ESTUDOS SOROLÓGICOS SOBRE O FUNGO
Hemileia vastatrix BERK. ET BR. E SOBRE SUA INTERAÇÃO
COM PLANTAS DO GÊNERO *Coffea*

RICARDO HARAKAVA
Biólogo

Orientador: Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1993

Harakava, Ricardo

H254e Estudos sorológicos sobre o fungo *Hemileia vastatrix* BERK. ET BR. e sobre sua interação com plantas do gênero *Coffea*. Piracicaba, 1993.
75p.

Resumo em português e espanhol

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

Resumo em português e espanhol

1. Anticorpo - Produção 2. Ferrugem do café - Controle 3. Fungo fitopatogênico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.425

ESTUDOS SOROLÓGICOS SOBRE O FUNGO
***Hemileia vastatrix* BERK. ET BR. E SOBRE SUA INTERAÇÃO**
COM PLANTAS DO GÊNERO *Coffea*

RICARDO HARAKAVA

Aprovada em: 25. 03. 1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva
Dr. Mario Barreto Figueiredo
Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes

ESALQ/USP
Instituto Biológico - SP
Instituto Biológico - SP

Profa. Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes
Orientadora

*Aos meus pais,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos

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

Ao Dr. MÁRIO BARRETO FIGUEIREDO, pela revisão dos originais e sugestões na redação do texto.

Ao Dr. ALUÍSIO PAIVA DE CARVALHO ALBA, pela revisão dos originais e sugestões na redação do texto.

À ADELAIDE FERREIRA MARSIGLIO, colega de graduação e pós-graduação, pelo incentivo e companheirismo.

Ao Dr. HIROSHI KATAYAMA, pelo gentil fornecimento das galinhas poedeiras utilizadas no presente trabalho.

À Dra. VERA CECÍLIA A. FERREIRA, pelo auxílio na imunização das aves.

Ao DANIEL RYO SHINOZAKI, pelo auxílio na revelação das fotografias.

Ao EDSON KUMASAKA, pelo auxílio na confecção dos gráficos e impressão dos originais.

À CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.

Aos colegas da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, pelo suporte técnico indispensável à realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS —————	iii
LISTA DE FIGURAS —————	vii
LISTA DE TABELAS —————	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS —————	x
LISTA DE PLANTAS CITADAS —————	xi
LISTA DE MICROORGANISMOS CITADOS —————	xiii
RESUMO —————	xv
SUMMARY —————	xvii
 1. INTRODUÇÃO —————	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA —————	 4
2.1. Sorologia de fungos fitopatogênicos —————	4
2.2. Antígenos comuns —————	10
2.3. Metodologias empregadas para a obtenção de anti- corpos —————	19
2.4. Utilização de anticorpos extraídos de ovos de gali- nhas poedeiras —————	22
 3. MATERIAL E MÉTODOS —————	 26
3.1. Fonte de material —————	26
3.1.1. <i>Hemileia vastatrix</i> —————	26
3.1.2. <i>Coffea</i> spp. —————	27
3.1.3. Galinhas poedeiras —————	28
3.2. Extração dos antígenos —————	28
3.2.1. <i>Hemileia vastatrix</i> —————	28
3.2.2. <i>Coffea</i> spp. —————	28
3.3. Imunização dos animais —————	29
3.3.1. Com antígenos de uredíniosporos de raças de <i>H. vastatrix</i> —————	29

3.3.2. Com antígenos de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> coletados no campo — — — — —	29
3.3.3. Com antígenos de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo — — — — —	30
3.4. Extração dos anticorpos a partir dos ovos — — — — —	30
3.5. Testes sorológicos — — — — —	32
3.6. Titulação dos anticorpos — — — — —	32
3.7. Absorção dos anticorpos — — — — —	33
3.8. Quantificação dos antígenos comuns — — — — —	33
3.9. Quantificação de proteínas e carboidratos — — — — —	34
3.10. Purificação dos antígenos comuns presentes no extrato foliar de cafeeiro cv. Mundo Novo — — — — —	34
3.10.1. Precipitação etanólica — — — — —	34
3.10.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-25 — — — — —	35
3.10.3. Filtração em gel de Sephadex G-100 — — — — —	36
3.10.4. Avaliação da eficiência dos processos utilizados na purificação dos antígenos comuns — — — — —	36
3.11. Estudos sobre a natureza química dos antígenos comuns — — — — —	37
3.11.1. Tratamento com metaperiodato de sódio — — — — —	37
3.11.2. Tratamento com pronase — — — — —	37
3.11.3. Tratamento térmico — — — — —	38
4. RESULTADOS — — — — —	39
4.1. Titulação dos anticorpos produzidos pela galinha A — — — — —	39
4.2. Comparações sorológicas — — — — —	39
4.2.1. Anticorpos para antígenos de raças de <i>H. vastatrix</i> — — — — —	39
4.2.2. Anticorpos para antígenos de <i>H. vastatrix</i> coletada no campo — — — — —	43
4.2.3. Anticorpos para antígenos de cafeeiro cv. Mundo Novo — — — — —	43

4.3. Purificação dos antígenos comuns presentes no ex-	
trato foliar de cafeeiro cv. Mundo Novo — — — — —	43
4.3.1. Precipitação etanólica — — — — —	43
4.3.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepha-	
dex A-25 — — — — —	46
4.3.3. Filtração em gel de Sephadex G-100 — — — — —	49
4.3.4. Comparação das frações provenientes do extrato	
de cafeeiro cv. Mundo Novo quanto ao grau de pu-	
reza dos antígenos comuns — — — — —	49
4.4. Estudos sobre a natureza química dos antígenos comuns — — — — —	54
4.4.1. Tratamento com metaperiodato de sódio — — — — —	54
4.4.2. Tratamento com pronase — — — — —	54
4.4.3. Tratamento térmico — — — — —	54
5. DISCUSSÃO — — — — —	55
5.1. Produção de anticorpos por galinhas poedeiras — — — — —	55
5.2. Comparações sorológicas entre raças de <i>H. vastatrix</i> — — — — —	56
5.3. Antígenos comuns: detecção, purificação e natureza	
química — — — — —	58
6. CONCLUSÕES — — — — —	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — — — — —	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
1 - Método de extração de anticorpos a partir das gemas de ovos —————	31
2 - Avaliação do título dos anticorpos produzidos pela galinha A ———	40
3 - Reação sorológica em ágar contendo NaCl à concentração de 0,14 M —————	41
4 - Comparação sorológica entre raças II e III de <i>H. vastatrix</i> através de anticorpos para a raça II —————	41
5 - Comparação sorológica entre raças II e III de <i>H. vastatrix</i> através de anticorpos para a raça III —————	42
6 - Reação dos anticorpos para <i>H. vastatrix</i> coletada no campo com antígeno homólogo e com antígeno de cafeeiro cv. Mundo Novo —————	42
7 - Detecção de antígenos comuns à <i>H. vastatrix</i> em diversas espécies de cafeeiro —————	44
8 - Reação dos anticorpos para cafeeiro cv. Mundo Novo com antígeno homólogo e com antígeno de <i>H. vastatrix</i> coletada no campo —————	44
9 - Cromatografia de troca iônica da fração MN-Sd80 em coluna de DEAE Sephadex A-25 —————	47
10 - Quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna de DEAE Sephadex A-25 —————	48

11 -	Determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i) eluídos da coluna de Sephadex G-100 — — — — —	50
12 -	Filtração da fração MN-TI em coluna de gel de Sephadex G-100 — — — — —	51
13 -	Quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna de Sephadex G-100 — — — — —	52

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1 - Interações nas quais foram detectados antígenos comuns ao patógeno e o hospedeiro — — — — —	11
2 - Concentrações de proteínas e carboidratos do sobrenadante e sedimento provenientes da precipitação etanólica do extrato bruto de <i>C. arabica</i> cv. Mundo Novo — — — — —	45
3 - Comparação do grau de pureza dos antígenos comuns presentes nas frações provenientes do extrato bruto de <i>C.</i> <i>arabica</i> cv. Mundo Novo — — — — —	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	anticorpo
cv	cultivar
CN-Br	brometo de cianogênio
DEAE	dietilaminoetil
EPS	exopolissacarídio
Eq	equivalente
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FEV	filtrado de esporos vivos
f. sp.	“formae speciales”
g	gravidade
Hv	<i>Hemileia vastatrix</i>
Ig	imunoglobulina
LPS	lipopolissacarídio
MN-EB	extrato bruto de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo
MN-GF	fração do extrato de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo proveniente da filtração em gel
MN-Sd80	sedimento proveniente da precipitação etanólica a 80% (v/v) a partir de extrato de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo
MN-Sn80	sobrenadante proveniente da precipitação etanólica a 80% (v/v) a partir de extrato de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo
MN-TI	fração do extrato de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo proveniente da cromatografia de troca iônica
PEG	polietilenoglicol
p/v	peso por volume
PVP	polivinilpirrolidona
SAB	soro-albumina bovina
SDS	dodecil sulfato de sódio
TF	tampão fosfato de sódio
TFS	tampão fosfato de sódio adicionado de NaCl

Tris ————— tris(hidroximetil)aminometano

TYMV ——— turnip yellow mosaic virus (vírus do mosaico amarelo do nabo)

Vi ————— volume interno

Vo ————— volume externo

LISTA DE PLANTAS CITADAS

NOME CIENTÍFICO

Allium cepa L.
Ananas sativus Schult.
Avena sativa L.
Brassica oleracea L. var. *Botrytis-cauliflora*
Cicer arietinum L.
Citrullus vulgaris Shrad.
Coffea arabica L.
Coffea canephora Pierre
Coffea congensis Froehner
Coffea eugenioides Moore
Coffea liberica Hiern
Cucumis sativus L.
Cucurbita pepo L.
Daucus carota L.
Fragaria vesca L.
Glycine max (L.) Merrill
Gossypium arboreum L.
Gossypium hirsutum L.
Hordeum vulgare L.
Linum usitatissimum L.
Lycopersicum esculentum Mill.
Mangifera indica L.
Nicotiana tabacum L.
Oryza sativa L.
Pelargonium zonale L'Her, ex Soland in Ait.
Perilla frutescens (L.) Britt.
Phaseolus aureus Roxb.
Phaseolus vulgaris L.
Pisum sativum L.
Raphanus sativus L.
Secale cereale L.

NOME POPULAR

cebola
 abacaxi
 aveia
 couve-flor
 grão-de-bico
 melancia
 cafeeiro
 cafeeiro
 cafeeiro
 cafeeiro
 cafeeiro
 pepino
 abóbora
 cenoura
 morango
 soja
 algodoeiro
 algodoeiro
 cevada
 linho
 tomateiro
 mangueira
 fumo
 arroz
 gerânio
 perila
 mungo
 feijão
 ervilha
 nabo
 centeio

<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	sorgo
<i>Trifolium repens</i> L.	trêvo
<i>Triticum aestivum</i> L.	trigo
<i>Zea mays</i> L.	milho

LISTA DE MICROORGANISMOS CITADOS

- Accrocyllindrium oryzae* Sawada
Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Conn
Ascochyta phaseolorum Sacc.
Botrytis allii Munn.
Botrytis cinerea Pers.
Botrytis squamosa Walker
Ceratocystis fimbriata Ell. et Halst.
Colletotrichum corchori Ikata et Tanaka
Colletotrichum gloeosporioides Penz.
Colletotrichum gloeosporioides f. sp. *cucurbitae* (Berk. et Mont.) n. comb.
Colletotrichum graminicola (Ces.) Wils.
Erysiphe graminis DC. f. sp. *hordei* Em. Marchal
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers
Fusarium caeruleum Lib. ex Sacc.
Fusarium moniliforme Sheldon
Fusarium moniliforme var. *subglutinans* Wollenw. et Reinking
Fusarium oxysporum Schlecht.
Fusarium oxysporum f. sp. *lupini* (Linf.) Snyder et Hansen
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder et Hansen
Fusarium oxysporum f. sp. *pisi* (Linf.) Snyder et Hansen
Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder et Hansen
Fusarium semitectum Berk. et Rav.
Fusarium solani (Mart.) Sacc.
Fusarium solani f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder et Hansen
Hemileia coffeicola Maubl. et Rog.
Hemileia vastatrix Berkeley et Brome
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid
Melampsora lini (Pers.) Lev.
Ophiobolus graminis (Sacc.) Sacc.
Phytophthora capsici Leonian.
Phytophthora cinnamomi Rands.
Phytophthora fragariae Hickman

- Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary
Phytophthora megasperma Drech. f. sp. *glycinea* (Hildeb.) Kuan
Pseudomonas phaseolicola (Burk.) Dowson
Puccinia graminis Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et E. Henn.
Puccinia psidii Wint.
Puccinia sorghi Schw.
Pythium aphanidermatum (Eds.) Fitzp.
Rhizobium leguminosarum (Frank) Frank
Rhizobium trifolii Dangeard
Ustilago maydis (DC.) Cda.
Verticillium albo-atrum Reinke et Berth
Verticillium dahliae Kleb.
Verticillium hemileiae Bouriquet (= *Verticillium lecanii* Zimm.)
Xanthomonas malvacearum (Smith) Dowson
Xanthomonas translucens Bradbury

**ESTUDOS SOROLÓGICOS SOBRE O FUNGO *Hemileia vastatrix*
BERK. ET BR. E SOBRE SUA INTERAÇÃO COM
PLANTAS DO GÊNERO *Coffea***

Autor: RICARDO HARAKAVA

Orientador: Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

RESUMO

A utilização de galinhas poedeiras para a produção de anticorpos a serem empregados em testes sorológicos foi avaliada. Esses animais mostraram-se de fácil manejo, tanto quanto aos cuidados diários quanto para a injeção dos antígenos. A metodologia de POLSON et alii (1985), para a extração dos anticorpos presentes nas gemas dos ovos, foi empregada com sucesso, sendo acessível a qualquer laboratório que disponha de centrífuga que desenvolva entre 8.000 a 12.000 g, de preferência, que comporte tubos com capacidade acima de 40 ml. O emprego dessa metodologia, além de tornar desnecessárias as sangrias, resulta em grande quantidade de anticorpos e, como os ovos podem ser conservados em geladeira, é possível a extração dos anticorpos de vários destes simultaneamente.

A produção de anticorpos por uma galinha imunizada com antígenos extraídos de uredíniosporos da raça II de *H. vastatrix*, foi acompanhada por 53 dias após a última injeção. Foi verificado título máximo (1 : 32) nos ovos postos entre os 18° e 41° dias após a última injeção.

Anticorpos produzidos para antígenos extraídos de uredíniosporos das raças II e III de *H. vastatrix*, respectivamente, não apresentaram especificidade para raça, reagindo igualmente com antígenos homólogos e heterólogos e perdendo completamente a capacidade de reagir com antígeno homólogo, após absorção com antígeno heterólogo.

As linhas de precipitação formadas em teste de dupla difusão foram mais intensas quando foi utilizado, para a preparação do gel de ágar, tampão adicionado de NaCl à concentração de 1,4 M do que à 0,14 M.

Anticorpos produzidos por galinha imunizada com antígeno extraído de uredíniosporos de *H. vastatrix* coletados no campo, apresentaram reação não só com o antígeno homólogo como também com antígenos extraídos de folhas de cafeeiros

pertencentes às seguintes espécies: *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. liberica*, *C. eugenoides*, *C. congensis*, *C. canephora* cv. Kouillou e cv. Robusta e híbrido Sarchimor. A ocorrência de antígenos comuns ao fungo em todas as espécies de cafeeiros estudadas, sugere um envolvimento destes antígenos na compatibilidade básica existente entre *H. vastatrix* e plantas do gênero *Coffea*.

Anticorpos produzidos por galinha imunizada com antígeno extraído de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, apresentaram reação somente com antígenos extraídos de cafeeiros, não detectando, portanto, antígenos comuns no extrato do fungo.

Extrato obtido a partir de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo foi submetido, sequencialmente, a precipitação com etanol à concentração final de 80% v/v, cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE Sephadex A-25 e filtração em coluna de Sephadex G-100. Os antígenos comuns foram detectados somente no precipitado etanólico, apresentaram afinidade pelo trocador aniônico e foram eluídos principalmente no volume externo da coluna de Sephadex G-100. O comportamento destes antígenos na cromatografia de troca iônica e na filtração em gel, mostrou uma heterogeneidade tanto quanto ao grau de afinidade pelo trocador aniônico quanto à dimensão de suas moléculas.

A correspondência entre a eluição das proteínas com a dos antígenos comuns, tanto na cromatografia de troca iônica quanto na filtração em gel, indicou uma natureza proteica para essas moléculas, porém, a resistência à fervura em banho-maria por 60 min ou ao tratamento com pronase indicou uma natureza polissacarídica para o epitopo ao qual os anticorpos se ligam. Portanto, os antígenos comuns poderiam tratar-se de glicoproteínas, nas quais predomina a porção proteica mas cujos sítios antigênicos residiriam nas ramificações polissacarídicas.

**SEROLOGICAL STUDIES ON THE FUNGUS *Hemileia vastatrix*
BERK. ET BR. AND ON ITS INTERACTION WITH
PLANTS OF THE GENUS *Coffea***

Author: RICARDO HARAKAVA

Adviser : Dr. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

SUMMARY

The utilization of laying hens for the production of antibodies to be employed in serological tests has been analysed. These animals have shown easy handling, for both the daily care and the injection of the antigens. The methodology of POLSON et alii (1985), for the extraction of the antibodies present in the eggs' yolks, was successfully employed, being accessible for any laboratory that has a centrifuge that develops between 8,000 to 12,000 g, preferentially one that bears tubes with capacity above 40 ml. The utilization of this methodology, besides rendering the bleedings unnecessary, results in large amounts of antibodies and, as the eggs can be kept in refrigerator, it is possible to extract the antibodies from many of them simultaneously.

The production of antibodies by a hen immunized against antigens extracted from urediniospores of the race II of *H. vastatrix*, was verified for 53 days after the last injection. The maximum titer (1 : 32) was verified for eggs layed between the 18th and 41st days after the last injection.

Antibodies produced against antigens extracted from urediniospores of the races II and III of *H. vastatrix*, respectively, did not show race specificity, reacting equally with homologous and heterologous antigens and loosing completely the capacity of reacting with homologous antigen after absorption with heterologous one.

Precipitation lines were more intense when the agar gel was prepared with buffer containing 1.4 M NaCl as compared with those in which 0.14 M was added.

Antibodies produced by a hen immunized against antigen extracted from urediniospores of *H. vastatrix* collected in the field, have shown reaction with both homologous antigen and antigens extracted from leaves of coffee plants of the following species: *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. liberica*, *C. eugenoides*, *C. congensis*, *C. canephora* cv. Kouillou and cv. Robusta and Sarchimor hibrid. The occurrence of common antigens between the fungus and all the species of coffee plants studied,

suggests an involvement of these antigens in the basic compatibility between *H. vastatrix* and plants of the genus *Coffea*.

Antibodies produced by a hen immunized against antigen extracted from leaves of *C. arabica* cv. Mundo Novo, have shown reaction only with antigens extracted from coffee plants, and did not detect common antigens in the fungus extract.

