diferenciação em vesícula sub-estomática (VSE) ou após a formação da primeira célula-mãe de haustório (1 CMH), enquanto que no cv com resistência induzida (MN-R), a maioria das colônias foram abortadas após a formação da segunda célula-mãe de haustório (2 CMH), o que também foi verdade para o cv. "Mundo Novo".

Tabela 13- Porcentagem de sítios de infecção de *H.vastatrix*, apresentando 5 células-mãe de haustório em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 5 CMH em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0
96	0,3±0,3	0,0	0,0
144	4,8±0,6 ^a	2,9±0,3 ^b	0,0 ^c
192	54,2±1,2 ^a	38,2±3,6 ^b	4,6±0,2 ^c
288	59,3±2,1 ^a	36,4±2,9 ^b	3,6±0,5 ^c
=====1=====			

CMH= célula-mãe de haustório; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada antes da inoculação com o patógeno; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 7: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 5 células-mãe de haustório, em cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 14 - Porcentagem de colônias de *H.vastatrix* abortadas 288hs após a inoculação em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

Estágio de desenvolvimento da colônia	% de colônias abortadas em		
	MN	MN-R	Sch
Ap	5,4 $\pm$ 1,6 ^a	5,9 $\pm$ 2,7 ^a	5,7 $\pm$ 1,2 ^a
HP	5,3 $\pm$ 0,8 ^a	7,5 $\pm$ 2,3 ^a	7,6 $\pm$ 2,5 ^a
VSE	9,8 $\pm$ 2,6 ^b	11,4 $\pm$ 2,6 ^b	22,3 $\pm$ 1,1 ^a
1 CMH	1,3 $\pm$ 0,6 ^c	4,1 $\pm$ 0,8 ^b	38,1 $\pm$ 0,9 ^a
2 CMH	12,4 $\pm$ 1,5 ^b	28,3 $\pm$ 2,4 ^a	7,4 $\pm$ 0,8 ^c
3 CMH	7,0 $\pm$ 0,5 ^b	6,6 $\pm$ 1,3 ^{ab}	10,0 $\pm$ 0,8 ^a
4 CMH	0,0	0,0	4,5 $\pm$ 1,1
5 CMH	0,0	0,0	4,4 $\pm$ 0,7

Ap = apressório; HP = hifa de penetração; VSE = vesícula sub-estomática; CMH = célula-mãe de haustório; MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Grafico 8: Histograma da porcentagem de colônias de *H. vastatrix* abortadas 288hs após a inoculação em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

Ap= apressório, CMH= célula-mãe de haustório, HP= hifa de penetração, VSE= vesícula sub-estomática, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.9- Número de sítios de infecção por cm²

O número de sítios de infecção por cm² de folha foi semelhante na interação incompatível (Sch) e na compatível (MN) em todos os intervalos de tempo observados (70-80%) (Tabela 15). Porém, no cv. com resistência induzida (MN-R) o número de sítios de infecção por cm² foi da mesma ordem somente até 72hs após a inoculação. Após esse intervalo de tempo, foi observada uma diminuição de 75-85% no número de sítios de infecção por cm² no cv. com resistência induzida MN-R (Tabela 15).

4.5.2.10- Tamanho da colônia

Os dados da Tabela 16 e Gráfico 9 mostram que as colônias do fungo no híbrido Sch apresentaram-se com um tamanho ca. de 26 e 68% menor do que no cv. suscetível MN, respectivamente as 72 e 96hs após a inoculação. No cv. com resistência induzida (MN-R), 96hs após a inoculação, as colônias apresentaram uma redução de tamanho ao redor de 20% em relação ao cv. MN.

Tabela 15 - Número de sítios de infecção de H.vastatrix por cm² de folha de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
nº de sítios de infecção em			
horas após -----			
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
24	73±11,9 ^a	77±6,7 ^a	78± 7,4 ^a
36	72± 6,7 ^a	70±5,1 ^a	71± 4,5 ^a
48	69± 6,3 ^a	70±8,7 ^a	74± 5,4 ^a
72	80± 3,6 ^a	13±4,8 ^b	80± 3,8 ^a
96	74± 6,3 ^a	15±3,7 ^b	71± 5,7 ^a
144	81±11,7 ^a	20±3,0 ^b	85±11,1 ^a
192	80± 2,4 ^a	13±2,3 ^b	80± 2,1 ^a
=====			

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72 hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Tabela 16 - Tamanho da colônia de *H.vastatrix* em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

horas após inoculação	tamanho da colônia (µm) em		
	MN	MN-R	Sch
36	22,7±0,6 ^a	23,0±0,6 ^a	21,3±0,7 ^a
48	24,9±0,5 ^a	24,9±0,9 ^{ab}	22,2±0,8 ^b
72	36,0±1,9 ^a	34,4±2,3 ^a	26,6±0,3 ^b
96	81,3±8,7 ^a	65,9±6,3 ^a	25,7±0,9 ^b

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Grafico 9: Comprimento da colônia do fungo *H. vastatrix*, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.11- Sítios de infecção associados a células epidérmicas necrosadas do hospedeiro

Em todas as interações estudadas, MN, MN-R e Sch, foi observado necrosamento de células estomáticas e subsidiárias associadas a sítios de infecção. Essas células necrosadas, contendo ou não haustórios, apresentaram-se com auto-fluorescência amarela, geralmente com o citoplasma colapsado e a parede celular espessada (Figura 6a). A porcentagem de sítios infecção associados a células necrosadas foi sempre menor no cv. suscetível MN e no cv. com resistência induzida MN-R do que no híbrido resistente Sch (Tabelas 17 e 18 e Gráficos 10 e 11).

4.5.2.11.1- Sítios de infecção sem célula-mãe de haustório

Os primeiros sítios de infecção, desenvolvidos até o estágio de VSE, associados a células epidérmicas necrosadas do hospedeiro, foram observados 36hs após a inoculação no híbrido Sch. A partir de 192hs após a inoculação, a porcentagem desse evento foi significativamente maior do que nas outras duas combinações estudadas (Tabela 17 e Gráfico 10).

No cv. MN, 1,0% ($\pm 0,6$) dos sítios de infecção nesse estágio apresentaram-se associados a células epidérmicas necrosadas 72hs após a inoculação, atingindo um máximo de 15-25% 144hs após a inoculação. O cv. com resistência induzida MN-R apresentou um padrão de resposta semelhante ao cv suscetível MN (Tabela 17 e Gráfico 10).

Figura 6: Necrosamento de células de folhas de cafeeiro, associado à presença do fungo *H. vastatrix*

- a)- célula epidérmica necrosada (CEN) de folhas do híbrido "Sarchimor", situada abaixo de um apressório (Ap);
- b)- células mesofilicas necrosadas (CMN) de folhas do híbrido "Sarchimor", em contacto com células-mãe de haustório (CMH);
- c)- células mesofilicas necrosadas (CMN) de folhas do híbrido "Sarchimor", delimitando a cavidade sub-estomática com uma vesícula sub-estomática (VSE);
- d)- célula mesofilica necrosada (CMN) de folhas do cv "Mundo" "Novo", em contacto com uma célula mãe de haustório (CMH).

Tabela 17 - Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, sem células-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

horas após inoculação	% de sítios de infecção sem CMH associados a CEN em		
	MN	MN-R	Sch
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	4,1±0,6
48	0,0	0,0	1,6±0,3
72	1,0±0,6 ^b	5,5±1,1 ^b	11,7±4,2 ^a
96	6,8±1,5 ^a	5,3±2,7 ^a	8,4±0,7 ^a
144	19,3±8,7 ^a	16,3±3,8 ^a	12,9±2,7 ^a
192	25,1±5,5 ^b	17,3±2,8 ^b	50,1±7,5 ^a
288	15,3±2,2 ^b	9,5±2,9 ^b	59,4±7,0 ^a

CMH= célula-mãe de haustório; CEN= célula epidérmica necrosada; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 10: Porcentagem de sítios de infecção, de *H. vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

CEN= célula epidérmica necrosada, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.11.2- Sítios de infecção apresentando célula(s)-mãe de haustório.

Os primeiros sítios de infecção apresentando CMH associados a células epidérmicas necrosadas foram observados, 48hs após a inoculação, no híbrido Sch ($0,3\% \pm 0,3$), porém, até 144hs após a inoculação a porcentagem não ultrapassou $13,3\% (1,4)$, e somente 192hs após a inoculação atingiu níveis superiores a 50% (Tabela 18 e Gráfico 11).

Nos cv MN e MN-R, foram observados os primeiros sítios de infecção com CMH associados a células epidérmicas necrosadas a partir de 72hs e 96hs após a inoculação, respectivamente. Em ambas as combinações, a porcentagem desse evento foi gradativamente aumentando com o tempo, atingindo valores máximos 144hs após a inoculação (Tabela 18 e Gráfico 11).

