ESTUDOS BIOQUIMICOS E FISIOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO

(*Hemileia vastatrix* Berk & Br.)

ARY CORREA JUNIOR
Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. Walkyria B. C. 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 Con-
centração: Microbiologia Agrícola

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Corrêa Junior, Ary

C824e Estudos bioquímicos e fisiológicos da diferenciação de estruturas de infecção da ferrugem do café (Hemileia vastatrix Berk & Br.). Piracicaba, 1990.

146p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Café - Doença 2. Ferrugem do café - Bioquímica 3. Ferrugem do café - Fisiologia I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 633.73

ESTUDOS BIOQUIMICOS E FISIOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO
DE ESTRUTURAS DE INFECÇÃO DA FERRUGEM DO CAFÉ
(*Hemileia vastatrix* Berk & Br.)

Ary Corrêa Junior

Aprovado em 02/08/90

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira	UNICAMP
Prof. Dr. Darcy Martins da Silva	ESALQ/USP
Prof. Dr. Mario Barreto de Figueiredo	Inst. Biol./S.P.

Prof. Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes
Orientadora

Aos meus avôs:

Anna,

Josepha,

Karllys e

Oracy

Dedico

A G R A D E C I M E N T O S

O autor expressa os mais sinceros agradecimentos

A Profa. Dr. Walkyria B. C. Moraes pela orientação e auxílio durante o período deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira pela amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Ao Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) pelo financiamento das pesquisas.

Aos amigos dos laboratórios de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo e de Serologia da UNICAMP pelos momentos agradáveis que me propiciaram.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Biologia do fungo <i>H. vastatrix</i>	12
2.2. Desenvolvimento e diferenciação celular em fungos causadores de ferrugens em vegetais....	19
3. MATERIAL E METODOS.....	36
3.1. Plantas utilizadas.....	36
3.2. Coleta e estocagem de uredinosporos de <i>H.</i> <i>vastatrix</i>	38
3.3. Germinação e diferenciação de apressórios em presença de compostos exógenos.....	39
3.4. Germinação e formação de estruturas de infecção em uredinosporos de <i>H. vastatrix</i> sobre água, folhas destacadas de cafeeiro cv. Mundo Novo, membranas de poliestireno com e sem ranhuras e membranas de colódio com e sem óleo de parafina.....	41
3.5. Efeito de vapores de β -ionona, 1-nonanol e compostos voláteis da folha do cafeeiro na germinação e diferenciação de apressórios em <i>H. vastatrix</i>	43
3.6. Análise bioquímica de uredinosporos germina- dos e não-germinados de <i>H. vastatrix</i>	45

3.6.1. Quebra de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i>	45
3.6.2. Quantidade total de lipídeos observados em urediniosporos germinados e não germinados de <i>H. vastatrix</i>	46
3.6.3. Quantidade total de carboidratos somáticos observados em urediniosporos germinados e não germinados de <i>H. vastatrix</i>	50
3.6.4. Carboidratos de parede de algumas estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i> evidenciados com lectinas fluorescentes.....	51
3.6.5. Extração de proteínas de urediniosporos não germinados de <i>H. vastatrix</i>	54
3.6.6. Extração de proteínas solúveis de urediniosporos germinados de <i>H. vastatrix</i> ...	56
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Germinação e diferenciação de apressórios de <i>H. vastatrix</i> sobre água e na presença de compostos exógenos.....	58
4.2. Germinação e diferenciação de estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i> sobre suportes artificiais.....	62
4.3. Germinação e formação de apressórios em urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> na presença de vapores de β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de caféiro.....	68
4.4. Percentagem de quebra de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> em almofariz, e na presença de carbóvão e nitrogênio líquido.....	86
4.5. Quantidade de lipídeos observados em urediniosporos e estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i>	88
4.6. Carboidratos somáticos recuperados de urediniosporos e estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i>	91

4.7. Carboidratos de parede de urediniosporos e estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i> evidenciados por lectinas fluorescentes.....	95
4.8. Proteínas recuperadas de urediniosporos e estruturas de infecção de <i>H. vastatrix</i>	102
5. DISCUSSÃO.....	106
6. CONCLUSÕES.....	125
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	129

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Percentual de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* que diferenciaram apressórios após 12 h de incubação na presença de diferentes concentrações de 1-nonanol.....61
- Figura 2: Uredíniosporos (UR); tubo germinativo (TG); septo (ST) e apressório de *H. vastatrix* formados sobre membranas de poliestireno com ranhuras.....64
- Figura 3: Percentagem de uredíniosporos de *H. vastatrix* germinados (A); germinados que formaram apressórios (B) e apressórios que desenvolveram vesícula sub-estomática sobre diferentes suportes de germinação.....69
- Figura 4: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* incubados por 24 h sobre água, membranas de poliestireno com e sem ranhuras e colódio com e sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, 1-nonanol, β -ionona e compostos emanados por folhas de cafeeiros...78
- Figura 5: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* que diferenciaram apressórios, após 24 h de incubação, sobre membranas de poliestireno com e sem ranhuras e colódio com e sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro.....85
- Figura 6: Percentagem de quebra de uredíniosporos de *H. vastatrix* incubados por 0 e 1 h em água destilada, após trituração em almofariz, almofariz na presença de nitrogênio líquido, almofariz com carborundum e almofariz com nitrogênio líquido e carborundum.....87
- Figura 7: Total de lipídeos recuperado de 50 mg de uredíniosporos não germinados de *H. vastatrix*, após a extração por diferentes períodos em éter etílico.....89

Figura 8:	Quantidade de lipídeos recuperados de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> incubados por diferentes períodos sobre membranas de colódio com óleo.....	90
Figura 9:	Quantidade de carboidratos recuperados do precipitado P2 de urediniosporos não-germinados de <i>H. vastatrix</i> , após extração por vários períodos em etanol 80 % e água.....	92
Figura 10:	Quantidade de carboidratos recuperados do precipitado P2 de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina por diferentes períodos de extração em etanol 80 % e água.....	94
Figura 11:	Urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> marcados com lectina de germe de trigo (WGA) fluorescente.....	97
Figura 12:	Tubo germinativo de <i>H. vastatrix</i> (6 h de incubação) marcado com Con-A fluorescente.....	98
Figura 13:	Célula-mãe de haustório (CM) e haustório (H) de <i>H. vastatrix</i> marcados com WGA fluorescente.....	101
Figura 14:	Quantidade de proteína recuperada de 100 mg de macerado de esporo de <i>H. vastatrix</i> após extração, por diferentes períodos, em tampão Tris-HCl pH 8.0 50 mM + EDTA 50 mM + SDS 1 % + 1 % de β -mercaptoetanol.....	103
Figura 15:	Quantidade de proteína extraídas de 100 mg de macerado de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> , incubados por diferentes períodos sobre membranas de colódio com óleo de parafina.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Percentual de germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> incubados por 12 h no escuro em câmara úmida (100 % de U. R.), na presença de compostos exógenos.....	59
Tabela 2:	Percentagem de germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> sobre diferentes suportes de germinação.....	63
Tabela 3:	Percentagem de urediniosporos germinados de <i>H. vastatrix</i> que formaram apressórios sobre diferentes suportes.....	66
Tabela 4:	Percentagem de apressórios de <i>H. vastatrix</i> , que desenvolveram vesícula sub-estomática sobre diferentes suportes de germinação.....	67
Tabela 5:	Percentagem de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> mantidos sobre água na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.....	71
Tabela 6:	Percentagem de germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> mantidos sobre membranas de poliestireno sem ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.....	72
Tabela 7:	Percentagem de germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> mantidos sobre membranas de poliestireno com ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.....	74
Tabela 8:	Percentagem de germinação de urediniosporos de <i>H. vastatrix</i> mantidos sobre membranas de colódio com óleo na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiros.....	75

- Tabela 9: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio sem óleo na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.....76
- Tabela 10: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix*, mantidos sobre água na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiros cv. Mundo Novo que diferenciaram apressórios.....79
- Tabela 11: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo que diferenciaram apressórios.....80
- Tabela 12: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, que formaram apressórios.....81
- Tabela 13: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de poliestireno sem ranhuras, na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo que diferenciaram apressórios.....83
- Tabela 14: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de poliestireno com ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo que diferenciaram apressórios.....84
- Tabela 15: Fluorescência observada em uredíniosporos não-germinados e germinados por 3, 6 e 9 h, após o tratamento com lectinas fluorescentes.....96

Tabela 16: Fluorescência observada em apressórios, célula-mãe de haustório e haustório de <i>H.</i> <i>vastatrix</i> tratados com lectinas fluorescentes.....	100
--	-----

ESTUDOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO DE
ESTRUTURAS DE INFECÇÃO DA FERRUGEM DO CAFÉ (*Hemileia*
vastatrix Berk & Br.).

Autor: Ary Corrêa Junior

Orientadora: Profa. Dra. Walkyria B. C. Moraes

RESUMO

O objetivo básico deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias que permitissem a formação de estruturas de infecção de *H. vastatrix* sobre suportes artificiais de germinação. Buscou-se também o isolamento de carboidratos, lipídeos e proteínas a partir das estruturas fungicas desenvolvidas *in vitro*. Os protocolos desenvolvidos neste trabalho servirão para futuros estudos envolvendo os mecanismos de reconhecimento patógeno x hospedeiro.

A taxa média de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* incubados em soluções de sacarose, manose e galactose (0,1 M) foi superior ao observado em uredíniosporos mantidos em água destilada. Vapores de β -ionona também estimularam a germinação do fungo.

Observou-se que membranas de colódio com óleo de parafina e poliestireno com ranhuras induziam a formação de apressórios em uredíniosporos germinados de *H. vastatrix*. 1-nonanol (vapores e em solução), também estimularam a germinação do fungo.

Em uredíniosporos não germinados da ferrugem do cafeeiro 44 % do peso total correspondem à fração lipídica e 19 % a carboidratos.

Durante a germinação e alongação do tubo germinativo os níveis de carboidratos observados diminuíram, enquanto durante a diferenciação do apressório foram os níveis de lipídeos que decresceram. Os níveis de proteína que, durante a germinação decresceram, mostraram-se similares ao observado em uredíniosporos não germinados.

Foi observada a diferenciação de vesículas sub-estomáticas sobre membranas artificiais. Estas vesículas sub-estomáticas eram menores do que as desenvolvidas em folhas de cafeeiro infectadas, não tendo sido observado qualquer desenvolvimento posterior. Este fato talvez se deva a exaustão das reservas metabólicas do uredíniosporo, o que pode indicar a necessidade do aporte de metabólitos do hospedeiro para o fungo durante esta fase.

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL STUDIES ON CELLULAR
DIFFERENTIATION IN THE INFECTIVE PROCESS OF THE COFFEE
RUST (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.).

Author: Ary Corrêa Junior

Adviser: Profa. Dra. Walkyria B. C. Moraes

SUMMARY

The purpose of this work was to establish a methodology in order to obtain the differentiation of infection structures of the coffee leaf rust on artificial supports. It was also tried the isolation of carbohydrates, lipids and proteins from the fungal structures developed *in vitro*. These protocols will be used in further studies on the recognition process in rust fungi.

The rate of germination of urediniospores incubated in sucrose, manose and galactose (0.1 M) solutions was higher than that observed for urediniospores incubated in distilled water. β -ionone vapors also stimulated the urediniospores germination.

Apressoria differentiation was stimulated by the nature of germination supports used. Membranes of

colodium with paraffin oil and polystyrene with scratches were inductive for the appressoria development.

Lipids and carbohydrates were isolated from non-germinated urediniospores. It was observed that 44 % of the total weight of the spore corresponded to lipids and 19 % to carbohydrates. During the germ-tube growth, the sugar levels decreased, showing that carbohydrates were used at the beginning of the development. Data also showed that the lipids were used during appressoria formation. The protein content decreased during the germ-tube growth but, during the appressoria development, it was similar to that observed in non-germinated urediniospores.

The development of substomatal vesicles on artificial membranes was observed. Those vesicles were different from those observed in coffee leaves and showed no further development.

1. INTRODUÇÃO

Em vegetais, durante o desencadeamento de um processo patogênico, ocorrem modificações tanto no patógeno como no hospedeiro. Estas modificações permitem o estabelecimento da moléstia, no caso de uma interação patógeno x hospedeiro, compatível ou desencadeiam a resposta de resistência da planta no caso de uma interação incompatível.

No decorrer do processo evolutivo, a seleção natural privilegiou o estabelecimento de interações patógeno x hospedeiro das quais resultassem um menor dano ao hospedeiro e um máximo aproveitamento pelo patógeno das condições que a planta oferece. Desta seleção resultaram estratégias que permitem à planta responder disparando os seus mecanismos específicos de resistência quando reconhecem as estruturas do patógeno. Em contrapartida, a seleção natural privilegiou patógenos com a capacidade de reconhecerem mas não serem reconhecidos

pelo hospedeiro.

Com o uso, no campo, de variedades vegetais artificialmente melhoradas para resistência, estabeleceram-se condições para a seleção mais rápida de patógenos virulentos, devido à grande pressão seletiva gerada pela alta homogeneidade na população de hospedeiros. Isto leva a necessidade do desenvolvimento constante, por parte do melhorista vegetal, de novas linhagens de hospedeiro com características diferentes de resistência e que possibilitam maior tempo de vida útil no campo.

Um melhor conhecimento dos processos de reconhecimento e desenvolvimento da interação patógeno x hospedeiro poderá levar ao estabelecimento de novas características que possam ser utilizadas pelos melhoristas vegetais e pesquisadores envolvidos em estratégias de controle de patógenos. Assim, poderão ser desenvolvidos melhores protocolos de controle, com menor impacto ambiental e que permitam o controle da moléstia, no campo, por maior período.

Um modelo biológico de interesse neste tipo de trabalho é a interação entre fungos causadores de ferrugens em vegetais e seus hospedeiros. Estes fungos

tem, no geral, alta especificidade pelo hospedeiro e apresentam várias estruturas que servem de marcadores do processo de reconhecimento patógeno x hospedeiro.

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., causador da ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro, é um modelo que pode ser estudado no Brasil com esta finalidade. Este fungo foi pela primeira vez caracterizado no país em 1970 (MEDEIROS, 1970), no estado da Bahia, e hoje pode ser encontrado em todas as regiões que cultivam café, sendo a mais grave moléstia que acomete a cafeicultura nacional (VALLECILLO, 1980 e AKUTSU, 1981).

H. vastatrix possui descrita apenas a fase uredinial como infectiva. O fungo inicia o seu desenvolvimento pela germinação dos urediniosporos, na parte abaxial da folha do cafeeiro, com a formação de um ou mais tubos germinativos. O tubo germinativo encontrando um estômato diferencia uma estrutura globosa, o apressório. A partir do apressório, forma-se um "peg" de infecção, que penetrando pela abertura do estômato, ganhará a câmara subestomática, onde ocorrerá a diferenciação de uma vesícula subestomática, que após a formação de um septo dará origem a duas ou mais células mãe de haustório. Desta, emerge um "peg" de penetração que, penetrando através da parede de uma célula da folha,

formará intracelularmente um haustório.

Como definem MENDGEN et alii (1988) o processo infectivo em ferrugens de vegetais pode ser dividido em três fases. A fase de "sinalização", que se inicia na germinação e vai até a formação do apressório. A fase de "reconhecimento", que vai do "peg" infectivo até a formação da célula mãe de haustório e a fase "parasítica", que se inicia com a formação do "peg" de penetração e se caracteriza com a diferenciação do haustório. Estas fases estão relacionadas a três processos de reconhecimento, que são demarcados por três processos de diferenciação celular que correspondem a formação do apressório, da célula mãe de haustório e do haustório.

Os fatores que levam ao estabelecimento do processo de reconhecimento nestas três fases, bem como como os eventos bioquímicos e fisiológicos que deles decorrem, não são ainda totalmente conhecidos. Isto se deve, principalmente, ao fato de serem as ferrugens de vegetais parasitas ecologicamente obrigados. Este fato dificulta o cultivo do fungo em meio de cultura artificial, além de tornar extremamente difícil separar de um extrato total de folhas infectadas, as estruturas de origem fúngica.

Algumas ferrugens formam estruturas de infecção sobre substratos artificiais. Este fato permite que algumas fases sejam obtidas sem o consórcio do hospedeiro, possibilitando assim a purificação e análise de seus componentes celulares, além da observação do comportamento do fungo diante de compostos administrados exogenamente.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias que permitam o desenvolvimento de algumas estruturas de infecção de *H. vastatrix* sobre substratos artificiais, para posterior análise do seu conteúdo protéico, de carboidratos e lipídios. Estes grupos de compostos são de fundamental importância para trabalhos envolvendo os mecanismos celulares de reconhecimento do patógeno e do hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo infectivo de fungos causadores de ferrugens de vegetais é complexo e envolve a diferenciação de diversas estruturas fúngicas. Esta diferenciação, além dos processos bioquímicos e fisiológicos próprios do parasita, depende do reconhecimento por parte do patógeno de algumas estruturas da planta. Assim, por exemplo, no caso das ferrugens que penetram pelo estômato, após a germinação do uredíniosporo em condições naturais, o apressório somente é formado quando a extremidade do tubo germinativo encontra o sítio próprio de penetração. Subsequentemente, a vesícula sub-estomática, somente se formará na cavidade sub-estomática, e o haustório apenas intracelularmente.

Temos aqui três processos que dependem do reconhecimento, por parte do fungo, de estruturas específicas do hospedeiro. Em contrapartida, os mecanismos de defesa da planta, em uma interação incompatível,

somente serão ativados após o reconhecimento por parte da planta, das estruturas do fungo.

O melhor conhecimento dos mecanismos, que levam ao reconhecimento patógeno x hospedeiro, poderá levar ao estabelecimento de estratégias de controle das moléstias dos vegetais, mais eficientes e com menor impacto ambiental, selecionando novas características que poderão ser utilizadas pelos melhoristas de vegetais no desenvolvimento de plantas resistentes, permitindo o estabelecimento de inibidores específicos dos processos fisiológicos do patógeno e também auxiliando na caracterização de melhores indutores de resistência.

Os fungos causadores de ferrugens em vegetais são um bom modelo neste tipo de pesquisa pois apresentam alta especificidade por seus hospedeiros, e possuem várias fases durante o seu desenvolvimento. Os fenômenos de diferenciação celular nestes fungos podem também ser considerados como marcadores do reconhecimento patógeno x hospedeiro.

Em nossas condições um fungo que poderia ser útil neste tipo de pesquisa é aquele causador da ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro, *H. vastatrix*.

A primeira observação da ferrugem alaranjada do cafeeiro foi feita no Ceilão por THWAITES em 1868 (SACCAS & CHARPENTIER, 1971), no distrito de Maldusima, que enviou o material contaminado à Inglaterra para ser examinado por BERKELEY & BROOME (1869). Estes pesquisadores concluíram que se tratava de uma infecção causada por um novo gênero de fungos da família Pucciniaceae. Este material constitui a espécie-tipo do fungo causador da ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro, *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., 1869.

Após a caracterização do fungo em 1869 no Ceilão, seguiram-se observações sucessivas da moléstia em várias partes do mundo. Assim o fungo foi constatado em Sumatra em 1876, Ilhas Fidji e República Sul-Africana em 1878, Java em 1879, Ilhas Maurício em 1882, Ilhas Reunião e Madagascar em 1886, Vietnã em 1888, Filipinas e Bornêo em 1890, Tanzânia, Samoa e Novas Hébridas em 1894, Nova Caledônia em 1910, Quênia em 1913, Costa do Marfim, Camarões e Libéria em 1951, Angola 1966, Porto Rico em 1903, chegando ao Brasil em 1970 (ROBER, 1953; MEDEIROS, 1970; SACCAS & CHARPENTIER, 1971; SCHIEBER, 1972; WELLMAN, 1975).

No Ceilão, uma epifitotia da moléstia

diminuiu a produção de 42000 toneladas/ano para cerca de 3000 toneladas/ano de café em apenas 4 anos. A área de plantio foi reduzida para 14170 ha entre 1893-1895, quando, no período de 1866-1868, ocupava uma área de cerca de 68787 ha. Após esta epidemia, o plantio de café deixou de ser estimulado pelo governo que passou a incentivar a produção de chá e seringueira (CRAMER, 1957).