Extract obtained from leaves of *C. arabica* cv. Mundo Novo was submitted, sequentially, to the precipitation with ethanol at a final concentration of 80% v/v, ion exchange chromatography in a column of DEAE Sephadex A-25 and gel filtration in a column of Sephadex G-100. Common antigens were detected only in the ethanolic precipitate, showed affinity for the ion exchanger and were eluted mainly in the void volume of the Sephadex G-100 column. The behaviour of these antigens in the ion exchange chromatography and in the gel filtration, showed to be heterogeneous in relation to both the affinity for the ion exchanger and the size of their molecules.

The correspondence between the elution of proteins and of common antigens in the ion exchange chromatography and in the gel filtration, suggests a protein nature for these molecules, but the maintenance of the serological reactivity even after heating in boiling water for 60 min or after pronase treatment, suggests a polysaccharide nature for the epitope to which the antibodies bind. Therefore, the common antigens seem to be complex protein-polysaccharide macromolecules in which the antigenic sites are located in the polysaccharide moiety.

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) tem como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley et Brome, pertencente a classe Basidiomycetes, ordem Uredinales e família Pucciniaceae. Outra espécie do mesmo gênero, *Hemileia coffeicola* Maubl. et Rog. é também causadora de ferrugem no cafeeiro, porém ainda não detectada no Brasil.

A ferrugem do cafeeiro foi observada pela primeira vez em 1861 na região do lago Vitória em Nyanza, na África Oriental e em 1869 foi relatado como causadora de danos econômicos no Ceilão (atual Sri Lanka) (BERKELEY, 1869). Atualmente essa doença está presente em países da África, Ásia, Oceania e Américas do Sul e Central. No hemisfério ocidental, a ferrugem foi detectada pela primeira vez no Brasil, em 1970, no Estado da Bahia e, apresentando rápida disseminação, atinge atualmente todas as regiões produtoras de café no país, além de outros países latino-americanos (CARDOSO et alii, 1986).

A quebra média na produção causada pela doença é estimada entre 20 e 30% em lavouras não tratadas ou tratadas incorretamente (IBC, 1985). Em termos mundiais, as perdas econômicas são estimadas entre 1 e 2 bilhões de dólares anuais, constituindo-se desta forma como uma dentre as 7 doenças ou pragas mais importantes das culturas tropicais (KUSHALAPPA & ESKES, 1989).

São conhecidas 31 raças fisiológicas de *H. vastatrix*, das quais 12 já detectadas no Brasil (CARDOSO et alii, 1986). A raça II, portadora do gene de virulência v5, é a predominante e ataca os cultivares de café portadores somente do gene de resistência SH5 (Mundo Novo, Catuaí, Caturra, Bourbon, Harar), que constituem a maioria nos cafezais brasileiros.

A identificação destas raças tem sido realizada através da inoculação de uredíniosporos em clones diferenciadores de café. Esta metodologia necessita de 30 a 40 dias para que os sintomas possam ser observados, e também 17 clones de diferentes grupos fisiológicos de cafeeiro (CARDOSO et alii, 1986). Metodologia empregando

discos de folhas, ao invés da planta inteira, tem sido utilizada com sucesso (CARDOSO et alii, 1986; ESKES, 1983).

Métodos sorológicos são apontados como capazes de distinguir grupos taxonômicos de fungos aos níveis de gênero, espécie, "formae speciales" e até mesmo de raça (FIGUEIREDO et alii, 1977).

Nos trabalhos de sorologia de fungos fitopatogênicos o animal mais utilizado para a produção dos anticorpos tem sido o coelho. Dentre as características favoráveis apresentadas por este animal, destacam-se a produção de grande quantidade de anticorpos circulantes que permite sangrias diárias de até 10 ml, fácil criação e manejo, alimentação pouco dispendiosa e necessidade de pouco espaço físico (FIGUEIREDO et alii, 1977).

Galinhas são também animais de fácil criação e manejo, porém menos utilizadas devido à pequena quantidade de sangue que pode ser extraído após as imunizações. Esta limitação está sendo contornada com o emprego da técnica de extração de anticorpos a partir das gemas dos ovos postos por galinhas imunizadas. Utilizando-se galinhas poedeiras, é possível obter anticorpos que seriam equivalentes aos oriundos de sangrias diárias, sem injuriar o animal.

Já foram descritas diversas técnicas de purificação dos anticorpos a partir da gema, desde processos refinados de cromatografia até métodos mais simples de precipitação, os quais chegam a diferentes graus de pureza dos anticorpos (POLSON et alii, 1980; POLSON et alii, 1985; HASSL & ASPOCK, 1988; VIEIRA et alii, 1984; BADE & STEGEMANN, 1984; JENSENIUS et alii, 1981).

Esses animais têm sido utilizados principalmente em pesquisas médicas e no desenvolvimento de radioimunoensaios para hormônios (CARROLL & STOLLAR, 1983; SONG et alii, 1985; VIEIRA et alii, 1984). Na patologia vegetal, relatos de sua utilização restringem-se à produção de anticorpos para teste imunoenzimático (ELISA) de detecção dos vírus da tristeza dos citros e do mosaico do fumo (BAR-JOSEPH & MALKINSON, 1980).

A utilização de métodos sorológicos tem revelado a existência de antígenos comuns a patógenos e plantas em diversas interações estudadas. Esses antígenos são encontrados, geralmente, entre patógenos e suas respectivas plantas hospedeiras, o que suscita a possibilidade destas moléculas estarem envolvidas no mecanismo de reconhecimento entre ambos.

Antígenos comuns a *H. vastatrix* e *C. arabica* foram detectados por

ALBA et alii (1983). Os autores observaram que em combinação compatível do fungo com o hospedeiro existia menor disparidade antigênica que em combinação incompatível.

Apesar de já terem sido detectados em inúmeras interações patógeno-planta, há uma carência de trabalhos mais aprofundados sobre os antígenos comuns. A purificação e caracterização destas moléculas é um pré-requisito para que o papel por elas desempenhado no mecanismo de reconhecimento possa ser elucidado.

Diante do exposto, são objetivos do presente trabalho:

- verificar a praticidade da utilização de galinhas poedeiras e do método de POLSON et alii (1985) para a obtenção de anticorpos a serem empregados em testes sorológicos,
- obter anticorpos para diferentes raças de *H. vastatrix* e verificar a especificidade destes,
- verificar a ocorrência de antígenos comuns a *H. vastatrix* e plantas do gênero *Coffea*, através de anticorpos produzidos por galinhas imunizadas com antígenos extraídos do fungo ou do hospedeiro,
- purificar e obter subsídios para uma melhor caracterização das moléculas antigênicas comuns a *H. vastatrix* e cafeeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SOROLOGIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

A sorologia vem sendo utilizada desde primórdios deste século, principalmente na Medicina onde é aplicada tanto na diagnose quanto na terapêutica de doenças. Até há poucas décadas sua aplicação na Fitopatologia era pouco difundida, principalmente no caso dos fungos, pois as técnicas desenvolvidas pela Micologia Médica, para fungos leveduriformes, não se aplicavam aos fungos fitopatogênicos (FIGUEIREDO et alii, 1977).

Atualmente já existem metodologias adequadas ao estudo destes fungos e o número de trabalhos publicados sobre o assunto multiplicaram. As técnicas desenvolvidas na pesquisa médica estão sendo transferidas mais rapidamente aos estudos fitopatológicos, assim, trabalhos nos quais foram produzidos anticorpos monoclonais para antígenos de fungos fitopatogênicos já não são raros.

FIGUEIREDO et alii (1977) realizaram extensa revisão sobre os trabalhos de sorologia de fungos fitopatogênicos. Foi realizado um levantamento das técnicas utilizadas nas várias etapas dos métodos sorológicos, desde a extração dos antígenos até os tipos de testes sorológicos utilizados. A análise dos trabalhos levou os autores à conclusão que a sorologia apresenta utilidade não somente na sistemática, diferenciando espécies, "formae speciales" e raças fisiológicas, como também no fornecimento de dados para um melhor entendimento de fenômenos relacionados à interação patógeno-hospedeiro.

A capacidade discriminatória dos testes sorológicos pode ser exemplificada pelos vários trabalhos realizados sobre o gênero *Fusarium*.

MADHOSINGH (1964) comenta em seu trabalho as dificuldades da taxonomia no gênero *Fusarium*, quando baseada somente em características morfológicas dos fungos. Através de testes sorológicos de dupla difusão em ágar (teste de Ouchterlony), verificou a existência de antígenos comuns às espécies *Fusarium*

oxysporum Schlecht., *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. assim como antígenos específicos, permitindo, desta forma, distingui-los sorologicamente. Foi verificada também uma maior proximidade entre *F. oxysporum* e *F. moniliforme* que entre estes e *F. solani*, o que estava de acordo com os dados de taxonomia morfológica.

TEMPEL (1957) inoculou coelhos com diferentes preparações antigênicas de raças e "formae speciales" de *F. oxysporum*. Não obteve sucesso na distinção entre estas através de microaglutinação e microprecipitina, porém, através de teste de dupla difusão em ágar, verificou alta especificidade para os anti-soros preparados com cultura líquida de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Linf.) Snyder et Hansen e *F. oxysporum* f. sp. *lupini* (Linf.) Snyder et Hansen.

HORNOK (1980) utilizou imunoeletroforese cruzada em tandem para comparar sorologicamente espécies de *Fusarium* pertencentes às seções Gibbosum e Discolor. Nesta técnica, os antígenos extraídos de dois fungos diferentes são colocados em poços localizados próximos um ao outro na placa de gel de agarose e, ao ser aplicada a corrente elétrica, os antígenos migram com uma pequena defasagem entre si. Realizando-se a corrida na segunda dimensão, no gel contendo os anticorpos, os antígenos em comum presentes nas amostras formam arcos de precipitação que se fundem em suas extremidades enquanto que antígenos distintos formam arcos que se cruzam. Através do cálculo do índice de similaridade sorológica, que leva em consideração a quantidade de antígenos comuns as duas espécies diferentes de fungo, foram agrupadas as espécies mais semelhantes sorologicamente. Em alguns casos houve concordância com a classificação segundo dados morfológicos e em outros isto não ocorreu. O autor enfatiza que a sorologia é somente uma das formas de se caracterizar organismos e, portanto, seus dados devem ser encarados como uma contribuição à taxonomia.

Três linhagens de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder et Hansen foram estudadas sorologicamente por KALYANASUNDARAM & CHARUDATTAN (1969). Duas destas mostraram-se patogênicas a diferentes espécies de algodão (*Gossypium arboreum* L. e *Gossypium hirsutum* L.) e a terceira era não-patogênica. Em teste de dupla difusão em ágar foi verificado maior número de linhas de precipitação em comum entre linhagens patogênicas do que entre estas e a linhagem não-patogênica. Segundo os autores parece haver correlação entre a presença de certos antígenos e a patogenicidade de linhagens do fungo.

MORTON & DUKES (1966), procurando encontrar um método alternativo para a diferenciação das raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder et Hansen, até então realizada através de inoculação em linhagens diferenciadoras de tomate, optaram pela sorologia devido a sua simplicidade e rapidez. Utilizando micélio desintegrado por ultra-som como antígeno imunizante, conseguiram obter anti-soros que, após absorção com antígenos heterólogos, apresentavam especificidade para raça.

Diferenças entre as raças fisiológicas 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lupini* foram detectadas por RATAJ-GURANOWSKA et alii (1984), através de imunoeletroforese cruzada e imunoeletroforese cruzada em tandem. Esta última permitiu que os autores verificassem que das 52 linhas de precipitação formadas em reação homóloga de anti-soro e antígeno da raça 3, 51 eram detectadas em reação heteróloga com antígenos da raça 2. Os autores acreditam que esta diferença possa estar relacionada à diferença na virulência entre as duas raças.

Os primeiros trabalhos de sorologia de fungos fitopatogênicos no Brasil são de FIGUEIREDO et alii (1972) e FIGUEIREDO & NAMEKATA (1974), que estudaram o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. Através de testes de aglutinação, precipitina e dupla difusão em ágar, e utilizando anti-soros absorvidos com antígenos heterólogos, puderam distinguir *A. phaseolorum* de outras espécies morfológicamente semelhantes. Os autores realizaram também estudos sobre a natureza química dos antígenos e os resultados indicaram a possibilidade de polissacarídeos serem responsáveis pela antigenicidade específica. Foi verificado que os antígenos extraídos de esporos produziam anti-soros mais específicos do que antígenos extraídos de micélio, possivelmente por estruturas reprodutivas estarem sujeitas a menor variação quantitativa e qualitativa dos antígenos, do que estruturas somáticas.

Uma série de trabalhos de tese apresentados ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, exemplificam como a sorologia pode contribuir com dados adicionais aos estudos taxonômicos baseados na morfologia, patogenicidade, compatibilidade sexual, requerimentos nutricionais e espectro de hospedeiros (KIMATI, 1975; MENTEN, 1977; BAJUNGU, 1979; GERALDI, 1981; GHINI, 1984; IGARASHI, 1984; CENTURION, 1985).

KIMATI (1975), em seu estudo sobre isolados de fungos do gênero *Colletotrichum* de esporos falcados obtidos da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*

L.), do milho (*Zea mays* L.) e do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), verificou que estes podiam ser distinguidos através de auxanografia, especificidade de hospedeiros e, também, sorologicamente, dando apoio a designação de *Colletotrichum graminicola* "formae speciales" *sacchari*, *zeae* e *sorghii*, respectivamente.

MENTEN (1977) não detectou diferenças entre raças fisiológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (Berk. et Mont.) n. comb. tanto por características culturais como morfológicas. Os dados de sorologia também não permitiram diferenciar as raças, porém o autor acredita que a utilização de técnicas sorológicas mais refinadas poderiam demonstrar diferenças antigênicas entre estas.

BAJUNGU (1979) verificou que isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. da cebola (*Allium cepa* L.) e da manga (*Mangifera indica* L.) apresentavam especificidade de hospedeiro, além de diferenças nas taxas de crescimento. Esta distinção pôde ser confirmada pelos testes sorológicos, onde anti-soros reagiram somente com antígenos homólogos. Foi verificado, porém, que um dos isolados da cebola, embora patogenicamente indistinguível dos demais, não apresentou homologia em nível sorológico. Os resultados obtidos suportam, segundo o autor, a designação de *C. gloeosporioides* "formae speciales" *cepa* para os isolados da cebola e que a validade da sorologia para a caracterização destes isolados precisa ser melhor estudada.

GERALDI (1981), complementando o trabalho de KIMATI (1975) sobre o fungo *C. graminicola*, causador de antracnose em várias espécies de gramíneas, verificou que isolados do trigo (*Triticum aestivum* L.) eram também patogênicos a cultivares de centeio (*Secale cereale* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) mas não afetavam o milho, sorgo e aveia (*Avena sativa* L.). Os dados de sorologia evidenciaram que *C. graminicola* do trigo é distinto dos isolados da cana-de-açúcar (*C. graminicola* f. sp. *sacchari*) e sorgo (*C. graminicola* f. sp. *sorghii*). Baseada nestes dados, a autora apóia a designação de "formae speciales" *secalis* para os isolados do trigo, centeio e cevada.

GHINI (1984) verificou a ocorrência dos fungos *Botrytis squamosa* Walker, *Botrytis allii* Munn. e *Botrytis cinerea* Pers. associados à queima das pontas e ao crestamento de inflorescências da cebola, em regiões produtoras dos Estados de São Paulo e Santa Catarina. As três espécies puderam ser distinguidas pela morfologia e pelo espectro de hospedeiros. Os dados de sorologia também deram indícios de tratarem-se de três espécies distintas, uma vez que o anti-soro produzido para *B. allii* reagiu somente com antígenos homólogos e o anti-soro para *B. squamosa*, apesar de apresentar reações

com antígenos heterólogos, mostrou também a ocorrência de um antígeno específico.

IGARASHI (1984) ao estudar 33 isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes cultivares de morango (*Fragaria vesca* L.) e de diferentes regiões do Estado de São Paulo, verificou a ocorrência de resistência ao fungicida Benomil em 27 destes. Estudos comparativos de morfologia e patogenicidade entre os isolados resistentes e sensíveis, demonstraram a ocorrência de diferenças significativas que puderam ser confirmadas pelos estudos sorológicos.

CENTURION (1985) não obteve sucesso na distinção sorológica entre isolados de *F. moniliforme* do arroz (*Oryza sativa* L.), milho, cana-de-açúcar e sorgo, assim como entre isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. et Reinking da cana-de-açúcar e abacaxi (*Ananas sativus* Schult.). Distinção entre os dois fungos também não foi possível. Estes resultados poderiam ser explicados, segundo a autora, pela não adequação da metodologia utilizada ou pelo fato destes fungos serem realmente indistinguíveis sorologicamente.

Nesta série de trabalhos acima descritos (KIMATI, 1975; MENTEN, 1977; BAJUNGU, 1979; GERALDI, 1981; GHINI, 1984; IGARASHI, 1984; CENTURION, 1985) a metodologia utilizada nos estudos sorológicos foi basicamente a mesma. O antígeno imunizante consistiu de suspensão de esporos (triturados ou não) em concentrações variando de 10^6 a 10^9 /ml em solução salina fisiológica, emulsionada com adjuvante completo ou incompleto de Freund. Duas injeções semanais foram aplicadas intramuscularmente em coelhos e após 4 semanas iniciou-se a coleta de amostras de sangue para obtenção do anti-soro. O antígeno utilizado nos testes sorológicos consistiu de extratos de esporos obtidos por trituração em almofariz. O teste utilizado foi o de dupla difusão em ágar.

Embora esta metodologia tenha se mostrado adequada na maioria dos casos, modificações poderiam ser efetuadas a fim de se contornar resultados negativos, como os obtidos por CENTURION (1985). Diferentes formas de obtenção do antígeno imunizante, vias alternativas de injeção, utilização de outras espécies de animais para a produção dos anticorpos e purificação do antígeno imunizante ou reagente, são algumas das possibilidades de modificação na metodologia que poderiam gerar melhores resultados (vide item 2.3.).

Anticorpos monoclonais foram utilizados em alguns dos trabalhos mais recentes sobre sorologia de fungos fitopatogênicos. A capacidade discriminatória que pode ser alcançada através destes anticorpos é exemplificada pelos trabalhos de

HARDHAM et alii (1986), ESTRADA-GARCIA et alii (1989) e WYCOFF & AYERS (1990) sobre os fungos *Phytophthora cinnamomi* Rands., *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp. e *Phytophthora megasperma* Drech. f. sp. *glycinea* (Hildeb.) Kuan, respectivamente.

HARDHAM et alii (1986) utilizaram a técnica de anticorpos monoclonais visando a obtenção de anticorpos específicos à *P. cinnamomi* que pudessem auxiliar em estudos taxonômicos. Foram obtidos anticorpos específicos ao isolado estudado, à espécie e ao gênero, assim como anticorpos com reação cruzada com fungos do gênero *Pythium*. Foi verificado que os anticorpos específicos ao isolado e à espécie ligavam-se à membrana plasmática dos zoósporos, sendo importante, portanto, a indução da formação destas estruturas quando se deseja identificar determinado isolado do fungo. Os autores acreditam que a existência de componentes isolado-específicos pode abrir caminho para o desenvolvimento de testes sorológicos que identifiquem raças fisiológicas do fungo, pois estas ainda não foram determinadas para *P. cinnamomi*.