Tabela 18 - Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células epidérmicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

horas após inoculação	% de sítios de infecção com CMH associados a CEN em		
	MN	MN-R	Sch
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	0,3±0,3 ^a
72	0,1±0,1 ^b	0,0 ^b	3,8±1,8 ^a
96	1,5±0,6 ^b	1,4±0,8 ^b	6,3±0,2 ^a
144	11,1±2,2 ^b	8,1±1,7 ^b	13,3±1,4 ^a
192	16,1±2,2 ^c	17,4±2,0 ^b	58,0±4,2 ^a
288	15,2±2,8 ^b	13,9±6,3 ^b	60,8±5,3 ^a

CMH= célula-mãe de haustório; CEN= célula epidérmica necrosada; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação; Sch= folhas do Híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 11: Porcentagem de sítios de infecção, de *H. vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células epidérmica necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

CEN= célula epidérmica necrosada, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.12- Sítios de infecção associados a células mesofilicas necrosadas do hospedeiro

Nas três interações estudadas foi também observado necrosamento de células do mesófilo, associado a sítios de infecção. Uma ou mais células do mesófilo, contendo ou não haustórios e vizinhas às estruturas do fungo, apresentaram-se com auto-fluorescência amarela, plasmolisada e com o citoplasma colapsado. Na interação compatível (MN) e no cv. com resistência induzida (MN-R), o número de células mesofilicas necrosadas por sítio de infecção foi normalmente de um (Figura 6d), raramente excedendo a dois, enquanto que na combinação incompatível Sch, de maneira geral, todas as células mesofilicas rodeando um sítio de infecção abortado apresentaram-se necrosadas (Figura 6b e 6c). Não só o número de células mesofilicas necrosadas por sítio de infecção mas também, o número de sítios de infecção associados a células mesofilicas necrosadas foram bastante menores nos cv suscetível (MN) e com resistência induzida (MN-R) do que no híbrido resistente (Sch), a partir de 96hs após a inoculação. (Tabelas 19 e 20 e Gráficos 12 e 13).

4.5.2.12.1- Sítios de infecção sem célula-mãe de haustório

A porcentagem de sítios de infecção associados a células mesofilicas necrosadas, onde o fungo se desenvolveu até o estágio de VSE, foi semelhante nas combinações suscetível (MN) e com resistência induzida (MN-R). Somente 96hs após a inoculação foi observado esse evento nestas combinações, sendo que as porcentagens máximas ocorreram após 144hs da inoculação (Tabela 19 e Gráfico 12).

No híbrido Sch, foram observados sítios de infecção sem CMH associados ao necrosamento do mesófilo, 48hs antes do que nas outras duas combinações estudadas. Além disso, a porcentagem desse evento foi significativamente maior nessa combinação incompatível, quando comparada à encontrada para o cv. suscetível (MN) ou com resistência induzida (MN-R) (Tabela 19 e Gráfico 12).

4.5.2.12.2- Sítios de infecção apresentando célula(s)-mãe de haustório

Como pode ser observado na Tabela 20 e Gráfico 13, a porcentagem de sítios de infecção com CMH associados a necrosamento de células mesofilicas foi mais elevada no híbrido Sch do que no cv com resistência induzida (MN-R) ou no cv. suscetível (MN). Esse evento foi observado desde as 48hs após a inoculação no híbrido Sch, e somente após 96hs, no cv. MN e no cv. com resistência induzida (MN-R).

Tabela 19 - Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, sem célula-mãe de haustório, associados a células mesofilica necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

horas após inoculação	% de sítios de infecção sem CMH associados a CMN em		
	MN	MN-R	Sch
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	1,2 $\pm$ 0,4
72	0,0	0,0	0,9 $\pm$ 0,4
96	0,8 $\pm$ 0,5 ^b	7,2 $\pm$ 5,5 ^{ab}	6,1 $\pm$ 1,3 ^a
144	10,3 $\pm$ 7,2 ^a	18,7 $\pm$ 3,6 ^a	17,4 $\pm$ 1,9 ^a
192	12,2 $\pm$ 6,0 ^b	10,5 $\pm$ 7,0 ^b	41,7 $\pm$ 6,5 ^a
288	16,8 $\pm$ 3,8 ^b	11,5 $\pm$ 2,8 ^b	80,1 $\pm$ 6,3 ^a

CMH= célula-mãe de haustório; CMN= célula mesofilica necrosada; MN= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72 hs antes da inoculação; MN-R= folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 12: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, sem célula-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

CMN= célula mesofilica necrosada, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 20 - Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando célula(s)-mãe de haustório associados a células mesofilicas necrosadas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

horas após inoculação	% de sítios de infecção com CMH associados a CMN em		
	MN	MN-R	Sch
24	0,0	0,0	0,0
36	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	1,5±0,7
72	0,0	0,0	3,7±1,5
96	2,2±0,6 ^b	1,9±0,9 ^b	8,4±1,7 ^a
144	4,3±1,6 ^b	7,0±1,7 ^b	23,4±2,0 ^a
192	11,7±2,0 ^b	11,4±4,8 ^b	56,8±7,4 ^a
288	25,7±1,8 ^b	17,3±9,1 ^b	83,7±3,5 ^a

CMH= célula-mãe de haustório; CMN= célula mesofilica necrosada; MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação; MN-R= folhas do cv. Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação; Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação. Média de 5 repetições (± erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 13: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando célula(s)-mãe de haustório, associados a células mesofilicas necrosadas, em cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

CMN= célula mesofilica necrosada, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

4.5.2.13- Primeiros haustórios diferenciados nas células epidérmicas

A diferenciação do primeiro haustório na célula epidérmica do hospedeiro (Figura 5a) atingiu valores máximos 72hs após a inoculação, tendo sido significativamente menor no híbrido Sch do que nas outras duas combinações. (Tabela 21 e Gráfico 14).

A porcentagem de diferenciação do segundo haustório foi significativamente menor no híbrido Sch do que no cv. MN e no cv. com resistência induzida (MN-R), e neste último, significativamente menor do que no cv. suscetível MN (Tabela 22 e Gráfico 15).

Após 96hs da inoculação, os primeiros haustórios diferenciados na epiderme apresentaram-se com tamanho maior na combinação compatível (MN) do que no cv com resistência induzida (MN-R) e neste com tamanho maior do que no híbrido binterações Sch) (Tabela 23 e Gráfico 16).

Além de apresentarem tamanho maior, os primeiros haustórios diferenciados nas células epidérmicas do cv. MN, mostraram uma menor frequência de encapsulamento (Figura 7b) do que em MN-R e Sch, (Tabela 24 e Gráfico 17).

Tabela 21 - Porcentagem de sítios de infecção de H. vastatrix, apresentando 1 haustório diferenciado em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 1 haustório em			
células epidérmicas de			
horas após	-----		
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
36	0,0	0,0	0,0
48	21,8 $\pm$ 2,1 ^a	19,2 $\pm$ 1,9 ^a	8,2 $\pm$ 0,9 ^b
72	73,5 $\pm$ 2,6 ^a	62,2 $\pm$ 4,1 ^a	34,4 $\pm$ 2,7 ^b
96	79,1 $\pm$ 6,4 ^a	59,7 $\pm$ 2,5 ^a	40,4 $\pm$ 2,2 ^b

=====

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 14: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 1 haustório, em células epidérmicas de cafeeiros suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

H= haustório MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 22 - Porcentagem de sítios de infecção de H.vastatrix, apresentando 2 haustórios diferenciados em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de sítios de infecção com 2 haustórios em			
células epidérmicas de			
horas após	-----		
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
36	0,0	0,0	0,0
48	7,8 $\pm$ 1,2 ^a	6,2 $\pm$ 0,8 ^a	1,5 $\pm$ 0,6 ^b
72	32,3 $\pm$ 0,9 ^a	23,5 $\pm$ 2,4 ^b	7,6 $\pm$ 1,9 ^c
96	36,0 $\pm$ 3,1 ^a	21,0 $\pm$ 1,5 ^b	6,4 $\pm$ 1,0 ^c
=====			

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 15: Porcentagem de sítios de infecção de *H. vastatrix*, apresentando 2 haustório, em células epidérmicas de cafeeiros suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

H= haustório MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 23 - Tamanho do haustório, de *H.vastatrix*, diferenciado em célula epidérmica de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
Area em μm^2			
horas após	-----		
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
48	$2,7 \pm 0,2^a$	$2,2 \pm 0,3^a$	$1,9 \pm 0,3^a$
72	$5,8 \pm 0,3^a$	$6,6 \pm 0,5^a$	$3,9 \pm 0,5^b$
96	$11,8 \pm 0,8^a$	$8,6 \pm 0,8^b$	$6,7 \pm 0,1^c$
=====			

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 16: Tamanho do haustório, de *H. vastatrix*, diferenciado em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

H= haustório MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patôgeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patôgeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patôgeno.