No Brasil, apesar dos prejuízos decorrentes da moléstia serem menos severos, a ferrugem do cafeeiro se apresenta como a mais séria patologia do cafeeiro (VALLECILLO, 1980; AKUTSU, 1981). O fungo *H. vastatrix* foi pela primeira vez constatado infectando cafeeiros na Bahia e, apesar das várias medidas tomadas na época para conter a disseminação da moléstia, hoje sua presença é verificada em todas as regiões cafeeiras do país.

As perdas na produção decorrentes da infecção pela ferrugem do café em cafeeiros suscetíveis, foi estudada por vários pesquisadores como: MAGALHAES (1964); NUTMAN & ROBERTS (1970); ALMEIDA et alii (1976); DUARTE et alii (1976) e MORAES (1980) que a correlacionaram com a diminuição da área fotossintética e abscisão prematura das folhas onde o fungo se desenvolve.

Inicialmente recomendou-se para o controle

da moléstia o tratamento dos cafezais brasileiros com fungicidas cúpricos que foram, dentre os vários tipos testados, os mais eficientes (ALMEIDA et alii, 1973, 1974a, 1974b; 1974c; MANSK et alii, 1973; ANDRADE et alii, 1974; ZAMBOLIN & CHAVES, 1974; ZAMBOLIN et alii, 1974, 1975; FIGUEIREDO et alii, 1981; CAMPACCI & CHIBA, 1983 e CARNEIRO FILHO et alii, 1973, 1983).

Outra estratégia que pode ser utilizada para o controle da ferrugem do cafeeiro é a introdução de variedades resistentes à moléstia, o que vem sendo tentado desde o século passado.

Em 1870, o primeiro cultivar resistente foi caracterizado em um cafezal fortemente atacado pela moléstia na região de Coorg, na Índia. Em 1911, o agricultor indiano KENT, selecionou outro cultivar resistente à moléstia em sua propriedade na região de Mysore. Este cultivar, em homenagem ao agricultor, levou o seu nome (BETTENCOURT, 1981).

No Brasil, a seleção de variedades resistentes foi iniciada muito antes do aparecimento das raças de *H. vastatrix* no país, com a seleção de variedades resistentes caracterizadas no Centro de Investigação das

Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal. ALMEIDA et alii (1974d); FAZUOLI et alii (1974); PAULINO et alii (1974); HOOGSTRATEN et alii (1983),- aferiram a grande variabilidade de genótipos destas variedades e selecionaram dentre elas, aquelas com melhor potencial para produção em nossas condições.

Mais recentemente, MORAES et alii (1976); BERETTA et alii (1977); MARTINS et alii (1985 ;1986), demonstraram a possibilidade de se obter uma resposta de resistencia à infecção com *H. vastatrix* por parte de cafeeiros geneticamente suscetíveis, através do tratamento das folhas com diferentes indutores bióticos e abióticos. Assim, a aspersão da folha do cafeeiro com filtrados de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ou com *Bacillus thuringiensis* Berliner, tornam resistentes cafeeiros da variedade Mundo Novo, que são totalmente suscetíveis à infecção pelo fungo.

Todos estes métodos de controle se beneficiariam dos conhecimentos gerados em trabalhos levando em conta a bioquímica e a fisiologia do fungo e os mecanismos de reconhecimento patógeno x hospedeiro. Assim, melhores indutores de resistência poderiam ser selecionados, a partir do conhecimento dos resíduos de açúcares presentes na parede da célula mãe de haustório e

haustório, que devem ser os responsáveis pela resposta de incompatibilidade na interação patógeno x hospedeiro segundo MENDGEN et alii (1985). O melhor conhecimento dos mecanismos bioquímicos da diferenciação celular do fungo, poderia resultar na caracterização de inibidores específicos do desenvolvimento do patógeno. O melhor conhecimento da fisiologia da interação patógeno x hospedeiro poderia servir de valioso auxílio para o melhorista, pela seleção de novas características a serem introduzidas no hospedeiro, que, por sua vez, poderiam resultar no aumento do tempo de vida útil, no campo do cultivar melhorado.

2.1. Biologia do fungo *H. vastatrix*

BERKELEY e BROOME, em 1869, caracterizaram a moléstia ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro por apresentar: "pequenas manchas brancas orbiculares na superfície inferior da folha, constituída de diminutos tufos de fitas flexuosas encimadas por esporos sub-reniformes, presos obliquamente pela base e extremamente 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 da moléstia se manifestar caracteristicamente nas folhas do cafeeiro lesões podem ser observadas, se bem que esporadicamente, em outras partes da planta como observou THIRUMALACHAR & NARASINHAM (1947) em *Coffea liberica* L.. Eventualmente frutificações do fungo aparecem nos cotilédones e frutos da planta. GOPALKRISHNAN (1951), relatou a presença de lesões nos pecíolos de plantas infectadas.

Segundo a classificação de GOPALKRISHNAN (1951), os uredínios de *H. vastatrix* são do tipo supraestomático A, ou seja, flexuosos em fascículos com base em forma de bulbo, e que emergem sem ruptura do tecido. Já RAJENDRAN (1967), consideram a possibilidade, se bem que rara, de urédias subepidérmicas emergirem a partir do parênquima lacunoso, com a ruptura da epiderme da folha do cafeeiro.

As dimensões dos uredíniosporos de *H. vastatrix* são variadas. SACCAS & CHARPENTIER (1971), medindo uredíniosporos da ferrugem do cafeeiro provenientes de diversas espécies de café constatou, para *C. robusta*, dimensões médias de 35.75 x 21.22 μ m. Para esporos coletados de *C. excelsa* observou uma média de 31.5

x 22.7 μ m. Em *C. arabica* as dimensões médias eram de 30.25 x 22.5 μ m e em *C. canephora* var. Nana as dimensões médias foram estimadas em 30.55 x 22.0 μ m.

A germinação dos uredíniosporos se dá obrigatoriamente na presença de água no estado líquido, mas a completa imersão dos esporos é prejudicial ao processo (MAYNE, 1932; SACCAS & CHARPENTIER, 1971).

WARD (1882), observou a formação de até cinco tubos germinativos em *H. vastatrix*, sendo três o número mais freqüente, apesar de apenas um chegar ao desenvolvimento pleno. Para DELACROIX & MAUBLANC (1911), apenas dois tubos germinativos eram formados em pontos opostos do esporo.

RAYNER em 1961, observou que a germinação se dava após o contato do esporo com água no estado líquido entre 2-4 a 6-7 h a 23 °C. O período mínimo de entumescimento era de 1 h e o apressório se formava entre 6 e 8 h. A germinação podia ser interrompida pela presença de luz até um comprimento do tubo germinativo de 30 μ m. Após o período sensível à luz observava-se, em sua presença, uma redução na velocidade de crescimento do tubo germinativo, embora o apressório ainda pudesse ser

formado.

Segundo NUTMAN et alii (1963), a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* só se dá no escuro ou em baixa intensidade luminosa e na presença de água no estado líquido. A temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 28 °C a germinação não se processava, observando-se um ótimo de germinação em 22 °C. A temperaturas acima de 24 °C a porcentagem de germinação diminuía.

HOCKING (1968), testando várias intensidades luminosas e correlacionando-as com a taxa de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix*, constatou que intensidades luminosas maiores de 21528 lux reduziam fortemente a germinação e que mais de 4 h de escuro eram necessárias para um máximo de germinação. Uma exposição luminosa por 2 h seguida da incubação dos esporos em obscuridade resultava em inibição da germinação.

A germinação se inicia com o aparecimento de uma pequena protuberância cilíndrica, incolor e involta por uma membrana, que rapidamente evolui para um tubo germinativo cilíndrico que parece surgir a partir da membrana interna do urediniospore e emergir pela pressão do protoplasto do esporo sobre o pore germinativo (SACCAS & CHARPENTIER, 1971).

Quando germinado sobre água a 24 °C, observa-se um tubo germinativo de 14 a 140 μ m de comprimento e 6 a 8 μ m de largura após 4 h. O comprimento da hifa, após 12 h de germinação, está por volta de 95 a 250 μ m e observa-se a presença de ramificações secundárias e terciárias. Entre 18 e 24 h o comprimento das hifas varia de 120 a 450 μ m com ramificações que, em algumas vezes chegam a quarta ordem (SACCAS & CHARPENTIER, 1971).

Ocasionalmente observa-se, sobre água, a formação de apressórios que tem a forma de uma vesícula sacular ovóide ou piriforme medindo, após 6-8 h de germinação, de 15-18 x 8-14 μ m (SACCAS & CHARPENTIER, 1971).

Sobre folhas de caféiro, NUTMAN & ROBERTS (1962), observaram que apenas 24 % dos uredíniosporos formaram apressórios sobre os estômatos da folha, enquanto 14 % pareceram penetrar sem a diferenciação de qualquer estrutura especial.

Após a formação do apressório, ocorrem os fenômenos responsáveis pela penetração do fungo no interior da folha do hospedeiro. Isto se dá pela formação,

por parte do fungo, de um "peg" de infecção que, passando através do óstio do estômato, ganha a cavidade sub-estomática, onde ocorrerá a diferenciação de uma estrutura globosa ou amebóide como descrita por SACCAS & CHARPENTIER (1971), ou em forma de âncora como afirma RIJO & RODRIGUES (1978), ou ainda com várias morfologias como cita MARTINS (1988).

As primeiras células do cafeeiro a serem invadidas pelo fungo são, geralmente, as células subsidiárias do estômato (RAJENDREN, 1967). Isto ocorre pela diferenciação de uma hifa de penetração a partir da septação da vesícula sub-estomática que, em contato com a parede das células vegetais, penetra no interior da célula e diferencia um haustório, que pode apresentar morfologia variada (RIJO & RODRIGUES, 1978; MARTINS, 1988).

As hifas do micélio intercelular, que se formam após o aparecimento do primeiro haustório, antes de penetrarem na célula formam um septo e diferenciam uma célula-mãe de haustório. Esta se caracteriza por apresentar uma estrutura semelhante a um disco na zona de contato entre a célula fúngica e a célula vegetal (RAJENDREN, 1967).

Observam-se vários tipos de hifas no

micélio intercelular, que foram classificadas por MACCAIN & HENNEN (1984), como hifas pioneiras, nutritivas e corredoras. As hifas pioneiras, se caracterizam por serem mais delgadas, com diâmetro médio de 3.5 a 4.5 μ m, e apresentarem poucos septos e ramificações e uma taxa média de 1 haustório por 10 células hospedeiras. As hifas nutritivas ou alimentadoras, se caracterizam por terem de 4.7 a 6.2 μ m de diâmetro, apresentarem muitos haustórios (6 a 7 por 10 células hospedeiras) e por serem observadas tanto no parênquima lacunoso como no palicádico. As hifas corredoras, que normalmente unem um protossoro a outro, não apresentam haustórios e são pouco septadas.

Em condições ótimas de temperatura e umidade, normalmente ocorre a germinação dos urediniosporos de *H. vastatrix* na face inferior das folhas do cafeeiro, ao redor de 8 h após a inoculação. Os apressórios começam a ser notados sobre os estômatos de 12 a 14 h, e a penetração se observa após 48 h. Depois de 72 h, o micélio já se encontra desenvolvido entre as células mesofilicas e duas semanas após a inoculação podem ser observadas manchas cloróticas na face inferior da folha. Ao redor de 25 dias após a inoculação, observa-se a presença de urediniosporos nas lesões cloróticas (WARD, 1892).

O período de incubação e esporulação de *H. vastatrix*, parece ser dependente das condições ambientais, da idade da folha e do cultivar utilizado (WARD, 1982; RAYNER, 1961; ESKES, 1983).

Apesar do grande número de trabalhos envolvendo o desenvolvimento do fungo *H. vastatrix*, são relativamente raros os que se dedicam a bioquímica e os mecanismos que permitem ao patógeno reconhecer as estruturas do hospedeiro.

2.2. Desenvolvimento e Diferenciação Celular em Fungos Causadores de Ferrugens em Vegetais

O processo de germinação de esporos de fungos causadores de ferrugens em vegetais depende de condições adequadas de temperatura, luminosidade e umidade. Urediniosporos de *P. graminis* f. sp. *tritici*, como diversas outras ferrugens, tem a germinação inibida por intensidades luminosas acima de 10000 lux (SHARP et

alii, 1958; GIVAN & BRONFIELD, 1964a; 1964b; LUCAS et alii, 1975). KNIGHTS & LUCAS (1980) observaram, entretanto, que se a irradiação se estender continuamente por mais de 24 h uma recuperação parcial do poder germinativo ocorre. Geralmente, o período sensível a inibição, da germinação de esporos de ferrugens, pela luz, coincide com o período de dissolução do poro germinativo. Após o início da formação do tubo germinativo o desenvolvimento do fungo não é mais interrompido pela presença de luz (CHANG et alii, 1974; HESS et alii, 1975; KNIGHTS & LUCAS, 1980).

A presença de auto-inibidores de germinação em fungos causadores de ferrugens em vegetais é comum e muitos compostos com esta propriedade foram isolados e caracterizados a partir de urediniosporos dos patógenos (MACKO et alii, 1970; 1971a; 1971b; 1972; MACKO et alii, 1977; FOUNDIN & MACKO, 1974; ALLEN, 1976).

Geralmente, os auto-inibidores de germinação são solúveis em água. Esta propriedade impede que urediniosporos iniciem sua germinação sem a presença de água no estado líquido, pois além do processo de embebição, a água é necessária para a retirada do composto autoinibidor da germinação do esporo. Outra consequência desta propriedade é impedir a germinação de urediniosporos

quando agrupados, pois a concentração do autoinibidor da germinação é muito elevada em condições de alta densidade de esporos (ALLEN, 1976; MACKO et alii, 1976). Estes mecanismos garantem que a germinação ocorra apenas nas condições ideais, impedindo o ressecamento do fungo durante a germinação e diminuindo a competição intraespecífica pelo sítio de infecção.

Muitos dos auto-inibidores de germinação são derivados dos ácidos cinâmico e ferúlico, como o metil cis-3-4-dimetoxycinamato, que inibe a germinação das ferrugens do feijão, girassol, milho e amendoim, e o metil cis-4-hidroxi-3-metoxi-cinamato (metil-cis-ferulato), obtido da ferrugem do trigo (MACKO et alii, 1970; 1971a; 1971b; 1972; 1977; FOUNDIN & MACKO, 1974).

HESS et alii (1975), propuseram que o metil-cis-ferulato impede a dissolução do poro germinativo, através da inibição das enzimas digestivas responsáveis pelo processo. Como a lavagem dos esporos da ferrugem do trigo, também prevenia o efeito inibidor da germinação pela luz (CHANG et alii, 1974), KNIGHTS & LUCAS (1980), sugeriram que os eventos de inibição da germinação pela luz e pelos autoinibidores de germinação estariam interrelacionados. Já ALLEN (1976), observou que a

dissolução do poro germinativo só se dava em condições aeróbicas o que, segundo o autor, poderia indicar que a inibição da germinação não ocorreria sobre as enzimas digestivas do poro germinativo ou seu substrato.

Algumas substâncias, naturalmente encontradas em vegetais, e que lhes conferem aroma nas flores e nas frutas, são também responsáveis pela estimulação da germinação de algumas ferrugens. Assim, nonanal estimula a germinação da ferrugem do trigo (FRENCH & WEINTRAUB, 1957), soja, milho, girassol, amendoim e feijão (RINES et alii, 1974). Outra classe de estimuladores de germinação são os análogos estruturais de alguns autoinibidores endógenos de germinação, como é o caso de β -ionona e cinamaldeído, que também são encontrados como compostos naturais em algumas plantas. Este fatos podem explicar a germinação de algumas ferrugens sobre as plantas hospedeiras na natureza (STAPLES & MACKO, 1984).

MACKO et alii (1976) observaram, que o efeito estimulador de germinação sobre *P. graminis* f. sp. *tritici*, prevalecia sobre o efeito inibidor resultante da alta densidade de esporos, mas não foi constatada qualquer reação entre o estimulador e o autoinibidor de germinação.

Após a germinação, durante a elongação do tubo germinativo, vários processos ocorrem resultando num crescimento orientado da hifa sobre o substrato. Estes processos visam direcionar o crescimento do patógeno em relação ao ponto de infecção. Assim, o tubo germinativo da ferrugem do trigo cresce formando um ângulo reto em relação as nervuras das folhas de trigo (JOHNSON, 1934). Isto se daria, segundo LEWIS & DAY (1972), devido a disposição ordenada de cristais de cera na epiderme das folhas de trigo, que se dispõem paralelamente ao sentido do crescimento do tubo germinativo de *P. graminis* f. sp. *tritici*. Comportamento similar de crescimento ordenado em relação ao substrato é observado em outros patossistemas, como por exemplo na ferrugem do feijão (MAHESHWARI & HILDEBRANDT, 1967; STAPLES & MACKO, 1980). Este comportamento deve ser o responsável pela maximização da possibilidade do patógeno encontrar o sítio de penetração no hospedeiro (LEWIS & DAY, 1972).

Aparentemente, estes dados poderiam sugerir algum tipo de interação química entre as estruturas do patógeno e a cutícula do hospedeiro. WYNN (1976), entretanto, demonstrou através da utilização de réplicas plásticas da epiderme de folhas de trigo, totalmente livres de resíduos da planta, que urediniosporos de *P.*

graminis f. sp. *tritici* eram capazes de desenvolver tubos germinativos ordenadamente e perpendicularmente ao molde das nervuras da folha, como também desenvolver apressórios, sobre os moldes dos estômatos.

Vários eventos de crescimento orientado do tubo germinativo sobre substratos artificiais foram caracterizados. ALLEN (1923, 1934) e DICKINSON (1949a, 1949b, 1969, 1970, 1971, 1972) evidenciaram, além do efeito da topografia do substrato, a ação de gradientes de umidade, CO₂, e luminosidade.

2

BALLS (1905) demonstrou, sobre membranas de borracha perfuradas, hidrotropismo positivo durante a elongação do tubo germinativo de *P. glumarum*. Já ROBINSON (1914), observando esporídios de *P. malvacearum*, caracterizou eventos de heliotropismo e hidrotropismo negativo, correlacionando estes eventos a um gradiente de gás carbônico ou oxigênio.

Para EDWARDS & BOWLINGS (1986), um gradiente de pH na superfície da folha do feijoeiros, seriam os responsáveis pelo evento de crescimento orientado dos tubos de *Uromyces vicia-fabae* em relação ao estômato.

Outro comportamento de crescimento orientado apresentado por algumas ferrugens de vegetais é o fototropismo negativo, observado na ferrugem do trigo por GETTKANDT (1954). Para explicar este tipo de comportamento, CHANG & CALPOUZOS (1973), sugeriram que o tubo germinativo funcionaria como uma lente cilíndrica, focando a luz na parede oposta à origem da fonte de luz. Como neste caso, a luz inibe o crescimento da parede celular e o resultado é um crescimento curvilíneo oposto à luz. Este efeito parece ser mediado pelos comprimentos de onda vermelho e vermelho extremo, de maneira similar ao observado na plômula do feijão, indicando a existência de um sistema fotorreceptor (CALPOUZOS & CHANG, 1971; LUCAS et alii, 1975; SCHNEIDER & MURRAY, 1979).

Durante o processo germinativo ocorrem modificações no conteúdo total de lipídeos, com a rápida utilização, por parte da ferrugem do trigo, dos ácidos palmítico, oléico, linolêico e 9,10 epoxioctadecanóico. (SHU et alii, 1954; REISENER & JAGER, 1966; JOHNSON & FREAR, 1962; CALTRIDER et alii, 1963; ALLEN, 1965). DALY et alii (1967), além de modificações no metabolismo de lipídeos, evidenciou como sendo principais as alterações no padrão de carboidratos e álcoois, com o extensivo uso de trealose, manitol e arabitól.

Para o processo germinativo de uredíniosporos de *U. appendiculatus*, LANGENBACH & KNOCHE (1971a, 1971b) observaram que ocorria inicialmente uma diminuição dos níveis de fosfolípidos presentes no esporo. Entretanto, após 3 h de germinação, os níveis de fosfolípidos aumentavam consideravelmente. Os autores correlacionaram estas alterações com os processos de degradação e síntese de membranas.