ESTRADA-GARCIA et alii (1989) também obtiveram anticorpos monoclonais com diferentes níveis de especificidade, porém, estes foram selecionados visando o estudo das moléculas envolvidas no processo de reconhecimento e encistamento dos zoósporos. Anticorpos específicos à membrana do zoósporo, à glicoproteína adesiva e à parede do cisto foram obtidos e, através destes, os autores pretendem estudar a estrutura e função dos componentes da superfície celular, pelos quais os zoósporos ligam-se às plantas e infectam-nas.

WYCOFF & AYERS (1990) obtiveram 44 linhagens de anticorpos que puderam ser reunidos em 11 grupos, conforme a especificidade de ligação à diferentes epitopos. Foram verificadas diferenças antigênicas entre raças e até mesmo entre isolados da mesma raça, porém os autores não obtiveram sucesso no objetivo principal do trabalho, qual seja, a identificação de epitopos correlacionados aos diferentes genes de avirulência do fungo *P. megasperma* f. sp. *glycinea*.

A análise dos trabalhos de sorologia de fungos fitopatogênicos mostra uma diversidade de metodologias de obtenção de anticorpos e de testes sorológicos utilizados. A aplicação de técnicas mais modernas tem permitido melhor caracterização dos componentes antigênicos, distinção entre fungos de grupos taxonômicos próximos entre si, obtenção de anticorpos para moléculas específicas, etc. Com isso a utilidade da sorologia tem se expandido principalmente no estudo da biologia dos fungos e da interação entre patógenos e plantas.

2.2. ANTÍGENOS COMUNS

Antígenos comuns ou de reação cruzada são moléculas detectadas através de métodos sorológicos, presentes tanto no patógeno quanto no hospedeiro de uma dada interação. O fato de serem detectados principalmente em combinações compatíveis de planta e patógeno, suscita a possibilidade destes antígenos terem participação no mecanismo de reconhecimento específico.

Já foi demonstrada a ocorrência de antígenos comuns em inúmeras interações, na sua maioria envolvendo fungos, em menor quantidade bactérias e, em um caso, nematóides (TABELA 1).

Alguns parasitas de animais superiores também apresentam antígenos comuns aos seus hospedeiros. A produção de anticorpos para estas moléculas tem sido responsabilizada como causa de reações auto-imunes que sucedem a infecção por alguns patógenos como micoplasmas, estreptococos e protozoários. Os antígenos comuns presentes em bactérias entéricas do homem poderiam ser considerados como uma forma de mimetismo molecular que permitiria o estabelecimento do microorganismo sem desencadear uma resposta imunológica por parte do hospedeiro (DEVAY & ADLER, 1976).

A teoria de mimetismo molecular poderia ser aplicada também nas interações patógeno-planta, onde os antígenos comuns permitiriam que os microorganismos penetrassem e se desenvolvessem nos tecidos vegetais sem que fossem reconhecidos como elementos estranhos. Porém, esta inferência deve ser feita com a ressalva de que apesar dos vegetais apresentarem comprovadamente sistemas passivos e ativos de defesa, os modos pelos quais estes atuam não estão suficientemente esclarecidos para que se possa afirmar que o meio interno das plantas exerça pressão de seleção que possa favorecer os microorganismos antigenicamente semelhantes ao hospedeiro.

VANDERPLANK (1982) considera a existência de antígenos comuns a patógenos e hospedeiros como uma das evidências a favor de sua teoria sobre a especificidade em interações onde a teoria gene-a-gene de Flor é válida. Segundo o autor, o reconhecimento nesses tipos de interações se daria através das proteínas codificadas por genes presentes tanto no patógeno como no hospedeiro. Na suscetibilidade, proteínas do patógeno e do hospedeiro polimerizariam entre si, na interface de contato entre os organismos e, com o crescimento e avanço do patógeno, o polímero iria sendo digerido, constituindo-se numa fonte de proteínas para este. Em

Tabela 1. Interações nas quais foram detectados antígenos comuns ao patógeno e o hospedeiro

BACTÉRIAS

<i>Pseudomonas phaseolicola</i> x Feijão	Fedotova (citada por DEVAY & ADLER, 1976)
<i>Xanthomonas translucens</i> x Trigo	Fedotova (citada por DEVAY & ADLER, 1976)
<i>Xanthomonas malvacearum</i> x Algodão	Fedotova (citada por DEVAY & ADLER, 1976), SCHNATHORST & DEVAY, 1963
<i>Rhizobium</i> sp. x Leguminosas	CHARUDATTAN & HUBBELL (1973)
<i>Rhizobium trifolii</i> x Trêvo branco	DAZZO & HUBBELL (1975)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> x Girassol	DEVAY et alii (1970)

FICOMICETOS

<i>Phytophthora infestans</i> x Batata	PALMERLEY & CALLOW (1978), ALBA & DEVAY (1985)
<i>Phytophthora fragariae</i> x Morango	MOHAN (1989)

ASCOMICETOS

<i>Ceratocystis fimbriata</i> x Batata doce	DEVAY et alii (1967)
<i>Colletotrichum corchori</i> x Juta	BATTACHARYYA & PURKAYASTHA (1985)
<i>Ophiobolus graminis</i> x Trigo e Aveia	Abbott (citado por DEVAY & ADLER, 1976)
<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> x Cevada	HEIDE & SMEDEGAARD-PETERSEN (1985)

DEUTEROMICETOS

<i>Fusarium semitectum</i> x Melancia	ABD-EL-REHIM et alii (1971)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> x Algodão	CHARUDATTAN & DEVAY (1972), ABD-EL- REHIM et alii (1988a e b)
<i>Verticillium dahliae</i> x Algodão	CHARUDATTAN & DEVAY (1972)
<i>Fusarium solani</i> x Algodão	CHARUDATTAN & DEVAY (1972)
<i>Fusarium solani</i> x Ervilha	SCALA & CRISTINZIO (1988)
<i>Macrophomina phaseolina</i> x Soja	CHAKRABORTY & PURKAYASTHA (1983)
<i>Accrocyllindrium oryzae</i> x Arroz	PURKAYASTHA & GHOSAL (1985)

BASIDIOMICETOS

<i>Melampsora lini</i> x Linho	DOUBLY et alii (1960)
<i>Ustilago maydis</i> x Milho	WIMALAJEEWA & DEVAY (1971)
<i>Hemileia vastatrix</i> x Café	ALBA et alii (1983)

NEMATÓIDES

<i>Meloidogyne incognita</i> x Soja e Algodão	McCLURE et alii (1973)
---	------------------------

ABBOTT, L. K. Taxonomy and host-specificity of *Ophiobolus graminis* Sacc.; an application of electrophoretic and serological techniques. Clayton, 1973. 200p. (PhD - Monash University/Australia).

FEDOTOVA, T. I. Leningrad. Inst. Zashch. Rast. Sborn. Trud. 1:62-71, 1948.

interações incompatíveis, o polímero não se formaria, impedindo o fluxo de proteínas para o patógeno e consequentemente causando a morte deste. O polímero se formaria devido a existência de um sítio A na proteína do patógeno, complementar a um sítio B da proteína da planta. Para que a polimerização vá além da formação de um dímero, é necessário que a proteína da planta apresente um outro sítio idêntico ao A que se ligaria a uma proteína do patógeno que apresente um sítio idêntico ao B, ou seja, o polímero se formaria desde que proteínas do patógeno e da planta apresentassem sítios em comum. Esses sítios, se antigênicos, corresponderiam aos antígenos comuns detectados nas interações compatíveis.

Apesar de sua função não estar estabelecida, a presença dos antígenos comuns foi correlacionada por Fedotova (citada por DEVAY & ADLER, 1976) à suscetibilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), trigo, algodão e melancia (*Citrullus vulgaris* Shrad.) aos patógenos *Pseudomonas phaseolicola* (Burk.) Dowson, *Xanthomonas translucens* Bradbury, *Xanthomonas malvacearum* (Smith) Dowson e *Fusarium semitectum* Berk. et Rav., respectivamente. A autora utilizou a serodiagnose como ferramenta de seleção de cultivares resistentes à doenças em programas de melhoramento genético na ex-União Soviética. Neste particular vale a lembrança do período compreendido entre as décadas de 40 a 60, quando a ciência soviética esteve sob forte domínio do Partido Comunista, representado por Trofim D. Lysenko, então presidente da Academia Lênin de Ciências Agrícolas. Além dos aspectos negativos deste período, como a crença na herdabilidade de características adquiridas (Michurinismo-Lamarckismo), a negação da genética mendeliana e a perseguição de cientistas "impatrióticos", os soviéticos, de acordo com o materialismo dialético preconizado pelo Partido, salientavam uma pesquisa pragmática e voltada ao progresso em oposição à inútil pesquisa acadêmica burguesa praticada no ocidente (HUXLEY, 1949).

DOUBLY et alii (1960) também verificaram correlação entre a presença de antígenos comuns e a compatibilidade entre cultivar do hospedeiro e raça do patógeno. Utilizando-se antígenos extraídos de 4 variedades diferentes de linho (*Linum usitatissimum* L.) e anti-soro para 4 raças de *Melampsora lini* (Pers.) Lev., foi verificado título elevado (1:160 ou 1:320) somente nas reações antígeno-anticorpo envolvendo variedade e raça compatível e título baixo (1:20 ou 1:40), nas interações incompatíveis. Esta correlação não foi verificada quando utilizado antígeno do fungo e anti-soro para a planta.

WIMALAJEEWA & DEVAY (1971) detectaram antígenos comuns a *Ustilago maydis* (DC.) Cda. e milho. O anti-soro para antígenos do fungo reagiu com antígenos do milho, assim como o anti-soro para o milho reagiu com antígenos do fungo. Devido a inexistência de linhagens de milho resistentes ao patógeno, foram utilizadas a aveia e a cevada como plantas resistentes. Plantas jovens de aveia, que são suscetíveis a *U. maydis*, apresentaram antígenos comuns ao fungo enquanto que plantas mais velhas, que são resistentes, apresentaram decréscimo na quantidade de antígenos comuns. Através de centrifugação diferencial chegou-se a conclusão que os antígenos comuns se encontravam na fração ribossomal do extrato antigênico, tanto do milho como do fungo. Segundo os autores, a ocorrência desses antígenos seria uma característica das interações compatíveis mas não garantiria o estabelecimento de uma condição de doença, eles representariam somente uma etapa inicial no processo de infecção sendo que outras etapas, como a ocorrência de toxinas do hospedeiro, precisariam ser posteriormente ultrapassadas.

Esta hipótese foi reformulada em trabalho posterior de CHARUDATTAN & DEVAY (1972) no qual os antígenos comuns foram detectados em interações compatíveis e incompatíveis entre cultivares de algodão e os patógenos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder et Hansen e *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. Como a expressão de resistência do algodão a estes patógenos só ocorre após a infecção das raízes e invasão do sistema vascular, os antígenos comuns estariam relacionados a esta compatibilidade inicial e não a suscetibilidade ou resistência dos cultivares, ou seja, seriam determinantes do parasitismo mas não da patogenicidade, ou segundo o conceito de outros autores, seriam determinantes da patogenicidade mas não da virulência.

CHARUDATTAN & DEVAY (1981) realizaram purificação e caracterização parcial da molécula antigênica comum ao algodão e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. A partir de extrato de conídios do fungo, através de centrifugação e precipitação com ácido tricloroacético e sulfato de amônio, obtiveram um antígeno comum que em eletroforese e ultracentrifugação analítica migrava e sedimentava como banda única. Este antígeno mostrou-se resistente à ação de diversas proteases, apresentando composição de 75% de carboidratos, 9% de proteínas e 16% de fósforo. A injeção deste antígeno purificado em coelhos, resultou em um anti-soro que formava uma única linha de precipitação em teste de dupla difusão em ágar na reação com antígenos totais de conídios do fungo. Os autores especularam a possibilidade de que,

devido à semelhança na natureza glicoproteica dos antígenos comuns e dos supressores de elicitores de fitoalexinas, estas moléculas apresentem funções semelhantes.

DEVAY et alii (1981) verificaram que, através de técnica de imunofluorescência, o antígeno comum ao algodão e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* localizava-se, em cortes de raízes, principalmente ao redor de elementos do xilema, endoderme e células epidérmicas mas também podia ser detectado por todo o córtex, indicando ampla distribuição no tecido. No fungo, o antígeno comum localizava-se principalmente nas pontas das hifas e em áreas localizadas do conídio. Foi observado também que plantas de algodão crescidas à 24°C apresentavam menor concentração do antígeno do que plantas crescidas à 33°C, paralelamente ao fato de que as primeiras mostraram-se resistentes ao patógeno e as últimas suscetíveis.

Relação sorológica entre cultivares resistentes e suscetíveis de batata (*Solanum tuberosum* L.) e a raça 4 de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, foi observada por PALMERLEY & CALLOW (1978). Foram incluídos no estudo um hospedeiro alternativo, o tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) e não-hospedeiros, como o pepino (*Cucumis sativus* L.), milho, mungo (*Phaseolus aureus* Roxb.), ervilha (*Pisum sativum* L.), gerânio (*Pelargonium zonale* L'Her, ex Soland in Ait.), perila (*Perilla frutescens* (L.) Britt.), nabo (*Raphanus sativus* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) além de um patógeno alternativo (*Fusarium caeruleum* Lib. ex Sacc.) e não-patógenos (*P. cinnamomi* e *U. maydis*). Tomate e fumo, ambas pertencentes à família das solanáceas, também apresentaram reação cruzada com *P. infestans*, o mesmo não tendo sido observado para as demais plantas. O patógeno alternativo e os não-patógenos não apresentaram relação sorológica com a batata. Esta ocorrência relativamente específica de antígenos comuns a plantas e fungo sugere que tais antígenos podem ser relevantes ao parasitismo e não seriam simples exemplos de antígenos "heterófilos", isto é, antígenos altamente conservados entre espécies de origem filogenética diversa. Os autores acreditam que o fato de terem utilizado antígenos solúveis totais, ao invés de somente antígenos da superfície celular, tenha impossibilitado a detecção de uma grande quantidade de relações sorológicas mais fracas, existentes entre o hospedeiro e o patógeno. Seguindo este raciocínio, antígenos comuns poderiam ser encontrados mesmo entre patógenos e plantas não-hospedeiras, mas somente a presença de algumas antígenos comuns "chave" seriam importantes na determinação da compatibilidade.

ALBA & DEVAY (1985) obtiveram evidências a favor das idéias acima descritas, utilizando o teste de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"). Os

antígenos extraídos a partir do fungo foram submetidos a precipitação fracionada com sulfato de amônio em diferentes níveis de saturação (20%, 40%, 60% e 80%). Foram detectados antígenos comuns em todas as frações porém em maior concentração na fração de 40% de saturação do sal. Verificaram também que nesta fração, antígenos da raça 4 de *P. infestans* reagem com maior intensidade com anti-soro de cultivar suscetível de batata que de cultivar resistente. As demais frações não apresentaram esta diferença. Antígenos da raça 1.2.3.4.7. de *P. infestans*, virulenta a ambos cultivares de batata testados, não apresentaram estas diferenças em qualquer das frações. Os resultados indicam uma heterogeneidade dos antígenos comuns, pois foram detectados nas várias frações precipitadas com diferentes níveis de saturação do sulfato de amônio, e que os antígenos comuns "chave", importantes na determinação da compatibilidade, se encontrariam na fração precipitada com 40%.

Esta heterogeneidade quanto aos antígenos comuns foi detectada também por MOHAN (1989), na interação entre morango e *Phytophthora fragariae* Hickman. Antígenos miceliais extraídos de 5 isolados de diferentes raças do fungo, quando testados com anti-soro produzido para antígenos da planta, apresentaram várias bandas em "western blotting", correspondentes a antígenos comuns de diferentes pesos moleculares. Na situação inversa, utilizando antígenos extraídos da planta e anti-soro para o fungo, foram detectadas até 6 bandas correspondentes aos antígenos comuns. Estudando a presença destes antígenos em plantas inoculadas com raças virulentas e avirulentas do patógeno, o autor levantou a possibilidade de alguns antígenos comuns observados estarem relacionados à compatibilidade e outros à incompatibilidade da interação.

CHAKRABORTY & PURKAYASTHA (1983) também verificaram heterogeneidade para os antígenos comuns a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid e soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Através de imunoelctroforese, foram detectadas até 4 linhas de precipitação correspondentes aos antígenos comuns.

PURKAYASTHA & GHOSAL (1985), através de metodologia semelhante, verificaram ocorrência de somente uma linha de precipitação correspondente ao antígeno comum a *Accrocyllindrium oryzae* Sawada e arroz. Porém, em comum ao trabalho anterior, os autores observaram reação cruzada somente em combinações compatíveis de cultivares da planta e isolados do fungo.

HEIDE & SMEDEGAARD-PETERSEN (1985) detectaram um antígeno comum a cevada e *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Em. Marchal, o

mesmo não foi verificado entre esse fungo e espécies não-hospedeiras como a aveia, trigo, ervilha e feijão. 4 linhagens quase-isogênicas de cevada, portadoras de diferentes genes de resistência ao oídio, apresentaram antígenos comuns ao fungo, tanto nas combinações compatíveis como nas incompatíveis. Análise quantitativa, realizada através de imunoeletroforese em foguete ("rocket immunoelectrophoresis"), do antígeno comum presente nas diferentes linhagens quase-isogênicas, não indicaram qualquer relação entre a concentração do antígeno e a compatibilidade entre linhagem do hospedeiro e isolado do fungo.

SCALA & CRISTINZIO (1988) observaram a ocorrência de antígenos comuns ao fungo *F. solani* e as plantas hospedeiras ervilha e grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Os autores detectaram estes antígenos em reações de anti-soro para o fungo com antígenos das plantas e vice-versa. Plantas não-hospedeiras como tomate, cenoura (*Daucus carota* L.), couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis-cauliflora*) e abóbora (*Cucurbita pepo* L.) não apresentaram reação com anti-soro para o fungo. Anti-soro para antígenos da ervilha não reagiu com antígenos dos não-patógenos *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Phytophthora capsici* Leonian. Os antígenos comuns extraídos tanto do fungo como da ervilha foram purificados através de cromatografia de imunoafinidade e, quando analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio), apresentaram pesos moleculares diferentes. Isolado avirulento do fungo também apresentou o antígeno comum, o que, segundo os autores, indica o envolvimento destas moléculas com a compatibilidade básica entre planta e patógeno, mas não com a patogenicidade.

ABD-EL-REHIM et alii (1988a) confirmaram a ocorrência de antígenos comuns ao algodão e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Anti-soro produzido para o fungo reagiu com lectinas extraídas de sementes de cultivares suscetíveis de algodão, mas não com aquelas extraídas de cultivar resistente. Neste trabalho não foi realizado qualquer experimento visando confirmar que os antígenos comuns tratavam-se realmente de lectinas, ou seja, proteínas ou glicoproteínas com capacidade de se ligar especificamente a carboidratos, portanto, a caracterização destes antígenos como sendo lectinas é questionável.

Relação entre lectinas e antígenos comuns foi relatada anteriormente por DAZZO & HUBBELL (1975), na interação de *Rhizobium trifolii* Dangeard com o trevo (*Trifolium repens* L.). Foi verificado que o antígeno comum presente na superfície das raízes da planta e no exopolissacarídeo (EPS) de "strains"

infectivos da bactéria, apresentavam afinidade por uma lectina produzida pelo trêvo que, sendo multivalente, propiciaria a ligação da bactéria aos pêlos absorventes da planta.