Tabela 24 - Porcentagem de haustórios, de *H.vastatrix*, encapsulados em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

=====			
% de haustórios encapsulados nas			
células epidérmicas de			
horas após	-----		
inoculação	MN	MN-R	Sch
=====			
48	0,0	0,0	0,0
72	4,3 $\pm$ 1,0 ^a	27,1 $\pm$ 9,7 ^b	20,1 $\pm$ 4,5 ^b
96	9,3 $\pm$ 2,1 ^a	24,1 $\pm$ 6,1 ^b	61,3 $\pm$ 6,4 ^c
=====			

MN = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno; MN-R = folhas do cv. "Mundo Novo" aspergidas com filtrado de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno; Sch = folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno. Média de 5 repetições ($\pm$ erro padrão). Médias com mesma letra, em fileiras horizontais, não diferem significativamente entre si a nível de 5% (Teste-t).

Gráfico 17: Porcentagem de haustórios, de *H. vastatrix*, encapsulados em células epidérmicas de cafeeiros com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética.

HE= haustório encapsulado, MN= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno, MN-R= folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" aspergidas com extrato de fermento 72hs antes da inoculação com o patógeno, Sch= folhas do híbrido "Sarchimor" aspergidas com água bidestilada 72hs antes da inoculação com o patógeno.

Figura 7: Encapsulamento de haustórios de *H. vastatrix*

- a)- haustório (H) encapsulado em célula mesofilica necrosada (CMN) de folhas do híbrido "Sarchimor" (CMH= célula-mãe de haustório, Se=septo);
 b)- haustório (H) encapsulado em célula epidèrmica necrosada (CEN) de folha do híbrido "Sarchimor" (N= núcleo).

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Genes de virulência presentes no inóculo.

O período de incubação do fungo *Hemileia vastatrix* pode ser definido como sendo o período de tempo decorrido desde a inoculação até o aparecimento de sintomas visíveis no hospedeiro (pequenas lesões amarelo-pálidas), quando no micélio do fungo se inicia a diferenciação de algumas hifas intercelulares em células esporogênicas. Período de latência seria o período de tempo decorrido desde a inoculação até o aparecimento de uredíniosporos em, pelo menos, 50% das lesões.

Foi verificado, por diversos pesquisadores, que o período de incubação e o de latência de *H. vastatrix* são dependentes de fatores ambientais (RAYNE, 1961), do cultivar do hospedeiro (MAYNE, 1932), da idade da folha do hospedeiro (ESKES, 1983), e da raça fisiológica do fungo (LEGUIZAMON, 1983).

O presente trabalho procurou definir temporalmente a ocorrência dos primeiros eventos durante o desenvolvimento do fungo em combinação compatível (MN), incompatível (Sch) e com resistência induzida (MN-R). Para esse fim, foram controladas algumas das variáveis, como os fatores ambientais e a idade da folha. O inóculo do fungo, coletado

predominantemente de raça II (v_3v_5). A presença dominante da raça II foi suposta em decorrência: (1) da lei da complementariedade de genes de resistência e de virulência (FLOR, 1955) - a qual se aplica à interação cafeeiro-ferrugem (NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT, 1967) -, e (2) do postulado fundamental, segundo o qual "raças com genes desnecessários de virulência são menos aptas em sobreviver". (BERGAMIM e KIMATI, 1978).

Pelos testes de resistência de clones diferenciais, com os uredíniosporos do inóculo utilizado nos experimentos do presente trabalho, ficou constatada a presença no inóculo dos genes de virulência v_1 e v_2 além do v_3 já esperado (Tabela 1). As raças fisiológicas presentes no inóculo utilizado, devem, pelo acima exposto, obrigatoriamente possuir o gene v_3 sozinho ou em combinação com os genes v_1 e/ou, v_2 . Assim sendo, as raças possíveis de comporem o inóculo utilizado são: raça I (v_2v_3), raça II (v_3), raça III (v_1v_3) e raça XVII ($v_1v_2v_3$).

O número de lesões por cm^2 foi significativamente mais elevado no cv. com gene de resistência S_{H5} ($13,3 \pm 0,8$) do que no cv. com genes $S_{H1}S_{H5}$ ($2,2 \pm 0,3$) ou com genes $S_{H2}S_{H5}$ ($0,9 \pm 0,6$) (Tabela 2). Este fato pode ser uma indicação da maior proporção da raça II no inóculo.

5.2 - Influência do hospedeiro nas fases de prè-penetração do fungo *H.vastatrix*.

Os urediniosporos das ferrugens, em geral, possuem uma reserva endôgena capaz de garantir a germinação, o crescimento do tubo germinativo, a diferenciação em apressório, em hifa de penetração e em vesícula sub-estomática sem a necessidade da concorrência de nutrientes exôgenos provenientes do hospedeiro. No entanto, todas essas etapas podem ser estimuladas ou inibidas devido a interações bioquímicas ou biofísicas entre a superfície do hospedeiro e o urediniosporo. GRAMBOW e RIEDEL (1977) e GRAMBOW e GRAMBOW (1978), demonstraram que compostos voláteis, fração fenólica da cutícula ou fração da parede celular de folhas de trigo induzem, em tubos germinativos de *P.graminis* f. sp. *tritici*, a diferenciação em apressórios sobre estômatos. E de se supor, portanto, que possa ocorrer a existência de cv. com diferentes qualidades ou quantidades desses compostos, de forma a concorrerem diferentemente na proporção de apressórios diferenciados. Segundo WYNN (1976), réplicas da superfície de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) induzem a diferenciação em apressórios de tubos germinativos de *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.. O estímulo ocorre quando o tubo germinativo cresce sobre a saliência correspondente aos lábios dos estômatos. Assim, a frequência ou o formato dos

estômatos de cvs. distintos poderiam determinar proporções diferentes na formação de apressórios sobre estômatos.

Na ferrugem do cafeeiro, SACCAS e CHARPENTIER (1971) citaram que os tubos germinativos têm um tropismo positivo que os direciona para abertura estomática onde diferenciam o apressório. Segundo HARR e GUGGENHEIM (1978), a diferenciação de tubos germinativos em apressórios não se deve exclusivamente à presença dos estômatos, já que observaram formação de apressórios em ambas as superfícies de folhas de cafeeiro, sendo que a epiderme superior não possui estômatos. Observa-se com frequência a formação de apressórios na superfície de agar-água ou mesmo de filme de água. Em superfície de poliestireno com sulcos finos, urediniosporos germinam e, ao encontrarem um sulco, diferenciam imediatamente o apressório, conforme CORREA e MORAES (1987).

Os resultados obtidos no presente trabalho quanto à porcentagem de germinação de urediniosporos de *H.vastatrix*, e de diferenciação em apressórios (Tabela 4), demonstram que, nas três interações estudadas, as superfícies dos hospedeiros influenciaram de forma semelhante o desenvolvimento do fungo nessas etapas citadas. Esta constatação corrobora os resultados obtidos por MARTINS et alii (1985a), para o mesmo sistema ora estudado *C.arabica* X *H.vastatrix*. Resultados semelhantes foram

encontrados para outros sistemas como:
T.aestivum X *P.graminis* f.sp. *tritici* (SKIPP e SAMBORSKY, 1974); *A.sativa* *P.coronata* f.sp. *avenae* (TANI et alii, 1976); *Hordeum vulgare* L. X *Puccinia hordei* Otth. (NIKS, 1981); *Saccharum officinarum* L. X *Puccinia melanocephala* H. Syd. et. P. Syd. (SOTOMAYOR et alii, 1983).

Nas três interações estudadas no presente trabalho, ca. de 50% dos tubos germinativos não se diferenciaram em apressórios. Segundo WYNN (1976), é essencial que ocorra a aderência do tubo germinativo à superfície da folha para que este tenha um crescimento direcionado para os estômatos e encontre a saliência dos lábios estomatais que serve de estímulo para a formação de apressório. A inoculação dos uredíniosporos em forma de aspersão de gotículas, usada no presente trabalho, pode, devido à interposição de um filme de água entre o tubo germinativo e a superfície da folha, ter dificultado, igualmente nas três interações, essa aderência necessária.

Dos apressórios formados, 30 a 40% não ocorreram sobre estômatos. Este fato poderia ser explicado pela presença de impurezas no inóculo. Os uredíniosporos coletados de folhas de cafezais, naturalmente infectados, traziam consigo muita poeira, e as partículas mais finas não foram excluídas, mesmo tendo havido peneiragem. Na aspersão do inóculo, essas partículas teriam se depositado na

superfície das folhas e poderiam, igualmente nas três combinações, ter simulado o estímulo das saliências dos estômatos, e dessa forma, uma porcentagem de apressórios teria se formado circunstancialmente longe dos estômatos.

5.3 - Influência do hospedeiro no desenvolvimento do fungo após a penetração.

A diferenciação em hifa de penetração e em vesícula sub-estomática também não foi afetada pelo mecanismo de resistência do híbrido Sch ou do cv. com resistência induzida MN-R (Tabelas 5 e 6 e Gráficos 1 e 2). Desta forma, essas duas interações, Sch X *H.vastatrix*, raça II e MN-R X *H.vastatrix*, raça II, podem ser incluídas na situação mais comum de resistência de plantas a ferrugens, embora não universal, onde a resistência do hospedeiro se expressa durante a penetração do fungo no tecido da planta (HEATH, 1982).