Apesar dos uredíniosporos da ferrugem do feijão, durante a germinação, apresentarem ribossomos com capacidade plena de síntese de proteínas, como demonstraram STAPLES et alii (1972), os níveis de proteínas do esporo mantem-se constante durante a germinação, evidenciando que a síntese de novas proteínas desempenha um papel secundário durante o processo. Já TROCHA & DALY (1970) mostraram um aumento de 25 % no conteúdo total de proteínas 90 min após o início de germinação.

Após os tubos germinativos dos fungos causadores de ferrugens em vegetais se localizarem sobre o sítio de infecção, o que ocorre, geralmente, é a diferenciação de uma estrutura globosa ou amebóide na extremidade do tubo germinativo, a divisão dos núcleos no

tubo de germinação, a migração destes núcleos para o apressório e a formação de um septo separando o apressório do tubo germinativo (EMNETT & PARBERY, 1975).

A diferenciação do apressório está na dependência de diversos fatores, embora WYNN (1976) afirme que apenas um, a topografia do substrato seja necessário para o início da diferenciação, em *P. graminis* f. sp. *tritici*.

HOCH et alii (1987) caracterizaram para a ferrugem do feijão, que uma única depressão de 0.5 μ m de profundidade em uma superfície plástica de poliestireno, pode estimular a formação de apressórios. Esta preparação simula o tamanho da borda das células subsidiárias, e desta indução, resulta um ciclo de divisão nuclear no dicário do tubo germinativo e um apressório morfológicamente perfeito.

Outros artifícios podem ser usados para induzir a formação de apressórios sobre substratos artificiais, como o tratamento de tubos germinativos de *P. graminis* f. sp. *tritici* por 1h a 30 °C (MAHESWARI & HILDEBRANDT, 1967a; 1987b). a utilização de acroleína (MACKO et alii, 1978), substâncias isoladas da cutícula da

folha (GRAMBOW & REISNER, 1976), ions potássio e AMP cíclico (AMPC) (STAPLES et alii, 1983a, 1983b, 1983c).

Os apressórios da ferrugem do trigo formados após o choque térmico, podem apresentar mais de uma seção de divisão nuclear, mas apresentam morfologia normal (HOCH & STAPLES, 1987).

Quando se utiliza acroleína como indutor da diferenciação do apressório, em *P. graminis* f. sp. *tritici*, estes se apresentam funcional e morfológicamente normais, com apenas uma divisão dos dois núcleos haplóides (MACKO et alii, 1978).

Quando do tratamento dos tubos germinativos com AMPC o que se observa é a divisão nuclear e a formação do septo, mas sem a diferenciação do apressório. Entretanto, tratamentos com inibidores da fosfodiesterase, que aumentam os níveis de AMPC, induzem a formação de apressórios normais (HOCH & STAPLES, 1984).

Tratamentos que reconhecidamente induzem a despolimerização de microtúbulos, como o choque térmico, ultrassom, citocalasina E, griseofulvina, etc. induzem a divisão do núcleo, enquanto tratamentos que promovem a estabilização dos microtúbulos, como taxol e D O, permitem

a formação do apressório, mas não a sessão de divisão nuclear (STAPLES & HOCH, 1982; STAPLES et alii, 1983a, 1983b). Indicando que após o estímulo, para o início da divisão nuclear, é necessário a estabilidade dos microtúbulos, que possivelmente funcionam como transmissores do sinal da ponta do tubo germinativo até os núcleos (HOCH & STAPLES, 1983a, 1983b, 1985; STAPLES et alii, 1983a, 1983b, 1983c).

STAPLES et alii (1983c) definiram os termos tigmiodiferenciação, como a diferenciação de estruturas de infecção mediada pela topografia do substrato e quimiodiferenciação como a diferenciação mediada por compostos químicos.

O reconhecimento das estruturas externas da folha do hospedeiro por *U. appendiculatus* parece envolver proteínas da matrix extracelular da parede do tubo germinativo do fungo. Tratamentos com pronase E, em tubos germinativos induzidos tigmiotropicamente para a diferenciação, inibem a formação do apressório. Pronase E denaturada por calor não apresenta efeito inibidor, e a enzima ativa não altera a germinação ou a elongação do tubo germinativo (EPSTEIN et alii, 1985; 1987).

Após a indução para diferenciação tigmiotrópicamente, HOCH & STAPLES, (1983a; 1983b; 1985; 1987) observaram que, na região da extremidade do tubo germinativo ocorria uma desordenação dos microtúbulos da célula. Observaram também que em células não diferenciadas os microtúbulos se distribuíam paralelamente às paredes do fungo, enquanto que em células induzidas para a diferenciação, os mesmos estavam dispersos na extremidade do tubo germinativo (STAPLES & HOCH, 1982, 1987).

Aparentemente a sequência de eventos que leva a formação dos apressórios se inicia com a interação entre estruturas proteínase-sensíveis da matriz extracelular de *U. appendiculatus* com a topografia do substrato. Desta interação resulta a desordenação dos microtúbulos da ponta do tubo germinativo o que resultaria na formação do apressório. Neste intervalo ocorreria a divisão do núcleo, que depende da integridade do citoesqueleto do tubo germinativo (HOCH & STAPLES, 1987).

Mensageiros secundários de diferenciação parecem estar envolvidos no processo, como os níveis intracelulares de cálcio e AMPc (HOCH et alii, 1987). Já foram isoladas e caracterizadas por LACCETTI et alii (1987) proteínas aceptoras de cálcio (calmodulina) em tubos germinativos de *U. appendiculatus*.

Durante a diferenciação do apressório observa-se, inicialmente um aumento da síntese de DNA (STAPLES et alii, 1975), previamente a divisão dos núcleos na ferrugem do feijão. Nesta fase também observa-se, quando da diferenciação induzida tigmiotrópicamente, um aumento da síntese protéica, com pelo menos 15 novas proteínas sendo sintetizadas, indicando, segundo STAPLES et alii (1976), a existência de pelo menos 15 genes que foram denominados por eles como genes específicos de diferenciação. Para a diferenciação induzida por choque térmico, observa-se um padrão diferente de síntese protéica, com quatro proteínas tendo suas sínteses amplificadas. Estas proteínas foram denominadas, por STAPLES & HOCH, (1987), como proteínas induzidas por choque térmico.

Quanto às interações com a planta hospedeira MENDGEN et alii (1988) dividiram os eventos da patogênese de ferrugens vegetais em três fases:

(1) - Fase de reconhecimento, em que, durante a fase de elongação do tubo germinativo, ocorre o reconhecimento da cutícula da planta. Nesta fase, se observam algumas modificações na planta hospedeira. Neste

período o suporte de germinação do patógeno pode ser substituído por membranas artificiais que, dependendo da sua arquitetura, permitem o desenvolvimento normal do patógeno, quando, então ocorre a diferenciação do apressório e o fungo ganha o espaço intrafoliar.

Algumas estruturas da superfície do tubo germinativo podem servir de elicitores para a síntese de alguns compostos de estresse da planta (YAMAMOTO et alii, 1977), como a produção de etileno (PARADIES & ELSTNER, 1980). O desenvolvimento da ferrugem do trigo na epiderme das folhas do hospedeiro pode levar ao aumento do total de lignina na folha (MOERSCHBACHER et alii, 1986). Para a ferrugem do feijão, o desenvolvimento do tubo germinativo externamente à folha leva ao acúmulo de faseolina intrafoliarmente. Quitina, encontrada em quase todas as ferrugens como constituinte das paredes do tubo germinativo, também é capaz de elicitar a síntese de fitoalexinas em diversos hospedeiros (YOUNG et alii, 1982; DARVILL & ALBERSHEIM, 1984). Nesta fase observam-se apenas respostas inespecíficas à infecção (KIM & HOWES, 1987).

(2) - Fase de sinalização, quando ocorre o contato da vesícula sub-estomática, hifa infectiva e célula-mãe de haustório, com o meio interno da planta e as paredes celulares do hospedeiro. Deste contato resulta, no

caso de uma interação compatível, a supressão da síntese dos compostos de estresse do hospedeiro, o que permite o desenvolvimento posterior do hospedeiro. Acredita-se que, nesta fase, ocorram interações moleculares entre carboidratos do patógeno com proteínas do hospedeiro, que resultariam no estabelecimento ou não da compatibilidade da interação (MENDGEN et alii, 1988).

O autor observou também modificações no conteúdo de carboidratos da superfície do fungo. Assim, as ferrugens da soja *Phakopsora pachirhizii* e do trigo, que contêm quitina na superfície externa da parede celular do tubo germinativo, após a diferenciação do apressório, passam a acumular β -1- $\rightarrow$ 3 e β -1- $\rightarrow$ 6 glucanas na parede (KAPDORIA & MENDGEN, 1985). Não se observa quitina na hifa infectiva destes fungos (MENDGEN et alii, 1985). Foi também evidenciado neste trabalho que, algumas alterações no perfil de carboidratos eram relacionadas à raça do patógeno.

MENDGEN (1988) sugerem que estes carboidratos seriam os responsáveis pela inibição de síntese de alguns compostos envolvidos nos mecanismos de defesa da planta hospedeira em interações incompatíveis.

Nesta fase observa-se, na interação entre

P. coronata e aveia, durante o desenvolvimento da vesícula sub-estomática, o aumento da atividade das enzimas fenilalanina-amoníase (YAMAMOTO et alii, 1977) e lipoxigenase (YAMAMOTO & TANI, 1986). No decorrer da formação da hifa infectiva nota-se uma diminuição da atividade dessas enzimas.

Possivelmente, a região fibrilar externa da parede da hifa infectiva seja a responsável pelas interações entre o patógeno e o hospedeiro (MENDGEN et alii, 1988). Infelizmente, esta região não é evidenciada em preparações microscópicas normais, mas alguns de seus componentes provavelmente estão presentes no líquido de lavagem intracelular (IWF). Este material é obtido pela extração sob centrifugação, de uma solução infiltrada a vácuo no espaço intercelular da folha do hospedeiro. ROHRINGER & MARTENS (1987), empregando esta metodologia demonstraram a presença de proteínas raça-específicas, neste material extraído de folhas de trigo infectadas com *P. graminis* f. sp. *tritici*. No IWF, também foi evidenciada a presença de seis β -1- $\rightarrow$ 3-glucanases e quatro quitinases (FINK et alii, 1988). Estas enzimas podem ser as responsáveis pela liberação de compostos, com a capacidade de inibir os mecanismos de defesa do hospedeiro e estimular a diferenciação do haustório (MENDGEN et alii,

1988).

(3) - Fase parasítica, neste período ocorre a penetração do parasita no interior da célula do hospedeiro, com a supressão das respostas específicas do mesmo.

Observam-se, neste período, modificações no protoplasto da planta, com a formação de várias camadas de membranas de origem vegetal que recobrem o haustório. Estas estruturas, denominadas, membranas extraustoriais, apresentam modificações em relação às membranas de células normais, com menor nível de esteróis (HARDER & MENDGEN, 1982), afinidade diferente da normal a determinados corantes (LITTLEFIELD & HEATH, 1979; HARDER & CHONG, 1984), e a perda da atividade ATPásica (LITTLEFIELD & BRACKER, 1972; SPENCER-PHILIPS & GAY, 1981).

Acredita-se que estas modificações facilitem a troca de metabólitos entre o patógeno e o hospedeiro (MENDGEN, 1981).

Um melhor conhecimento destes processos, que permitem o desenvolvimento do patógeno e impedem a resposta do hospedeiro, será de grande valia no desenvolvimento de novas estratégias de controle das moléstias causadas por fungos causadores de ferrugens em vegetais.

3. MATERIAL E METODOS

Pretendeu-se verificar a germinação e diferenciação das estruturas de infecção de uredíniosporos de *H. vastatrix* sobre água e na presença de alguns sais inorgânicos, carboidratos, e alcoois. Aferiu-se também o comportamento da germinação e diferenciação de apressórios de uredíniosporos do fungo sobre diferentes suportes artificiais, com e sem a presença de alguns compostos voláteis. Analisou-se também o conteúdo de lípidios, proteínas e carboidratos solúveis e de parede de uredíniosporos germinados e não germinados de *H. vastatrix* incubados sobre membranas de colódio com óleo de parafina.

3.1. Plantas utilizadas

Foram utilizadas nos experimentos plantas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo, LCMP 376-4, portadora do gene de resistência SH5, pertencente ao grupo

fisiológico E, o qual é suscetível à maioria das raças de ferrugem alaranjada do cafeeiro, incluindo as raças I e II que são as mais comuns (CARVALHO, 1968 ; BETTENCOURT, 1981).

As sementes de *C. arabica* cv. Mundo Novo foram obtidas da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas e da Cooperativa dos Cafeicultores de Garça (GARCAFE), S.P.. A semeadura foi feita em areia contida e germinadores (110 x 80 x 60 cm) com tampa de vidro, onde as sementes permaneceram à temperatura ambiente até o aparecimento da folha primária (estágio "orelha-de-onça"). As plântulas foram então transplantadas para sacos plásticos de 11 cm de diâmetro por 30 cm de altura, contendo terra vegetal / esterco de galinha / superfosfato simples / calcário calcítico e cloreto de potássio (250 l / 2,5 l / 1,25 g / 250 g / 250 g) (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 (250 g / 50 g / 100 g) em 100 l de água (p/p/p/v) para cada 3000 mudas.

Das plantas de café, foram utilizadas

apenas as folhas do segundo par, considerando-se como primeiro par as folhas logo abaixo da gema apical.

3.2. Coleta e estocagem de urediniosporos de *H. vastatrix*

Urediniosporos foram coletados de lesões esporulantes de plantas naturalmente infectadas nas regiões paulistas de Campinas, Brotas e Aguas de Lindóia. Os esporos recolhidos foram armazenados em lotes de 100 mg, acondicionados em tubos criogênicos plásticos e imersos em nitrogênio líquido (-196°C).

Os urediniosporos, quando da sua utilização, foram submetidos a choque térmico por 10 min a 45°C .

A análise da viabilidade dos esporos, realizada em lâmina escavada, foi feita através da incubação em água destilada, por 9 h no escuro a 25°C , de uma amostra de cada tubo recolhida na ponta de uma agulha. Cem urediniosporos foram contados e o percentual de urediniosporos germinados anotado. As análises de

viabilidade foram feitas em triplicata.

Amostras com menos de 25 % de germinação não foram utilizadas nos experimentos de análise bioquímica.

3.3. Germinação e diferenciação de apressórios em presença de compostos exógenos

Amostras de uredíniosporos de *H. vastatrix*, recolhidos na ponta de uma agulha foram colocadas em lâmina escavada contendo uma solução de amido, extrato de levedura (nas concentrações de 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 g/ml), glicina, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, sulfato de manganês, glicose (1, 0,1, 0,01 e 0,001 M), azida sódica, sacarose, sulfato cúprico, sulfato de cálcio, galactose, manose (0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 M), 1-nonanol e 8-ionona (1, 0,1, 0,01 e 0,001 µl/ml). Como controles *in vitro* utilizou-se uma preparação em água destilada e *in vivo* a aspersão, até o ponto de escoamento, de uma suspensão aquosa com 4 mg/ml de uredíniosporos na face abaxial de folhas destacadas de cafeeiros cv. Mundo Novo. Estas folhas destacadas foram colocadas em placas de petri com 20 cm de diâmetro forradas com papel de filtro umedecido.

Todas as preparações foram feitas em triplicatas e incubadas por 12 h no escuro a 25 °C em câmara úmida (100 % de U.R.). Após este período as preparações foram fixadas e coradas com azul de algodão em lactofenol. Observou-se em microscopia ótica 100 uredíniosporos de cada preparação e o percentual, destes que germinaram, foi anotado. De 100 uredíniosporos germinados foi observado o percentual que diferenciou apressórios. Para a contagem do percentual de germinação e formação de apressórios nas folhas destacadas, uma porção da epiderme abaxial foi destacada, fixada e corada com azul de algodão em lactofenol e montada em água sobre lâminas de vidro para observação em microscopia ótica.

A análise estatística das médias foi feita através do teste *t* ao nível de 5 %.

3.4. Germinação e formação de estruturas de infecção em uredíniosporos de *H. vastatrix* sobre água, folhas destacadas de cafeeiro cv. Mundo Novo, membranas de poliestireno com e sem ranhuras e membranas de colódio com e sem óleo de parafina.

Membranas de poliestireno com e sem ranhuras e membranas de colódio com e sem óleo de parafina foram denominadas suportes artificiais de germinação.

As membranas de poliestireno foram preparadas a partir de placas de petri plásticas, moídas e solubilizadas em acetato de etila para uma concentração final de 25 %. Quatro mililitros desta solução foram depositados em lâminas de microscopia, previamente lavadas com extran neutro e enxaguadas com acetona. Após a evaporação da solução, a camada de poliestireno que se formou foi cortada em pedaços de 1 cm² com um estilete e posta a flutuar sobre água, em placas de petri com 7 cm de diâmetro.

Para o preparo de lâminas de poliestireno com ranhuras, o procedimento inicial foi igual ao

anteriormente descrito, porém, após a evaporação da solução, um pedaço de palha de aço fina foi passado sobre a membrana delicadamente, por 3 vezes no mesmo sentido, de tal sorte a não rompê-la. Após a abrasão, a membrana foi lavada em água destilada corrente, cortada em pedaços de 1 ² cm e posta a flutuar em água destilada, em placa de petri.

As membranas de colódio sem óleo de parafina foram preparadas a partir de uma solução de colódio elástico, éter etílico e etanol (2:4:2; v/v/v). Quatro mililitros desta solução foram depositados em lâminas de microscopia, previamente lavadas com extran neutro e enxaguadas com acetona. Após a evaporação da solução, a membrana de colódio que se formou foi cortada em pedaços de 1 cm² e posta a flutuar sobre água, em placas de petri.

Para o preparo de membranas de colódio com óleo de parafina, foi acrescentada, à solução de preparo de membranas de colódio, 50 µl de óleo de parafina, para cada 100 ml de solução. Esta solução foi vigorosamente agitada em agitador de tubos e depositada imediatamente sobre lâminas de microscopia de maneira similar ao feito para membranas de colódio sem óleo.

Essas membranas, folhas destacadas de cafeeiro cv. Mundo Novo e placas de petri contendo água destilada foram aspergidas, com uma suspensão de 4 mg/ml de uredíniosporos de *H. vastatrix* e incubadas por 3, 6, 12 e 24 h a 25 °C no escuro em câmara úmida (100 % de U.R.).

Todo o experimento foi realizado com 3 réplicas e as médias analisadas estatisticamente através do teste-t.

3.5. Efeito de vapores de β -ionona, 1-nonanol e compostos voláteis da folha do cafeeiro na germinação e diferenciação de apressórios em *H. vastatrix*

Uredíniosporos de *H. vastatrix* em suspensão aquosa com 4 mg/ml foram aspergidos sobre membranas de colódio, com e sem óleo de parafina, de poliestireno, com e sem ranhuras, e sobre água. Todas as amostras foram incubadas por 3, 6, 12 e 24 h a 25 °C no escuro em câmara úmida, na presença de vapores de β -ionona, 1-nonanol e compostos voláteis emanados por folhas de cafeeiros.

Utilizaram-se placas de petri com 7 cm de

diâmetro e 1,5 cm de altura onde foram postas a flutuar sobre água as membranas de colódio, com e sem óleo de parafina e de poliestireno com e sem ranhuras. Utilizou-se também placas de petri com água, porém sem membranas. Nas tampas dessas placas foram depositadas internamente gotas de 25 µl de 8-ionona, 1-nonanol ou água, de tal sorte a não permitir contato direto entre as soluções e os urediniosporos. As placas foram seladas com parafilme e permaneceram fechadas durante todo o período do experimento. Para aferir um possível efeito de compostos voláteis emanados por folhas do hospedeiro, foram colocadas também internamente nas tampas 3 folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, de tal sorte que quando as placas fossem fechadas e seladas com parafilme as folhas ficassem presas e não entrassem em contato direto com os urediniosporos do fungo.

Após a incubação, de cada 100 urediniosporos contados por tratamento foi determinado o percentual de germinação. Para cada 100 urediniosporos germinados foi também verificado o percentual de formação de apressório e, quando possível, de cada 100 apressórios formados verificou-se o percentual de formação de vesículas sub-estomáticas.

Os experimentos foram feitos em triplicata e as médias analisadas estatisticamente pelo teste *t*.