Em trabalho posterior ABD-EL-REHIM et alii (1988b) modificaram o método de extração de antígenos da semente e, talvez pelos motivos acima citados, passaram a denominar as proteínas obtidas como globulinas e não mais como lectinas. Segundo classificação bioquímica, globulinas são proteínas insolúveis em água mas solúveis em soluções salinas de baixas concentrações. Neste trabalho foi verificada a ocorrência de antígenos comuns tanto em cultivares suscetíveis como nos resistentes, porém, o número de linhas de precipitação observado para os últimos foi sempre menor que para os primeiros. A ocorrência de múltiplas linhas de precipitação correspondentes aos antígenos comuns (até 8 linhas observadas) confirma a heterogeneidade destas moléculas.

A heterogeneidade dos antígenos comuns detectada nos trabalhos de ALBA & DEVAY (1985), ABD-EL-REHIM et alii (1988a e b), MOHAN (1989) e CHAKRABORTY & PURKAYASTHA (1983) não significa necessariamente que essas moléculas sejam completamente diferentes entre si e que para cada uma foi produzido um anticorpo específico. Os antígenos comuns de diferentes pesos moleculares poderiam ser glicoproteínas com a fração peptídica de tamanho variável mas com epitopos glicosídicos idênticos, de modo que um mesmo tipo de anticorpo poderia estar se ligando a antígenos de diferentes tamanhos. Sítios glicosídicos comuns a glicoproteínas de pesos moleculares variados já foram demonstrados tanto em plantas como em fungos (LAINE & FAYE, 1988; WYCOFF et alii, 1987).

Fenômeno de mimetismo molecular parece ocorrer também entre *Rhizobium leguminosarum* (Frank) Frank e leguminosas, em fases posteriores à penetração, quando a bactéria ocorre na forma de bacteróides. BREWIN et alii (1986) detectou através de anticorpos monoclonais e "immunoblotting", diferenças entre bactérias crescidas em meio de cultura e bacteróides extraídos de nódulos. Os bacteróides são envolvidos por cadeias de ácido poligalacturônico, que conferem a sua superfície uma alta densidade de cargas negativas e a torna semelhante estruturalmente à pectina. Os autores acreditam que desta maneira os bacteróides evitariam serem detectados como corpos estranhos por apresentarem uma superfície com propriedades físico-químicas semelhantes as da parede celular primária das plantas.

ALBA et alii (1973) realizaram os primeiros estudos sorológicos sobre o fungo *H. vastatrix*. Foram produzidos anti-soros para a raça II da ferrugem e

para cafeeiros suscetível e resistente. Foi verificada reação somente entre os antígenos e seus anti-soros homólogos. A não detecção de antígenos comuns poderia ser explicada, segundo os autores, pela metodologia utilizada na preparação dos antígenos fúngicos e das plantas, a qual teria resultado em extratos pouco concentrados, ou pela possibilidade do parasitismo de *H. vastatrix* ser um tipo de interação diferente das reportadas por outros autores, nas quais tais antígenos haviam sido detectados. O sucesso na obtenção de anti-soro para a raça II de *H. vastatrix*, que não reagiu com antígenos de outras ferrugens (*Puccinia sorghi* Schw. e *Puccinia psidii* Wint.), encorajava a continuidade dos experimentos no sentido de se obter anti-soros específicos para as demais raças.

Dando prosseguimento a estes trabalhos, ALBA et alii (1983) lograram detectar antígenos comuns a cafeeiro e *H. vastatrix*. Em relação ao trabalho anterior houve modificações no método de obtenção dos antígenos que resultaram em extratos mais concentrados. Os anti-soros, tanto para o fungo como para a planta, detectaram antígenos comuns em reações heterólogas. Tais antígenos parecem estar localizados na superfície externa dos uredíniosporos pois puderam ser extraídos através de simples agitação em água. O extrato fúngico foi submetido a precipitação com sulfato de amônio a 50%, 70% e 100% de saturação e em todos os precipitados obtidos, os antígenos comuns estavam presentes. Este mesmo extrato, submetido a precipitação com etanol a 80% de concentração final, também apresentou antígenos comuns no precipitado. Os antígenos das plantas foram extraídos a partir do pó cetônico de folhas e, posteriormente, submetidos a precipitação fracionada com sulfato de amônio (20%, 40%, 60% , 80% e 100% de saturação) e etanol (20%, 40%, 60% e 80% de concentração final). Dos precipitados obtidos com o sulfato de amônio, somente o correspondente a 80% de saturação apresentou antígenos comuns, tanto para a planta resistente como para a suscetível. Na precipitação etanólica, o sedimento obtido com 80% de concentração do álcool apresentou antígenos comuns em ambas as plantas enquanto que o sedimento de 60% apresentou antígenos comuns somente no caso de planta suscetível. Além desta diferença, foi verificado que os antígenos comuns podiam ser detectados em diluições mais elevadas dos extratos e precipitados de planta suscetível que de planta resistente. Segundo os autores, os resultados suportam o conceito de que em interações incompatíveis a disparidade antigênica seria maior que nas interações compatíveis, o que ocasionaria uma resposta inibitória por parte do hospedeiro no primeiro caso. Os antígenos comuns relevantes para a determinação da compatibilidade entre *H. vastatrix* e *C. arabica* estariam no precipitado obtido com 60% de

concentração de etanol, o que estaria de acordo com as conclusões de PALMERLEY & CALLOW (1978), de que nem todos antígenos comuns seriam importantes na determinação da compatibilidade, mas somente alguns antígenos comuns "chave".

A análise dos trabalhos relativos aos antígenos comuns permite fazer as seguintes considerações:

- são detectados principalmente em combinações compatíveis de espécie de planta hospedeira e espécie de patógeno (DEVAY & ADLER, 1976),
- quando detectados em plantas não-hospedeiras, estas são taxonomicamente próximas às plantas hospedeiras (mesmo gênero ou família) (PALMERLEY & CALLOW, 1978),
- alguns trabalhos indicam que para cada interação podem existir várias moléculas antigênicas em comum, de diversos pesos moleculares. Isto pode ser demonstrado pelo fato de serem detectadas em diferentes frações obtidas em precipitação fracionada com sulfato de amônio ou etanol, através da visualização de várias linhas de precipitação em testes de dupla difusão em ágar ou imunoeletroforese, ou várias bandas em "western blotting" (ALBA et alii, 1983; ALBA & DEVAY, 1985; ABD-EL-REHIM et alii, 1988a e b; MOHAN, 1989; CHAKRABORTY & PURKAYASTHA, 1983),
- as moléculas em comum ao patógeno e planta não são necessariamente idênticas (mesmo peso molecular) mas podem apresentar epitopos antigênicos em comum (SCALA & CRISTINZIO, 1988; MOHAN, 1989),
- em alguns trabalhos diferenças na concentração de antígenos comuns entre raças virulentas e avirulentas ou entre cultivares resistentes e suscetíveis puderam ser evidenciadas pelo número de linhas de precipitação observadas em testes sorológicos, pela intensidade de reação em teste de ELISA ou pelo padrão de bandas formadas em "western blotting" (ALBA et alii, 1983; ALBA & DEVAY, 1985; ABD-EL-REHIM et alii, 1988a e b; MOHAN, 1989; CHAKRABORTY & PURKAYASTHA, 1983).

2.3. METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPOS

Nos trabalhos citados sobre sorologia de fungos fitopatogênicos e antígenos comuns, o coelho destaca-se como o animal mais utilizado para a produção de anticorpos. As facilidades proporcionadas por sua utilização, já citadas anteriormente (item 1.), explicam esta predominância.

HORNOK (1980) utilizou ratos, ao invés de coelhos, em seu trabalho de sorotaxonomia de espécies de *Fusarium*. Foram produzidos anti-soros para 13 espécies diferentes do fungo, sendo que para cada uma foram utilizados 10 animais, a fim de se obter uma caracterização mais consistente dos componentes antigênicos. O número elevado de animais utilizado explica o porquê da utilização de animais de menor porte para a produção dos anticorpos.

Camundongos foram utilizados em trabalhos nos quais se empregou a técnica de anticorpos monoclonais (HARDHAM et alii, 1986; ESTRADA-GARCIA et alii, 1989; WYCOFF et alii, 1987. Nestes casos, a utilização destes animais é uma imposição da técnica, pois as células de mieloma comercialmente disponíveis para a produção de hibridomas são compatíveis com células de camundongos.

Animais de maior porte como a cabra, carneiro e cavalo são utilizados quando maior quantidade de anti-soro se faz necessária, o que raramente ocorre nos trabalhos sobre fungos fitopatogênicos.

Após a publicação de vários trabalhos descrevendo métodos de purificação dos anticorpos presentes nas gemas dos ovos, galinhas poedeiras passaram a ser utilizadas com maior frequência (POLSON et alii, 1980 e 1985; JENSENIUS et alii, 1981; BADE & STEGEMANN, 1984; VIEIRA et alii, 1984; HASSL & ASPOCK, 1988).

Os antígenos utilizados na imunização dos animais são geralmente obtidos por uma das seguintes maneiras: extrato de micélio triturado (MORTON & DUKES, 1966), extrato de conídios rompidos por ultra-som (RATAJ-GURANOWSKA et alii, 1984), suspensão de conídios intactos (KIMATL, 1975), filtrado de suspensão de esporos em água (ALBA et alii, 1983). Em alguns casos, as proteínas presentes no extrato micelial sofrem ainda precipitação com sulfato de amônio, para então serem utilizadas na imunização (CHAKRABORTY & PURKAYASTHA, 1983).

O antígeno imunizante é geralmente emulsionado com um agente adjuvante, com a finalidade de intensificar a resposta imunológica do animal. O adjuvante completo de Freund, composto de suspensão de micobactéria morta em óleo mineral, é o mais utilizado. O adjuvante incompleto costuma ser utilizado nas doses de reforço ("booster") pois, por não conter a micobactéria, não causa problemas de hipersensibilização do animal. O alginato de sódio também pode ser utilizado como adjuvante, porém são poucos os autores que o empregam.

Nos estudos sobre os antígenos comuns, os antígenos imunizantes

são extraídos das plantas hospedeiras a partir de suas folhas ou raízes congeladas com gelo seco ou N₂ líquido e trituradas em almofariz com auxílio de abrasivos como alumina, areia ou pó de vidro. O pó resultante da trituração é suspenso em tampão adicionado de agentes redutores como o ácido ascórbico ou mercaptoetanol, que impedem o acúmulo de quinonas, e também de polímeros que adsorvem compostos fenólicos, como a polivinilpirrolidona (PVP) insolúvel (HALL et alii, 1974).

Na extração de antígenos de sementes com alto teor de óleo, como no caso do algodão, torna-se necessária uma etapa de delipidação do triturado com éter de petróleo para, posteriormente, realizar-se a extração dos antígenos solúveis em tampão (ABD-EL-REHIM et alii, 1988a e b).

Para a inoculação dos antígenos, as seguintes vias são as mais utilizadas: intravenosa, intramuscular, intralinfonódulo, intraperitônio e subcutânea. Em muitos casos, uma combinação de duas ou mais vias diferentes são utilizadas concomitantemente.

De um trabalho para outro são encontradas grandes variações nos cronogramas de imunização. São utilizados desde métodos intensivos, com inoculações diárias por várias vias simultaneamente (CHARUDATTAN & DEVAY, 1972), até métodos prolongados, com espaço de mais de um mês entre uma injeção e outra (ALBA et alii, 1983).

A sangria em coelhos é feita principalmente pela veia marginal da orelha, ou com menor frequência, por punção cardíaca. Costuma-se manter o animal em jejum por um dia, antes da sangria.

O sangue coletado é deixado em temperatura ambiente por 2 horas, para que ocorra a formação do coágulo, e por mais algumas horas em refrigerador, para que haja liberação do soro. Hemáceas, quando presentes no soro, podem ser removidas por centrifugação. Ao soro é adicionado algum preservativo, como o thimerosal ou azida de sódio, sendo então mantido em congelador para posterior utilização.

Geralmente, os anti-soros são utilizados na sua forma bruta, porém, em alguns casos é necessário concentrá-los, o que pode ser feito através de uma das seguintes maneiras: liofilização, absorção da água com substâncias como o Sephadex G-25 ou Bio-Gel P2, diálise contra soluções concentradas de moléculas inertes de alto peso molecular (polivinilpirrolidona ou polietilenoglicol), diálise contra sacarose, ultrafiltração, evaporação da água através de membrana de diálise (CROWLE, 1973).

A técnica de absorção tem sido utilizada para a obtenção de anti-

soros com maior especificidade. Utilizando este recurso, MORTON & DUKES (1966) conseguiram diferenciar sorologicamente as raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Os anticorpos presentes no anti-soro podem também sofrer purificação através de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia em coluna de DEAE Sephadex A-50 (HORNOK, 1980) ou coluna de CN-Br (brometo de cianogênio) Sepharose 4B à qual antígenos específicos foram acoplados (MOHAN, 1989).

A metodologia dos anticorpos monoclonais tem sido aplicada no estudo de fungos fitopatogênicos com frequência cada vez maior. Enquanto que nos métodos convencionais obtém-se uma mistura de anticorpos, com especificidade aos vários sítios antigênicos presentes nas moléculas injetadas (anti-soro policlonal), no método mais moderno, através de uma separação das linhagens de células produtoras de anticorpos, obtêm-se diferentes culturas, cada uma produzindo somente um tipo de anticorpo. Esta metodologia é constituída, resumidamente, pelos seguintes passos: imunização do animal, extração do baço e homogeneização do órgão, fusão das células produtoras de anticorpos com células cancerosas de mieloma (obtenção dos hibridomas), seleção dos hibridomas produtores dos anticorpos desejados, clonagem dos hibridomas. Esta técnica foi empregada com sucesso em trabalho recentes como os de HARDHAM et alii (1986), ESTRADA-GARCIA et alii (1989) e WYCOFF & AYERS (1990), já descritos anteriormente.

2.4. UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS EXTRAÍDOS DE OVOS POSTOS POR GALINHAS POEDEIRAS IMUNIZADAS

Apesar de apresentar resposta imunológica comparável a de mamíferos, galinhas e aves em geral têm sido pouco utilizadas para a produção de anticorpos, devido principalmente ao pequeno volume de anti-soro que pode ser obtido a partir das sangrias (CARROLL & STOLLAR, 1983).

Esse inconveniente tem sido contornado atualmente pela extração dos anticorpos a partir da gema de ovos postos por galinhas imunizadas. A transferência em larga escala de imunoglobulinas do soro sanguíneo para as gemas dos ovos já havia sido demonstrada por PATERSON et alii (1962) e constituiria numa forma de

transferência de imunidade da mãe para os filhotes, similar a que ocorre em mamíferos através da placenta. Porém, a inexistência de métodos adequados à extração desses anticorpos, rotineiramente, impedia um melhor aproveitamento deste fenômeno.

Esta situação foi modificada durante a década de 80, com a publicação de inúmeros trabalhos referentes a purificação de anticorpos a partir da gema de ovos (POLSON et alii, 1980 e 1985; JENSENIUS et alii, 1981; BADE & STEGEMANN, 1984; VIEIRA et alii, 1984; HASSL & ASPOCK, 1988).

Dentre os vários protocolos, o que tem sido mais utilizado é o de POLSON et alii (1980), o qual foi aprimorado posteriormente (POLSON et alii, 1985). Basicamente, o método envolve a diluição da gema em tampão, eliminação da fração sólida através de precipitação com polietilenoglicol (PEG) a concentração de 3,5% p/v e posterior precipitação dos anticorpos com PEG a concentração de 12% p/v. Contaminação pelo PEG junto aos anticorpos precipitados, pode ser eliminada através de reprecipitação com sulfato de amônio a 33% de saturação ou etanol a 25% v/v, seguida de diálise. Na versão aprimorada de 1985, os autores conseguiram um melhor rendimento na quantidade de anticorpos extraídos, simplesmente aumentando o volume de tampão no qual as gemas são diluídas inicialmente.

JENSENIUS et alii (1981) descreveram dois métodos de extração, sendo o primeiro baseado em eliminação das lipoproteínas por precipitação com sulfato de dextrana e o segundo, na utilização da agregação dos lipídios em soluções de baixa força iônica e pH neutro. Ambos os métodos são seguidos de precipitação com sulfato de sódio e diálise.

BADE & STEGEMANN (1984) basearam seu método na precipitação de proteínas em solventes orgânicos, no caso o propanol e acetona. Para cada gema, o volume de solvente necessário é bastante elevado (400 ml de propanol e 200 ml de acetona), o que torna esta metodologia pouco acessível.

HASSL & ASPOCK (1988) compararam metodologia própria, baseada em cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel, com o método de POLSON et alii (1985). A partir de um ovo de 60g, conseguiram extrair 14,5 mg de anticorpos, menos que a metade obtida pelo outro método. Em termos de atividade dos anticorpos, as duas metodologias foram equivalentes. Os autores afirmam ser o método deles uma alternativa viável, com a vantagem de ser mais rápido que o método de POLSON et alii (1985).

Um grupo de pesquisadores da Escola Paulista de Medicina utilizou

anticorpos extraídos de ovos, para o desenvolvimento de radioimunoensaio para o paratormônio humano. VIEIRA et alii (1984 e 1986) separaram as imunoglobulinas das lipoproteínas e lipídios das gemas através de precipitação com cloreto de magnésio e ácido tungstofosfórico, seguida de precipitação com sulfato de amônio e diálise.

A utilização de galinhas poedeiras associada aos métodos de extração dos anticorpos dos ovos por elas postos tem sido apontada como vantajosa por diversos pesquisadores, pelos seguintes aspectos:

- grande quantidade de anticorpos produzidos (equivalente a 100 ml de anti-soro, por semana, produzido por uma galinha,
- manutenção de títulos elevados por períodos prolongados, com menor necessidade de injeções de reforço,
- não necessidade de sangrias,
- obtenção do pico de produção de anticorpos em poucos dias,
- facilidades na manutenção dos animais, sob aspectos alimentares, sanitário e de prevenção ou incidência de doenças,
- o processo de purificação resulta num sedimento contendo anticorpos que pode ser retomado em volume que o pesquisador julgar conveniente.

Em algumas situações, a utilização de galinhas é fundamental para o sucesso na obtenção de anticorpos reativos, como nos casos onde os antígenos são oriundo de mamíferos. Certas moléculas são altamente conservadas dentro desta classe animal, o que as tornam pouco imunogênicas quando inoculadas em qualquer animal da mesma classe. As galinhas, sendo filogeneticamente distantes dos mamíferos, são mais propícias a reagirem contra estes antígenos. Valendo-se deste fenômeno, CARROLL & STOLLAR (1983) conseguiram anticorpos específicos para uma polimerase de RNA extraída de timo de bezerro, SONG et alii (1985) produziram anticorpos específicos para uma sub-unidade do receptor da insulina e VIEIRA et alii (1984 e 1986) puderam obter anticorpos para o radioimunoensaio do paratormônio humano.