Foi observado, nos experimentos do presente trabalho, que a VSE pode se apresentar com formas variadas, o que talvez explique as discrepâncias encontradas na literatura quanto à descrição dessa estrutura do fungo. Segundo SACCAS e CHARPENTIER (1971), a VSE seria globosa ou ameboide; segundo RIJO e RODRIGUES (1978), teria a forma de uma âncora. Pelos resultados mostrados nas Tabelas 7 e 8 verifica-se, nas três interações estudadas (MN, MN-R e

Sch), que as VSEs podem ser encontradas, 24hs após a inoculação, em grande proporção apresentando a forma esférica, correspondente as VSEs globoides citada por SACCAS e CHARPENTIER (1971), e os formatos menos ramificados como formas de gancho (1 ramificação) ou de âncora (2 ramificações) . Porém 36hs após a inoculação, as VSEs mais comumente encontradas foram em forma de âncora como descrito por RIJO e RODRIGUES (1978), e em formas mais ramificadas, sendo estas últimas provavelmente coincidentes com as referidas formas amebóides de SACCAS e CHARPENTIER (1971). Pelos resultados obtidos no presente trabalho, é razoável supor-se que a formação das VSEs ocorreriam pelo alargamento das hifas de penetração (HP), inicialmente na forma esférica, e, com o passar do tempo, dela se desenvolveriam uma ou mais hifas de infecção (HI). E, dependendo do número de HI, a VSE pode apresentar-se na forma de gancho (1 HI), na forma de âncora (2 HI), tripartida (3 HI) ou tetrapartida (4 HI). A forma mais frequentemente observada foi a de âncora , isto é, com 2 HI voltadas para as células subsidiárias da epiderme, como descrito por RIJO e RODRIGUES (1978).

5.3.1 - Híbrido "Sarchimor".

Na combinação Sch X *H.vastatrix*, raça II, as primeiras evidências de inibição do desenvolvimento do fungo ocorreram ao redor de 48hs após a inoculação, quando foi detectada uma redução de 44,4% no número de colônias apresentando 1 CMH, em comparação com o número encontrado no cv. suscetível MN (Tabela 9 e Gráfico 3). Essa inibição, ocorrida ao redor de 48hs após a inoculação, ficou evidenciada pelo tamanho reduzido das colônias após 72hs. Enquanto o tamanho médio das colônias no híbrido Sch foi de 26,6um, no cv. MN foi de 36,0um (Tabela 16 e Gráfico 9). Isso demonstra que o fungo, no cv. suscetível MN, apresentou um crescimento 35% superior ao observado no híbrido Sch. O bloqueio do desenvolvimento do fungo ocorrido nesse horário foi apenas em parte letal, pois somente 22,3% das colônias foram abortadas na fase de VSE, antes de conseguirem diferenciar a 1^{ra} CMH (Tabela 14 e Gráfico 8). Outra parcela dessa inibição envolveu apenas um retardamento no desenvolvimento do fungo, já que, 72hs após a inoculação, a redução do número de colônias apresentando 1 CMH baixou de 44,4% para ca. de 20% (Tabela 9 e Gráfico 3).

Assim, no híbrido Sch, 61% das colônias conseguiram desenvolver 1 CMH, e destas, ca. de 66% diferenciaram haustório nas células epidérmicas do

hospedeiro (Tabelas 21 e 22 e Gráficos 14 e 15). E foi neste estágio de desenvolvimento que a maioria das colônias foram abortadas (38,1%) (Tabelas 10 e 14 e Gráficos 4 e 8).

Desta forma, é de se supor que os efeitos deletérios da expressão da resistência do híbrido Sch sobre a *H. vastatrix*, raça II (interação que apresenta reação de resistência tipo i) se processem, em parte, durante o crescimento da hifa de infecção (22,3%), e, na grande maioria (38,1%), após a formação de 1 CMH. As observações feitas por RIJO et alii (1982), em interações incompatíveis de cafeeiro-ferrugem, sem sintomas visíveis (reação de resistência tipo i) 2 meses após a inoculação, levaram os autores a concluir que as colônias do fungo, em sua totalidade, tinham sido abortadas antes de desenvolverem CMH. Porém, decorrido todo esse espaço de tempo após a inoculação (2 meses), as estruturas do fungo apresentam-se colapsadas, bem como as células hospedeiras vizinhas à colônia, dificultando a visualização das estruturas do fungo que possibilitam a determinação de seu estágio de desenvolvimento. Nessas condições, dificilmente se distingue o septo que separa a CMH da HI (Figura 6b), ou o espessamento do ápice da CMH na zona de contacto com a célula hospedeira, ou mesmo o haustório na célula hospedeira (Figura 7).

Apesar dos dados obtidos serem insuficientes para se estabelecer precisamente quando e de que forma ocorre o reconhecimento da raça avirulenta pelo híbrido Sch, pode-se supor, levando em conta o não sincronismo de desenvolvimento do fungo, que esse fenômeno se passaria logo após a formação da VSE ou da HI a partir da VSE, de forma semelhante ao que acontece em folhas de aveia na interação *A.sativa* L. cv. "Shokan I" X *P.coronata* f.sp. *avenae*, raça 226 (TANI et alii, 1975a e 1975b). Entre o reconhecimento e a expressão do(s) gene(s) de resistência o fungo chegaria a alcançar uma etapa mais adiantada de desenvolvimento formando CMH, 1 ou 2 haustórios, e só então, o crescimento do fungo cessaria definitivamente, e os efeitos deletérios do mecanismo de resistência tornar-se-iam visíveis ao microscópio. Uma parcela de colônias que se diferenciasse mais lentamente cessaria seu desenvolvimento na fase de VSE, quando já estariam presentes nas células hospedeiras os fatores responsáveis pela morte do fungo. Ou então, os talos, cada um oriundo de um uredíniosporo, apresentariam níveis diferentes de sensibilidade aos fatores de resistência desencadeados, uns resistindo por mais tempo que outros à ação desses fatores.

HEATH (1982), baseando-se nos estudos histológicos e ultra-estruturais sobre resistência a ferrugens, generaliza a afirmação de que o desenvolvimento do fungo e

a resposta do hospedeiro podem diferir em distintos sítios de infecção num mesmo tecido. Desta forma sugere que tanto a população de uredíniosporos que compõem o inóculo, como a população de células que compõem o tecido hospedeiro, não sejam homogêneas quanto ao estado de virulência ou resistência, respectivamente.

5.3.2 - Cultivar com resistência induzida (MN-R).

Provavelmente as plantas, como os animais, devem possuir gene(s) que codifica(m) os mecanismos de resistência característicos da espécie, para todos os tipos de agentes infecciosos. E a resistência seria determinada pela velocidade e magnitude da expressão desses genes e da atividade dos seus produtos. Dentre os mecanismos característicos a uma planta estão; (1) aqueles que as tornam não-hospedeiras à maioria dos parasitas; (2) aqueles que são respostas gerais ou inespecíficas à injúrias mecânica ou metabólica; (3) e aqueles com distintos graus de especificidade que as tornam hospedeiras resistentes a um grupo específico de patógenos (KUC, 1987). Assim, geralmente, o tipo de interação planta-patógeno determina a velocidade e a magnitude da expressão de cada mecanismo.

Plantas hospedeiras com resistência induzida mostram um grau de inespecificidade muito grande, sugerindo que o tratamento da planta com o indutor acionaria os

mecanismos mais gerais de resistência e produziria, além disso, um estado de "sensibilização" na planta que a levaria a acionar rapidamente determinados mecanismos de resistência, quando em contacto com patógenos potenciais, independentes do tipo de interação. (DEAN e KUC, 1985).

O tratamento de folhas de cafeeiro cv. "Mundo Novo" com filtrado de fermento, 72 hs antes da inoculação com o fungo *H.vastatrix*, induziu uma redução de 83% no número de lesões por cm² (Tabela 3 e Figura 1). A partir das 72hs após a inoculação, constatou-se uma redução de 80% no número de sítios de infecção por cm² (Tabela 15). Os dados das Tabelas 5, 6, 9, 10, e 15 mostram que, até esse intervalo de tempo, o fungo se desenvolve no cv. com resistência induzida (MN-R) e no cv. suscetível (MN) de forma semelhante, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Após esse intervalo de tempo 80% das colônias deixam de ser visualizadas pela técnica empregada no cv. MN-R (Tabela 15). A suposição é de que as colônias teriam sido abortadas nesse período de tempo, envolvendo talvez drásticas alterações na porção polissacarídica da parede celular do fungo, de forma a perder a afinidade pelo fluorocromo dietanol. Ou ainda, poderia ter ocorrido lise das estruturas do fungo formadas na cavidade sub-estomática pela ação de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência. Assim, a porção do fungo externa à planta se desprenderia, não

deixando esse sinais de sua prévia existência. Pelos dados das Tabelas 10 e 14 e Gráficos 4 e 8 pode supor-se que a maioria das colônias abortadas nesse período de tempo teriam atingido o estágio de 2 CMH.