3.6. Análise bioquímica de uredíniosporos germinados e não-germinados de *H. vastatrix*.

Procurou-se desenvolver metodologias que permitissem a quebra dos uredíniosporos de *H. vastatrix* para a recuperação de carboidratos, proteínas e lipídios do fungo. Procurou-se também evidenciar alguns dos carboidratos de parede presentes na ferrugem do café.

3.6.1. Quebra de uredíniosporos de *H. vastatrix*

Cinquenta miligramas de uredíniosporos de *H. vastatrix*, incubadas por 0 e 1 h em 10 ml de água destilada foram centrifugadas por 5 min a 5000 g. O precipitado obtido foi macerado segundo 4 processos: a trituração em almofariz, em almofariz na presença de nitrogénio líquido, em almofariz na presença de carborundum e em almofariz na presença de carborundum e nitrogénio líquido. Após a maceração, 10 ml de água

destilada foram adicionados aos triturados, que foram homogeneizados.

O experimento foi feito em triplicata e para aferir a porcentagem de quebra dos urediniosporos, uma alíquota de 10 μ l foi retirada da solução antes da centrifugação e após a ressuspensão do triturado. Todos os urediniosporos integros observados foram contados e a porcentagem de quebra estimada pela seguinte equação

$$\% \text{ de Quebra} = [1 - (\text{ND médio} / \text{NA médio})] \times 100$$

onde: ND médio = número médio de urediniosporos integros após o tratamento

NA médio = número médio de urediniosporos integros antes do tratamento.

3.6.2. Quantidade total de lipídios observados em urediniosporos germinados e não germinados de *H. vastatrix*.

Urediniosporos de *H. vastatrix* foram aspergidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina

em placas de petri com 15 cm de diâmetro e incubados por 0, 3, 6, 12 e 24 h a 25 °C no escuro em câmara úmida. Após a incubação, as membranas foram recolhidas e solubilizadas em acetona fervente por 1 min. O material recolhido foi centrifugado a 5000 g por 20 min e o precipitado (P1), após secagem a vácuo à temperatura ambiente, foi pesado. Cem miligramas do precipitado (P1) foram macerados em almofariz, na presença de nitrogênio líquido e carborundum, ressuspensas em 10 ml de éter etílico e mantidos a temperatura ambiente por 2, 4, 6, 12, 18 e 24 h. Após este período, o material foi centrifugado a 15000 g por 30 min, e o sobrenadante (S2), evaporado sob pressão reduzida a 30 °C. O sobrenadante evaporado assim obtido foi ressuspendido em 1 ml de clorofórmio e denominado fração lipídica de *H. vastatrix*, enquanto o precipitado foi seco (P2), pesado e utilizado para a extração de carboidratos (Esquema 1).

O total de lipídies obtido foi quantificado por colorimetria através da reação com fosfovanilina. Como padrão utilizaram-se soluções com 1, 10, 50 e 100 µg/ml de ácido palmítico.

Para a quantificação de lipídios, foi adicionada a 0.1 ml da solução de lipídios de *H. vastatrix*, 0.1 ml de água destilada e 2 ml de ácido

sulfúrico concentrado. Esta solução foi aquecida a 100 °C por 10 min, resfriada e misturada a 5 ml de uma solução de fosfovanilina (1g de vanilina dissolvido em 100 ml d'água + 40 ml de ácido fosfórico 85 %) e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Após este período a coloração resultante foi medida em 530 nm, e o valor obtido (CHABROL & CHARONNAT, 1937).

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e as médias analisadas estatisticamente pelo teste t.

Esquema 1: Procedimento no isolamento de lipídios e carboidratos solúveis de *H. vastatrix*.

100 mg de urediniosporos de
H. vastatrix
germinados ou não sobre
membranas de colódio com óleo

| 1 min em acetona fervente
| Centrif. 20 min x 5000 g

P 1

| Macerado (Carbu. + N2 (1))
| Extr. em 10 ml de Eter
| 2, 4, 6, 12, 18 e 24 h
| Centrif. 30 min x 15000 g

100 mg P 2

S 2

| Extr. em EtOH 80%
| 2, 6, 12, 18 e 24
| Centrif. 30 min x
| 15000 g

| Evaporação
| Ajuste p/ 1 ml
| Clorofórmio

Fração Lipídica de
H. vastatrix

100 mg P 3

S 3

| Extr. em
| Água
| 2, 6, 12
| 18, 24 h
| Centr. 30
| 15000 g
| Evap.
| Ajuste
| 1 ml

Carboidratos Solúveis
Etanol 80 %

Carboidratos Solúveis
Água

3.6.3. Quantidade total de carboidratos somáticos observados em urediniosporos germinados e não germinados de *H. vastatrix*.

Cem miligramas do precipitado P2, obtido da extração de lipídeos foram ressuspensos em 10 ml de etanol 80 % e mantidos por 3, 6, 12, 18 e 24 h a temperatura ambiente. Após este período, o material foi centrifugado por 15000 g por 30 min. O sobrenadante (S3) foi evaporado a 30 °C sob pressão reduzida, solubilizado em 1 ml de etanol 80 % e quantificado colorimetricamente através da reação com antrona.

O precipitado (P3), foi seco à temperatura ambiente e 100 mg foram ressuspensas em 10 ml de água destilada e mantidas à temperatura ambiente por 3, 6, 12 e 24 h. O material foi centrifugado por 30 min a 15000 g, sendo o precipitado (P4) descartado, e o sobrenadante (S4), após ter sido evaporado sob pressão reduzida a 30 °C, foi ressuspensa em 1 ml de água destilada e quantificado pelo método de antrona.

A quantificação de carboidratos totais da amostra foi feita através da medida da absorbância a 530 nm da reação entre 0.1 ml da solução que se queria medir

com 2 ml de uma solução a 0.2 % do reagente de antrona em ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi aquecida a 100 °C por 10 min e resfriada rapidamente. Para a confecção da curva padrão utilizou-se soluções com 0.1, 1, 10 e 100 mg/ml de manose (DREYWOOD, 1946).

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e as médias analisadas estatisticamente pelo teste t.

3.6.4. Carboidratos de parede de algumas estruturas de infecção de *H. vastatrix* evidenciados com lectinas fluorescentes

Utilizaram-se lectinas de *Concanavalina ensiformis* (Con-A), *Glicine max* (SBA), *Lens culinaris* (LCA), *Lycopersicum sculentum* (LEA), *Arachis hipogaea* (PNA), *Triticum vulgaris* (WBA) e *Vicia fabae* (VFA), marcadas com o composto fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). Todos os compostos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Ltda., St. Louis, USA.

Foi observada a possível ligação de Con-A, SBA, LEA, LCA, VFA, WGA e FNA em uredíniosporos não-germinados e germinados em água por 3, 6 e 9 h a 25 °C no escuro.

Os uredíniosporos incubados foram centrifugados a 1000 g por 5 min e ressuspensos em soluções com 0,2 mg/ml de lectinas fluorescentes por 20 min. Na solução com Con-A foi acrescentado cloreto de cálcio e manganês, para uma concentração final de 10 mM de cada sal. Após a marcação, os uredíniosporos foram centrifugados novamente (1000 g por 5 min) e lavados 3 vezes com tampão borato 10 mM pH 6,5. Os uredíniosporos marcados foram observados em microscópio de epifluorescência MP12 em vários comprimentos de onda.

Para aferir a especificidade da ligação, as preparações foram incubadas por 1 h em soluções com 0,1 M de carboidratos específicos para cada lectina e observadas novamente ao microscópio de epifluorescência. Para Con-A, LCA e VFA utilizou-se uma solução de D-manose, para LEA e WGA, uma solução de N-acetil- β -glicosamina e para SBA, uma solução de N-acetil- β -galactosamina.

Utilizou-se para a avaliação a seguinte notação: (-) sem fluorescência, (+) pouca fluorescência,

(++) média fluorescência, e (+++) muito fluorescência.

Os apressórios foram observados a partir de uredíniosporos incubados sobre membranas de poliestireno com ranhuras, por 12 h a 25 °C, no escuro, em câmara úmida. Estas membranas, após a incubação, foram mantidas por 20 min invertidas em soluções com 0,2 mg/ml de Con-A, WGA, SBA, LEA e PNA, lavadas 3 vezes em gotas de tampão borato 10 mM pH 6,5 e observadas em microscópio de epifluorescência. A especificidade da ligação foi aferida e a intensidade de fluorescência anotada utilizando-se a mesma escala de notas descrita anteriormente.

Células-mãe de haustório e haustórios foram observados, em secções de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, cortadas em criostato (0,5 mm) e montadas em gelatina. As lâminas foram tratadas, por 20 min com gotas de soluções (0,2 mg/ml) das lectinas fluorescentes PNA, Con-A e WGA, lavadas 3 vezes por 5 min com gotas de tampão borato 10 mM, pH 6,5 e observadas ao microscópio de epifluorescência. O mesmo procedimento descrito anteriormente para aferir a especificidade da ligação e intensidade de fluorescência foi utilizado.

3.6.5. Extração de proteínas de uredíniosporos não-germinados de *H. vastatrix*.

A extração das proteínas a partir de uredíniosporos de *H. vastatrix* foi feito segundo o processo de obtenção de pó cetônico. Para tal uredíniosporos do fungo foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido e carborundum e ressuspendidos em acetona gelada (-18°C). O material obtido foi centrifugado a 15000 g por 20 min e o precipitado novamente ressuspendido em acetona gelada e centrifugado por mais duas vezes. O precipitado foi seco em temperatura ambiente, sob vácuo, e estocado a -18°C .

Cem miligramas do pó cetônico foram incubadas por 18 h a 4°C em 5 ml de tampão Tris-HCl 10 mM pH $5,0$, $5,5$, $6,0$, $6,5$, $7,0$, $7,5$, $8,0$ e $8,5$, tampão fosfato de sódio 10 mM pH $6,0$, $7,0$ e $8,5$ e tampão Tris-HCl pH $8,0$ 50 mM , 100 mM , 500 mM e 1 M .

Após a incubação, o material foi centrifugado por 20 min a 15000 g e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio a 50% de saturação e

incubado por 12 h a 4 °C. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 15000 g por 20 min e ressuspendido em 0.5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.3. O material foi dializado contra 2 l de água destilada por 24 h a temperatura ambiente e o volume acertado para 1 ml.

O total de proteínas obtido foi quantificado pelo teste de LOWRY (1951).

Para a quantificação de proteínas 0,1 ml da solução a ser testada foi adicionada a 1 ml de uma solução com 2 % de carbonato de sódio em 0,1 N de NaOH e 0,1 % de sulfato de cobre em 1 % de tartarato de sódio potássio. Esta mistura foi incubada por 10 min a temperatura ambiente e em seguida misturada vigorosamente com 0,1 ml do reagente de Folin-Ciocalteu e novamente incubada por 30 min. A cor resultante da reação foi medida em espectrofotômetro a 750 nm. Como padrão utilizou-se soluções com 1, 10, 50 e 100 µg/ml de soro albumina bovina (BSA).

Outras extrações foram feitas nos mesmos moldes da anterior, utilizando-se como meio de extração tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com a adição de EDTA 10, 30, 50 e 100 mM, SDS 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 %, 8-

Mercaptoetanol 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 % e EDTA 50 mM, 1 % SDS e 1% de β -Mercaptoetanol.

Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 50 mM + SDS 1 % + β -Mercaptoetanol 1 % também foi utilizado para a extração de proteínas após a incubação por 1, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 h a 4 °C de, a partir de 100 mg de pó cetônico. Após a extração o mesmo procedimento foi utilizado para a recuperação e quantificação de proteínas.

3.6.5. Extração de proteínas solúveis de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix*

Uredíniosporos incubados por 0, 3, 6, 12 e 24 h sobre membranas de colódio com óleo de parafina a 25 °C no escuro, em câmara úmida, foram solubilizados em acetona gelada, centrifugados a 5000 g por 5 min e o precipitado macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido e carborundum. O material foi ressuspêndido em acetona gelada e centrifugado a 5000 g por 5 min por 3 vezes. Amostras de 100 µg do último precipitado foram ressuspêndidas em 5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + 50 mM de EDTA + 1 % de SDS e 1 % de β -Mercaptoetanol e mantidas a 4 °C por 12 h. O material foi

centrifugado a 15000 g por 20 min e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio a 50 % de saturação por 12 h. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 15000 g por 20 min, ressuspendido em 0,5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,3 e dializado por 24 h contra 2 l de água destilada, sendo o volume final ajustado para 1 ml e a quantidade de proteína medida pelo método de LOWRY.

4. RESULTADOS

4.1. Germinação e diferenciação de apressórios de *H. vastatrix* sobre água e na presença de compostos exógenos.

Amostras de uredíniosporos de *H. vastatrix* incubadas em soluções de sacarose e manose nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 mM, e, galactose com 1, 10 e 100 mM, apresentaram uma taxa de germinação maior do que a observada para uredíniosporos incubados em água.

Soluções de amido com 0,1, 0,01, 0,001 e 0,001 g/l, e, 1-nonanol com 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μ l/ml, não alteraram a taxa média de germinação de *H. vastatrix* em relação ao observado para uredíniosporos incubados sobre água (Tabela 1).

Tabela 1: Percentual de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* incubados por 12 h no escuro em câmara úmida (100 % de U.R.), na presença de compostos exógenos.

COMPOSTO EXOGENO	DILUIÇÃO			
	1	1/10	1/100	1/1000
	a			
Sacarose	33,3	28,6	25,0	15,3
0,1 M	($\pm 4,0$)	($\pm 1,5$)	($\pm 2,0$)	($\pm 1,5$)
	b			
Manose	24,6	24,0	23,3	17,0
0,1 M	($\pm 2,5$)	($\pm 3,6$)	($\pm 1,5$)	($\pm 2,0$)
	b			
Galactose	20,0	19,0	16,0	13,0
0,1 M	($\pm 3,0$)	($\pm 3,6$)	($\pm 1,0$)	($\pm 1,0$)
	c			
Amido	14,6	17,0	15,0	12,3
0,1 g/ml	($\pm 0,5$)	($\pm 4,0$)	($\pm 2,0$)	($\pm 1,5$)
	c			
1-nonanol	13,3	17,0	15,6	17,3
1,0 μ l/ml	($\pm 1,5$)	($\pm 7,0$)	($\pm 3,7$)	($\pm 6,6$)
	d			
Glicose	0,6	0,3	4,6	8,3
1,0 M	($\pm 0,5$)	($\pm 0,5$)	($\pm 2,0$)	($\pm 2,0$)
	d			
Clor. Sódio	2,0	2,6	5,6	12,3
1,0 M	($\pm 0,5$)	($\pm 1,5$)	($\pm 2,8$)	($\pm 1,5$)
	d			
Sulf. Cálcio	0,6	0,3	4,6	8,3
0,1 M	($\pm 0,5$)	($\pm 0,5$)	($\pm 2,0$)	($\pm 0,5$)
	d			
Sulf. Cobre	5,0	6,3	6,3	6,3
0,1 M	($\pm 2,0$)	($\pm 0,5$)	($\pm 2,0$)	($\pm 1,1$)
	d			
β -ionona	3,0	1,6	4,3	3,0
1,0 μ l/ml	($\pm 1,0$)	($\pm 1,6$)	($\pm 2,5$)	($\pm 1,0$)
	c			
Água	14,0			
Destilada	($\pm 2,0$)			

Média de 3 repetições, desvio padrão entre parentêsis
 Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente a
 nível de 5 % (Teste-t)

Urediniosporos incubados em soluções de glicose (10, 100 mM e 1 M), cloreto de sódio (10, 100 mM e 1 M), sulfato de cálcio (0,1, 1, 10 e 100 mM), sulfato de cobre (0,1, 1, 10 e 100 mM) e *B*-ionona (0,001, 0,01, 0,1 e 1 μ l), apresentaram uma taxa de germinação significativamente menor do que o verificado em urediniosporos mantidos sobre água destilada (Tabela 1).

Observou-se total inibição da germinação para as amostras incubadas em soluções de glicina, azida sódica, sulfato de magnésio, extrato de levedura, cloreto de potássio e cloreto de magnésio, para todas as concentrações testadas (dados não mostrados na tabela 1).

Para urediniosporos inoculados em folhas destacadas de cafeeiros cv. Mundo Novo, a taxa de germinação observada foi de 32,3 %.

Observou-se a formação de agressórios apenas nas amostras de urediniosporos de *H. vastatrix* incubados em soluções de 1-nonanol nas concentrações de 1 μ l/ml (65,0 %), 0,1 μ l/ml (64,3 %) e 0,01 μ l/ml (14,3 %) (Figura 1).

Figura 1: Percentual de urediniosporos germinados de *H. vastatrix* que diferenciaram apressórios, após 12 h de incubação na presença de diferentes concentrações de 1-nonanol

4.2. Germinação e diferenciação de estruturas de infecção de *H. vastatrix* sobre suportes artificiais.

O percentual médio de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, após 24 h de incubação sobre água, foi igual a 24,6 %. Para amostras mantidas sobre folha destacadas de cafeeiro, membranas de poliestireno com e sem ranhuras e membranas de colódio com e sem óleo de parafina, os percentuais de germinação (39,3 %, 36,0 %, 34,0 %, 38,3 % e 36,0 %, respectivamente) não diferiram entre si ao nível estatístico de 5 % de confiança (Tabela 2).

Morfológicamente o tubo germinativo formado nos diferentes suportes de germinação era similar, sendo que os formados sobre folha de cafeeiro, membranas de poliestireno com ranhuras e colódio com óleo de parafina se apresentaram menores do que os formados sobre água, poliestireno sem ranhuras e colódio sem óleo de parafina. Uredíniosporo, tubo germinativo, apressório e vesícula sub-estomática estão mostrados na Figura 2.

Para o percentual de uredíniosporos germinados que diferenciaram apressórios, observou-se que nas amostras incubadas por 24 h sobre água, uma média

Tabela 2: Percentagem de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* sobre diferentes suportes de germinação.

SUPORTE DE GERMINAÇÃO	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	6,3 (± 0,5)	14,0 (± 1,0)	21,6 (± 3,7)	24,6 ^a (± 3,5)
Folha de Café	14,0 (± 2,6)	21,6 (± 4,5)	33,0 (± 2,6)	39,3 ^b (± 2,0)
Pol. sem Ranhuras	14,6 (± 1,1)	24,6 (± 2,0)	30,6 (± 4,0)	34,0 ^b (± 4,0)
Pol. com Ranhuras	12,3 (± 1,1)	21,0 (± 3,6)	29,3 (± 6,8)	36,0 ^b (± 3,6)
Col. sem Óleo	14,3 (± 3,0)	22,0 (± 3,6)	32,3 (± 2,5)	36,0 ^b (± 3,4)
Col. com Óleo	13,0 (± 1,0)	20,6 (± 4,0)	36,3 (± 4,7)	38,3 ^b (± 3,0)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Figura 2: Urediniospore (UR); tubo germinativo (TG); septo (ST), apressório (AP) e vesículas subestomáticas (VS), formados sobre membranas de poliestireno com ranhuras.

de 9,3 %, o que não foi significativamente diferente do observado para os urediniosporos mantidos sobre membranas de poliestireno sem ranhuras (9,6 %) e colódio sem óleo (9,3 %). As amostras mantidas sobre folhas de caféiro diferenciaram apressórios em 42,6 % dos urediniosporos que germinaram, este valor não foi estatisticamente diferente do observado nas amostras mantidas sobre membranas de poliestireno com ranhuras (49,3 %). Para os urediniosporos germinados sobre membranas de colódio com óleo de parafina o percentual de germinação médio observado foi de 28,0 % (Tabela 3).

Morfologicamente os apressórios formados sobre todos os suportes foram similares, apresentando forma arredondada, e com tamanho similar ao tamanho do urediniosporo.

Sobre membranas de poliestireno sem ranhuras, colódio sem óleo e sobre água, após 24 h de incubação a média de vesículas sub-estomáticas formadas não diferiu estatisticamente. Sobre membranas de poliestireno com ranhuras o percentual de apressórios que desenvolveu vesículas sub-estomática foi de 36,0 % e sobre membranas de colódio com óleo 30,3 % (Tabela 4).

Tabela 3: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* que formaram apressórios sobre diferentes suportes.