São poucos os trabalhos envolvendo agentes fitopatogênicos, nos quais empregaram-se anticorpos extraídos de ovos de galinhas imunizadas. Dentre estes temos o de BAR-JOSEPH & MALKINSON (1980), que utilizaram estes anticorpos em teste de ELISA, para a detecção do vírus da tristeza de plantas cítricas e do vírus do mosaico do fumo (isolado do abacate). No trabalho de POLSON et alii (1980) que descreve a metodologia de purificação dos anticorpos a partir da gema, também foram utilizados vírus fitopatogênicos, como os causadores do mosaico do fumo, mosaico do

capim-cevadinha e mosaico amarelo do nabo, entre outros.

Trabalhos recentes de NOVAK & KOHN (1990) e BURDSALL et alii (1990) empregaram estes anticorpos em estudos taxonômicos, respectivamente, de fungos dos gêneros *Aspergillus* e de fungos dos gêneros *Armillaria* e *Lentinula*.

A aplicação destes anticorpos pode se estender a outras áreas como a tecnologia de alimentos. SHIMIZU et alii (1988) verificaram que os anticorpos presentes nas gemas dos ovos eram resistentes ao processo de pasteurização, às enzimas proteolíticas gastrointestinais e ao ambiente ácido do estômago, de modo que poderiam atingir o intestino ainda ativos. Se galinhas poedeiras forem imunizadas contra bactérias e vírus causadores de diarreias no ser humano, os anticorpos por elas produzidos poderiam servir como aditivos em alimentos, especialmente aqueles voltados ao público infantil.

As imunoglobulinas (Ig) encontradas nas gemas dos ovos de galinhas são as mesmas que predominam no soro sanguíneo destes animais e têm sido erroneamente designadas como imunoglobulina G (IgG) em analogia a mamíferos, que têm esta Ig como principal componente de seus anti-soros. LESLIE & CLEM (1969) verificaram ocorrência de 2 tipos de Ig em galinhas, uma semelhante à IgM humana e outra com valores de peso molecular e coeficiente de sedimentação ligeiramente diferentes da IgG de mamíferos. Os autores não puderam correlacionar estas últimas com qualquer das Ig de mamíferos (IgG, IgA, IgD, IgE ou IgM) e propuseram, então, a designação de IgY.

Posteriormente, HADGE & AMBROSIUS (1984) verificaram, através de radioimunoensaio, que anticorpos para a Ig de galinhas reagem fortemente com a IgA de mamíferos. Estes resultados, associados a novos dados sobre os pesos moleculares destas Ig, levaram os autores a conclusão que as IgY, predominantes no anti-soro de anfíbios, répteis e aves, seriam precursoras das IgA de mamíferos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FONTE DE MATERIAL

3.1.1. *Hemileia vastatrix*

Urediniosporos de *H. vastatrix* foram coletados em cafeeiros naturalmente infectados na Fazenda Santa Elisa (Instituto Agronômico de Campinas). Tubos plásticos de ultracentrífuga foram utilizados para a coleta de urediniosporos, através de raspagem cuidadosa de suas bordas sobre a superfície abaxial das folhas com lesões. Folhas com sinais de necrose ou de presença do hiperparasita *Verticillium hemileiae* Bouriquet (= *Verticillium lecanii* Zimm.) foram descartadas no processo de coleta. Os urediniosporos coletados foram passados por peneira Granutest 0,149 mm e armazenados em criotubos, dentro de tambor de nitrogênio líquido, até o momento de sua utilização.

Urediniosporos das raças fisiológicas II e III de *H. vastatrix*, portadoras dos genes de virulência v5 e v1/v5, respectivamente, foram coletados a partir de plantas de aproximadamente 1 ano de idade, inoculadas artificialmente em laboratório. A inoculação foi realizada através de aspersão de suspensão de urediniosporos em água destilada (2 mg/ml), sobre a superfície abaxial das folhas, com aspersor de vidro propelido por nitrogênio gasoso. Em seguida, as plantas inoculadas foram transferidas para câmara úmida ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 95%), onde permaneceram no escuro nos primeiros 2 dias e, passado este período, sob ciclos alternados de 12 h claro/escuro. A iluminação foi feita através de mistura de lâmpadas fluorescentes e incandescentes, fornecendo aproximadamente 1.200 lux. 30 a 40 dias após a inoculação, com o aparecimento dos primeiros sintomas, as plantas foram levadas para casa de vegetação onde, após a esporulação do fungo, procedeu-se a coleta de seus urediniosporos utilizando-se pincel e tubo plástico. Os urediniosporos coletados foram acondicionados em criotubos e armazenados em tambor de nitrogênio líquido.

3.1.2. *Coffea* spp.

Plantas de *C. arabica* cv. Mundo Novo, portador do gene de resistência SH5 (grupo fisiológico E), foram utilizadas para a produção de uredíniosporos da raça II de *H. vastatrix* assim como para a obtenção de antígenos utilizados na imunização dos animais e em testes sorológicos. Foram utilizadas plantas apresentando de 9 a 12 pares de folhas, com aproximadamente 1 ano de idade, desenvolvidas a partir de sementes obtidas junto a Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas ou a Cooperativa dos Cafeicultores de Garça. A semeadura foi feita em areia contida em germinadores com tampa de vidro, onde permaneceram à temperatura ambiente até o aparecimento da folha primária. As plântulas foram então transplantadas para sacos plásticos de 11 cm de diâmetro por 20 cm de altura contendo terra vegetal/esterco de galinha/superfosfato simples/calcáreo calcítico/cloreto de potássio (250 g/125 g/1250 g/250 g/250 g) (v/v/p/p/p). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura ambiente, até atingirem o tamanho apropriado, recebendo adubação mensal por irrigação com solução de sulfato de amônio / superfosfato simples e cloreto de potássio (250 g/500 g/100 g em 100 l de água (p/p/p/v) para 3.000 mudas).

Plantas de *C. arabica* cv. Geisha, portador dos genes de resistência SH1 e SH5 (grupo fisiológico C), foram utilizadas para a produção de uredíniosporos da raça III de *H. vastatrix* e para a obtenção de antígenos utilizados em testes sorológicos.

Plantas do cv. Sarchimor, portador dos genes de resistência SH6 e outros não determinados (grupo fisiológico A), resultante do cruzamento entre Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora* Pierre) e cv. Villa Sarchi (*C. arabica*), resistente a todas as raças conhecidas de *H. vastatrix*, foram utilizadas para a obtenção de antígenos utilizados em testes sorológicos.

As plantas pertencentes aos cultivares Geisha e Sarchimor foram obtidas por propagação vegetativa de ramos ortotrópicos. Essas plantas foram desenvolvidas em casa de vegetação, acondicionadas em sacos plásticos contendo o mesmo substrato que o utilizado para as plantas do cv. Mundo Novo e recebendo a mesma adubação mensal. No momento de sua utilização, apresentavam entre 6 a 10 pares de folhas.

Folhas de cafeeiros pertencentes às espécies *C. canephora* (variedades Robusta e Kouillou), *Coffea liberica* Hiern, *Coffea eugenioides* Moore e *Coffea congensis* Froehner, foram obtidas a partir de plantas cultivadas na Fazenda

Santa Elisa, pertencentes à Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas.

3.1.3. GALINHAS POEDEIRAS

Galinhas poedeiras foram gentilmente cedidas pelas Granjas Ito (Sumaré - SP). As aves utilizadas tinham aproximadamente 1 ano de idade e peso ao redor de 1,5 kg. Foram mantidas em gaiolas apropriadas à postura, com fornecimento diário de ração comercial e água.

3.2. EXTRAÇÃO DOS ANTÍGENOS

3.2.1. *Hemileia vastatrix*

Antígenos de uredíniosporos de *H. vastatrix* foram obtidos pelo método do filtrado de esporos vivos (FEV), descrito por BERETTA et alii (1977). Suspensão de uredíniosporos em água destilada (20 mg/ml) foi submetida a agitação por 2 h em placa agitadora magnética e, em seguida, passada por pré-filtro de fibra de vidro e membranas de nitrato de celulose com porosidades de 0,8 μ m, 0,44 μ m e 0,22 μ m, sucessivamente. O filtrado resultante (FEV), foi liofilizado e conservado a -20°C em congelador.

3.2.2. *Coffea* spp.

Antígenos de cafeeiros foram extraídos a partir de folhas trituradas em almofariz resfriado com gelo seco. Ao pó resultante da trituração, foi adicionada a mesma quantidade em peso de polivinilpirrolidona (PVP) insolúvel (Sigma) e essa mistura foi despejada, na proporção de 0,1 g de folha por ml, sobre tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) adicionado de ácido ascórbico na concentração de 0,1 M. Esta suspensão foi mantida sob agitação constante por 2 h em geladeira, com auxílio de placa agitadora magnética e, em seguida, passada por malha de náilon e centrifugada a 20.000 g por 20 min sob refrigeração (4°C). O sobrenadante obtido foi passado por pré-filtro de fibra de vidro e submetido a precipitação com etanol à concentração final de 80% v/v. Após 48 h em geladeira, o precipitado foi sedimentado através de centrifugação a 2.500 g por 20 min e retomado em solução de NaCl 0,14 M. A retomada do sedimento foi

realizada com auxílio de aparelho agitador de ultra-som (35 kHz) e os resíduos não solubilizados foram removidos por filtração em membrana de nitrato de celulose com porosidade de 0,22 μm

3.3. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS:

3.3.1. COM ANTÍGENOS DE UREDINIOSPOROS DE RAÇAS DE *H. vastatrix*

As galinhas poedeiras designadas pelas letras A e B foram imunizadas com antígenos extraídos de urediniosporos das raças II e III de *H. vastatrix*, respectivamente. Esses antígenos, obtidos pelo método do FEV, foram liofilizados e retomados em solução de NaCl 0,14 M. Para a raça II, a concentração de carboidratos e proteínas foi respectivamente de 0,36 Eq mg glicose/ml e 1,00 Eq mg SAB/ml e para a raça III foi de 0,41 Eq mg glicose/ml e 0,80 Eq mg SAB/ml. Cada animal recebeu 3 injeções do antígeno, com intervalo de 2 semanas entre cada, sendo que cada uma delas constou de 100 μl de antígeno emulsionado em igual volume de adjuvante completo de Freund. A galinha B recebeu uma 4ª injeção do antígeno, 1 mês após a 3ª, devido a baixa produção de anticorpos verificada. Os antígenos foram injetados via sub-cutânea, na região axilar sob as asas das aves, alternando-se, a cada injeção, as axilas direita e esquerda.

3.3.2. COM ANTÍGENOS DE UREDINIOSPOROS DE *H. vastatrix* COLETADOS NO CAMPO

Os anticorpos utilizados no estudo sobre os antígenos comuns foram produzidos pela galinha designada pela letra C, que para tal recebeu 6 injeções, com intervalo de uma semana entre cada, de antígeno extraído de urediniosporos coletados no campo em plantas naturalmente infectadas. Cada dose constou de 200 μl de antígeno emulsionado em igual volume de adjuvante completo de Freund e foi aplicada por método idêntico ao descrito no item 3.3.1. O antígeno imunizante, obtido pelo método do FEV, foi liofilizado e retomado em solução de NaCl 0,14 M para uma concentração de 0,65 Eq mg glicose/ml e 2,07 Eq mg SAB/ml.

3.3.3. COM ANTÍGENOS DE FOLHAS DE CAFEEIRO CV. MUNDO NOVO

O precipitado etanólico obtido a partir do extrato de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, foi utilizado como antígeno imunizante da galinha designada pela letra D. A concentração do antígeno foi de 0,86 Eq mg glicose/ml e 2,08 Eq mg SAB/ml. Foram aplicadas 8 injeções de 200 µl do antígeno emulsionado em igual volume de adjuvante de Freund, com intervalo de 1 semana entre cada. Na primeira aplicação foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nas demais, o incompleto. O método de inoculação foi o mesmo descrito nos itens anteriores.

3.4. EXTRAÇÃO DOS ANTICORPOS A PARTIR DOS OVOS

A extração dos anticorpos presentes nas gemas dos ovos foi realizada com base em metodologia descrita por POLSON et alii (1985). A figura 1 representa esquematicamente o método utilizado. Inicialmente, a gema foi separada da clara e lavada em água corrente de torneira. Com auxílio de um bastão de vidro, a membrana que envolve a gema foi rompida e o seu conteúdo coletado em proveta para a aferição de seu volume. Em seguida, ela foi despejada em um becker e diluída em 4 volumes de tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) adicionado de NaCl a 0,1 M e azida de sódio a 0,01% p/v (TFS). À gema diluída, foi acrescentado polietilenoglicol (PEG) 6.000 (Merck), obtendo-se uma concentração final de 3,5% p/v. A mistura foi mantida sob agitação por alguns minutos até completa dissolução do PEG. Após centrifugação a 12.000 g por 15 min, foi obtido um sedimento amarelo, um sobrenadante contendo os anticorpos e, sobre este, uma fina camada de gordura. Esse sobrenadante foi despejado em proveta, restando-se a gordura em chumaço de algodão colocado no gargalo de um funil. Aferido o volume, o sobrenadante foi acrescido de PEG para uma concentração de 12% p/v. O material foi agitado por alguns minutos até completa dissolução do PEG e, em seguida, centrifugado a 12.000 g por 15 min, resultando em um sedimento branco contendo os anticorpos.

Com a finalidade de se eliminar contaminação pelo PEG presente junto aos anticorpos sedimentados, estes foram retomados em 10 ml de TFS e reprecipitados pela adição de igual volume de etanol 50% v/v, tomando-se o cuidado de manter o material em banho de gelo. Após nova centrifugação a 12.000 g por 15 min, os

Figura 1. Método de extração de anticorpos a partir das gemas de ovos

Baseado em Polson et alii (1985)

TFS = tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) adicionado de NaCl 0,1 M e NaN_3 0,01%

TF = tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) adicionado de NaN_3 0,01%

anticorpos sedimentados foram retomados em tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) adicionado de azida de sódio a 0,01% p/v, em volume correspondente a 1/4 do volume inicial da gema. Os anticorpos foram, então, acondicionados em frascos de vidro e guardados em congelador (-20°C).

3.5. TESTES SOROLÓGICOS

O teste sorológico utilizado foi o de dupla difusão em ágar (teste de Ouchterlony). Para tal, lâminas de microscopia (2,5 x 7,5 cm) foram recobertas com 5 ml de ágar fundido (1% p/v em tampão fosfato 10 mM, pH 7,5, azida de sódio 0,1% p/v). Foram avaliadas duas concentrações de NaCl adicionado ao tampão: 0,14 M e 1,4 M. Os orifícios para anticorpos e antígenos foram perfurados com furador de 3 mm de diâmetro, em disposições variáveis conforme a necessidade, mas mantendo-se sempre uma distância de 4 mm entre as bordas dos orifícios de anticorpos e antígenos. Em cada orifício foram aplicados 15 µl do antígeno ou do anticorpo, conforme a necessidade. As lâminas foram mantidas em placas de Petri fechadas, contendo um chumaço de algodão umedecido em seu interior, por uma semana à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas através de imersão destas em água destilada, por um dia. Para a secagem, as lâminas foram recobertas com papel de filtro umedecido e colocadas em estufa à temperatura aproximada de 37°C, por um dia. A coloração das lâminas foi realizada com solução de negro de amido 0,1% p/v em etanol-ácido acético (9 : 1) e a lavagem, com a mesma mistura de etanol-ácido acético, sem o corante.

Para o registro fotográfico, os testes sorológicos foram realizados em placas de Petri de 7 cm de diâmetro preenchidas com 10 ml de ágar fundido. Os orifícios para anticorpos e antígenos foram perfurados com furador de 6 mm de diâmetro, em disposições variáveis conforme a necessidade, mas mantendo-se sempre uma distância de 7 mm entre as bordas dos orifícios de anticorpos e antígenos. Os orifícios foram preenchidos com 50 µl dos anticorpos ou antígenos e as fotos foram tiradas após uma semana.

3.6. TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS

O título dos anticorpos produzidos pela galinha A (imunizada com antígenos da raça II de *H. vastatrix*), foi verificado para os ovos postos até 53 dias após

a última injeção, através de teste de dupla difusão em ágar. Os anticorpos extraídos de cada ovo foram diluídos em série, seguindo uma progressão geométrica de razão 2, a partir de 1 : 2, em tampão fosfato (TF), e colocados em orifícios no gel dispostos ao redor de um orifício central contendo o antígeno (FEV da raça II à concentração de 0,36 Eq mg glicose/ml e 1,00 Eq mg SAB/ml). Os orifícios foram preenchidos com 15 µl dos anticorpos ou do antígeno. A diluição máxima na qual ainda era visível a linha de precipitação foi considerada como o título dos anticorpos do ovo do qual foram extraídos.

3.7. ABSORÇÃO DOS ANTICORPOS

Os anticorpos produzidos pelas galinhas A e B (Ac-HvII e Ac-HvIII), imunizadas com antígenos das raças II e III de *H. vastatrix*, respectivamente, foram absorvidos com os antígenos heterólogos, a fim de se verificar a especificidade dos mesmos. A absorção foi realizada misturando-se 0,5 ml dos anticorpos com 0,5 ml de antígeno heterólogo (Ac-HvII com FEV da raça II e Ac-HvIII com FEV da raça II). Após incubação à 37°C por 1 h, os anticorpos absorvidos foram avaliados, em teste de dupla difusão em ágar, quanto à reação com os antígenos homólogos.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS COMUNS

A quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações obtidas nas etapas de sua purificação, foi realizada através de teste de dupla difusão em ágar, de maneira similar à utilizada para a titulação dos anticorpos. As frações contendo os antígenos comuns foram diluídas em série, seguindo uma progressão geométrica de razão 2, a partir de 1 : 2, e colocadas em orifícios no gel, ao redor de um orifício central no qual eram aplicados os anticorpos. Os orifícios periféricos foram preenchidos com 15 µl das diluições dos antígenos e o orifício central, com 15 µl dos anticorpos produzidos pela galinha C. A diluição máxima na qual ainda era visível a linha de precipitação, foi utilizada como parâmetro de comparação da concentração dos antígenos comuns presentes nas diferentes frações.

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS

Para a quantificação das proteínas presentes nas diferentes amostras estudadas, foi utilizado o teste de Lowry (LOWRY et alii, 1951), empregando a soroalbumina bovina (SAB) como referência.

A quantificação de carboidratos foi efetuada através de teste de antrona (DISCHE, 1962), utilizando a glicose como referência.

3.10. PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS COMUNS PRESENTES NO EXTRATO FOLIAR DE CAFEEIROS CV. MUNDO NOVO

3.10.1. PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA

A partir de 30 g de folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo trituradas em almofariz resfriado com gelo seco, foram obtidos 260 ml de extrato bruto, utilizando-se método descrito no item 3.2.2. Através de ultrafiltração em membrana Amicon YM 10 (permeável à moléculas menores que 10.000 daltons), o volume do extrato bruto foi reduzido para 60 ml, sendo designado por MN-EB. Uma alíquota de 5 ml do MN-EB foi exaustivamente dialisada contra água destilada e analisada quanto ao conteúdo de carboidratos, proteínas e antígenos comuns. Os 55 ml restantes foram adicionados de 220 ml de etanol previamente resfriados em congelador (-20°C). A adição do etanol foi realizada lentamente, sob agitação constante em placa agitadora magnética e em banho de gelo. Após 48h em geladeira (4°C), a suspensão foi submetida à centrifugação a 2.500 g por 20 min.