As porcentagens de colônias no estágio de 1 CMH no cv. com resistência induzida (Tabela 9 e Gráfico 3) 192 e 288hs após a inoculação, foram significativamente menores do que no cv. suscetível MN, nesses períodos de tempo e menores do que as porcentagens obtidas após 96 e 144hs, para esse mesmo cv. (MN-R). Este fato pode ser devido à dificuldade encontrada para se distinguir as estruturas do fungo em colônias colapsadas sem afinidade pelo fluorocromo, e apresentando uma auto-fluorescência amarela semelhante as células necrosadas do hospedeiro. Desta forma, muitas colônias podem ter sido classificadas erroneamente num estágio anterior, como se tivessem se desenvolvido apenas até o estágio de VSE.

5.3.3 - Cultivar "Mundo Novo".

O cafeeiro cv. "Mundo Novo" com gene de resistência vertical *S_{H5}* inoculado com *H. vastatrix*, raça II predominantemente, mostrou tipo de reação 3-4, segundo escala OLIVEIRA (1955c), o que caracteriza alta suscetibilidade (Tabela 1). Esses dados se harmonizam com os obtidos por ESKES (1983). Apesar da alta suscetibilidade

desse cv. a essa raça do fungo, ca. de 40% das colônias foram abortadas nos diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 14 e Gráfico 8). A porcentagem maior de colônias abortadas (12,4%) apresentava 2 CMH. Somente 72hs após a inoculação, um número relativamente alto (45%) das colônias apresentava 2 CMH. A presença de metabolitos dos urediniosporos solubilizados na água de germinação poderia, em 72hs, ter induzido, no cv. suscetível, uma mudança em seu estado de resistência, e os urediniosporos que se desenvolveram mais lentamente poderiam ter sido afetados pelos efeitos deletérios da expressão do estado alterado de resistência da planta. Pode-se também considerar a possibilidade de que esse cv. "Mundo Novo" possua um certo grau de resistência horizontal, a qual seria responsável por essa porcentagem de colônias abortadas.

5.4 - Influência do hospedeiro na diferenciação dos primeiros haustórios em células epidérmicas

Segundo BUSHNELL (1972), pode se definir haustório como sendo o órgão especializado na absorção de nutrientes e que se forma dentro da célula hospedeira, como um prolongamento da célula-mãe de haustório. Somente nesta parte do fungo não existe parede celular do hospedeiro separando o citoplasma do fungo do da célula da planta, o que poderia facilitar, de certa forma, a troca de metabolitos entre os dois organismos. Assim, é de se esperar

que essa estrutura do fungo possa desempenhar um papel importante no fenômeno da resistência.

RAJENDREN (1968), relatou que em cv. suscetível os primeiros haustórios são diferenciados nas células subsidiárias, fato confirmado mais tarde por RIJO e RODRIGUES (1978). No presente trabalho foi também observado esse comportamento na maioria das colônias que formaram haustório, porém, foi constatado que mesmo o primeiro haustório pode, às vezes, ser diferenciado na célula mesofilica, geralmente naquelas células que delimitam a cavidade sub-estomática.

Apesar da parede celular dos haustórios apresentar afinidade pelo fluorocromo dietanol, a dificuldade de penetração do corante nas células hospedeiras inviabiliza o estudo quantitativo da formação dessas estruturas através da técnica de fluorocromação em discos de folhas descoloridos, segundo TIBURZY, et alii (1983). Por isso, empregou-se a técnica de retirada de fragmentos de epiderme, seguida da coloração dos mesmos com DAPI/sulfato de berberina, para a avaliação quantitativa dos primeiros haustórios diferenciados nas células epidérmicas.

Comparando-se os dados da Tabelas 9 e Gráfico 3 com os da Tabela 21 e Gráfico 14, e os da Tabela 10 e Gráfico 4 com os da Tabela 22 e Gráfico 15, pode-se

constatar que de forma semelhante, no cv. MN e no cv. com resistência induzida (M-R), a quase totalidade (ca. de 80 a 100%) das colônias apresentando 1 CMH diferenciaram 1 haustório na célula epidérmica, sendo que, no híbrido resistente Sch, apenas ca. de 66% o conseguem. Já das colônias apresentando 2 CMH, apenas ca. de 50% diferenciaram 2 haustórios em células epidérmicas nos cv. MN e MN-R, e ca. de 20% no híbrido Sch. Pelas observações feitas, não é possível afirmar se as colônias restantes não diferenciaram haustório ou o fizeram em células do mesófilo do hospedeiro.

Observando os dados que dizem respeito ao tamanho dos haustórios (Tabela 23 e Gráfico 15), observamos que os haustórios nas interações MN e MN-R tiveram um desenvolvimento semelhante até 72hs após a inoculação, sendo que, 96hs após a inoculação, os haustórios formados nas células epidérmicas do cv. MN-R mostraram um crescimento reduzido em relação aos do cv. MN. No híbrido Sch, já a 72hs após a inoculação, os haustórios apresentaram menor tamanho comparado àqueles desenvolvidos nas outras duas interações.

De forma semelhante, foi demonstrado não haver diferenças marcantes no desenvolvimento do primeiro haustório de *Melampsora lini* (Ehrenb.) Lev., raça 1, na var. nº1 de *Linum usitatissimum* L., (combinação incompatível) e de *M. lini*, raça 228 na var. nº7, (combinação compatível), nas primeiras 36hs após a inoculação. Porém a 48 e 60hs após a

inoculação, o haustório na interação incompatível apresentou-se menor do que na compatível (LITTLEFIELD et alii, 1969). HEATH (1982) relatou que nas interações entre feijão caupi cv. "TVu 4552" ou cv. "Purple Hull Pinkeye" e *U. phaseoli*, os primeiros sinais morfológicos de resistência observados foram após a formação do primeiro haustório. Em ambas as interações, os haustórios se desenvolveram normalmente por um certo período de tempo, mesmo após o necrosamento da célula hospedeira.

5.5 - Alterações morfológicas da célula hospedeira correlacionadas com o desenvolvimento do fungo.

O desenvolvimento das ferrugens em combinações incompatíveis é usualmente acompanhado de alterações morfológicas no hospedeiro. A resposta mais comum de incompatibilidade encontrada em interações com ferrugens é a necrose de células contendo haustórios (HEATH, 1982). Segundo ROHRINGER e HEITEFUS (1984), a necrose é melhor definida morfológicamente, porque muito pouco se conhece sobre os danos funcionais que o processo de necrotização ocasiona na célula. Uma célula totalmente necrótica apresenta-se eletronicamente densa ao microscópio eletrônico, e com uma desorganização tal que não é possível distinguir-se organelas individualizadas. Ao microscópio ótico, a célula necrótica é reconhecida pela cor marrom característica e, quando corada com corantes tipo azul de

Trypan, apresenta uma coloração diferente e muito mais intensa do que a célula normal. Ao microscópio de fluorescência, a célula necrótica é facilmente detectada por uma auto-fluorescência amarela característica.

Entre os exemplos de incompatibilidade, caracterizados pelo rápido necrosamento das células invadidas por haustórios, podem ser citadas as interações entre: *U.phaseoli* var. *vignae* e *U.sinensis* cvs "TVu 4552" e "Purple Hull Pinkey" (HEATH, 1982); *P.graminis* f.sp. *tritici*, raça 32 e *T.aestivum* "Prelude-Sr5" (TIBURZY, 1984).

No presente trabalho, foi constatado que, nas três interações de cafeeiro-ferrugem estudadas, 72 a 96hs após a inoculação, ocorreu o necrosamento de células epidérmicas ou mesofilicas contendo ou não haustórios, ou mesmo associadas a colônias apresentando ou não haustório. A porcentagem de colônias associadas a células necrosadas no hospedeiro foi significativamente maior no híbrido Sch (acima de 50%, 144hs após a inoculação) do que nas outras duas interações (abaixo de 20%, 144hs após a inoculação) (Tabelas 17, 18, 19 e 20 e Gráficos 10, 11, 12 e 13).

Em algumas interações incompatíveis entre hospedeiros e ferrugens, o necrosamento de células da planta aparentemente precede a inibição do desenvolvimento do fungo, como, por exemplo, na interação já citada entre a

var. de trigo com gene Sr5 de resistência ao gene P5 de virulência e da raça 32 da ferrugem do caule de trigo portadora daquele gene de virulência (TIBURZY, 1984). Nessa interação, o autor mostrou que o desenvolvimento do haustório ocorreu ao redor de 24hs após a inoculação; 32hs após a inoculação, as células epidérmicas invadidas mostraram sinais de necrosamento e, somente 72 a 96hs após a inoculação a inibição do crescimento da colônia foi detectada. Segundo o autor, durante o processo de necrosamento ocorreria deposição de compostos tipo lignina e calose na célula hospedeira impedindo o desenvolvimento posterior do haustório.