SUPORTE DE GERMINAÇÃO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0 (± 0,0)	2,0 (± 1,0)	8,6 (± 1,5)	9,3 ^a (± 3,0)
Folha de Café	0,0 (± 2,6)	3,3 (± 4,5)	28,3 (± 2,6)	42,6 ^b (± 2,0)
Pol. sem Ranhuras	0,0 (± 0,0)	4,3 (± 2,0)	8,6 (± 3,0)	9,6 ^a (± 1,5)
Pol. com Ranhuras	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	35,3 (± 2,3)	49,3 ^b (± 7,3)
Col. sem Óleo	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	7,6 (± 1,5)	9,3 ^a (± 2,5)
Col. com Óleo	0,0 (± 0,0)	3,0 (± 1,0)	16,4 (± 4,1)	28,0 ^c (± 2,6)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parêntesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 4: Percentagem de apressórios de *H. vastatrix*, que desenvolveram vesícula sub-estomática sobre diferentes suportes de germinação.

SUFORTE DE GERMINAÇÃO	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Agua	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,3 ^a (± 0,5)
Pol. sem Ranhuras	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,0 ^a (± 0,0)
Pol. com Ranhuras	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	7,6 (± 3,0)	36,0 ^b (± 4,0)
Col. sem Oleo	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	0,3 ^a (± 0,5)
Col. com Oleo	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)	12,6 (± 3,5)	30,3 ^b (± 1,5)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas vegetais, não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Morfológicamente as vesículas sub-estomáticas eram esféricas e menores do que as observadas em folhas infectadas, onde apresentaram morfologia variando de esféricas a ovóides ou em forma de âncora.

As 3 h de incubação, em todos os suportes testados, apenas tubos germinativos foram observados. Após 6 h de incubação, observou-se apenas alguns apressórios em membranas de poliestireno com ranhuras, colódio com óleo, folhas de cafeeiro, e sobre água. Com 12 h de incubação, apressórios eram vistos em todos os suportes testados. Vesículas sub-estomáticas foram observadas após 12 h em membranas de poliestireno com ranhuras e colódio com óleo e após 24 h de incubação, esporadicamente sobre água e membranas de colódio sem óleo (Figura 3).

4.3. Germinação e formação de apressórios em urediniosporos de *H. vastatrix* na presença de vapores de *B*-ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro.

Urediniosporos mantidos sobre água apresentaram após 24 h, uma taxa média de germinação de 16,3 % quando incubados na presença de vapor d'água. Este

Figura 3: Percentagem de urediniosporos de *H. vastatrix* germinados (A); germinados que formaram apressorios (B) e apressorios que desenvolveram vesícula sub-estomática (C) sobre diferentes suportes de germinação.

valor não foi significativamente diferente (ao nível 5 % de confiança) ao observado para urediniosporos incubados na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiro. Quando incubados sobre água, mas na presença de vapores de 1-nonanol a taxa de germinação observada foi de 20,6 % e 45,6 %, quando na presença de vapores de β -ionona (Tabela 5).

As amostras de *H. vastatrix* incubadas, por 24 h sobre membranas de poliestireno sem ranhuras, apresentaram quando mantidas na presença de vapores d'água uma média de germinação de 26,6 %. Este valor foi estatisticamente igual a nível de 5 %, ao observado para amostras mantidas na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiro (26,3 %) e vapores de 1-nonanol (25,6 %). Os urediniosporos incubados na presença de β -ionona apresentaram uma germinação média de 54,6 % (Tabela 6).

Quando o suporte de germinação utilizado foram membranas de poliestireno com ranhuras a média de germinação nos diferentes tratamentos não foi diferente do observado para urediniosporos mantidos em membranas de poliestireno sem ranhura. Observou-se 26,3 % de germinação quando da incubação na presença de vapor d'água e compostos emanados por folhas de cafeeiro, 26,6 % na

Tabela 5: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre água na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	4,6 ($\pm$ 1,5)	9,6 ($\pm$ 2,5)	14,6 ($\pm$ 1,5)	16,3 ($\pm$ 2,5) ^a
Folha de Cafeeiro	4,3 ($\pm$ 2,0)	12,0 ($\pm$ 4,0)	15,6 ($\pm$ 2,0)	16,0 ($\pm$ 3,0) ^a
β -ionona	9,0 ($\pm$ 3,0)	14,6 ($\pm$ 1,5)	37,3 ($\pm$ 3,0)	45,6 ($\pm$ 5,7) ^b
1-nonanol	6,0 ($\pm$ 1,0)	11,3 ($\pm$ 1,1)	15,6 ($\pm$ 2,0)	20,6 ($\pm$ 2,0) ^a

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 6: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre poliestireno sem ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	8,6 ($\pm$ 4,1)	13,6 ($\pm$ 2,0)	24,6 ($\pm$ 2,0)	26,3 ($\pm$ 1,5) ^a
Folha de Cafeeiro	8,6 ($\pm$ 2,3)	13,3 ($\pm$ 1,5)	21,3 ($\pm$ 5,8)	26,3 ($\pm$ 0,5) ^a
β -ionona	13,3 ($\pm$ 2,3)	19,0 ($\pm$ 4,0)	37,6 ($\pm$ 4,1)	54,6 ($\pm$ 9,2) ^b
1-nonanol	8,6 ($\pm$ 1,5)	13,6 ($\pm$ 3,2)	24,0 ($\pm$ 3,4)	25,6 ($\pm$ 6,5) ^a

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

presença de vapores de 1-nonanol e 56,6 % na presença de vapores de β -ionona (Tabela 7).

Para urediniosporos mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina observou-se após 24 h de incubação, 29,6 % de germinação quando na presença de vapores d'água, 29,0 % na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiro e 28,6 % com vapores de 1-nonanol. Para as amostras incubadas na presença de vapores de β -ionona o percentual médio de germinação observado foi de 54,0 % (Tabela 8).

Quando o suporte de germinação utilizado foram membranas de colódio sem óleo de parafina, verificou-se um percentual médio de germinação após 24 h de incubação, de 25,3 % na presença de vapores d'água, 23,6 % na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiros, 25,3 % na presença de vapores de 1-nonanol e 53,6 % na presença de vapores de β -ionona (Tabela 9).

Observou-se que a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* foi maior em suportes sólidos (membranas de colódio com e sem óleo e poliestireno com e sem ranhuras), do que sobre água. A incubação na presença de vapores de β -ionona resultou sempre numa taxa de germinação maior do que nos

Tabela 7: Percentagem de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de poliestireno com ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro var. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	9,6 ($\pm$ 2,5)	14,6 ($\pm$ 2,0)	25,3 ($\pm$ 5,5)	26,3 ($\pm$ 1,5) ^a
Folha de Cafeeiro	9,0 ($\pm$ 2,6)	15,3 ($\pm$ 3,5)	23,0 ($\pm$ 5,1)	26,3 ($\pm$ 3,0) ^a
β -ionona	14,6 ($\pm$ 2,0)	19,3 ($\pm$ 2,0)	40,6 ($\pm$ 3,7)	56,6 ($\pm$ 3,2) ^b
1-nonanol	9,0 ($\pm$ 1,7)	13,0 ($\pm$ 1,0)	26,0 ($\pm$ 4,3)	26,6 ($\pm$ 2,5) ^a

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 8: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio com óleo na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	7,3 ($\pm$ 1,5)	13,3 ($\pm$ 1,5)	25,3 ($\pm$ 3,7)	29,6 ^a ($\pm$ 5,0)
Folha de Cafeeiro	8,3 ($\pm$ 3,0)	13,0 ($\pm$ 3,6)	25,0 ($\pm$ 4,0)	29,6 ^a ($\pm$ 5,2)
β -ionona	13,6 ($\pm$ 3,5)	17,3 ($\pm$ 2,0)	42,0 ($\pm$ 2,6)	54,0 ^b ($\pm$ 6,0)
1-nonanol	8,3 ($\pm$ 0,5)	13,6 ($\pm$ 1,5)	22,3 ($\pm$ 2,3)	28,6 ^a ($\pm$ 4,7)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis

Médias com a mesma letra, em colunas verticais, não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t),

Tabela 9: Percentagem de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio sem óleo na presença de vapores d'água. β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	9,6 ($\pm 1,1$)	15,0 ($\pm 1,7$)	24,3 ($\pm 5,6$)	25,3 ^a ($\pm 1,5$)
Folha de Cafeeiro	9,3 ($\pm 2,0$)	14,6 ($\pm 2,0$)	24,0 ($\pm 2,6$)	23,6 ^a ($\pm 1,1$)
β -ionona	12,6 ($\pm 1,1$)	20,0 ($\pm 5,0$)	38,0 ($\pm 5,2$)	53,6 ^b ($\pm 6,4$)
1-nonanol	7,0 ($\pm 1,0$)	12,3 ($\pm 2,0$)	24,0 ($\pm 4,5$)	25,3 ^a ($\pm 2,5$)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

tratamentos com vapor d'água, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro (Figura 4).

Sobre água, 12,0 % dos uredíniosporos germinados formaram apressórios (após 24 h de incubação), quando na presença de vapores d'água, 13,6 % na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiros, 14,3 % na presença de vapores de β -ionona e 19,0 % na presença de 1-nonanol (Tabela 10).

Quando da incubação por 24 h de uredíniosporos de *H. vastatrix* sobre membranas de colódio sem óleo de parafina, a taxa média de apressórios formados em relação a taxa de germinação foi de 13,6 % na presença de vapores d'água, 13,3 % com compostos emanados por folhas de cafeeiro, 11,3 % na presença de vapores de β -ionona e 13,6 % na presença de vapores de 1-nonanol (Tabela 11).

Amostras de uredíniosporos incubados em membranas de colódio com óleo de parafina por 24 h, apresentaram uma taxa de formação de apressórios de 19,3 % se incubados na presença de vapores d'água, 19,6 % na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiro, 23,0 % na presença de β -ionona e 43,3 % na presença de vapores de 1-nonanol (Tabela 12).

Figura 4: Percentagem de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* incubados por 24 h sobre água, membranas de poliestireno com e sem ranhuras e colódio com e sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, 1-nonanol, β -ionona e compostos emanados por folhas de cafeeiros.

Tabela 10: Percentagem de urediniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre água na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro var Mundo Novo que diferenciaram apressórios. Estão indicados as médias e desvio padrão de três repetições.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0 ($\pm$ 0,0)	1,3 ($\pm$ 1,1)	6,0 ($\pm$ 2,0)	12,0 ($\pm$ 4,0) ^a
Folha de Cafeeiro	0,0 ($\pm$ 0,0)	1,6 ($\pm$ 1,1)	6,3 ($\pm$ 0,5)	13,6 ($\pm$ 3,2) ^a
β -ionona	0,0 ($\pm$ 0,0)	2,6 ($\pm$ 1,5)	7,3 ($\pm$ 1,5)	14,3 ($\pm$ 2,0) ^a
1-nonanol	0,0 ($\pm$ 0,0)	6,0 ($\pm$ 1,0)	13,6 ($\pm$ 3,0)	19,0 ($\pm$ 7,2) ^a

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais, não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 11: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, que diferenciaram apressórios.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0 ($\pm$ 0,0)	5,0 ($\pm$ 1,0)	9,3 ($\pm$ 1,1)	13,6 ^a ($\pm$ 4,0)
Folha de Cafeeiro	0,0 ($\pm$ 0,0)	4,3 ($\pm$ 1,5)	9,0 ($\pm$ 0,0)	13,3 ^a ($\pm$ 1,1)
β -ionona	0,0 ($\pm$ 0,0)	2,6 ($\pm$ 1,5)	4,3 ($\pm$ 1,1)	11,3 ^a ($\pm$ 3,0)
1-nonanol	0,0 ($\pm$ 0,0)	4,6 ($\pm$ 1,5)	9,6 ($\pm$ 2,0)	13,6 ^a ($\pm$ 1,5)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 12: Percentagem de de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina na presença de vapores d'água, 8-ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, que formaram apressórios.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0 (± 0,0)	1,6 (± 1,1)	10,3 (± 2,0)	19,3 (± 3,7) ^a
Folha de Cafeeiro	0,0 (± 0,0)	2,0 (± 1,0)	10,6 (± 3,0)	19,6 (± 5,6) ^a
8-ionona	0,0 (± 0,0)	3,6 (± 0,5)	13,6 (± 2,5)	23,0 (± 2,6) ^a
1-nonanol	0,0 (± 0,0)	5,0 (± 0,0)	26,6 (± 1,5)	43,3 (± 6,6) ^b

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais, não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Para urediniosporos incubados por 24 h, sobre membranas de poliestireno sem ranhuras, as taxas de diferenciação de apressórios não diferiram significativamente quando da incubação em presença de vapores d'água (11,0 %) e β -ionona (10,6 %). Porém, ambas diferiram significativamente daquela observada quando a incubação se processou na presença de vapores de 1-nonanol (20,6 %) (Tabela 13).

Quando se utilizou como suporte de germinação membranas de poliestireno com ranhuras, após 24 h de incubação, verificou-se uma média de formação de apressórios de 24,0 % na presença de vapores d'água, 23,6 % na presença de compostos emanados por folhas de cafeeiros, 33,0 % na presença de vapores de β -ionona e 56,0 % na presença de vapores de 1-nonanol (Tabela 14).

Observou-se que a diferenciação de apressórios sempre foi mais freqüente sobre membranas de poliestireno com ranhuras e colódio com óleo do que sobre membranas de colódio sem óleo, poliestireno sem ranhuras e água. Para os compostos voláteis utilizados a taxa de diferenciação de apressórios sempre foi maior, em todas as preparações, quando a incubação se processou na presença de vapores de 1-nonanol (Figura 5).

Tabela 13: Percentagem de urediniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de poliestireno sem ranhuras, na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo.

COMPOSTO VOLATIL	PERIODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0 ($\pm$ 0,0)	1,3 ($\pm$ 1,1)	6,0 ($\pm$ 2,6)	11,0 ^a ($\pm$ 1,7)
Folha de Cafeeiro	0,0 ($\pm$ 0,0)	0,3 ($\pm$ 0,5)	8,3 ($\pm$ 1,1)	10,6 ^a ($\pm$ 3,5)
β -ionona	0,0 ($\pm$ 0,0)	0,3 ($\pm$ 0,5)	8,3 ($\pm$ 1,1)	10,6 ^a ($\pm$ 2,0)
1-nonanol	0,0 ($\pm$ 0,0)	5,0 ($\pm$ 1,0)	6,3 ($\pm$ 4,1)	20,6 ^a ($\pm$ 4,5)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parenteses.
Médias com a mesma letra, em colunas verticais, não diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Tabela 14: Percentagem de uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de poliestireno com ranhuras na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, que diferenciaram apressórios.

COMPOSTO VOLATIL	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	3	6	12	24 h
Água	0,0	2,6	11,6	24,0
	($\pm$ 0,0)	($\pm$ 0,5)	($\pm$ 2,8)	($\pm$ 4,0)
Folha de Cafeeiro	0,0	1,6	12,0	23,6
	($\pm$ 0,0)	($\pm$ 0,5)	($\pm$ 2,6)	($\pm$ 3,2)
β -ionona	0,0	5,6	16,6	33,0
	($\pm$ 0,0)	($\pm$ 1,1)	($\pm$ 4,0)	($\pm$ 2,6)
1-nonanol	0,0	8,3	24,6	56,0
	($\pm$ 0,0)	($\pm$ 1,1)	($\pm$ 4,0)	($\pm$ 4,5)

Médias de 3 repetições, desvio padrão entre parentesis
Médias com a mesma letra, em colunas verticais, não
diferem estatisticamente a nível de 5 % (Teste-t).

Figura 5: Percentagem de urediniosporos germinados de *H. vastatrix* que diferenciaram apressórios, após 24 h de incubação; sobre água membranas de poliestireno com e sem ranhura e colódio com e sem óleo de parafina na presença de vapores d'água, β -ionona, 1-nonanol e compostos emanados por folhas de cafeeiro.

4.4. Percentagem de quebra de urediniosporos de *H. vastatrix* em almofariz, e na presença de carborundum e nitrogênio líquido .

Urediniosporos de *H. vastatrix* macerados em almofariz apresentaram um percentual de quebra de 2,58 % quando mantidos em água por 0 h e de 8,13 %, quando incubados por 1 h em água destilada. Para amostras de urediniosporos que foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido o percentual de quebra foi de 15,69 % para urediniosporos incubados por 0 h e de 21,81 %, após 1h em água.

Para amostras maceradas em presença de carborundum observou-se 19,13 % de ruptura dos urediniosporos nas amostras incubadas por 0 h em água e de 26,15 %, naquelas mantidas por 1 h em água destilada. Quando do tratamento com carborundum e nitrogênio líquido, o percentual de quebra para incubação por 0 h em água foi de 52,64 e de 89,93 %, quando pré-incubados por 1 h em água destilada (Figura 6).

Figura 6: Percentagem de quebra de urediniosporos de *H. vastatrix* incubados por 0 e 1 h em água destilada, após trituração em almofariz, almofariz na presença de nitrogênio líquido, almofariz com carborundum e almofariz com nitrogênio líquido e carborundum.

4.5. Quantidade de lipídeos observados em uredíniosporos e estruturas de infecção de *H. vastatrix*.

A análise de lipídeos totais de uredíniosporos de *H. vastatrix* não germinados foi expressa em equivalentes de ácido palmítico (Eq. Ac. Palmítico). A extração etérea, com variação de tempo, foi feita sempre com 50 mg de uredíniosporos. Observou-se uma recuperação crescente de lipídeos em decorrência do aumento do tempo de extração. Assim tivemos 4,66 mg/2 h; 6,33/4 h; 12,34/6 h; 25,00 mg/12 h; 25,33 mg/18 h e 20,33 mg/24 h (Figura 7).

Para o total de lipídeos recuperados nas diferentes fases de desenvolvimento do fungo sobre membranas de colódio com óleo de parafina, observou-se que às 0 h de incubação (uredíniosporos não germinados) recuperava-se 43,53 mg para cada 100 mg de material fúngico extraído por 12 h. As 3 h de incubação (início da germinação), o total de lipídeos recuperado foi de 41,48 mg; às 6 h de incubação (tubos germinativos e alguns apressórios), o total recuperado foi de 36,39 mg e às 12 h (tubos germinativos e apressórios), 12,58 mg puderam ser recuperadas de cada 100 mg de material fúngico. Para a incubação por 24 h (apressórios e vesículas sub-estomáticas), o total recuperado foi de 6,12 mg de lipídeos para cada 100 mg de material fúngico (Figura 8).

Figura 7: Total de lipídeos recuperado de 50 mg de urediniosporos não germinados de *H. vastatrix*, após a extração, por diferentes períodos em éter etílico.

Figura 8: Quantidade de lipídeos recuperados de urediniosporos de *H. vastatrix* incubados por diferentes períodos sobre membranas de colódio com óleo de parafina.

4.6. Carboidratos somáticos recuperados de urediniosporos e estruturas de infecção de *H. vastatrix*.

Para a extração de carboidratos do precipitado P2 (Esquema 1), preparado a partir de urediniosporos não germinados de *H. vastatrix*, observou-se que após a incubação por 2 h em etanol 80 %, foram recuperados 4,15 mg de Eq manose/ml para cada 100 mg de precipitado. Com 4 h de extração foram recuperados 8,33 mg, às 6 h recuperava-se 14,65 mg, às 12 h, 13,37 mg e às 24 h 17,56 mg de Eq manose/ml de carboidrato para cada 100 mg de precipitado P2 (Figura 9).

Na extração em água feita após a extração em etanol 80 %, não foram recuperados carboidratos às 2 e 4 h de incubação. Com 6 h de extração em água, a recuperação média foi de 3,16 mg, às 12 h, 6,15 mg e as 24 h, recuperou-se 5,38 mg de Eq manose/ml para cada 100 mg de precipitado P2, previamente tratado com etanol 80 % por 6, 12 e 24 h respectivamente (Figura 9).

Para a extração em etanol 80 % do precipitado P2 de urediniosporos mantidos sobre membranas

Figura 9: Quantidade de carboidratos recuperados do precipitado P2 de urediniosporos não germinados de *H. vastatrix*, após extração por vários períodos em etanol 30 % e água.

de colódio com óleo de parafina, observou-se para material obtido a partir de urediniosporos incubados por 0 h, uma recuperação de 21,54 mg de Eq manose/ml. Com 3 h recuperou-se 18,36, com 6 h, 9,76 mg e com 24 h a média observada foi de 10,33 mg de Eq. manose/ml para cada extração de 100 mg do precipitado P2 (Figura 10).