O sobrenadante obtido, foi decantado e submetido à secagem em rotoevaporador à 40°C, resultando em um resíduo que foi retomado em 10 ml de água destilada e dialisado exaustivamente contra a mesma. Em seguida, o volume do sobrenadante foi acertado para 55ml e avaliado quanto ao seu conteúdo de proteínas, carboidratos e antígenos comuns. Esta fração foi denominada de MN-Sn80.

O sedimento foi retomado em 10 ml de água destilada, com auxílio de agitador de ultra-som (35 kHz) e dialisado exaustivamente contra a mesma. Em seguida, o material foi filtrado em membrana 0,22 µm e o seu volume acertado para 55 ml. Essa fração foi denominada de MN-Sd80. Uma alíquota de 5 ml do MN-Sd80 foi separada para quantificação de proteínas, carboidratos e antígenos comuns e os 50 ml

restantes foram submetidos a secagem em rotoevaporador à 40°C. O resíduo obtido foi retomado em 4 ml de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), para realização da cromatografia de troca iônica.

3.10.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE SEPHADEX A-25

Para o preparo da coluna, 6,5 g de DEAE Sephadex A-25 foram embebidos em 50 ml de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), através de aquecimento em banho-maria fervente por 1 h. Após o embebedimento, a solução tampão foi trocada repetidas vezes até a estabilização do pH no valor 8,0. Em seguida, o gel foi degaseificado e empacotado em coluna de vidro (1,5 x 25 cm), obtendo-se 33,5 ml de gel sedimentado. A coluna foi estabilizada através da passagem de 100 ml de tampão Tris-HCl. A taxa de fluxo, ajustada para 20 ml/h, foi controlada através de bomba peristáltica (LKB) e as frações, de 6 ml cada, foram coletadas em aparelho coletor automático (LKB).

Os 4 ml correspondentes ao MN-Sd80 concentrado, foram cuidadosamente aplicados sobre o leito da coluna. As 6 primeiras frações foram eluídas em tampão Tris-HCl e da 7ª fração até a 24ª, foram eluídas com gradiente crescente de NaCl (0 a 0,8 M). As 6 últimas frações (25ª a 30ª) foram eluídas em tampão Tris-HCl com NaCl à 0,8 M.

As frações foram avaliadas quanto ao conteúdo de proteínas, carboidratos e antígenos comuns e aquelas que se mostraram positivas para a presença destes últimos foram reunidas. O volume destas frações agrupadas foi reduzido a aproximadamente 15 ml, em rotoevaporador à temperatura de 40°C, realizando-se em seguida, exaustiva diálise do material contra água destilada. Após a diálise, o volume da amostra foi acertado para 50 ml com água destilada, sendo então designada de MN-TI. Uma alíquota de 5 ml do MN-TI foi separada para a quantificação de proteínas, carboidratos e antígenos comuns e os 45 ml restantes foram submetidos a secagem em rotoevaporador à 40°C. O resíduo obtido foi retomado em 2 ml de água destilada, a fim de se realizar a filtração em gel de Sephadex.

3.10.3. FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100

Para o preparo da coluna, 4,7 g de Sephadex G-100 foram embebidos em 100 ml de água destilada, através de aquecimento em banho-maria fervente por 5 h. Após resfriamento e desgaseificação do gel, este foi empacotado em coluna de vidro (1,6 x 40 cm), obtendo-se 70 ml de gel sedimentado. A coluna foi estabilizada através da passagem de 120 ml de água destilada.

Para o cálculo experimental do volume externo (V_o) e volume interno (V_i), foram aplicados à coluna 2 ml de amostra contendo 4 mg de Blue Dextran 2.000 (Pharmacia) e 0,5 mg de glicose. A taxa de fluxo, ajustada para 12 ml/h, foi controlada através de bomba peristáltica (LKB) e o eluato coletado em coletor automático (LKB). Foram coletadas 25 frações de 4 ml cada, as quais foram avaliadas quanto a absorbância em 340 nm (para a detecção do Blue Dextran) e quanto a presença de glicose, através de teste de antrona.

Uma vez determinados os V_o e V_i , 2 ml correspondentes ao MN-TI foram cuidadosamente aplicados sobre o leito da coluna e eluídos com água destilada em 25 frações de 4 ml cada. A taxa de fluxo utilizada foi de 8 ml/h. As frações eluídas foram avaliadas quanto a presença de proteínas, carboidratos e antígenos comuns.

As frações positivas para a presença dos antígenos comuns foram reunidas e o seu volume acertado para 45 ml, sendo denominadas de MN-GF. O conteúdo em proteínas, carboidratos e antígenos comuns do MN-GF foi avaliado visando a comparação com as demais frações resultantes da precipitação etanólica e da cromatografia de troca iônica.

3.10.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS COMUNS

O grau de pureza dos antígenos comuns presentes nas frações provenientes da precipitação etanólica, da cromatografia de troca iônica e da filtração em gel, foi avaliado através do cálculo das concentrações mínimas necessárias (de proteínas e carboidratos) para a formação de linha de precipitação em teste de dupla difusão em ágar. Esse cálculo consistiu na divisão dos valores das concentrações de proteínas ou carboidratos de cada fração, pelo fator de diluição máxima para o qual ainda se observava a formação de linha de precipitação. O resultado desta divisão corresponde às

concentrações de proteínas de carboidratos presentes na diluição máxima. Quanto menor a concentração mínima necessária, maior o grau de pureza dos antígenos comuns.

3.11. ESTUDOS SOBRE A NATUREZA QUÍMICA DOS ANTÍGENOS COMUNS

3.11.1. TRATAMENTO COM METAPERIODATO DE SÓDIO

A metodologia utilizada para o tratamento das amostras com o metaperiodato de sódio foi baseada em SPIRO (1972). Aliquotas de 4 ml do MN-GF, contendo 28 Eq μ g glicose totais, foram liofilizadas e, em seguida, dissolvidas em 2 ml de solução aquosa de metaperiodato de sódio 15 mM (pH 5,0). Após incubação à temperatura ambiente e no escuro, por 2 dias, o excesso de metaperiodato foi consumido pela adição de 0,2 ml de etileno glicol, a cada alíquota. Como controle, uma das alíquotas do MN-GF foi dissolvida em solução de metaperiodato tratado previamente com o etileno glicol. Passados os 2 dias, as amostras foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e examinadas quanto a presença de antígenos comuns através de teste sorológico.

3.11.2. TRATAMENTO COM PRONASE

Amostras do MN-GF foram submetidas ao tratamento com pronase, segundo metodologia descrita por SPIRO (1972) e KOGEL et alii (1988).

Aliquotas de 4 ml do MN-GF, contendo 0,25 Eq mg SAB totais cada, foram liofilizadas e em seguida dissolvidas em 1 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) acrescido de CaCl_2 1 mM. As alíquotas foram adicionadas de 25 μ l de solução de pronase a 0,01% p/v no mesmo tampão, e incubadas à 37°C. Após 48 h, uma das alíquotas recebeu mais 25 ml da solução da enzima. Passadas 96 h, desde o início do tratamento, as amostras foram submetidas a banho-maria fervente por 15 min e centrifugadas a 5.000 g por 15 min. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi examinado quanto a presença de antígenos comuns. O controle consistiu de alíquota do MN-GF que sofreu o mesmo processo das demais, exceto que não foi adicionada da solução da pronase.

3.11.3. TRATAMENTO TÉRMICO

Alíquotas do MN-GF foram submetidas, independentemente, aos seguintes tratamentos térmicos: banho-maria fervente por 30 e 60 min e autoclavagem à 120°C por 30 min. Após os tratamentos, as alíquotas foram examinadas, através de teste sorológico, quanto a presença de antígenos comuns.

4. RESULTADOS

4.1 TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PELA GALINHA A

O título dos anticorpos produzidos pela galinha A, imunizada contra antígenos da raça II de *H. vastatrix*, estão expressos na Figura 2. Os ovos postos logo após a 3ª injeção já apresentavam anticorpos com reação ao antígeno. Foi verificado um aumento gradativo no título até o 18º dia, quando o título atingiu o valor máximo de 1 : 32. Do 18º ao 41º dia, o título foi mantido no seu valor máximo, com pequenas oscilações, e em seguida, houve uma queda para o valor de 1 : 8, permanecendo ao redor deste valor até o último ovo analisado, posto no 53º dia após a última injeção.

A utilização de tampão adicionado de NaCl na concentração de 1,4 M, para a confecção das lâminas de ágar, proporcionou linhas de precipitação mais intensas que aquelas formadas na presença do sal à concentração de 0,14 M (Figuras 3 e 4). Em decorrência disso, os demais testes sorológicos realizados no presente trabalho foram feitos em ágar confeccionado com o NaCl na concentração mais elevada.

4.2. COMPARAÇÕES SOROLÓGICAS

4.2.1. ANTICORPOS PARA ANTÍGENOS DE RAÇAS DE *H. vastatrix*

Os anticorpos produzidos pelas galinhas A e B, imunizadas com antígenos das raças II e III de *H. vastatrix*, respectivamente (Ac-HvII e Ac-HvIII), resultaram em até duas linhas de precipitação na reação com seus antígenos homólogos. Esses anticorpos não apresentaram especificidade para raça pois reagiram igualmente com antígeno heterólogo, formando linhas de precipitação com as bordas completamente coalescidas (Figuras 4 e 5). A inespecificidade destes anticorpos foi verificada tanto para aqueles extraídos de ovos postos na 1ª semana após a última imunização como para aqueles extraídos de ovos postos nas semanas posteriores. Não foi detectada reação de

Figura 2. Titulação dos anticorpos produzidos pela galinha A

O título dos anticorpos foi verificado através de teste de dupla difusão em ágar em lâmina de microscopia. Os valores correspondem à diluição máxima na qual ainda era visível a linha de precipitação.

Figura 3. Reação sorológica em ágar contendo NaCl à concentração de 0,14M.

Ac = anticorpos para antígenos da raça II de *H. vastatrix* (Ac-HvII)

II = FEV da raça II de *H. vastatrix* (reação homóloga)

III = FEV da raça III de *H. vastatrix* (reação heteróloga)

Figura 4. Comparação sorológica entre raças II e III de *H. vastatrix* através de anticorpos para raça II.

Ac = anticorpos para antígenos da raça II de *H. vastatrix* (Ac-HvII)

II = FEV da raça II de *H. vastatrix* (reação homóloga)

III = FEV da raça III de *H. vastatrix* (reação heteróloga)

Gel confeccionado com NaCl à concentração de 1,4 M.

Figura 5. Comparação sorológica entre raças II e III de *H. vastatrix* através de anticorpos para raça III.

Ac = anticorpos para antígenos da raça III de *H. vastatrix* (Ac-HvIII)

II = FEV da raça II de *H. vastatrix* (reação heteróloga)

III = FEV da raça III de *H. vastatrix* (reação homóloga)

Figura 6. Reação dos anticorpos para *H. vastatrix* coletada no campo, com antígenos homólogo e de café cv. Mundo Novo.

Ac = anticorpos para antígenos de *H. vastatrix* coletada no campo

Hv = FEV de *H. vastatrix* coletada no campo (reação homóloga)

MN = extrato de folhas de café cv. Mundo Novo (reação heteróloga)

qualquer destes anticorpos com antígenos extraídos de cafeeiro. Anticorpos extraídos de ovo posto previamente à imunização, não reagiram com qualquer desses antígenos.

4.2.2. ANTICORPOS PARA ANTÍGENOS DE *H. vastatrix* COLETADA NO CAMPO

Anticorpos produzidos pela galinha C, imunizada com antígenos de uredíniosporos de *H. vastatrix* coletados no campo, designados por Ac-HvC, apresentaram reação tanto com antígenos homólogos como com antígenos extraídos de cafeeiros pertencentes a diversas espécies do gênero *Coffea* (Figuras 6 e 7).

Na reação homóloga, foi observada a formação de pelo menos 3 linhas de precipitação, enquanto que na heteróloga, com antígenos de cafeeiros, somente uma linha tênue, próxima ao poço dos anticorpos, pôde ser observada (Figura 6).

Anticorpos extraídos de ovo posto pela galinha C, previamente à imunização não reagiram com qualquer destes antígenos.

4.2.3. ANTICORPOS PARA ANTÍGENOS DE CAFEEIRO CV. MUNDO NOVO

Os anticorpos produzidos pela galinha D (Ac-MN) apresentaram reação intensa com antígeno homólogo, resultando na formação de pelo menos 3 linhas de precipitação (Figura 8). Porém, estes anticorpos não detectaram antígenos comuns na reação com antígenos do fungo (Figura 8).

Anticorpos extraídos de ovo posto pela galinha D, previamente à imunização não reagiram com qualquer destes antígenos.

4.3. PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS COMUNS PRESENTES NO EXTRATO FOLIAR DE CAFEEIRO CV. MUNDO NOVO

4.3.1. PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA

As concentrações de proteínas e carboidratos presentes no extrato bruto (MN-EB), sobrenadante (MN-Sn80) e sedimento (MN-Sd80) estão expressos na Tabela 2.

Figura 7. Detecção de antígenos comuns a *H. vastatrix* em diversas espécies de cafeeiro.

Ac = anticorpos para *H. vastatrix* coletada no campo

1 = *C. liberica* 2 = *C. eugenoides* 3 = *C. congensis*

4 = *C. canephora* (Robusta) 5 = *C. canephora* (Kouillou)

6 = Híbrido Sarchimor

Figura 8. Reação dos anticorpos para cafeeiro cv. Mundo Novo, com antígenos homólogo e de *H. vastatrix*.

Ac = anticorpos para antígenos de cafeeiro cv. Mundo Novo

HvC = FEV de *H. vastatrix* coletada no campo (reação heteróloga)

MN = extrato de cafeeiro cv. Mundo Novo (reação homóloga)

Tabela 2. Concentrações de proteínas e carboidratos do sobrenadante e sedimento provenientes da precipitação etanólica do extrato bruto de *C. arabica* cv. Mundo Novo¹.

FRAÇÕES	PROTEÍNAS ² (Eq µg SAB/ml)	CARBOIDRATOS ³ (Eq µg glicose/ml)	PROTEÍNAS ⁴ (%)	CARBOIDRATOS ⁴ (%)
MN-EB	1.039	209	-	-
MN-Sn80	219	32	37,76	17,88
MN-Sd80	361	147	62,24	82,12
MN-Sn80 + MN-Sd80	580	179	-	-
% RECUPERAÇÃO ⁵	55,82	85,65	-	-

1. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos com 3 réplicas cada.

2. Concentração de proteínas determinada pelo teste de Lowry.

3. Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antrona.

4. % de proteínas e carboidratos de cada fração em relação ao total recuperado.

5. $\frac{\text{MN-Sn80} + \text{MN-Sd80}}{\text{MN-EB}} \times 100$

O total de proteínas, somados o MN-Sn80 e MN-Sd80, corresponderam a somente 55,82% do total presente no MN-EB, indicando baixa taxa de recuperação. Com relação aos carboidratos, a taxa de recuperação foi maior, atingindo 85,65%.

Do total de proteínas recuperadas, a maior parte (62,24%) foi detectada no sedimento. Quanto aos carboidratos, o percentual presente no sedimento foi mais elevado ainda (82,12%).

Os antígenos comuns foram detectados somente no EB-MN e no MN-Sd80. Em ambas as frações, a diluição máxima na qual esses antígenos puderam ser detectados foi de 1 : 128.

4.3.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

As concentrações de proteínas e carboidratos detectadas nas frações eluídas da coluna estão expressas na Figura 9. Os totais de proteínas e carboidratos presentes na amostra de MN-Sd80 aplicada à coluna foram de, respectivamente, 18,05 Eq mg SAB e 7,35 Eq mg glicose.

Em relação às proteínas, foi verificado um pequeno pico na fração 2, eluída em tampão, e um pico maior, com máximo na fração 14, eluída no gradiente de NaCl.

Quanto aos carboidratos, um pico elevado foi detectado na fração 2 e outro menor, com o máximo na fração 10, foi eluído sob ação do gradiente de NaCl.

A Figura 10 mostra os resultados da quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna. Esses antígenos foram detectados em concentrações decrescentes, da fração 14 até a última. Para a fração 14, a detecção foi possível em diluições de até 1 : 256 e para a última fração, em diluições de até 1 : 2. Esses resultados indicam um comportamento heterogêneo dos antígenos comuns quanto a afinidade pelo trocador aniônico, pois foram eluídos ao longo de quase todo o gradiente de NaCl.

O pico de concentração dos antígenos comuns coincidiu com o das proteínas (fração 14), porém os antígenos foram detectados, também, em frações nas quais não se detectaram proteínas (frações 21 a 30).

Figura 9. Cromatografia de troca iônica da fração MN-Sd80 em coluna de DEAE Sephadex A-25.

A seta indica o início da aplicação do gradiente linear de NaCl. Frações 1 à 6 foram eluídas em tampão. Frações 7 à 24 foram eluídas em gradiente de NaCl 0 à 0,8 M. Frações 25 à 30 foram eluídas com NaCl à concentração de 0,8 M. As concentrações de proteínas (●—●) e carboidratos (○---○) das frações eluídas da coluna foram determinadas respectivamente por teste de Lowry e de antrona.

Figura 10. Quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna de DEAE Sephadex A-25. As barras representam a diluição máxima de cada fração, na qual ainda era visível a formação de linha de precipitação em teste de dupla difusão em ágar, utilizando-se anticorpos produzidos pela galinha C (Ac-HvC). A seta indica o início da aplicação do gradiente linear de NaCl 0 à 0,8 M.

4.3.3. FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100

A Figura 11 mostra o resultado da determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i), obtidos, respectivamente, com o Blue Dextran e a glicose. Através do gráfico chegou-se aos valores de 30,5 ml para o V_o e 72,0 ml para o V_i .

A amostra proveniente da cromatografia de troca iônica, MN-TI (4,03 Eq mg SAB e 0,35 Eq mg glicose totais), foi aplicada à coluna de Sephadex G-100 e as concentrações de proteínas e carboidratos presentes nas frações eluídas estão apresentados na Figura 12.

Foi verificado um pico de eluição das proteínas na fração 8 e, de carboidratos, na fração 7, ambos próximos ao volume externo. No volume interno não foram detectadas proteínas e os carboidratos foram detectados em pequenas concentrações.

A Figura 13 apresenta os resultados da quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna. Esses antígenos estavam presentes em várias frações, desde o V_o até o V_i . O máximo foi detectado na fração 8, apresentando decréscimo gradual nas frações subsequentes. Estes resultados indicam uma grande heterogeneidade dos antígenos comuns quanto à dimensão de suas moléculas, porém com predominância na faixa de peso molecular igual ou maior que 150.000 daltons (próximo ao V_o).

Foi observada, novamente, uma coincidência nos picos de eluição das proteínas e dos antígenos comuns, porém, nas frações correspondentes ao volume interno, somente os antígenos puderam ser detectados.