Já em outras interações, a inibição do crescimento do fungo foi detectada algumas horas antes do necrosamento das células hospedeiras. ONOE et alii (1976) mostraram que, embora o necrosamento das células hospedeiras seja bastante proeminente na interação entre *A.sativa* cv. "Shokan I" e *P.coronata* f.sp. *avena*, raça 226, ele ocorre 8hs após a inibição do desenvolvimento do fungo. No entanto, bem antes da formação do haustório, as primeiras alterações estruturais já haviam sido detectadas (12hs após a inoculação), como o aumento do número de vesículas de Golgi e a ocorrência de depósito de material eletronicamente denso nessas vesículas e na parede da célula hospedeira. Há evidências de que, nessa interação, eventos de primária

importância devem ocorrer na cavidade sub-estomática antes da penetração do haustório, e só após o fungo ter mostrado sinais de inibição de crescimento é que as células hospedeiras evidenciam o seu necrosamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que, como no segundo exemplo citado no parágrafo anterior, na interação incompatível Sch e raça II da ferrugem do café, o necrosamento das células hospedeiras ocorreu aparentemente após a inibição do fungo. Depois de 48hs da inoculação, o fungo já apresentava sinais de inibição de desenvolvimento, como pode ser visto pela análise das Tabelas 9 e 10 e dos Gráficos 3 e 4. Estas Tabelas e Gráficos mostram que o número de colônias nos estágios de 1 a 2 CMH é bem menor (40 a 50%) do que no cv. suscetível, e que 72hs após a inoculação, essa inibição fica bem evidenciada pelo reduzido tamanho das colônias, cerca de 30% do tamanho das colônias no cv. suscetível MN (Tabela 16 e Gráfico 9). No entanto, apenas um número insignificante de colônias apresentaram-se associadas a necrosamento da célula hospedeira 72-96hs após a inoculação, sendo que essa porcentagem só atingiu níveis próximos de 50%, 192hs após a inoculação.

Embora o necrosamento da célula hospedeira seja uma resposta frequente de plantas hospedeiras resistentes à infecção por ferrugens, seu papel no mecanismo de resistência e seu modo de ação ainda são motivos de muita

controvérsia. Os resultados de algumas pesquisas têm sido interpretados como uma indicação do papel primário do necrosamento na incompatibilidade, enquanto resultados de outras pesquisas sugerem que a necrose seja mais a consequência do que a causa da morte do fungo. Os dados do presente trabalho fornecem evidências de que, na interação incompatível estudada (Sch X raça II) o necrosamento não deve ser a causa primária da inibição do fungo, já que ocorreu posteriormente à inibição deste. Esses mesmos dados não trazem, porém qualquer indicação de que o necrosamento seja consequência da morte do fungo.

No presente trabalho, outra alteração morfológica observada, 72hs após a inoculação do fungo, foi um espessamento do citoplasma da célula hospedeira envolvendo o haustório formado na célula epidérmica do híbrido Sch (60%) (Tabela 24). Esse encapsulamento do haustório foi observado com pouca frequência no cv. suscetível (10%) e no cv. suscetível com resistência induzida (24%).

Esse tipo de resposta de resistência já foi relatado para outras interações envolvendo outras ferrugens, como por exemplo para *U. sinensis* (Torner) cv. "Queen Anne" e *U. phaseoli* (Pers.) var. *vignae* (HEATH, 1971). Segundo o autor, enquanto a necrose induzida pelo haustório na célula hospedeira acarreta a morte imediata do haustório e da CMH, no encapsulamento do haustório, peculiar ao cv. "Queen

Anne", o haustório sobrevive por um tempo, pois algumas outras CMH são ainda formadas, posteriormente. Através de estudos histológicos, foi detectada a presença de compostos tipo calose nesses espessamentos que aparentemente são formados à partir da membrana da célula hospedeira envolvendo o haustório, o que dificulta assim a troca de metabolitos entre os dois organismos. A desnutrição do fungo, causada pela impossibilidade do haustório absorver nutrientes, poderia ser uma das causas da morte do fungo.

Embora os resultados do presente trabalho não contribuam de forma decisiva para o estabelecimento dos eventos primários que determinariam a incompatibilidade entre cafeeiros resistentes ou com resistência induzida e a ferrugem, eles fornecem evidências que constituem um passo a mais nos esforços de se esclarecer o mecanismo de resistência envolvido nas interações consideradas, além de estarem de acordo com as reflexões escritas por HEATH em 1982, diante dos resultados dos estudos histológicos e ultraestruturais feitos até aquela data. A autora sugere ser possível generalizar que: (1) exista uma grande diversidade entre diferentes interações incompatíveis e cada uma delas exiba suas próprias características em termos de grau de crescimento do fungo ou tipo e tempo de resposta do hospedeiro, e do aparente efeito dessas respostas sobre o fungo; (2) o desenvolvimento do fungo e a resposta do

hospedeiro podem diferir em distintos sítios de infecção num mesmo tecido de uma dada interação. Essas ponderações apontam a possibilidade de que diferentes eventos devam ser de fundamental importância para diferentes interações ou mesmo em diferentes sítios de infecção num mesmo tecido; ou ainda, que o evento primário seja único e universal, não relacionado com a maioria ou com todas as respostas observadas até o momento.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

(1)- O desenvolvimento do fungo *H. vastatrix*, nas combinações incompatíveis estudadas, não sofreu inibição em estágios de pré-penetração, mas somente após a diferenciação da vesícula sub-estomática, quando o fungo já se encontrava no interior da folha.

(2)- A expressão do mecanismo de resistência inerente ao híbrido "Sarchimor", portador do gene de resistência *Sh6*, com reação de resistência tipo i, pode ser detectada ao microscópio entre 48 e 72hs da inoculação do fungo, quando:

(2a)- As colônias (73,7%) foram abortadas antes de diferenciarem a segunda célula-mãe de haustório (2 CMH), e destas um grande número (38,1%) atingiu o estágio de 1 CMH com 1 haustório na célula epidérmica.

(2b)- O crescimento da colônia se restringiu a poucas células além da cavidade sub-estomática, atingindo em média uma extensão de 26µm, 96hs após a inoculação.

(2c)- Somente ca. de 96hs após a inibição do desenvolvimento do fungo, as células hospedeiras da epiderme e do mesófilo mostraram sinais de necrosamento. Portanto

aparentemente a morte do fungo antecedeu a morte da(s) célula(s) hospedeira(s).

(2d)- As 192hs após a inoculação, a maioria dos sítios de infecção, apresentou-se associada a mais de 5 células hospedeiras necrosadas, 1 a 2 na epiderme e 3 ou mais no mesófilo. As estruturas do fungo também mostraram sinais de necrosamento, apresentando-se colapsadas e com auto-fluorescência amarela.

(2e)- Associadas a colônias abortadas, não só células hospedeiras contendo haustórios se apresentaram necrosadas como também células vizinhas àquelas invadidas por haustórios, ou mesmo células associadas a colônias que não diferenciaram CMH.

(3)- A resistência induzida em "Mundo Novo" pela aplicação de extrato de fermento, aparentemente é expressa através de mecanismo(s) distinto(s) da resistência genética inerente ao híbrido "Sarchimor". Pois, nessa interação, as alterações nas estruturas do fungo que devem ter ocorrido, foram de tal ordem que impossibilitaram a visualização do fungo 72hs após a inoculação, pelas técnicas utilizadas no presente trabalho, visto que, o número de sítios de infecção por cm^2 diminuiu 80% a partir desse horário. Além disso, o abortamento das colônias devido ao(s) mecanismo(s) de resistência induzida aparentemente não foi acompanhado de necrosamento de células hospedeiras.

(4)- Na interação compatível, entre o cv "Mundo Novo", portador do gene de resistência *S_{H5}*, e a raça II de *H. vastatrix*, uma porcentagem considerável (ca. de 40%) de colônias foram abortadas, antes de atingirem o estágio de 3 CMH. Algumas dessas colônias abortadas mostraram-se associadas à reação necrótica de células hospedeiras, tanto da epiderme como do mesófilo; contendo ou não contendo haustórios. O número de células hospedeiras necrosadas por colônia abortada raramente excedeu a dois. Esse fato sugere que o cv. "Mundo Novo" também expressou um certo grau de resistência, que pode ser considerada uma resistência horizontal ou uma resistência induzida. Esta última ocorreria no intervalo de tempo entre a deposição dos uredíniosporos na epiderme da folha e a penetração dos haustório nas células hospedeiras ($\pm$ 48hs), devido a metabolitos do fungo liberados na água de germinação,

(5)- O primeiro haustório foi geralmente diferenciado na célula epidérmica, entre 48hs e 72hs após a inoculação, independente do hospedeiro envolvido na interação. Na interação incompatível *Sch*-raça II, o(s) primeiro(s) haustório(s) tiveram seu crescimento inibido, e mostraram-se encapsulados em uma formação aparentemente oriunda da célula hospedeira.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALLEN, R.F. A cytological study of infection of Baart and Kanred wheats by *Puccinia graminis tritici*. *J. of Agric. Res.*, Washington, D.C, 23(3): 131-51, jan. 1923.
- ALLEN, R.F. Cytological studies of forms 9, 21 and 27 of *Puccinia graminis tritici* on Khapli Emmer. *J. of Agric. Res.*, Washington, D.C., 32(8): 701-25, abr. 1926.
- BECKER, S.M. Coffee leaf rust and its epidemiology. In: GTZ *La lucha contra la roya del cafe. Coffee rust control*. Rossodorf, Verlags GmbH, 1979. p.1-8
- BENAC, R. La rouille commune du cafier (*Coffea* sp.): Etude du champignon *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dans les tissus foliaires. *Caryologia, Firenze*, 34(2): 141-77. 1981.
- BERETTA, M. J.G.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of the inducing action in coffee plants. *Summa Phytopath.*, Piracicaba, 3(1): 66-70, jan./fev./ mar. 1977.