Para a extração em água, do precipitado da extração em etanol 80 % dos urediniosporos mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina, observou-se que de urediniosporos incubados por 0 h, foram recuperados 2,05 mg de Eq manose/ml para cada 100 mg de precipitado. Com 3 h foram recuperados 1,95 mg, com 6 h a recuperação média foi de 1,78 mg e com 12 h recuperou-se 1,94 mg de Eq manose/ml para cada 100 mg de precipitado (Figura 10).

Figura 10: Quantidade de carboidratos recuperados do precipitado P2 de urediniosporos de *H. vastatrix* mantidos sobre membranas de colódio com óleo de parafina por diferentes períodos após extração em etanol 80 % e água.

4.7. Carboidratos de parede de uredíniosporos e estruturas de infecção de *H. vastatrix* evidenciados por lectinas fluorescentes

Uma afinidade inespecífica foi observada entre uredíniosporos não germinados de *H. vastatrix* e as lectinas Con-A, SBA, LEA, LCA e VFA. Não se observou qualquer reação entre a lectina PNA e uredíniosporos não germinados, enquanto que a reação com WGA foi específica e de grande intensidade (Tabela 15, Figura 11).

Ao tubo germinativo se ligaram especificamente as lectinas SBA, LEA, LCA, VFA e WGA. Com 3 h de germinação, a ligação entre o tubo germinativo e Con-A foi muito intensa, com LCA medianamente intensa e com SBA, LEA, VFA e WGA, a ligação foi pouca intensa (Figura 12). As 6 h de germinação, observou-se uma reação medianamente intensa entre o tubo germinativo e as lectinas Con-A, SBA e WGA, enquanto que com LEA, LCA, VFA, a reação foi pouco intensa. Com relação aos tubos germinativos após 9 h de incubação, observou-se reação pouco intensa com as lectinas Con-A, LEA, LCA e VFA, medianamente intensa com SBA e muito intensa com WGA. Não se observou reação entre PNA e o tubo germinativo de *H. vastatrix* (Tabela 15).

Tabela 15: Fluorescência observada em uredíniosporos não germinados e germinados por 3, 6 e 9 h, após o tratamento com lectinas fluorescentes.

LECTINAS	TEMPO DE INCUBACAO (h)				ESPECIFICIDADE
	0	3	6	9	
Con-A	***	***	++	+	alfa-mananas alfa-glucanas
SBA	***	+	++	++	N-acetil galactosamina
LEA	***	+	+	+	N-acetil glicosamina
LCA	***	++	+	+	manose glicose
VFA	***	+	+	+	manose glicose
WGA	***	+	++	+++	N-acetil- β - glicosamina
PNA	-	-	-	-	β -Galac(1-3)- acetil-galacAN

* >=> Ligação inespecífica

- >=> Não ligação

+ >=> Ligação pouco intensa

++ >=> Ligação medianamente intensa

+++ >=> Ligação muito intensa

Figura 11: Urediniosporos de *H. vastatrix* marcados com lectina de WGA fluorescente.

Figura 12: Tubo germinativo (TG) e apressório (AP) de *H. vastatrix* (6 h de incubação) marcado com Con-A fluorescente.

Aos apressórios ligaram-se fracamente as lectinas Con-A, SBA e LEA e medianamente a lectina WGA. Não se observou ligação entre PNA e apressórios de *H. vastatrix* (Tabela 16).

Nas células-mãe de haustório, observou-se forte ligação específica da Con-A e WGA enquanto que nos haustórios a reação com estas lectinas foi fraca (Figura 13). PNA não reagiu com apressórios, célula-mãe de haustório e haustórios de *H. vastatrix* (Tabela 16).

Tabela 16: Fluorescência observada em apressórios, célula-mãe de haustório e haustório de *H. vastatrix* tratados com lectinas fluorescentes

LECTINAS	APRESSÓRIO	CEL.MÃE HAUSTÓRIO	HAUSTÓRIO
Con-A	+	++	+
WGA	++	++	+
SBA	+	NE	NE
LEA	+	NE	NE
PNA	-	-	-

NE >=> Não executado

+ >=> Ligação pouco intensa

++ >=> Ligação medianamente intensa

- >=> Não ligação

Figura 13: Célula-mãe de haustório (CM) e haustório de *H. vastatrix* marcados com WGA fluorescente.

4.8. Proteínas recuperadas de urediniosporos e estruturas de infecção de *H. vastatrix*.

Dos vários sistemas-tampão testados para a extração de proteínas de urediniosporos não germinados de *H. vastatrix*, o que se mostrou mais eficiente foi a extração em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 50 mM + 1 % SDS + β -mercaptoetanol 1 %. Neste sistema, recuperou-se de 100 mg de macerado de esporo uma média de 217,87 μ g de Eq SBA/ml após a extração por 12 h a temperatura ambiente.

Variando-se o tempo de incubação do macerado de esporos neste sistema de extração, observou-se que com 1 h de incubação recuperava-se uma média de 54,27 μ g Eq. SBA/ml, com 2 h a recuperação média foi de 60,12 μ g, com 4 h recuperava-se 70,17 μ g, com 6 h, 98,14 μ g e com 9 h a recuperação média foi de 187,34 μ g. Com 12 h, a recuperação média foi de 217,56 μ g Eq SBA/ml e com 24 h de extração foram recuperadas 200,34 μ g para cada 100 mg de macerado de esporo (Figura 14).

Quanto à quantidade de proteína recuperada das diferentes fases de desenvolvimento do fungo

Figura 14: Quantidade de proteína recuperada de 100 mg de macerado de esporo de *H. vastatrix* após extração, por diferentes períodos, em tampão Tris-HCl pH 8.0 50 mM + EDTA 50 mM + SDS 1 % + 1 % de β -mercaptoetanol.

incubados sobre membranas de colódio com óleo de parafina observou-se que com 0 h de incubação recuperava-se 223,76 μg de Eq SBA/ml para cada 100 mg de esporo, com 3 h de incubação a recuperação média foi de 206,65 μg e às 6 h, recuperava-se 117,45 μg de Eq. SBA/ml para cada 100 mg de macerado de esporo. Com 12 h de incubação, a média de recuperação foi de 179,74 μg e com 24 h, recuperava-se uma média de 54,67 μg de Eq. SBA/ml para cada 100 mg de macerado de esporo (Figura 15).

Figura 15: Quantidade de proteínas extraídas de 100 mg de macerado de uredinisporos de *H. vastatrix* incubados por diferentes períodos sobre membranas de colódio com óleo de parafina.

5. DISCUSSÃO

A ação de ions em solução sobre a germinação de fungos causadores de ferrugens é conhecida. BAKER (1983), constatou que urediniosporos de *U. phaseoli*, germinam em água de torneira, mas não em água destilada ou deionizada. O autor concluiu que a presença de cátions divalentes eram responsáveis pelo fenômeno. Dentre as soluções testadas pelo autor, as que continham, pelo menos, 3 mM de cálcio, 2 mM de magnésio, ou 0.4 mM de mangênes, promoviam um aumento significativo na taxa de germinação do fungo. A adição de EDTA, que diminui a quantidade de cátions livres na solução, prevenia a germinação até que uma adição suplementar de um dos três cátions fosse feita.

Em nossos experimentos verificamos que a ferrugem do cafeeiro não germina em presença de água de torneira. Este fato talvez se deva a presença de cloretos em solução. Dentre os sais testados por nós, os que

continham cloreto em concentrações maiores que 10 mM inibiram totalmente a germinação do fungo, sendo que os cloretos de magnésio e de potássio em concentrações de 1 mM já inibiam completamente a germinação de *H. vastatrix*. Para urediniosporos da ferrugem do cafeeiro mantidos em 20 mM de magnésio em presença de sulfato, não se observou inibição significativa na germinação. Pode-se supor assim, que o principal responsável pela inibição seja a ação de ions cloreto. Outras soluções contendo sulfato inibiram apenas parcialmente a germinação, indicando que talvez o efeito de inibição parcial se deva ao cátion associado ao sulfato. Cátions cálcio, magnésio e manganês não estimularam a germinação de *H. vastatrix*.

Na presença de galactose, manose e sacarose, em concentrações maiores de 1 mM, a taxa de germinação observada foi maior do que a observada para água, indicando que possivelmente o fungo possa utilizar durante a germinação, açúcares presentes no meio em solução. Glicose e amido não apresentaram efeito sobre a taxa de germinação de urediniosporos de *H. vastatrix*, indicando que, possivelmente, tanto a glicose como seus polímeros não são metabolizados pelo fungo, e que, da molécula de sacarose, possivelmente apenas a frutose seja metabolizada.

Extrato de levedura, azida sódica e glicina inibem totalmente a germinação do fungo.

Compostos voláteis emanados por folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo aparentemente não apresentam qualquer ação sobre a germinação do fungo, mas vapores de β -ionona aumentam a taxa de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, em quase duas vezes o valor normalmente observado (Figura 3).

Alguns fungos são influenciados por compostos voláteis emanados de seus hospedeiros. Compostos emanados de folhas, ramos e sementes germinadas de açafrão estimularam a germinação de teliosporos da ferrugem do açafrão, *Puccinia carthami* Cda. (KLISIEWICZ, 1972 e 1973). BINDER et alli (1977) demonstraram que os poliacetilenos voláteis isolados de açafrão estimulavam a germinação de teliosporos de *P. carthami*. Foi observado pelos autores que 15 ng/cm^3 de 1,11-tridecadieno-3,5,7,9-tetraíno, aumentavam a taxa de germinação de 10 % para 83 %. GOLD & MENDGEN (1983), também observaram um efeito estimulante na germinação de teliosporos de *U. appendiculatus* por compostos emanados de grãos de feijão, em germinação.

Aparentemente, os compostos emanados de

folhas de cafeeiro não tem efeito sobre a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix*, pois, como se observa na figura 4, as médias de germinação nas amostras mantidas em ambiente com vapor d'água, 1-nonanol ou na presença de compostos voláteis de folhas de cafeeiro não diferiram entre si, quaisquer que fossem os suportes de germinação utilizados.

β -ionona é um composto naturalmente encontrado em várias plantas, e é estruturalmente similar ao retinol e retinal, à partir dos quais pode ser sintetizado (STACHER, 1968). Estes compostos podem ser originados da clivagem do β -caroteno e estão, segundo GALLAND & RUSSO (1979), envolvidos na diferenciação celular de *Phycomyces blakesleeana*. SALT et alii (1986), constataram que a inoculação de *Peronospora tabacina* em hastes de tabaco induziam a síntese de β -ionona e que a inoculação exógena do composto em *Nicotiana tabacum* levava a modificações no padrão de crescimento da planta, que passava inclusive, a apresentar respostas de resistência a inoculação com *P. tabacina*.

β -ionona estimula a germinação de urediniosporos de diversos fungos causadores de ferrugens, como *U. phaseoli* (FRENCH et alii, 1977), *Uredo eichhorniae*

Gonz.-Frag. & Cif. e *Uromyces pontederiae* Gerard (CHARUDATTAN et alii, 1981).

Foi observado que uma concentração de $0.05 \frac{\mu\text{l}}{\text{cm}^3}$ de vapores de β -ionona, era capaz de estimular a germinação em 82.5 % dos uredíniosporos de *H. vastatrix* germinados sobre água, enquanto que uma solução de 10^{-3} $\frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$ do mesmo composto inibia fortemente a germinação do fungo. MUSUMECI (1976), entretanto, não observou diferenças entre as taxas de germinação de uredíniosporos germinados sobre água e em soluções com 10^{-4} M de β -ionona. É possível que o efeito inibidor sobre a germinação provocado por β -ionona em solução se deva, não a ação do composto, mas sim ao fato de que nestas soluções os uredíniosporos não flutuam, o que segundo RAYNER (1961), e HOCKING (1968) é essencial para a germinação da ferrugem do café.

Observou-se também em nossos experimentos que, a taxa de germinação do fungo é dependente do tipo de substrato sobre o qual foi depositado o uredíniosporo de *H. vastatrix*. Assim, a germinação sempre foi maior em substratos sólidos do que sobre água (Figura 3).

WOODBURY & STAHMANN (1970), observando a liberação de compostos por uredíniosporos de *P. graminis* e

U. phaseoli e medindo a tensão superficial no líquido de germinação, correlacionaram a presença destes compostos com a taxa de germinação dos fungos. Segundo os autores, estes compostos formariam uma película sobre a água e sugeriram que as interações entre esta película e a cutícula do hospedeiro (ou o suporte de germinação), resultariam na formação de uma gota de infecção com uma área definida. Nesta gota as interações entre as reações na película e o volume de água presente na gota, resultariam no controle do processo de germinação e posterior desenvolvimento do tubo germinativo e diferenciação das estruturas de infecção. Como sobre suportes sólidos, após determinado período, formam-se gotículas d'água por condensação de vapor, estas películas formadas pelo urediniosporo do fungo diminuiriam a taxa de evaporação, delimitariam a área de atuação dos autoinibidores e estimuladores de germinação e regulariam o desenvolvimento do fungo. Em grandes volumes d'água, o controle da germinação seria prejudicado pela difusão dos fatores de regulação.

STAHMANN et alii (1976) descreveram a formação de uma película durante a germinação de *H. vastatrix*, e o mecanismo descrito por WOODBURY & STAHMANN (1970) pode ser o responsável pela maior taxa de

germinação observada sobre membranas de colódio, com e sem óleo de parafina e poliestireno, com e sem ranhuras em relação ao observado para uredíniosporos mantidos em água.

Observamos nos nossos experimentos que, para o total de uredíniosporos germinados que formaram apressórios, o tipo de suporte de germinação utilizado teve grande importância. Membranas de colódio com óleo de parafina e de poliestireno com ranhuras se mostraram indutoras para a diferenciação de apressórios se comparadas ao observado quando os uredíniosporos foram incubados sobre água e se mostraram miméticas se comparadas com o verificada em folhas de caféiro susceptível. As membranas de colódio sem óleo e poliestireno sem ranhuras induziram um comportamento similar entre si quanto à diferenciação de apressórios, porém, em menor intensidade ao observado para as superfícies indutoras. Estas membranas apresentaram uma taxa média de indução de apressórios maior do que o observado para uredíniosporos incubados sobre água (Figura 4).

O fato de algumas superfícies apresentarem condições para a diferenciação de apressórios, em fungos causadores de ferrugens foi descrita por DICKINSON (1949a), em *P. tritici*, *P. graminis* e *P. glumarum*. O

autor verificou que membranas de colódio com óleo de parafina, induziam a formação de apressórios, vesículas subestomáticas e hifas infectivas. Com a adição às membranas de frações de parede celular e proteínas extraídas de folhas de trigo, o autor observou que as estruturas formadas apresentaram 4 núcleos. Entretanto, DICKINSON (1949a) não relatou com que frequência a diferenciação ocorria. Posteriormente, MAHESWARI & HILDEBRANDT (1967), utilizando membranas de colódio com óleo de parafina, induziram a formação de estruturas de infecção em várias ferrugens vegetais, mas não em *P. graminis*. Entretanto, quando os autores, submeteram uredíniosporos da ferrugem do trigo germinados em membranas de colódio com óleo a um choque térmico ou utilizaram compostos ativadores de germinação, descritos por ALLEN (1955), as estruturas de infecção se desenvolveram. MACKO et alii (1978), caracterizaram o composto indutor de diferenciação, utilizado por MAHESHWARI et alii (1967), como sendo acroleína. WYNN (1976), através do uso de réplicas plásticas da epiderme de feijoeiros, demonstraram que a topografia da folha era capaz de induzir a formação de apressórios na ferrugem do feijão. STAPLES et alii (1983b), conseguiram diferenciar apressórios em *P. graminis* f. sp. *tritici* apenas pelo uso de várias membranas onde se fizeram previamente algumas

ranhuras. Este estímulo topográfico era responsável, segundo os autores, pelo posicionamento do apressório por sobre o estomato, e que o desenvolvimento posterior do fungo, inclusive a formação dos 8 núcleos na hifa infectiva, só era possível com um segundo estímulo do hospedeiro, que podia ser substituído por acroleína ou choque térmico.

HOCH et alii (1987), através de membranas de poliestireno onde se produziram ranhuras com tamanho definido, conseguiram verificar que uma saliência de 0,5 μ m era necessária para a indução de apressórios em *U. appendiculatus*. Curiosamente esta medida corresponde ao tamanho do lábio da célula-guarda do estômato de feijoeiros suscetíveis.

Na ferrugem do café, sobre membranas de colódio com óleo de parafina e poliestireno com ranhuras, foi observado a formação de apressórios e o que pode ser considerado como o início da diferenciação da vesícula subestomática, pois observou-se após o apressório a formação de um septo seguida de uma estrutura globosa. MUSUMECI (1976) denominou esta estrutura de vesícula primária. Esta estrutura não se desenvolve posteriormente, possivelmente pela exaustão dos metabólitos do fungo.

As membranas de poliestireno com ranhuras e de colódio com óleo de parafina apresentam depressões em sua superfície que talvez sejam as responsáveis pela indução da diferenciação do fungo e pela localização do apressório sobre o estômato.

Foi possível a diferenciação destas estruturas sobre membranas sem o consórcio de qualquer outro artifício, como choque térmico ou indutores químicos, caracterizando um fenômeno de tigmiodiferenciação, como o definido por STAPLES et alii (1983b). Este fenômeno já havia sido observado por MUSUMECI (1976) na ferrugem do café, observando o comportamento do fungo sobre membranas de colódio com óleo de parafina.

Este fenômeno pode ser útil em protocolos de controle, através de modificações genéticas da arquitetura dos estômatos de cafeeiro, ou outras medidas que alterem a morfologia externa da folha. OSSWALD et alii (1984), tratando folhas de feijoeiros com uma solução do composto "Merniel", observaram uma diminuição de 95 % na taxa de infecção com *U. appendiculatus*. Segundo os autores, isto se deveu a formação de uma cobertura de Merniel polimerizado, que além de diminuir a taxa de

evaporação da folha, impediu o reconhecimento do sítio de infecção por parte do fungo.

Também caracterizou-se um evento de quimiodiferenciação (STAPLES et alii, 1983c) em urediniosporos de *H. vastatrix*, através da estimulação com vapores ou soluções de 1-nonanol.

O composto 1-nonanol, é um conhecido estimulador da germinação de *P. graminis* (ALLEN & DUNKLE, 1971), e pode ser isolado a partir de seus urediniosporos.

Fenômenos de quimiodiferenciação são descritos em várias ferrugens, como o caso de *U. appendiculatus*, que pode ter a formação de apressórios induzida por ions potássio (STAPLES et alii, 1983a); AMPc (STAPLES & MACKO, 1984), ions magnésio (KAMINSKYJ & DAY, 1984b), sacarose e glicose (KAMINSKYJ & DAY, 1984a). Em *P. graminis* a formação de apressórios pode ser induzida por pelargonaldeído (FRENCH & WEINTRAUB, 1957) ou acroleína (MAHESHWARI et alii, 1967; MACKO et alii, 1978).

Pelargonaldeído ou n-nonanal, é um aldeído estruturalmente similar ao álcool 1-nonanol e MUSUMECI (1976), tratando urediniosporos de *H. vastatrix*, com os dois compostos em soluções com 10 ml, não observou

qualquer efeito na germinação ou formação de estruturas de infecção. Isto se deve talvez, a concentração do produto utilizada no experimento.

Quando os esporos de *H.vastatrix* eram tratados por 30 min com vapores de 1-nonanol e posteriormente incubados, sem o composto, sobre membranas de poliestireno com ranhuras, o fenômeno de indução continuava ocorrendo indicando que a indução com 1-nonanol, age em passos iniciais do processo de diferenciação, e que a possibilidade de formação de apressórios estaria predeterminada, antes mesmo da germinação.