4.3.4. COMPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DO EXTRATO DE CAFEEIRO CV. MUNDO NOVO, QUANTO AO GRAU DE PUREZA DOS ANTÍGENOS COMUNS

A tabela 3 contém os dados referentes ao conteúdo em proteínas e carboidratos do extrato foliar bruto de cafeeiro cv. Mundo Novo (MN-EB) e das frações dele provenientes (MN-Sd80, MN-TI e MN-GF). Constam também da tabela, a diluição máxima na qual ainda ocorria a formação de linha de precipitação e a concentração mínima necessária para a detecção dos antígenos comuns, obtida pela divisão do

Figura 11. Determinação experimental dos volumes externo (V_o) e interno (V_i) eluídos da coluna de Sephadex G-100. A amostra aplicada, de 2 ml, continha 4,0 mg de Blue Dextran 2.000 e 0,5 g de glicose. As frações eram de 4 ml cada. O Blue Dextran 2.000 (—•—) foi detectado pela absorbância à 340 nm e a glicose (o---o) pelo teste de antrona.

Figura 12. Filtração da fração MN-TI em coluna de gel de Sephadex G-100. As frações foram de 4 ml cada. As concentrações de proteínas e carboidratos das frações eluídas foram medidas respectivamente por teste de Lowry e de antrona. As setas indicam os volumes externo ($V_0 = 30,5$ ml) e interno ($V_i = 72,0$ ml), determinados experimentalmente.

Figura 13. Quantificação dos antígenos comuns presentes nas frações eluídas da coluna de Sephadex G-100.

As barras representam a diluição máxima de cada fração, na qual ainda era visível a formação de linha de precipitação em teste de dupla difusão em ágar, utilizando-se anticorpos produzidos pela galinha C (Ac-HvC).

Tabela 3. Comparação do grau de pureza dos antígenos comuns presentes nas frações provenientes do extrato bruto de *C. arabica* cv. Mundo Novo.

FRAÇÕES	PROTEÍNAS ²	CARBOIDRATOS ³	DIL. MÁXIMA ⁴	CONC. MÍN. NECESSÁRIA ⁵	
	(Eq µg SAB/ml)	(Eq µg glicose/ml)		Proteínas	Carboidratos
MN-EB	1.039	209	1 : 128	8,1	1,6
MN-Sd80	361	147	1 : 128	2,8	1,1
MN-TI	66	8	1 : 16	4,1	0,5
MN-GF	54	7	1 : 16	3,4	0,4

1. Os resultados apresentados, referentes às concentrações de proteínas e carboidratos, representam a média de dois experimentos com 3 réplicas cada.
2. Concentração de proteínas determinada pelo teste de Lowry.
3. Concentração de carboidratos determinada pelo teste de antrona.
4. Diluição máxima da fração, na qual ainda era visível a formação de linha de precipitação em teste de dupla difusão em ágar.
5. Obtida pela divisão das concentrações de proteínas ou carboidratos, pelo valor da diluição máxima.

conteúdo de proteínas ou carboidratos de cada amostra pelos respectivos valores de diluição máxima.

A análise dos valores das concentrações mínimas necessárias mostra, em relação aos carboidratos, um ligeiro, porém progressivo, aumento no grau de pureza dos antígenos comuns ao longo das etapas realizadas, entretanto, em relação às proteínas, o mesmo não pôde ser constatado. Maiores considerações sobre estes dados serão feitas no item 5.3. da Discussão.

4.4. ESTUDOS SOBRE A NATUREZA QUÍMICA DOS ANTÍGENOS COMUNS

4.4.1. TRATAMENTO COM METAPERIODATO DE SÓDIO

As alíquotas do MN-GF, tratadas com solução de metaperiodato de sódio 15 mM, não perderam a capacidade de reagir com os anticorpos produzidos pela galinha C (Ac-HvC).

4.4.2. TRATAMENTO COM PRONASE

Ambas as alíquotas do MN-GF tratadas com 25 e 50 µl da solução de pronase 0,02%, mantiveram a reação sorológica indicadora da presença dos antígenos comuns.

4.4.3. TRATAMENTO TÉRMICO

Dos tratamentos térmicos realizados com amostra do MN-GF: banho-maria fervente por 30 e 60 min e autoclavagem a 120°C por 30 min, somente o último causou perda da reação sorológica.

5. DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POR GALINHAS POEDEIRAS

Os resultados obtidos com a utilização de galinhas poedeiras para a produção de anticorpos, mostraram que esses animais representam alternativa viável ao uso de coelhos, confirmando a experiência de outros pesquisadores que fizeram uso deste tipo de ave (CARROLL & STOLLAR, 1983; SONG et alii, 1985; BAR-JOSEPH & MALKINSON, 1980; VIEIRA et alii, 1984; BURDSALL et alii, 1990).

Em relação aos aspectos práticos da utilização de galinhas poedeiras destacaram-se a facilidade no trato, bastando o fornecimento diário de ração e água, a não ocorrência de doenças e a fácil manipulação para a injeção do antígeno.

A utilização da técnica de extração de anticorpos a partir das gemas dos ovos, por tornarem as sangrias desnecessárias, permitiu um acompanhamento diário da resposta imunológica da ave, sem injuriá-la, assim como a obtenção de grandes quantidades de anticorpos para os testes sorológicos. Outra facilidade resultante dessa técnica consistiu na possibilidade de se conservar os ovos em geladeira e proceder a extração de seus anticorpos de uma só vez, o que não seria possível no caso de realização de sangrias.

A metodologia de POLSON et alii (1985) mostrou-se de fácil aplicação, sendo acessível a qualquer laboratório que disponha de centrífuga refrigerada capaz de desenvolver entre 8.000 a 12.000 g e, de preferência, com rotor que comporte tubos com capacidade acima de 40 ml.

A galinha designada pela letra A, imunizada com antígenos da raça II de *H. vastatrix*, e cuja produção de anticorpos foi acompanhada por 53 dias após a última injeção, possibilitou a obtenção de anticorpos com título de até 1 : 32. Esse valor foi obtido em ovos postos do 18º ao 41º dia após a última injeção. A comparação destes resultados com aqueles obtidos por outros pesquisadores, que também utilizaram galinhas poedeiras, deve ser feita levando-se em consideração as diferenças na natureza e

concentração do antígeno imunizante, cronograma e via de injeção dos antígenos, assim como o método de extração dos anticorpos.

POLSON et alii (1980), por exemplo, obtiveram títulos máximos variando de 1 : 64 a 1 : 512, para galinhas imunizadas com diferentes tipos de vírus.

Com relação ao tempo necessário para se atingir o título máximo, POLSON et alii (1980) e RICKE et alii (1988) obtiveram-no em 20 dias após o início da imunização e SHIMIZU et alii (1990), em 35 dias. No presente trabalho foram necessários 50 dias, desde o início da imunização, explicados, possivelmente, pela baixa concentração do antígeno imunizante.

Os anticorpos produzidos pela galinha A apresentaram reação mais intensa com antígeno homólogo, quando utilizada a concentração de 1,4 M (8,0% p/v) de NaCl adicionado ao tampão do gel de ágar. Segundo CROWLE (1973), anticorpos do tipo 7S de aves, apresentam agregação espontânea em concentrações salinas acima de 5,8% p/v, formando trímeros ou tetrâmeros, o que causaria aumento de sua capacidade de precipitação.

Nem sempre, porém, concentrações mais elevadas do sal resultam em linhas de precipitação mais intensas. POLSON et alii (1980) verificaram que para antígenos virais, a utilização de concentração 0,14 M (0,8% p/v) de NaCl proporcionava melhores resultados, provavelmente porque em altas concentrações do sal ocorreriam mudanças irreversíveis nas estruturas terciárias antigênicas.

5.2. COMPARAÇÕES SOROLÓGICAS ENTRE RAÇAS DE *H. vastatrix*

Os anticorpos Ac-HvII e Ac-HvIII, produzidos pelas galinhas A e B respectivamente, não apresentaram especificidade ao nível de raça pois reagiram igualmente com antígenos homólogos e heterólogos. Além disso, a absorção destes anticorpos com antígenos heterólogos causou perda completa da reação com antígenos homólogos.

A inespecificidade desses anticorpos não constitui surpresa visto que as diferenças existentes entre raças de um mesmo fungo são mínimas. RATAJ-GURANOWSKA et alii (1984), por exemplo, utilizando imunoelctroforese cruzada em tandem, verificaram que de 52 moléculas antigênicas presentes na raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lupini*, 51 eram comuns a raça 2 do mesmo fungo. Utilizando

eletroforese em duas dimensões, HOWES et alii (1982) verificaram que 4 raças diferentes de *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et E. Henn. apresentam mais de 270 polipeptídios, extraídos de uredíniosporos, em comum. Somente 18 polipeptídios não eram comuns a essas 4 raças.

Portanto, para a distinção das raças de *H. vastatrix* seriam necessários não somente anticorpos reativos a uma parcela maior dos determinantes antigênicos presentes nos extratos do fungo, mas também a utilização de teste sorológico que permitisse a detecção de todos esses determinantes, como a imunoeletroforese cruzada em tandem ou o "western blotting".

Outra alternativa para a distinção sorológica das raças, seria a produção de anticorpos monoclonais. HARDHAM et alii (1986) obtiveram anticorpos específicos ao isolado de *P. cinnamomi* por eles estudado e WYCOFF & AYERS (1990) conseguiram distinguir não só raças de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, como também diferentes isolados da mesma raça.

O emprego de técnicas sorológicas para a detecção de diferenças entre raças de um patógeno, constitui uma das estratégias para se determinar quais moléculas atuam no mecanismo de reconhecimento raça-específico pois, dentre as moléculas que diferem de uma raça para outra, devem estar aquelas que decorrem da presença de diferentes genes de avirulência. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as moléculas imunodominantes, isto é, que desencadeiam maior produção de anticorpos, são comuns às raças II e III de *H. vastatrix*, portanto, para se obter anticorpos que evidenciem diferenças entre estas, seriam necessárias imunizações mais intensas dos animais, para que estes produzam anticorpos, também contra as moléculas de menor capacidade imunogênica ou que estão presentes em pequenas concentrações nos antígenos imunizantes.

Conforme já discutido anteriormente, a utilização de anticorpos monoclonais poderia evidenciar diferenças entre as raças de *H. vastatrix* e permitiria, possivelmente, a associação destas diferenças aos genes de avirulência. Entretanto, a obtenção destes anticorpos é dificultada pelas exigências da metodologia quanto aos recursos do laboratório.

Uma maneira mais acessível, e elegante, para se obter anticorpos para os antígenos presentes em baixas concentrações ou de menor capacidade imunogênica, seria a utilização do processo de imunização em "cascata" proposto por THALHAMER & FREUND (1984). Esta técnica baseia-se na remoção dos

componentes antigênicos imunodominantes, presentes no antígeno imunizante, por absorção em coluna de imunoafinidade preparada com os anticorpos produzidos por um animal que já recebeu uma primeira injeção do antígeno bruto. Dessa maneira, os antígenos aos quais o animal responde mais rapidamente são retidos na coluna, enquanto que os antígenos para os quais o animal ainda não respondeu, passam livremente e podem ser utilizados na injeção seguinte. Utilizando esta técnica, ANICETTI et alii (1989) verificaram, em comparação com a imunização convencional, um aumento na produção de anticorpos contra antígenos secundários de uma mistura de proteínas extraídas de *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers.

Através da imunização em "cascata" seria possível aumentar a resposta imunológica dos animais, contra antígenos de menor imunogenicidade presentes nos extratos de raças de *H. vastatrix*, aumentando, conseqüentemente, a possibilidade de se obter anticorpos para os antígenos raça-específicos e, dentre estes, aqueles decorrentes da expressão dos genes de avirulência.

Outro procedimento que poderia aumentar as chances de se detectar as moléculas relacionadas aos genes de avirulência, consistiria em induzir a formação das estruturas de infecção de *H. vastatrix* (tubo de germinação, apressório, vesícula sub-estomática, célula mãe de haustório e haustório) e então proceder a extração dos antígenos, pois é possível que os genes de avirulência só se expressem durante o processo de infecção da planta pelo fungo.

5.3. ANTÍGENOS COMUNS: DETECÇÃO, PURIFICAÇÃO E NATUREZA QUÍMICA

A presença de antígenos comuns a *Coffea* spp. e *H. vastatrix* foi detectada através da reação dos anticorpos Ac-HvC (para antígenos do fungo coletado no campo) com antígenos extraídos de cafeeiros de diversas espécies. Na reação recíproca, os anticorpos Ac-MN (para antígenos de cafeeiro Mundo Novo) não detectaram antígenos comuns em extrato do fungo. Esses resultados reproduzem parcialmente aqueles obtidos por ALBA et alii (1983), pois estes detectaram tais antígenos tanto com o anti-soro para o fungo como com o anti-soro para o cafeeiro.

A não detecção de antígenos comuns através dos anticorpos Ac-MN, pode ser atribuída ao fato de as doses de reforço aplicadas na galinha D terem

consistido de antígeno emulsionado em adjuvante incompleto de Freund, o qual é menos eficiente na estimulação do sistema imunológico. Optou-se por esse tipo de adjuvante devido a galinha C, que recebeu todas as aplicações com o adjuvante completo, ter apresentado ulcerações nos locais injetados.

Os antígenos comuns foram detectados em todas as espécies de cafeeiros estudadas, quais sejam: *C. arabica*, *C. liberica*, *C. eugenioides*, *C. congensis*, *C. canephora* cultivares Robusta e Kouillou e o híbrido Sarchimor. Considerando que o híbrido Sarchimor pertence ao grupo fisiológico A, o qual engloba plantas resistentes a todas as raças conhecidas de *H. vastatrix*, conclui-se que a simples presença dos antígenos comuns não determina a suscetibilidade do hospedeiro.

A detecção de antígenos comuns a planta e patógeno, mesmo em combinações incompatíveis de cultivares e raças, foi também relatada por CHARUDATTAN & DEVAY (1972), PALMERLEY & CALLOW (1978), ALBA et alii (1983), ALBA & DEVAY (1985), HEIDE & SMEDEGAARD-PETERSEN (1985), ABD-EL-REHIM et alii (1988a e b) e SCALA & CRISTINZIO (1988).

Considerando que, na interação entre o algodão e fungos dos gêneros *Fusarium* e *Verticillium*, a resistência do hospedeiro só é expressada após a infecção das raízes e invasão do sistema vascular, CHARUDATTAN & DEVAY (1972) sugeriram que os antígenos comuns, presentes tanto nas combinações compatíveis como nas incompatíveis destes organismos, estariam relacionados ao processo de infecção e estabelecimento do patógeno mas não determinariam o desenvolvimento da doença.

Os estudos histológicos da interação entre *H. vastatrix* e cafeeiros, realizados por MARTINS (1988), mostraram que, no híbrido Sarchimor, os primeiros sinais de incompatibilidade ocorrem 48 h após a inoculação, quando o fungo forma a 1ª célula mãe de haustório. Segundo a autora, o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro deve se dar logo após a formação da vesícula sub-estomática ou da hifa de infecção que se desenvolve em seguida. Portanto, ao contrário do que ocorre no algodoeiro, a expressão da resistência no cafeeiro ocorre rapidamente após a infecção pelo fungo.

Apesar destas diferenças existentes entre o algodoeiro e o cafeeiro, quanto a expressão da resistência, os dados do presente trabalho não invalidam a hipótese de CHARUDATTAN & DEVAY (1972) segundo a qual os antígenos comuns estariam relacionados à compatibilidade básica entre o patógeno e o hospedeiro. A ocorrência de tais antígenos em todas as espécies de cafeeiros estudadas, suscetíveis e resistentes, sugere

uma relação destas moléculas com a compatibilidade básica do fungo *H. vastatrix* com plantas do gênero *Coffea*.

Os antígenos comuns presentes no extrato bruto de folhas de cafeeiro Mundo Novo (MN-EB), foram totalmente precipitados pela adição de etanol à concentração final de 80% v/v, resultando numa purificação parcial destas substâncias. Este resultado está de acordo com o obtido por ALBA et alii (1983) que, após precipitação etanólica fracionada do extrato foliar de cafeeiro suscetível, detectaram estes antígenos nas frações obtidas com 60% e 80% de concentração do solvente.

Apesar da utilização de agitador de ultra-som, não foi possível ressolubilizar parte do precipitado obtido pela adição do etanol, o qual permaneceu na forma de flocos e foram removidos por filtração em membrana. A baixa taxa de recuperação de proteínas (55,82% - Tabela 2) deve-se, provavelmente, a este fenômeno.

Previamente à precipitação etanólica, o extrato foliar foi concentrado através de ultrafiltração em membrana Amicon YM 10, a qual é permeável a moléculas menores que 10.000 daltons. Como não foram detectados antígenos comuns no ultrafiltrado, conclui-se que estas substâncias apresentam dimensão maior que 10.000 daltons.

A cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE Sephadex A-25, revelou uma heterogeneidade dos antígenos comuns quanto a afinidade pelo trocador aniônico, pois foram eluídos pelo gradiente de NaCl, em concentrações variando, aproximadamente, de 0,3 a 0,8 M. Houve uma separação substancial dos carboidratos em relação às proteínas pois os primeiros apresentaram menor afinidade pelo trocador que as últimas. As eluições das proteínas e dos antígenos comuns mostraram-se coincidentes na maior parte das frações obtidas com o gradiente de NaCl. O fato de as proteínas não terem sido detectadas em frações que continham antígenos comuns, poderia ser explicada pela maior sensibilidade do teste de dupla difusão em relação ao teste de Lowry. Segundo MATHEWS (1967), até 0,1 µg de TYMV ("turnip yellow mosaic virus" = vírus do mosaico amarelo do nabo) pode ser detectado através de teste de dupla difusão em lâmina de microscopia, enquanto que, pela experiência pessoal, o teste de Lowry apresenta perda de precisão em concentrações proteicas menores que 10 µg/ml.

Através da filtração em gel de Sephadex G-100, foi verificado que os antígenos comuns são heterogêneos, também, quanto à dimensão de suas moléculas, pois foram eluídos em várias frações compreendidas entre os volumes externo e interno da coluna. Maiores concentrações destes antígenos foram detectadas nas frações

próximas ao volume externo, indicando pesos moleculares iguais ou maiores que 150.000 daltons (baseando-se no valor do limite de exclusão para proteínas globulares indicada pelo fabricante do gel).

Na filtração em gel foi observada, também, na maior parte das frações, uma correlação entre a eluição das proteínas e dos antígenos comuns. A ocorrência de algumas frações contendo antígenos comuns, mas não proteínas, poderia ser explicada, novamente, pela menor sensibilidade do teste de Lowry.

Os dados da tabela 3 não indicam uma diminuição gradativa da concentração mínima necessária para a detecção dos antígenos comuns, como seria esperado caso houvesse ocorrido uma purificação destas substâncias. Essa diminuição foi verificada somente para a precipitação etanólica, principalmente em relação às proteínas; e para a cromatografia de troca iônica, em relação aos carboidratos.

Esse insucesso na purificação pode ser atribuído à heterogeneidade apresentada pelos antígenos comuns, tanto na cromatografia de troca iônica como na filtração em gel. Apesar de, nestes dois processos, terem sido detectados picos na eluição dos antígenos comuns, optou-se pelo agrupamento de todas as frações positivas para a sua presença, pois julgou-se ser a heterogeneidade uma característica importante destas substâncias.

Na análise dos dados referentes à purificação dos antígenos comuns deve ser levada em consideração a existência de uma margem de erro nos valores das concentrações mínimas necessárias, decorrente da imprecisão do teste de determinação da diluição máxima, o qual foi baseado na avaliação visual da formação, ou não, de linha de precipitação. À esta imprecisão podemos atribuir o fato das frações MN-TI e MN-GF terem apresentado menor grau de pureza, quanto às proteínas, que a fração MN-Sd80, a qual, teoricamente, deveria ser menos pura.