BERGAMIN FILHO, A. Possibilidades do emprego da resistência vertical no melhoramento do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. *Summa Phytopath.*, Piracicaba, 2(2):103-8, abr./mai./jun. 1976.

BERGAMIM FILHO, A. e KIMATI, H. Variedades resistentes. In: GALLI, F. et alii. ed. *Manual de Fitopatologia*, 2ª edição, São Paulo, Editora Agrônoma Ceres Ltda, 1978. vol. I, cap. 17:297-324

BERKELEY, M.J. The Gardeners' Chronicle. *The Gardeners Chronicle and Agricultural Gazette*, London, 06 de nov. 1869. p.11.

BETTENCOURT, A.J. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de fatores de resistência *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para os principais cultivares de *Coffea arabica* L. *Junta de Investigações Científicas do Ultramar CIFC*, Lisboa. 1981. 93p.

BETTENCOURT, A.J. Características agronômicas de seleções derivadas de cruzamentos entre Híbrido de Timor e as variedades Caturra, Vila Sarchi e Catuai. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, Oeiras, 1983. Comunicações. CIFC, Oeiras - Portugal, 1984. p.353-71.

BETTENCOURT, A.J. and NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* B. et Br. *Agronomia Lusitana*, Alcobaça, 31: 285-92, abr.1971.

BUSHNELL, W.R. Physiology of fungal haustoria. *An. Rev. of Phytopath.*, Palo Alto, 10: 151-76. 1972.

CARVALHO, A. Pesquisas sobre a resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix* em São Paulo. *Garcia de Orta, Ser. Est. Agron.*, Lisboa, 9(1-2): 129-36. 1982.

CHAMBERLAIN, D. W. Heat-induced susceptibility to non-pathogens and cross-protection against *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. *Phytopath.*, St.Paul 62(6): 645-6, jun. 1972.

CORREA Jr., A. e MORAES, W. B. C. Indução de estruturas de infecção de *Hemileia vastatrix* sobre substratos artificiais. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Londrina, 1987. *Fitopat. Bras.*, Brasília, 12(2): 124, jun. 1987 (Resumo).

DEAN, A.R. and KUC, J. Induced systemic protection in plants. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, 3(5): 125-9, 1985.

- DISHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R.L. and WOLFROM, M. L. ed. *Methods in carbohydrate chemistry*, New York, Academic Press, 1962 vol I: p.478- 512
- ESKES, A.B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Wageningen, 1983. 140p. (Doutoramen-to-Landbouwhogeschool te Wageningen)
- FERNANDEZ, M. R. and HEATH, M. C. Cytological responses induced by five phytopathogenic fungi in a nonhost plant, *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 64(3): 648-57, mar. 1986.
- FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rusts-its genetics and other implications. *Phytopath.*, St. Paul, 45 (12):680-5, dez. 1955.
- GOPALKRISHNAN, K.S. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. *Mycol.*, Lancaster, 43 (3), 271-83, mai./ jun. 1951.
- GRAMBOW, H.J. and GRAMBOW, G.E. The involvement of epicuticular and cell wall phenols of the host plant in the "in vitro" development of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Z. fuer Pflanzenphysiol.*, Stuttgart , 90(1): 1-9. 1978.

- GRAMBOW, H.J. and RIEDEL, S. The effect of morphogenically active factors from host and nonhost plants on the "in vitro" differentiation of infection structures of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Plant Path.*, London, 11: 213-24. 1977.
- HAMMERSCHMIDT, R. and KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Path.*, London, 20: 61-71. 1982.
- HAHN, M.G. and ALBERSHEIM, P. Host pathogens interactions. XIV- Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol.*, Lancaster, 62 (1): 107-11, jul. 1978.
- HARR, J. and GUGGENHEIM, R. Contributions to the biology of *Hemileia vastatrix* I. SEM-investigations on germination and infection of *Hemileia vastatrix* on leaf surfaces of *Coffea arabica*. *Phytopath. Z.*, Berlin, 92(1):70-5, mai. 1978.
- HEAGLE, A.S. and MOORE, M.B. Some effects of moderate adult resistance to crown rust of oats. *Phytopath.*, St. Paul, 60 (3):461-6, mar. 1970.
- HEATH, M.C. Haustorial sheath formation in cowpea leaves immune to rust infection. *Phytopath.*, St. Paul, 61 (4): 383-8, abr. 1971.

HEATH, M.C. Ultrastructure of host and non-host reactions to cowpea rust. *Phytopath.*, St. Paul, 62(1): 27-38, jan. 1972.

HEATH, M.C. Light and electron microscope studies of the interactions of host and nonhost plants with cowpea rust-*Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol. Plant Path.*, London, 4: 403-14. 1974.

HEATH, M.C. Fungal growth, haustorial disorganization, and host necrosis in two cultivars of cowpea inoculated with an incompatible race of cowpea rust fungus. *Physiol. Plant Path.*, London, 21 (3): 347-59, nov. 1982a.

HEATH, M.C. Host defense mechanisms against infection by rust fungi. In: SCOTT, K. J. and CHAKRAVORTY, A.K., ed. *The rust fungi*. New York, Academic Press, 1982b. p.223-45.

HEATH, M.C. and HEATH, I.B. Ultrastructure of an immune and a susceptible reaction of cowpea leaves to rust infection. *Physiol. Plant Path.*, London, 1: 277-87. 1971.

KITAJIMA, E.W. Ultraestrutura do fungo causador da ferrugem do cafeeiro nos tecidos da hospedeira. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 24: 267-72. 1972.

KOCHMAN, J.K. and BROWN, J.F. Development of the stem rust fungi on leaves, sheaths and peduncles of oats. *Phytopath.*, St. Paul, 65 (12):1404-9, dez. 1975.

KUC, J. Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In: BAILEY, J. and DEVERALL, B. ed. *The dynamics of host defence*, New York, Academic Press, 1983. p.191-221.

KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. CHET, I., ed. *Innovative approaches to plant disease control*, New York, John Wiley and Sons, Inc., 1987. p.255-73.

LEGUIZAMON, J.C. Contribution à la connaissance de la résistance incomplète du caféier à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Montpellier, 1983. 182p. (Doutorado- Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier).

LITTLEFIELD, L.J. Histological evidence for diverse mechanisms of resistance to flax rust, *Melampsora lini* (Ehrenb.). *Physiol. Plant Pathol.*, London, 3:241-7. 1973.

LITTLEFIELD, L.J. and ARONSON, S.J. Histological studies of *Melampsora lini* resistance in flax. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 47(11): 1713-7, nov. 1969.

MacCAIN, J.W. and HENNEN, J.F. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Phytopath.*, St. Paul, 74(6):714-21, jun. 1984.

MARES, D.J. Microscopic study of the development of yellow rust (*Puccinia striitiformis*) in a wheat cultivar showing adult resistance. *Physiol. Plant Path.*, London, 15:289-96. 1979.

MARTIN, C.D.; LITTLEFIELD, L.J.; MILLER, J.D. Development of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* in seedling of slow rusting wheats. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, 68(2):161-6. 1977.

MARTINS, E.M.F.; TIBURZY, R.; MORAES, W.B.C. Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopat. Bras.*, Brasilia, 10(3): 627-36, out. 1985a.

MARTINS, E. M.F.; BERETTA, M. J.G.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. *Fitopat. Bras.*, Brasilia, 10(3): 521-9, out. 1985b.

MARTINS, E.M.F.; MARIA, A.C. de; GRUNEWALDT-STOECKER, G.; MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. *Fitopat. Bras.*, Brasilia, 11(4) :891-8, dez. 1986.

- MATIELLO, J.B. et alii. In: *Cultura de café no Brasil, Manual de recomendações*, Rio de Janeiro, IBC-GERCA, 5ª edição, 1985. p.580.
- MAYNE, W.W. Physiologic specialisation of *Hemileia vastatrix* B. and Br. *Nature*, London, 129(2):510, abr. 1932.
- MENDGEN, K. Der Infektionsverlauf von *Uromyces phaseoli* bei anfälligen und resistenten Bohnensorten. *Phytopath. Z.*, Berlin, 93 (2):295-313. 1978.
- McNEAL, F.H.; KONZAK, C.F.; SMITH, E.P.; TATE, W.S.; RUSSELL, T.S. A uniform system for recording and processing cereal research data. Washington, DC USA. Agricultural Research Service. Document. ARS/M71/34-121, 42p. 1971.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M.J. G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. *Summa Phytopath.*, Piracicaba, 2 (1): 39-43, jan./fev./mar. 1976.
- NIKS, R. E. Early abortion of colonies of leaf rust, *Puccinia hordei*, in partially resistant barley seedlings. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 60 (5): 714-23, mai. 1982.