Quando se utilizou 1-nonanol em solução aquosa, observou-se a formação de apressórios em urediniosporos germinados sobre água, apenas em níveis muito baixos na ausência do composto. Para vapores de 1-nonanol, não se observou, ao contrário, qualquer indução em urediniosporos germinados sobre água, ou em substratos não indutivos, mas apenas em membranas de colódio com óleo ou de poliestireno com ranhuras. Isto indica, provavelmente, a ação conjunta dos fenômenos de quimiodiferenciação e tigmiodiferenciação, com 1-nonanol desreprimindo um passo da cadeia de eventos que leva a

diferenciação, de maneira a encurtar o período necessário para o início da formação do apressório, enquanto a topografia atua sobre outro passo da mesma linha de eventos. Com relação a ação do 1-nonanol em solução, com 12 h, já se observa uma grande taxa de diferenciação de apressórios. Este fato corrobora a suposição de que o 1-nonanol predispõe os uredíniosporos à diferenciação, e que a topografia e/ou estado genético fisiológico do esporo iniciam o processo.

Dos apressórios formados sobre membranas artificiais emergiu, após 12 h de incubação, uma estrutura globosa, com septo, que foi denominada como estrutura similar à vesícula subestomática. Aparentemente, esta estrutura não tem significado fisiológico, pois não foi observado desenvolvimento posterior e nem apresentou morfologia característica. Nesta fase, os níveis de carboidratos e lipídeos são baixos, se comparados aos de uredíniosporos não germinados, o que talvez explique o seu não desenvolvimento e, sugira a necessidade do aporte, para o fungo, de substâncias presentes na cavidade subestomática da folha do cafeeiro.

Uredíniosporos de *H. vastatrix* apresentam uma parede rígida, o que dificultou a sua maceração mecânica nos processos de extração de componentes celulares.

Aparentemente, durante as primeiras fases de germinação, ocorrem processos que levam à diminuição da rigidez, o que permitiu após 1 h de incubação em água destilada, a maceração de quase todos os esporos incubados. Este fato pode indicar que nos primeiros momentos do processo germinativo atuam enzimas degradativas da parede, que ajam possivelmente na dissolução do poro germinativo.

Na parede de urediniosporos germinados de *H. vastatrix*, observou-se a presença de alfa-manose, alfa-glicose e quitina. Durante o desenvolvimento do tubo germinativo, observou-se um aumento da quantidade de quitina na parede, e uma redução nos níveis de manose e glicose. Os mesmos carboidratos estão presentes nos apressórios, células mãe-de haustório e haustórios.

KAPOORIA & MENDGEN (1985), observaram em *Uromyces fabae* (Pers.) de Bary, através de lectinas marcadas com FITC, a presença de quitina no tubo germinativo do fungo. A fluorescência dos tubos germinativos marcados com WGA-FITC não diminui em urediniosporos germinados por 3, 5 e 7 h, indicando que os totais de quitina não se alteraram. Evidenciaram também que a quantidade de quitina na parede do apressório era menor do que a observada no tubo germinativo, sendo que o

componente não foi observado na vesícula subestomática e na hifa infectiva. Fucose e galactose também foram observadas nas paredes do fungo.

Para a *U. appendiculatus* e *P. coronata* MENDGEN et alii (1985), evidenciaram com FITC-lectinas, a presença de quitina nos tubos germinativos, glucanas e quitina nos apressórios sendo que as vesículas subestomáticas e as hifas infectivas contêm apenas glucanas.

CHARD & GAY (1984), estudando, através de FITC-lectinas, a interface entre *E. graminis* e *Pisum sativum* L. observaram na matrix-extrahaustorial a presença de polissacarídeos $\beta(1 \rightarrow 4)$ ligados e pequenas quantidades de alfa manose e glicose e β -Nacetil-glicosamina. Nos haustórios observaram β -N-acetilglicosamina, alfa-manose, alfa-glicose e galactose. Comparando interações compatíveis e incompatíveis observaram que nas linhagens resistentes a quantidade de manose e glicose terminal e grupamentos N-acetil-glicosamina era maior do que nas interações com plantas susceptíveis.

MENDGEN et alii (1988), através da marcação de macerado de parede de tubos germinativos de *U. phaseoli*

com FITC, mostrou que em plantas onde normalmente o patógeno forma haustórios, observa-se forte marcação fluorescente, ou seja, grande ligação entre o material fúngico e a parede vegetal. Estes dados, segundo o autor, sugerem que a ligação entre a parede do fungo e do hospedeiro é necessária para a indução dos haustórios.

Observa-se que os carboidratos expostos na parede de fungos causadores de ferrugens em vegetais, diferem de espécie para espécie, e segundo MENDGEN et alii (1988) estes compostos devem estar envolvidos no reconhecimento espécie-específico do hospedeiro, podendo ser os responsáveis pela supressão das reações de defesa do hospedeiro nas interações compatíveis.

Observou-se uma diminuição crescente dos níveis de lipídeos presentes em *H. vastatrix* durante o seu desenvolvimento. Esta diminuição foi mais acentuada no período que corresponde a formação do apressório, o que pode indicar uma maior necessidade de energia, ou de esqueletos carbônicos para o desenvolvimento do fungo neste período.

Para a quantidade de carboidratos solúveis recuperados, observou-se uma diminuição acentuada dos

níveis destes compostos num período de 0 a 6 h de incubação, o que corresponde ao período de elongação do tubo germinativo e de início da diferenciação do apressório. Este fato parece indicar, serem os carboidratos os compostos inicialmente utilizados, durante a germinação e elongação do tubo germinativo, enquanto que os lipídeos, poderiam ser importantes no processo de formação de apressórios. Como manose, galactose e sacarose, propiciaram um aumento na taxa de germinação de *H. vastatrix*, talvez sejam estes os carboidratos utilizados pelo fungo durante a germinação.

DALY et alii (1967), observando os padrões de carboidratos e lipídeos durante a germinação de *P. graminis* f. sp. *tritici* constataram que 22 % do total de carbono presente no esporo estava na fração solúvel em etanol 80 %. A quantidade de carbono recuperada na fração solúvel em éter dietílico foi similar. Os autores observaram que após 7 h de germinação, o total de carboidratos diminuía para cerca de 20 % do inicial, enquanto o total de lipídeos manteve-se próximo dos níveis iniciais. Neste período, o comportamento da ferrugem do trigo e do cafeeiro são similares. Infelizmente DALY et alii (1967), não observaram variações dos níveis destes compostos durante a diferenciação das estruturas de infecção do fungo.

O total de carboidratos presente na fração solúvel em etanol 80 % do macerado de uredíniosporos não germinados de *H. vastatrix*, correspondeu aproximadamente a 19 % do peso dos uredíniosporos, enquanto que a fração solúvel em éter correspondeu a 44 % do peso dos esporos. LEAL et alii (1983), estudando os polissacarídeos isolados de *H. vastatrix*, constataram que esta fração correspondia a 20 % do peso do uredíniosporo.

A quantidade de proteína recuperada de *H. vastatrix* foi pequena em relação ao observado em outros modelos biológicos. Este fato parece ser resultado da ação de enzimas proteolíticas presentes no fungo, pois ao se utilizar um quelante no tampão de extração a quantidade de proteína recuperada aumentou significativamente. Quando da utilização, durante a extração de proteínas, de agentes denaturantes, como SDS e Mercaptoetanol, observou-se também um aumento da quantidade de proteínas recuperada, sugerindo que uma parte das proteínas recuperadas estaria ligada a outros compostos como membranas e fênols.

Observou-se no período de elongação do tubo germinativo uma degradação intensa do total de proteínas presentes no fungo. Já durante a formação do apressório

observou-se a síntese de proteínas "de novo", a níveis próximos ao observado no início da germinação.

DUNKLE et alii (1969), constataram que utilizando inibidores de síntese de proteínas e RNA, a síntese de RNA é necessária para o início da diferenciação de apressórios e a síntese de proteína era um requisito para o desenvolvimento das estruturas de infecção em *P. graminis* f. sp. *tritici*.

WANNER et alii (1985), comprovaram que durante a diferenciação, induzida por choque térmico da vesícula subestomática do trigo, ocorria a síntese de proteínas.

HUANG & STAPLES (1982) demonstraram a síntese de pelo menos 3 proteínas durante a diferenciação de *U. appendiculatus*.

Após 12 h de incubação os níveis de quantidade de proteína decressem rapidamente, bem como os de lipídeo e carboidratos, indicando provavelmente a exaustão das reservas do esporo, e o início, na natureza da fase parasítica.

6. CONCLUSÕES

- A taxa de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* pode ser influenciada por compostos em solução. Assim, sacarose, manose e galactose estimulam enquanto, cloreto de sódio, glicose, sulfato de cálcio e sulfato de cobre, azida sódica glicina, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e sulfato de magnésio inibem a germinação do fungo.
- A germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* também é influenciada pelo tipo de suporte de germinação, assim os uredíniosporos do fungo sempre apresentam uma taxa de germinação maior sobre suportes sólidos do que sobre água.
- Vapores de β -ionona estimulam a germinação de *H. vastatrix*.
- A taxa de formação de apressórios em uredíniosporos germinados de *H. vastatrix* é aumentada pela

administração de 1-nonanol (vapores e solução aquosa).

- A formação de apressórios também é dependente do suporte de germinação. Suportes com orifícios (colódio com óleo de parafina) e ranhuras (poliestireno com ranhuras) induzem a formação de apressórios.
- Sobre membranas indutivas para a diferenciação de apressórios, ocorre também a formação de estruturas similares a vesículas subestomáticas.
- Sobre suportes artificiais de germinação início da formação de apressórios ocorre 12 h pós inoculação e estruturas similares a vesículas subestomáticas são observadas 24 h após o início da germinação.
- Durante a formação e elongação do tubo germinativo ocorre a diminuição dos níveis de lipídeos e carboidratos em relação ao observado em uredíniosporos não germinados de *H. vastatrix*. Durante a diferenciação dos apressórios os níveis de lipídeos e carboidratos diminuem a cerca de 1/3 do total observado em uredíniosporos não germinados.
- Em uredíniosporos não germinados caracterizou-se a

presença de quitina. Para tubo germinativo, célula mãe de haustório e haustório observou-se além de quitina a presença de alfa manose e alfa glicose.

- Os níveis de quantidade de proteínas diminuem em urediniosporos germinados após 6 h. Os níveis de quantidade de proteína tornam-se similar ao observado em urediniosporos não germinados a's 12 h pós inoculação e diminuem drasticamente após 24 h de germinação.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- AKUTSU, M. Relação de função climática e biótica com a taxa de infecção da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 67 pp., 1981
- ALLEN, P. J. The role of self-inhibitor in the germination rust urediospores. Phytopathology 45:259-266, 1955
- ALLEN, P. J. Metabolic aspects of spore germination in fungi Ann. Rev. Phytopathology 3:312-342, 1965
- ALLEN, P. J. Control of spore germination and infection structure formation in the fungi Encycl. Plant Physiol. New Ser. 4:51-85, 1976
- ALLEN, P. J. & DUNKLE L. D. Natural activators and inhibitors of spore germination In Morphological and Biochemical Events in Plant-Parasite Interactions Ed. S. Akai & S. Ouchi. Phytopathol. Soc. Jpn., Tokio pp.23-58, 1971.
- ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B.; ANDRADE, I. P. R.; ABREU, R. G. & SILVA, J. B. S. Ensaio quantitativo de cobre, para o controle da ferrugem do cafeeiro no sul de Minas. In: 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, pp.197-199, 1974a.
- ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B.; MANSK, Z.; ANDRADE, I. P. R. & SILVA, J. B. S. Competição entre fungicidas cúpricos, orgânicos e sistêmicos, aplicados em

polvilhamento e pulverização, para controle de ferrugem do cafeeiro. In: 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, pp. 166-167, 1974b

ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B.; MANSK, Z.; ANDRADE, I. P. R. & ABREU, R. G. Interação dose x época de aplicação de fungicidas cúpricos, no controle da ferrugem do cafeeiro na zona sul de Minas Gerais. In: 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, pp 218-223., 1974c

ALMEIDA, S. R.; CARVALHO, A.; MONACO, L. C. & FAZUOLI, L. C. Avaliação de germoplasma de *C. arabica* com resistência a raças de *H. vastatrix* no Sul de Minas Gerais. In: Anais do 2o Congresso Brasileiro sobre Congressos Cafeeiras. Poços de Caldas, pp.99-100, 1974d.

ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B. & FRANCO, C. M. Influência da enfolhamento sobre o pegamento da florada e a frutificação do café. In: 4o Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, pp 268-269, 1976.

ANDRADE, I. P. R.; MANSK, Z.; CHAVES, G. M. & MATIELLO, J. B. Avaliação comparativa de diferentes fungicidas no controle da ferrugem e seus efeitos sobre a produção de café. In: 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas, pp. 161-163, 1974.

BAKER, C. J. Effect of divalent cations on germination of ureiospores of *Uromyces phaseoli*; *Phytopathology* p. 964 Abril, 1983.

BALLS, W. L. Infection of plants by rust fungi *New Phytol.*, 4:15, 1905

BERETTA, M. J.; 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 Phytopathol.* 3:66-70, 1977.

BERKELEY, M. J. & BROOME, C. E. Gardener's Chronicle 6:1157, 1869

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

BINDER, R. G.; KLISIEWICZ, J. M. & WAISS, A. C. J. Stimulation of germination of *Puccinia carthami* teliospores by poliacetylenes from safflower. Phytopathology 67:472-474, 1977

CALFOUZOS, L. & CHANG, H. Fungus spore germination inhibited by blue and far red radiation Plant Physiol. 47:727-730, 1971.

CALTRIDER, P. G.; RAMACHANDRAN, S. & GOTTLEIB, D. Metabolism during germination and function of glyoxylate enzymes in rust diseases. I. Factors influencing rates of decarboxylation Phytopathology, 53:86-92, 1963

CAMPACCI, C. A. & CHIBA, S. Efeito do Triadimefon puro e associado a fungicidas cúpricos no controle da ferrugem do cafeeiro no estado de São Paulo. In: 10o Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, pp. 49-53, 1983.

CARNEIRO FILHO, F.; MENDES, A. T. A.; ANDRADE, I. P. R.; MATIELLO, J. B.; ABREU, R. G.; MANSK, Z. & HOLTRUP, H. H. Interação dosagem x época de aplicação de fungicidas, no controle de ferrugem do cafeeiro no Paraná. In: 10o Congresso Brasileiro sobre Pragas e Doenças do Cafeeiro. Vitória, pp. 126-126, 1973

CARNEIRO FILHO, F.; MATIELLO, J. B.; MANSK, Z. Competição de novos fungicidas sistêmicos e cúpricos de baixa concentração no controle da ferrugem do cafeeiro no Paraná. In: 10o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, pp.376-377, 1983.

- CARVALHO, A. Pesquisas sobre a resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix* em São Paulo. Garcia de Orta, Ser. Est. Agron., Lisboa, 9:129-136, 1968.
- CHABROL, E. & CHARONNAT, R. Une nouvelle reaction pour l'étude des lipides: L'oleidemie. Presse Med. 45: 1713-1714, 1937.
- CHANG, H. & CALPOUZOS, L. Phototropism of the uredospore germ tubes of *Puccinia graminis tritici*. Bot. Bull. Acad. Sin. 14:35-40, 1973.
- CHANG, H.S; WILCOXSON, R. D. & CALPOUZOS, L. Inhibition of urediospore germination by light partially relieved by soaking spores in water Phytopathology 64:158, 1974.
- CHARD, J. M. & GAY, J. L. Characterization of the parasitic interface between *Erysiphe pisi* and *Pisum sativum* using fluorescent probes Physiological Plant Pathology 25:259-276, 1984.
- CHARUDATTAN, R.; McKINNEY, D. E. & HEPTING, K. T. Production, Storage, Germination, and Infectivity of Uredospores of *Uredo eichhorniae* and *Uromyces pontederiae* Phytopathology 71:1203-1207, 1981.
- CRAMER, P. J. S. A review of literature of coffee research in Indonesia. Misc. Publi. Inter. Amer. Inst. Agric. Sci., Turialba, 15: p.262, 1957
- DALY, J. M.; KNOCH, H. W. & WIESE, M. V. Carbohydrates and lipid metabolism during germination of urediospores of *Puccinia graminis tritici* Plant Physiol. 42:1633-1642, 1967
- DARVILL, A. G. & ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants Annu. Plant Physiology 35:245-275, 1984.
- DELACROIX, J. & MAUBLANC, A. Maladies des plants cultivées dans les pays chauds, Edts. Augustin Challamel, Paris, pp.271-303, 1911.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. I. The stimuli determining the direction of growth of the germ-tubes of rust and mildew spores. Ann. Bot. (London) 13:89-104, 1949a

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. II. The behavior of the germ tubes of certain rusts in contact with various membranes. Ann. Bot. (London) 13:219-236, 1949b

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. VI. Direct growth. Phytopathol. Z. 66:38-49, 1969.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. VII. The effect of a curved thigmotropic stimulus. Phytopathol. Z. 69:115-124, 1970.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. VIII. An analysis of fungal responses to thigmotropic stimuli Phytopathol. Z. 70:62-70, 1971

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. IX. The measurement of a thigmotropic stimulus Phytopathol. Z. 73:347-358, 1972.

DREYWOOD, R. Qualitative test for carbohydrate material Analytical Edition p. 499, August 1946

DUARTE, C. S.; CHALFOUN, S. M.; REIS, P. R.; ALVARENGA, G. CARVALHO, M. M. Efeito da ferrugem alaranjada e do bicho mineiro no conteúdo foliar do cafeeiro. In: Anais do 4o Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, pp. 204-204, 1976

DUNKLE, L. D.; MAHESHWARI, R. & ALLEN, P. J. Infection structures from rust urediospores: Effect of RNA and protein synthesis inhibitors. Science 163:481-482, 1969.

- EDWARDS, M. C. & BOWLING, D. J. F. The growth of rust germ tubes towards stomata in relation to pH gradients. Physiological and Molecular Plant Pathology 29:185-196, 1986
- EMMET, R. W. & PARBERY, D. G. Apressoria. Annu. Rev. Phytopathol. 13:147-167, 1975
- EPSTEIN, L.; LACCETTI, L.; STAPLES, R. C.; HOCH, H. C.; HOOSE, W. A. Extracellular protein associated with induction of differentiation in bean rust uredospore germlings Phytopathology 75(9):1073-1076, 1985
- EPSTEIN, L.; LACCETTI, L. B. & STAPLES, R. C. Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact response of the bean rust fungus Physiological and Molecular Plant Pathology 30:373-378, 1987.
- ESKES, A. B. Incomplete resistance to coffee leaf rust. In Durable resistance in crops, Eds. LAMBERTI, F.; WALLER, J. M. & VAN DER GRAAFF, N. A. Vol. 55. NATO Advanced Study Institute Series. 450 pp., 1983
- FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, A.; MONACO, L. C. & SCALI, M. H. Produtividade de progênies de cafeeiro com resistência a *H. vastatrix* em São Paulo. In: Anais do 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas. pp.94-95, 1974.
- FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R.; OLIVEIRA, D. A.; OLIVEIRA FILHO, N. L. & BONINI, R. Avaliação de novas formulações de fungicidas no controle da ferrugem do cafeeiro e seus efeitos na desfolha e produção, nas condições do sul de São Paulo. In: 9o Congresso Brasileiro sobre Pesquisa Cafeeiras. São Lourenço. pp. 285-287, 1981.
- FINK, W. M.; LIEFLAND, M. & MENDGEN, K. Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.) Plant Physiology 81:123-126, 1988.