NORONHA-WAGNER, M. and BETTENCOURT, A.J. 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.*, Ottawa, 45(11): 2021-31, nov. 1967.

OLIVEIRA, A.B. d' As ferrugens do cafeeiro. *Rev. do Cafe Port.*, Lisboa, 1(4): 5-13. 1954; 2(5):5-12. 1955a; 2(6):5-15. 1955b; 2(7):9-17. 1955c; 2 (8): 5-22. 1955d; 4(16):5-15. 1957.

OGLE, H.J. and BROWN, J.F. Quantitative studies of the post-penetration phase of infection by *Puccinia graminis tritici*. *Ann. of Ap. Biol.*, Cambridge, 67(3): 309-19, abr. 1971.

ONOE, T.; TANI, T.; NAITO, N. Changes in the fine structure of Shokan I oat leaves at the early stage of infection with incompatible race 226 of crown rust fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan, Tokyo*, 42:481-8. 1976.

PRUSKY, D.; DINDOR, A.; JACOBY, B. The sequence of death of haustoria and host cells during the hypersensitive reaction of oat crown rust. *Physiological Plant Path.*, London, 17:33-40. 1980.

- RAJENDREN, R.B. Pathologic-histology and morphology of haustoria in *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Mycopath. Mycol. Appl.*, Dordrecht, 36: 107-12. 1968.
- RAYNER, R. W. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). *Ann Appl. Biol.*, Cambridge, 49(3): 497-505, out. 1961.
- RAYNER, R.W. Micología, historia y biología de la roya del cafeto. IICA Turrialba. Publicación Miscelánea nº 94, 68p., 1972.
- RAZAFINDRAMAMBA, R. Biologie de la rouille du Cafèier. *Rev. de Mycol.*, Paris, 23: 177-200. 1958.
- REISENER, H.J.; TIBURZY, R.; KOGEL, K.H. Mechanism of resistance of wheat against stem rust in the Sr5/P5 interaction. In: BAILEY, J.A., ed. *Biology and molecular biology of plant-pathology interactions Series, H: Cell Biology*, Berlin, Springer-Verlag, 1986. vol. 1: 141-8.
- RICHMOND, S.; KUC, J.; ELLISTON, J.E. Penetration of cucumber leaves by *Colletotrichum lagenarium* is reduced in plants systemically protected by previous infection with the pathogen. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 14: 329-38. 1979.

RIJO, L. Histopathology of the hypersensitive reaction to (tumefaction) induced on *Coffea* spp. by *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.. *Agronomia Lusitana*, Alcobaca, 33: 427-31, mai. 1972.

RIJO, L. e RODRIGUES Jr., C.J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L.. *Garcia de Orta, Ser. Est. Agr.*, Lisboa, 5(1-2):23-24. 1978.

RIJO, L.; RODRIGUES Jr., C. J.; VASCONCELOS, M.I. Immunity on the coffee-orange rust association. Histopathological aspects. *Garcia de Orta Ser. Est. Agr.*, Lisboa, 9(1-2):101-4. 1982.

RIJO, L. and SARGENT, J.A. The fine structure of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 52(6):1363-7. 1974.

RODRIGUES Jr., C.J. Coffee leaf races and resistance. In: FULTON, R.H., ed., *Coffee rust in the Americas*, St Paul, The American Phytopathological Society, 1984. p.41-58.

RODRIGUES, Jr., C.J. Ferrugens das plantas tropicais. In: CURSO DE APERFEIÇOAMENTO DE PATOLOGIA DAS PLANTAS TROPICAIS E SUBTROPICAIS, Oeiras, out., 1985.

- RODRIGUES Jr., C.J.; MEDEIROS, E.F.; LEWIS, B.G. The relationship between a phytoalexin like response in coffee leaves. (*Coffea arabica* L.) and incompatibility with *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Physiol. Plant Path.*, London, 6:35-41. 1975.
- ROHRINGER, R. and HEITEFUSS, R. Histology and molecular biology of host-parasite specificity. In: BUSHNELL, W.R. and ROELFS, A.P., ed., *The cereal rusts*. New York, Academic Press, 1984. cap.7:193-229.
- ROHRINGER, R.; KIM, W.K.; SAMBORSKI, D.J. A histological study of interactions between avirulent races of stem rust and wheat containing resistance genes Sr5, Sr6, Sr8 or Sr22. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 57 (4): 324-331, fev. 1979.
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, R.; MORAES, W.B.C. *Bacillus thuringiensis*- A new perspective for an induced protection to coffee leaf-rust. *Journal of Phytopathology* 1988 (no Prelo).
- SACCAS, A.M. and CHARPENTIER, J. Caracteres microscopiques du champignon sur la plante hôte. In: SACCAS, A.M. and CHARPENTIER, J., ed., *La rouille des cafeiers due a la Hemileia vastatrix Berk. et Br.*. Paris, Imprimerie JOUVE, 1971. p.28-32.

- SCHIEBER, E. and ZENTMYER, G.A. Coffee rust in the Western hemisphere. *Plant Disease*, St Paul, 68(2): 89-93, feb. 1984.
- SKIPP, R.A. and SAMBORSKY, D.J. The effect of the Sr6 gene for host resistance on histological events during the development of rust in near-isogenic wheat lines. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 52 (5): 1107-15, mai. 1974.
- SILVA, D. M. e NOGUEIRA, N. L. Observações ao microscópio eletrônico do processo de infecção do cafeeiro pela *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.. *Summa Phytopath.*, Piracicaba, 3 (1):89-92, jan./fev./març. 1977.
- STAKMAN, E.C. and HARRAR, J.G. *Principles of Plant Pathology*. New York, The Ronald Press Company, 1957. 581p.
- STERMER, B.A. and HAMMERSCHMIDT, R. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidases activity in cucumbers. *Physiol. Plant Path.*, London, 25 (2):239-49, set. 1984.
- SOTOMAYOR, I.A.; PURDY, L.H.; TRESE, A.T. Infection of sugar-cane leaves by *Puccinia melanocephala*. *Phytopath.*, St. Paul, 73 (5): 695-9, mai. 1982.

STENZEL, K.; STEINER, U.; SCHOENBECK, F. Effect of induced resistance on the efficiency of powdery mildew haustoria in wheat and barley. *Physiol. Plant Path.*, London, 27(3):357-67, nov. 1985.

TANI, T.; YAMAMOTO, H.; ONOE, T.; NAITO, N. Initiation of resistance and host cell collapse in the hypersensitive reaction of oat leaves against *Puccinia coronata avenae*. *Physiol. Plant Path.*, London, 7: 231-42, 1975a.

TANI, T.; OUCHI, S.; ONOE, T.; NAITO, N. Irreversible recognition demonstrated in the hypersensitive response of oat leaves against the crown rust fungus. *Phytopath.*, St. Paul, 65 (11):1190-3, nov. 1975b.

TANI, T.; YAMAMOTO, H.; KADOTA, G.; NAITO, N. Primary recognition and subsequent expression of resistance in oat leaves hypersensitively responding to crown rust fungus. In: TOMYAMA, K.; DALY, J.M.; URITANI, I.; OKU, H.; OUCHI, S. ed.. *Biochemistry and cytology of plant parasite interactions.*, New York, Elsevier Scientific Publishing Company, 1976. cap. 4.6:124-35.

THIRUMALACHAR, M.J. and NARASIMAHAN, M.J. Studies on the morphology and parasitism of *Hemileia* species on Rubiaceae in Mysore. *Ann. Bot.*, London N.S. 11: 77- 89. 1947.

TIBURZY, R. Untersuchungen zur Bedeutung der hypersensitiven Reaktion befallener Weizenzellen als Resistenzfaktor gegen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Aachen, 1984. 145p. (Doutorado - Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinisch-Westfaelischen Teschnischen Hochschule Aachen, BDR).

TIBURZY, R; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Visualization of *Hemileia vastatrix* structures in coffee leaves by fluorescence microscopy. *Fitopat. Bras.*, Brasilia 8(3):461-6, out. 1983.

WAARD, H.M. Coffee leaf disease. *Sessional Papers*, XVII, Ceylon, Colombo: George J.A. Skeen, Government Printer, 1881.

WAARD, H.M. On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. (The fungus of the Coffee disease of Ceilon). *Q.J. Microbiol. Sic.*, London, 22: 1-11, 1882.

WYNN, W.K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. *Phytopath.*, St. Paul, 66(2):136-46, feb. 1976.

YARWOOD, C. E. Cross protection with two rust fungi. *Phytopath.*, St. Paul, 46 (10):540-4, out. 1956.