- FOUNDIN, A. S. & MACKO, V. Identification of the self-inhibitor and some germination characteristics of peanut rust uredospores *Phytopathology* 60:990-993, 1974
- FRENCH, R. C. & WEINTRAUB, R. L. Pelargonaldehyde as an endogenous germination stimulator of wheat rust spores *Arch. Biochem. Biophys.* 72:235-237, 1957
- FRENCH, R. C.; GRAHAM, C. L.; GALE, A. W. & LONG, R. K. Structural and exposure time requirements for chemical stimulation of germination of uredospores of *Uromyces phaseoli*. *J. Agric. Food Chem.* 25:84-88, 1977.
- GALLAND, P. & RUSSO, V. E. A. The role of retinol in the initiation of sporangiophores of *Phycomyces blakesleeanus* *Planta* 146:257-262, 1979.
- GETTKANDT, G. Zur kenntnis des phototropismus der keimmyzelien einiger parasitischer pilze. *Wiss. Z. Univ. Halle-Wittenberg, Math.-Naturwiss.* 3:691-670, 1954.
- GIVAN, C. V. & BRONFIELD, K. R. Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia recondita*. *Phytopathology* 54:116-117, 1964a
- GIVAN, C. V. & BRONFIELD, K. R. Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia graminis* var. *tritici*. *Phytopathology* 54:382-384, 1964b
- GOLD, R. E. & MENDGEN, K. Activation of teliospore germination in *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* I. Aging and temperature. *Phytopath. Z.* 108:267-280, 1983
- GOPALAKHRISHNAN, K. S. Notes of the morphology of the genus *Hemileia*. *Mycologia* 43:271-283, 1951.
- GRAMBOW, H. J. & REISENER, H. J. Differenzierung und wachstum von *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* "in vitro" *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 89:555-561, 1976

- HARDER, D. E.; MENDGEN, K. Filipin-sterol complexes in bean rust and oat crown rust-fungal/plant interactions: Freeze-etch electron microscopy. *Protoplasma* 112:46-54, 1982.
- HARDER, D. E.; CHONG, J. Structure and physiology of haustoria in. *The cereal rusts* Eds. BUSHNELL, W. R. & ROELFS, A. P. Academic Press, Orlando pp.431-476, 1984
- HESS, S. L.; ALLEN, P. J.; NELSON, D. & LESTER, H. Mode of action of methyl *cis*-ferulate, the self-inhibitor of stem rust urediospore germination. *Physiol. Plant Pathol.* 5:107-112, 1975.
- HOCH, H. C. & STAPLES, R. C. Ultrastructural organization of non-differentiated uredospores germilng of *Uromyces phaseoli* variety *typica*. *Mycologia* 75:795-824, 1983a
- HOCH, H. C. & STAPLES, R. C. Visualization of actin in situ by rhodamine-conjugated phalloin in the fungus *Uromyces phaseoli* *Eur. J. Cell Biol* 32:52-58, 1983b
- HOCH, H. C. & STAPLES, R. Evidence that cAMP Initiates Nuclear Division And Infection Structure Formation in the Bean Rust Fungus, *Uromyces phaseoli*. *Experimental Mycology* 8:37-46, 1984.
- HOCH, H. C. & STAPLES, R. C. The microtubuline cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germilngs. Its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytoskeleton. *Protoplasma* 124:112-122, 1985
- HOCH, H. C. & STAPLES, R. C. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:231-247, 1987.
- HOCH, H. C.; WHITEHEAD, B.; COMEAU, J. & WOLF, E. D. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces* *Science* 235:1659-1662, 1987.

- HOCKING, D. Effects of light on germination and infection of coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Trans. Br. Mycol. Soc. **51**:89-93, 1968.
- HOOGSTRATEN, J. G. J.; TOMA BRAGHINI, M.; ESKES, A. B. Segregação para resistência a *H. vastatrix* em ICATU e CATIMOR. In: Anais do 10o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas. pp. 79-81, 1983.
- HUANG, B. F. & STAPLES, R. C. Synthesis of proteins during differentiation of the bean rust fungus Exp. Mycol. **6**:7-14, 1982.
- JONHSON, T. A tropic response in germ tubes of urediospores of *Puccinia graminis tritici*. Phytopathology **24**:80-82, 1934.
- JONHSON, M. A. & FREAR, D. S. The conversion of lipids to carbohydrates by germinating flax rust urediospores [*Melampsora lini* (Pers.) Lev.] Plant Physiol. **37**:1
- KAMINSKYJ, S. G. W. & DAY, A. W. Chemical Induction of infection structures in rust fungi I. Sugars and Complex Media Exp. Mycol. **8**:186-192, 1984a
- KAMINSKYJ, S. G. W. & DAY, A. W. Chemical Induction of infection structures in rust fungi II. Inorganic ions. Exp. Mycol. **8**:193-201, 1984b
- KIM, W. K.; HOWES, N. K. & ROHRINGER, R. Detergent-soluble polypeptides in germinated urediospores and differentiated urediosporeling of wheat stem rust Can. J. Plant Pathol. **4**:328-333, 1987.
- KAPDORIA, R. G. & MENDGEN, K. Infection structures and their surface changes during differentiation in *Bromyces fabae*. Phytopathol. Z. **113**:317-323, 1985
- KNIGHTS, I. K. & LUCAS, J. A. Photosensitivity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* urediniospores *in vitro* on the leaf surface Trans. Br. Mycol. Soc. **74**:543-549, 1980.

- KLISIEWICZ, J. M. Effect of host plant materials and temperature on germination of teliospores of *Puccinia carthami*. *Phytopathology* 62: 436-438. 1972
- KLISIEWICZ, J. M. Effect of volatile substances from safflower on germination of teliospores of *Puccinia carthami*. *Phytopathology* 63:795. 1973.
- LACCETTI, L.; STAPLES, R. C. & HOCH, H. C. Purification of calmodulin from bean rust uredospores. *Experimental Mycology* 11:231-235, 1987
- LAGENBACH, R. J. & KNOCH, H. W. Phospholipids in urediospores of *Uromyces phaseoli*. I. Identification and localization. *Plant. Physiol.* 48:729-734, 1971a
- LAGENBACH, R. J. & KNOCH, H. W. Phospholipids in urediospores of *Uromyces phaseoli*. II. Metabolism during germination. *Plant. Physiol.* 48:735-742, 1971b.
- LEAL, J. A.; GOMEZ-MIRANDA, B. & RUIZ, P. Polysaccharides from *Uromyces vastatrix* uredospores. *Experimental Mycology* 7:67-69, 1983.
- LEWIS, B. G. & DAY, J. R. Behaviour of urediospor germ-tube of *Puccinia graminis tritici* in relation to the fine structure of wheat leaf surface. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 58:139-145. 1972.
- LITTLEFIELD, L. J. & HEATH, M. C. *Ultrastructure of rust fungi*. Academic Press, New York, 146 pp., 1979
- LITTLEFIELD, L. J. & BRACKER, C. E. Ultrastructural specialization of the host-pathogen interface in rust infected flax. *Protoplasma* 74:271-305. 1972
- LOWRY, D. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

- LUCAS, J. A.; KENDRICK, R. E. & GIVAN, C. V. Photocontrol of fungal spore germination *Plant Physiol.* **56**:847-849, 1975.
- MACCAIN, J.W. & HEMMEM, J. F. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus *Hemileia vastatrix*. *Phytopathology* **34**:714-721 1984.
- MACKO, V.; STAPLES, R. C.; GERSHON, H. & RENWICK, J. A. A. Self-inhibitor of bean rust urediospores: 3,4-dimethoxycinnamate *Science* **170**:539-540, 1970
- MACKO, V.; STAPLES, R. C.; ALLEN, P. J. & RENWICK, J. A. A. Identification of the germination self-inhibitor from wheat stem rust urediospores. *Science* **173**:835-836, 1971a
- MACKO, V.; STAPLES, R. C.; ALLEN, P. J. & RENWICK, J. A. A. Germination self-inhibitor of sunflower and snapdragon rust urediospores *Phytopathology* **61**:902, 1971b
- MACKO, V.; STAPLES, R. C.; RENWICK, J. A. A. & PIRONE, J. Germination self-inhibitor of rust urediospores *Physiol. Plant Pathol.* **2**:347-355, 1972
- MACKO, V.; STAPLES, R. C.; YANIV, Z. & GRANADOS, R. R. Self-inhibitors of fungal spore germination. In: *The fungal spore* Eds. D. J. WEBER & HESS, W. M pp. 73-100, Wiley, New York, 1976.
- MACKO, V.; TRIGONE, E. J. & YONG, S. A. Identification of germination self-inhibitor from urediospores of *Puccinia striiformis* *Phytopathology* **67**:1473-1474, 1977
- MACKO, V.; RENWICK, J. A. A. & RISSLER, J. F. Acrolein induces differentiation of infection structures in the wheat stem rust fungus. *Science* **199**:442-443, 1978

- MAHESHWARI, R. & HILDEBRANDT, A. C. Directional growth of the urediospore germ tubes and stomatal penetration. *Nature* 214:1145-1146, 1967.
- MAHESHWARI, R.; HILDEBRANDT, A. C. & ALLEN, P. J. The cytology of infection structures development in urediospore germ tubes of *Uromyces phaseoli* var. *typica* (Pers.) Winter. *Can. J. Bot.* 45:447-450, 1967.
- MANSK, Z.; ANDRADE, I. P. R.; MATIELLO, J. B. & ABREU, R. G. Efeito de fungicidas cúpricos, sistêmicos e orgânicos no controle da ferrugem do cafeeiro e na produção de café, em cafezal "conilon" (*Coffea canephora*), no Espírito Santo In. 1o Congresso Brasileiro sobre Pragas e Doenças do Cafeeiro, Vitória, pp 6-7. 1973.
- MARTINS, E. M. F. Sequencia de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em folhas de cafeeiro com susceptibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Tese de mestrado apresentada na ESALQ Piracicaba. 144 pp. 1983.
- MARTINS, E. M. F.; TIBURZY, R. & MORAES, W. B. C. Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix* *Fitopatologia Brasileira* 10:627-636, 1985.
- MARTINS, E. M. F.; BERETTA, M. J.; 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. *Fitopatologia Brasileira* 10:521-529, 1986.
- MAYNE, W. W. Physiological specialization of *Hemileia vastatrix* E et Br *Nature* 129:510-511, 1932.
- MEDEIROS, A. G. Informe sobre *Hemileia vastatrix* em café na Bahia, Brasil. Com. Exec. Pl. Recup. Econ. Rural Lav. Cacaueira, Rio de Janeiro, 1970.
- MENDGEN, K. Nutrient uptake in rust fungi *Phytopathology*

71:983-989, 1981

MENDGEN, K. & NASS, P. The activity of powdery mildew haustoria after feeding the host cells with different sugars, as measured with a potentiometric cyanine dye. Planta 174:283-288, 1988.

MENDGEN, K.; LANGE, M. & BRETSCHNEIDER Quantitative estimation of the surface carbohydrates on the infection structures of rust fungi with enzymes and lectins. Arch. Microbiol. 140:307-311, 1985.

MENDGEN, K.; SCHNEIDER, A.; STERK, M. & FINK, W. The differentiation of infection structures as a result of recognition events between some biotrophic parasites and their hosts. J. Phytopathology 12:73-78, 1988

MOERSCHBACHER, B.; KOEGL, K. H.; NOLL, U. & REISNER, H. J. An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. I. Partial purification and characterization. Z. Naturforsch. 41:830-835, 1986.

MORAES, S. A. A ferrugem do cafeeiro: importância, condições predisponentes, evolução e situação no Brasil. Trabalho apresentado em exame de qualificação no Departamento de Fitopatologia, ESALQ, Piracicaba, 36 pp. (mimeografado), 1980

MORAES, W. B. D.; MARTINS, E. M. F.; MUSUMECI, M. R. & BERETTA, M. J. S. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. Summa Phytopathol. 2:36-43, 1976

MUSUMECI, M. R. Influência de substratos artificiais na diferenciação dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. associado a estímulos de luz e calor. Summa Phytopathologica 2:270:274, 1976.

NUTMAN, F. J. & ROBERTS, F. M. Coffee leaf rust. EANS 16:660-624, 1970

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F. M. & CLARKE, R. T. Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46(1):27-48, 1963

OSSWALD, W.; NIEHUSS, M.; HUBER, W. ELSTNER, E. F. Support of non-host resistance by artificial leaf coating. Journal of plant Diseases and Protection 91:337-344, 1984.

PARADIES, J. & ELSTNER, E. F. Wirt-parasite beziehungen: Untersuchungen zur induktion der athylenbildung in höheren pflanzen und zur rolle des athylens bei der ausprägung von krankheitssymptomen und der eileitung von abwehrreaktionen. Ber. Dtsch. Bot. Ges 93:635-657, 1980

PAULINO, A.I.; MONACO, L. C. & FAZUOLI, L. C. Avaliação de germoplasma de *C. arabica* com resistência a raças de *H. vastatrix* no Espírito Santo. In: Anais do 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas. pp 78-79, 1974.

RAJENDREN, R. B. Atypical and typical germination of uredinoid teliospores of *Hemileia vastatrix*. Mycologia 59:918-921, 1967

RAYNER, R. W. Germination and Penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.) Annual Applied Biology. 49:497-505, 1961

REISENER, H. J. & JAGER, K. The quantitative importance of some metabolic pathways in uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Planta 72:265-283, 1966.

RIJO, L. & RODRIGUES, C. J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. Ser. Est. Agron. Lisboa 5:23-24, 1978.

RINES, H. W.; FRENCH, R. C. & DAASCH, L. W. Nonanal and 6-methyl 5-hepten-2-one: Endogenous germination stimulators of urediospores of *Puccinia graminis* var. *tritici* and other rusts J. Agric. Food Chem. 22:96-100, 1974

ROBINSON, W. Some experiments on the effect of external stimuli on the sporidia of *Puccinia malvacearum* (Mont). Ann. Bot., London 28:331-342, 1914

ROHRINGER, R. & R. MARTENS Infected-related proteins in intercellular washing fluids from stem rust-affected leaves: race-associated protein differences revealed by PAGE and Con-A blotting. Physiol. Mol. Plant Pathol. 31: 375-386, 1987

ROGER, L. Phytopathologie des pays chauds. Encyclopédie Mycologique 18:V(2) 538-843 Lechevalier ed, Paris 1953

SACCAS, A. M. & CHARPENTIER, J. La rouille des caféiers due à *Hemileia vastatrix*. Institut Français du Café et du Cacao Bulletin No. 10, 123 pp, 1971.

SALT, S. D. & KUC, J. Possible role of non-carotenoids in induced resistance of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to blue mold (*Peronospora tabacina* Adam). In Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology Symposium University of Missouri-Columbia, 1985.

SCHIEBER, E. Economic impact of coffee rust in South America. Annual Review of Phytopathology 13:375-382, 1972

SCHNEIDER, N. J. & MURRAY, B. J. Phytochrome mediation of urediospores germination in the fungus *Puccinia graminis*. Photochem. Photobiol 29:1051-1052, 1979

SHARP, E. L.; SCHMITT, C. G.; STANLEY, J. M. & KINGSOLVER Some critical factors involved in establishment of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Phytopathology

48:469-474, 1958

- SHU, F.; NEISH, A. C. & LEDINGHAM, G. A. Utilization of added substrates by uredospores of wheat stem rust. Can. J. Botany 32: 16-23, 1954
- SPENCER-PHILIPS, P. T. N. & GAY, J. L. Domains of ATPase in plasma membranes and transport through infected plant cells New Phytologist 89:393-400, 1981
- STACHER, P. G. The Merck Index Merck & Co., Inc. Rahway, NJ 8a. Ed. 1713 pp., 1968.
- STAHMANN, M. A.; MUSUMECI, M. R. & MORAES, W. B. C. Germination of coffee leaf rust uredospores and their inhibition by cinnamic acid derivatives. Phytopathology 66: 765-769, 1976.
- STAPLES, R. C. & MACKO, V. Formation of infection structures as a recognition response in fungi. Exp. Mycol. 4:2-16, 1980
- STAPLES, R. C. & HOCH, H. C. A possible role for microtubules and microfilaments in the induction of nuclear division in bean rust uredospores germlings Exp. Mycol. 6:293-302, 1982.
- STAPLES, R. C. & HOCH, H. C. Infection structures - form and function Exp. Mycology 11:163-169, 1987.
- STAPLES, R. C.; YANIV, Z. & BUSHNELL, W. R. Spore germination and ribosomal activity in the rust fungi. I. Comparison of the bean rust fungus and a culturable wheat rust fungus Physiol. Plant Pathol. 2:27-35, 1972
- STAPLES, R. C. & MACKO, V. Germination of urediospores and differentiation of infection structures. In: The cereal rusts Ed. BUSHNELL, W. R. & ROELFS, A. P. Academic Press, Orlando. pp.255-289, 1984.

STAPLES, R. C.; APP, A. A. & RICCI, P. DNA synthesis and nuclear division during formation of infection structures by bean rust urediospore germilings. Arch. Microbiol. 104:123-127, 1975

STAPLES, R. C.; LACCETTI, L. & YANIV, Z. Appressorium formation and nuclear division in *Colletotrichum truncatum* Arch. Microbiol. 109:75-84, 1976.

STAPLES, R. C.; GRAMBOW, H. J. & HOCH, H. C. Potassium ion induces bean rust germilings to develop infection structures. Phytopathology 72:957, 1982.

STAPLES, R. C.; GRAMBOW, H. J. & HOCH, H. C. Potassium ion induces bean rust fungi to develop infection structures Exp. Mycol 7:40-46, 1983a

STAPLES, R. C.; GRAMBOW, H. J. & HOCH, H. C. Contact stimuli induce wheat stem rust urediospores to differentiate appressoria but not vesicles. Phytopathology 73:1436-1439, 1983b

STAPLES, R. C.; MACKO, V.; WYNN, W. K. & HOCH, H. C. Terminology to describe the differentiation response by germlings of fungal spores Phytopathology 78:380, 1983c

THIRUMALACHAR, M. J. & NARASIMHAN, N. J. INDES. Ann. Bot. pp.77-89. 1947, apud SACCAS A. M. & CHARPENTIER, J. La rouille des caféiers due à *Hemileia vastatrix* Institut Français de Café et du Cacao Bulletin No.10, 123 pp.

THWAITES, G. H. K. Report of the director of the Royal Botanic Garden, Peradenia. 1971 apud SACCAS, A. M. & CHARPENTIER, J. La rouille des caféiers due à *Hemileia vastatrix*. Institut Français du Café et du Cacao Bulletin No. 10, 123 pp., 1971.

TROCHA, P. & DALY, J. M. Protein and ribonucleic acid synthesis during germination of urediospores Plant

Physiol 46:520-526, 1970

- VALLECILLO, S. H. D. Efeito de fatores biológicos e climáticos sobre o desenvolvimento da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) do cafeeiro. Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 57 pp., 1980.
- WANNER, R.; FORSTER, H.; MENDGEN, K. & STAPLES, R. C. Synthesis of differentiation-specific proteins in germilings of the wheat stem rust fungus after heat shock. Exp. Mycol. 9:279-283, 1985.
- WARD, M. H. The life history of *Hemileia vastatrix* on coffee J. of Bot. 20:22-24, 1882.
- WELLMAN, F. L. Resumen de la difusion mundial de la Roya del Café. In: Simposio sobre la Roya del Café. I.I.C.A., Zona Norte, México, pp. 9-17, 1975
- WOODBURY, W. & STAHMANN, M. A. Role of surface films in the germination of rust uredospores Can. J. Bot. 48: 499-511, 1970.
- WYNN, W. K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. Phytopathology 56:136-146, 1976
- YAMAMOTO, H.; HOKIN, H.; TANI, T. & KADOTA, G. Phenylalanine ammonia-lyase in relation to the crown rust resistance of oat leaves Phytopath. Z. 90:203-211, 1977.
- YAMAMOTO, H. & TANI, T. Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to *Puccinia coronata avenae*. J. Phytopathology. 6:329-337, 1986
- YAMAMOTO, H.; HOKIN, H.; TANI, T. & KADOTA, G. Phenylalanine ammonia-lyase in relation to the crown rust resistance of oats carbohydrates on the infection structures of rust fungi with enzymes and lectins.

Mycologia 48:20-24, 1956

YOUNG, D. H.; KOHLE, H. & KRAUSS, H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. Plant Physiology 70:1449-1454, 1982.

ZAMBOLIN, L. & CHAVES, G. M. Avaliação comparativa da eficiência de fungicidas protetores no controle da ferrugem do cafeeiro. In 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas, pp. 236-237, 1974

ZAMBOLIN, L.; CHALFOUN, S. M. & CHAVES, G. M. Efeito de dosagens de fungicidas protetores orgânicos e cúpricos no controle da ferrugem do cafeeiro. In: 2o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Poços de Caldas. pp. 251-253, 1974

ZAMBOLIN, L.; PAIVA, F. A.; COSTA, J. D. P. & CHAVES, G. M. Efeito de dosagens de fungicidas cúprico veiculado em emulsão óleo-água no controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) nos anos agrícolas 1973/74 e 1974/75. In 3o Congresso Brasileiro sobre Pesquisas Cafeeiras. Curitiba, pp.92-93, 1975.