Evidências da heterogeneidade dos antígenos comuns ao cafeeiro e *H. vastatrix* já haviam sido obtidas anteriormente por ALBA et alii (1983). Esses autores verificaram que os antígenos comuns extraídos tanto do fungo quanto da planta, quando submetidos à precipitação fracionada com etanol ou sulfato de amônio, perdiam solubilidade em vários níveis de concentração ou saturação do agente precipitante. ALBA & DEVAY (1985) verificaram comportamento semelhante dos antígenos comuns a *P. infestans* e batata.

A heterogeneidade foi também evidenciada para os antígenos comuns das interações *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* x algodão, pela formação de

várias linhas de precipitação em teste de dupla difusão em ágar (ABD-EL-REHIM et alii, 1988b); *M. phaseolina* x soja, pela formação de vários arcos de precipitação em imunoelektroforese (CHAKRABORTY & PURKAYASTHA, 1983) e *P. fragariae* x morango, pela formação de várias bandas em "western blotting" (MOHAN, 1989).

Os dados do presente trabalho, assim como os daqueles acima descritos, indicam que a heterogeneidade dos antígenos comuns é um fenômeno difundido nas interações patógeno-planta. Essa heterogeneidade pode ser interpretada de duas maneiras (não excludentes): os antígenos compreendem vários tipos diferentes de moléculas, cada qual capaz de induzir a formação de um anticorpo específico, ou esses antígenos compreendem moléculas diversas que apresentam um epítipo em comum, o qual induz a formação de somente um tipo de anticorpo. Qualquer que seja o caso, entretanto, a ubiquidade dos antígenos comuns sugere que ao longo do processo evolutivo, o meio interno das plantas causou seleção das formas de patógenos portadoras destas substâncias.

Os dados da cromatografia de troca iônica e da filtração em gel indicam que os antígenos comuns têm composição essencialmente proteica, porém, a não suscetibilidade destes ao tratamento com pronase, assim como a resistência ao tratamento térmico em banho-maria fervente por 60 min, sugerem que o epítipo ao qual os anticorpos se ligam é de natureza polissacarídica. É possível, portanto, que os antígenos comuns a *H. vastatrix* e *Coffea* spp. sejam glicoproteínas. A resistência ao tratamento com metaperiodato de sódio não invalida esta hipótese pois o epítipo polissacarídico em questão pode ser constituído por monossacarídios não suscetíveis à oxidação por este agente, ou seja, unidades que não possuam em sua cadeia carbonos adjacentes apresentando grupos hidroxila.

Natureza glicoproteica foi encontrada também para os antígenos comuns a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e algodão, por CHARUDATTAN & DEVAY (1981). Estes antígenos apresentaram resistência aos tratamentos térmico e com enzimas proteolíticas, tendo predominância polissacarídica em sua composição (75% carboidrato, 16% fósforo e 9% proteína).

A utilização do complexo *H. vastatrix* x *Coffea* spp., para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, apresenta algumas características que dificultam a realização dos experimentos, como, por exemplo:

- o fungo é um parasita obrigado para o qual ainda não foi possível o cultivo em meio artificial, o que limita a disponibilidade de material para os estudos, além de dificultar a

obtenção de material livre de contaminação por outros microorganismos,

- o hospedeiro é uma planta de desenvolvimento lento, se comparado com plantas de culturas anuais, o que exige o seu plantio com meses de antecedência à data de seu uso.

Face a esses contratempos, estudos mais aprofundados sobre a interação patógeno-hospedeiro, especialmente sobre os antígenos comuns, seriam facilitados se empregado outro sistema, no qual o patógeno pudesse ser cultivado em meio sintético e o hospedeiro apresentasse desenvolvimento mais acelerado (de preferência uma planta de cultura anual). Esse sistema deveria apresentar também uma característica favorável da interação *H. vastatrix* x *Coffea* spp. que consiste na disponibilidade de várias raças do patógeno assim como de vários cultivares do hospedeiro, portadores de diferentes combinações dos genes de resistência.

Os recentes avanços no campo da manipulação genética de plantas, permitirão num futuro próximo o desenvolvimento de inúmeras variedades resistentes a doenças, porém, isto dependerá de um profundo conhecimento dos fenômenos que desencadeiam, ou inibem, a expressão da resistência por parte do hospedeiro. Dentro deste contexto, a ocorrência generalizada de antígenos comuns a patógenos e plantas é um dos fenômenos que necessitam de maior compreensão e, para tal, técnicas sorológicas e bioquímicas mais refinadas têm muito a contribuir.

6. CONCLUSÕES

- A utilização de galinhas poedeiras constitui uma alternativa viável para a produção de anticorpos a serem utilizados em testes sorológicos, uma vez que esses animais apresentam facilidade no trato diário e na manipulação para a injeção dos antígenos, aliados a uma boa resposta imunológica mesmo com baixas concentrações do antígeno imunizante.

- A metodologia de POLSON et alii (1985) para a extração dos anticorpos presentes nas gemas dos ovos, além de tornarem desnecessárias as sangrias, é de fácil aplicação e requer reagentes de baixo custo e em pequenas quantidades, sendo acessível a qualquer laboratório que disponha de centrífuga refrigerada capaz de desenvolver acima de 8.000 g e, de preferência, com rotor que comporte tubos com capacidade acima de 40 ml.

- Os antígenos imunodominantes presentes nos extratos de uredíniosporos são comuns às raças II e III de *H. vastatrix*. Portanto, para que diferenças antigênicas entre raças possam ser detectadas, são necessárias modificações na metodologia de imunização assim como o emprego de testes sorológicos com maior poder de resolução.

- Para os antígenos de *H. vastatrix* e de cafeeiros, as linhas de precipitação formadas em gel de ágar preparado com tampão adicionado de NaCl à concentração de 1,4 M foram mais intensas do que aquelas formadas em presença do sal à concentração de 0,14 M.

- Antígenos comuns a *H. vastatrix* e cafeeiros pertencentes a diversas espécies do gênero *Coffea* foram detectados através de anticorpos produzidos para antígenos do fungo, porém essa detecção não foi possível através de anticorpos produzidos para antígenos de cafeeiro.

- Os antígenos comuns presentes no extrato foliar de cafeeiro são precipitados com

etanol à concentração final de 80% v/v, apresentam afinidade pelo trocador aniônico DEAE Sephadex A-25 e são eluídos principalmente no volume externo de coluna de gel de Sephadex G-100.

- Esses antígenos mostram comportamento heterogêneo tanto na cromatografia de troca iônica quanto na filtração em gel, apresentando pesos moleculares variados, mas predominantemente maiores ou iguais a 150.000 daltons.

- Os antígenos comuns presentes nos extratos de folhas de cafeeiro são resistentes à fervura em banho-maria por até 60 min, porém a autoclavagem a 120°C por 30 min causa perda completa da reação sorológica. Tratamentos com pronase e metaperiodato de sódio não afetaram a reação sorológica destes antígenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-REHIM, M. A.; ABOU-TALEB, E. M.; TOHAMY, A. Common antigen(s) in cotton to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *J. Phytopathology*, Berlin, 121: 217-23, 1988a.
- ABD-EL-REHIM, M. A.; ABOU-TALEB, E. M.; TOHAMY, A. Lectins specificity to pathogenesis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *J. Phytopathology*, Berlin, 121:1-7, 1988b.
- ABD-EL-REHIM, M. A.; IBRAHIM, I. A.; MICHAIL, S. H.; FADEL, F. M. Serological and immunoelectrophoretical studies on resistant and susceptible watermelon varieties to *Fusarium semitectum* Berk. and Rav. *Phytopath. Z.*, Berlin, 71:49-55, 1971.
- ALBA, A. P. C. & DEVAY, J. E. Detection of cross-reactive antigens between *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Solanum* species by indirect enzyme linked immunosorbent assay. *Phytopath. Z.*, Berlin, 112:97-104, 1985.
- ALBA, A. P. C.; GUZZO, S. D.; MAHLOW, M. F. P.; MORAES, W. B. C. Common antigens in extracts of *Hemileia vastatrix* urediniospores and of *Coffea arabica* leaves and roots. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 8:473-483, 1983.
- ALBA, A. P. C.; NAMEKATA, T.; MORAES, W. B. C.; OLIVEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, M. B. Serological studies on coffee rust. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 40:227-31, 1973.

- ANICETTI, V. R.; SIMONETTI, M. A.; BLACKWOOD, L. L.; JONES, A. J. S.; CHEN, A. B. Immunization procedures for *E. coli* proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, 22:151-68, 1989.
- BADE, H. & STEGEMANN, H. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, 72:421-6, 1984.
- BAJUNGU, H. E. Caracterização patogênica, serológica e fisiológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (sensu Arx, 1957) f. sp. *cepa* n. c. Piracicaba, 1979. 35p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAR-JOSEPH, M. & MALKINSON, M. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *Virological Methods*, Amsterdam, 1:179-83, 1980.
- BHATTACHARYYA, B. & PURKAYASTHA, R. P. Occurrence of common antigens in jute and *Colletotrichum corchori*. *Current Science*, Bangalore, 54:251-2, 1985.
- BERETTA, M. J. G.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of the inducing action in coffee plants. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 3:66-70, 1977.
- BERKELEY, M. J. The gardeners' chronicle. *The gardeners' chronicle and agricultural gazette*. London. 6 de nov. 1869.
- BREWIN, N. J.; WOOD, E. A.; BRADLEY, D. J.; BUTCHER, G. W. Surface interactions between *Rhizobium* and infected pea root nodule cells, as revealed by using monoclonal antibodies. In: BAILEY, J. A., ed. *Biology and molecular biology of plant-pathogen interaction*. Berlin, Springer-Verlag, 1986. p.99-106.
- BURDSALL Jr., H. H.; BANIK, M.; COOK, M. E. Serological differentiation of three species of *Armillaria* and *Lentinula edodes* by enzyme linked immunosorbent assay using immunized chickens as a source of antibodies. *Mycologia*, New York, 82:415-23, 1990.

- CARDOSO, R. M. L.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* coletada do germoplasma de *Coffea arabica* no Estado de Minas Gerais. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, 13:343-6, 1986.
- CARROL, S. B. & STOLLAR, B. D. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 258:24-6, 1983.
- CENTURION, M. A. P. C. Compatibilidade sexual e caracterização serológica e patogênica de *Fusarium moniliforme* Sheldon. Piracicaba, 1985. 69p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CHAKRABORTY, B. N. & PURKAYASTHA, R. P. Serological relationship between *Macrophomina phaseolina* and soybean cultivars. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 23:197-205, 1983.
- CHARUDATTAN, R. & DEVAY, J. E. Common antigens among varieties of *Gossypium hirsutum* and isolates of *Fusarium* and *Verticillium* species. *Phytopathology*, St. Paul, 62:230-4, 1972.
- CHARUDATTAN, R. & DEVAY, J. E. Purification and partial characterization of an antigen from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* that cross reacts with antiserum to cotton (*Gossypium hirsutum*) root antigens. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 18:289-95, 1981.
- CHARUDATTAN, R. & HUBBELL, D. H. The presence and possible significance of cross-reactive antigens in *Rhizobium*-legume associations. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, Amsterdam, 39:619-27, 1973.
- CROWLE, A. J. *Immunodiffusion*. 2. ed. New York, Academic Press, 1973. 545p.
- DAZZO, F. B. & HUBBELL, D. H. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Applied Microbiol.*, Washington, 30:1017-33, 1975.

- DEVAY, J. E. & ADLER, H. E. Antigens common to hosts and parasites. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 30:147-68, 1976.
- DEVAY, J. E.; ROMANI, R. J.; MONADJEM, A. M.; ETZLER, M. Induction of phytoprecipitins in sunflower gall tissue in response to infection by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, St. Paul, 60:1289, 1970. (Resumo).
- DEVAY, J. E.; SCHNATHORST, W. C.; FODA, M. S. Common antigens and host-parasite interactions. In: MIROCHA, C. J. & URITANI, I. eds. *The dynamic role of molecular constituents in plant-parasite interactions*. New York, Plenum Press, 1967. p.313-28.
- DEVAY, J. E.; WAKEMAN, R. J.; KAVANAGH, J. A.; CHARUDATTAN, R. The tissue and cellular location of a major cross-reactive antigen shared by cotton and soil-borne fungal parasites. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 18:59-66, 1981.
- DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M. L., eds. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press, 1962. vol 1, p.478-512.
- DOUBLY, J. A.; FLOR, H. H.; CLAGETT, C. C. Relation of antigens of *Melampsora lini* and *Linum usitatissimum* to resistance and susceptibility. *Science*, Washington, 131:229, 1960.
- ESKES, A. B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Wageningen, 1983. 140p. (Doutoramento - Landbouwhogeschool te Wageningen).
- ESTRADA-GARCIA, M. T.; GREEN, J. R.; BOOTH, J. M.; WHITE, J. G.; CALLOW, J. A. Monoclonal antibodies to cell surface components of zoospores and cysts of the fungus *Pythium aphanidermatum* reveal species-specific antigens. *Exper. Mycology*, Duluth, 13:348-55, 1989.

- FIGUEIREDO, M. B. Estudos fisiológicos e sorológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, 1972. 130p. (Doutoramento - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FIGUEIREDO, M. B.; ALBA, A. P. C.; OLIVEIRA, A. R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 3:233-59, 1977.
- FIGUEIREDO, M. B. & NAMEKATA, T. *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e outros fungos do gênero *Ascochyta*. I - Sorologia e sua aplicação na sistemática. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 41:67-93, 1974.
- GERALDI, M. A. P. Caracterização patogênica e sorológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957) do trigo e resistência varietal em *Triticum aestivum* L. Piracicaba, 1981. 39p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)..
- GHINI, R. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura de cebola (*Allium cepa* L.). Piracicaba, 1984. 53p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- HADGE, D. & AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins - IV. IgY like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Molecular Immunology*, Elmsford, 21:699-707, 1984.
- HALL, J. L.; FLOWERS, T. J.; ROBERTS, R. M. *Plant cell structure and metabolism*. London, Longman Inc., 1978. 426p.
- HARDHAM, A. R.; SUZAKI, E.; PERKIN, J. L. Monoclonal antibodies to isolate-, species-, and genus-specific components on the surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 64:311-21, 1986.

- HASSL, A. & ASPOCK, H. Purification of egg yolk immunoglobulins - a two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, 110:225-8, 1988.
- HEIDE, M. & SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Common antigens between barley and barley powdery mildew and their relation to resistance and susceptibility. *Can. J. Plant Pathol.*, Ontario, 7:341-6, 1985.
- HORNOK, L. Serotaxonomy of *Fusarium* species of the sections Gibbosum and Discolor. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 74:73-8, 1980.
- HOWES, N. K.; KIM, W. K.; ROHRINGER, R. Detergent soluble polypeptides extracted from uredospores of four physiologic races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 21:361-6, 1982.
- HUXLEY, J. *Heredity, east and west*. New York, Henry Schuman Inc., 1949. 246p.
- IGARASHI, S. Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. do morango (*Fragaria* spp.). Piracicaba, 1984. 57p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. *Cultura do café no Brasil: manual de recomendações*. 5.ed. Rio de Janeiro, IBC-GERCA, 1985. 580p.
- JENSENIUS, J. C.; ANDERSEN, I.; HAU, J.; CRONE, M.; KOCH, C. Eggs: conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, 46:63-8, 1981.
- KALYANASUNDARAM, R. & CHARUDATTAN, R. Serological studies in the genus *Fusarium* a comparison of strains. *Phytopathol. Z.*, Berlin, 64:28-31, 1969.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- KOGEL, G.; BEISSMANN, B.; RESSENER, H. J.; KOGEL, K. H. A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, London. 33:173-85, 1988.
- KUSHALAPPA, A. C. & ESKES, A. B. Advances in coffee rust research. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 27:503-31, 1989.
- LAINE, A. C. & FAYE, L. Significant immunological cross-reactivity of plant glycoproteins. *Electrophoresis*, Deerfield Beach. 9:841-4, 1988.
- LESLIE, G. A. & CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function - III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.*, New York. 130:1337-52, 1969.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 193:265-75, 1951.
- MADHOSINGH, C. A serological comparison of three *Fusarium* species. *Can. J. Bot.*, Ottawa. 42:1143-6, 1964.
- MARTINS, E. M. F. Sequência de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Piracicaba, 1988. 149p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MATHEWS, R. E. F. Serological techniques for plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSKI, H., eds. *Methods in virology*. New York, Academic Press, 1967. vol. 3, p.201-39.
- MCCLURE, M. A.; MISAGHI, I.; NIGH, E. L. Shared antigens of parasitic nematodes and hosts plants. *Nature*, London, 244:306, 1973.

- MENTEN, J. O. M. Morfologia, patogenicidade e serologia de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (Berk. et Mont.) n. comb. e resistência em melancia (*Citrullus vulgaris* Shrad.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). Piracicaba, 1977. 141p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MOHAN, S. B. Analysis of cross-reactive antigens of *Phytophthora fragariae* and strawberry and their relation to resistance and susceptibility. *J. Phytopathol.*, Berlin, 127:316-30, 1989.
- MORTON, D. J. & DUKES, P. D. Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Dis. Rep.*, St. Paul, 50:444-5, 1966.
- NOVAK, L. A. & KOHN, L. M. Developmental proteins in *Aspergillus*. *Exper. Mycology*, Duluth, 14:339-50, 1990.
- PALMERLEY, R. A. & CALLOW, J. A. Common antigens in extracts of *Phytophthora infestans* and potatoes. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 12:241-8, 1978.
- PATERSON, R.; YOUNGNER, J. S.; WEIGLER, W. O.; DIXON, F. J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunology*, Baltimore, 89:272-8, 1962.
- POLSON, A.; COETZER, T.; KRUGER, J.; VON MALTZAHN, E.; VAN DER MERWE, K. J. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest.*, New York, 14:323-7, 1985.
- POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, New York, 9:475-93, 1980.
- PURKAYASTHA, R. P. & GHOSAL, A. Analysis of cross-reactive antigens of *Accrocyldrium oryzae* and rice in relation to sheath rot disease. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 27:245-52, 1985.

- RATAJ-GURANOWSKA, M.; WIATROSZAK, I.; HORNOK, L. Serological comparison of two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*. *Phytopath. Z.*, Berlin, 110:221-5, 1984.
- RICKE, S. C.; SCHAEFER, D. M.; COOK, M. E.; KANG, K. H. Differentiation of ruminal bacterial species by enzyme-linked immunosorbent assay using egg yolk antibodies from immunized chicken hens. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 54:596-9, 1988.
- SCALA, F. & CRISTINZIO, G. Common antigens in extracts of pea and *Nectria haematococca*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 5., Tokyo, 1988. *Proceedings*. Tokyo, International Society for Plant Pathology, 1988. p.225.
- SCHNATHORST, W. C. & DEVAY, J. E. Common antigens in *Xanthomonas malvacearum* and *Gossypium hirsutum* and their possible relationship to host specificity and disease resistance. *Phytopathology*, St. Paul, 53:1142, 1963. (Resumo).
- SHIMIZU, M.; FITZSIMMONS, R. C.; NAKAI, S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Science*, Chicago, 53:1360-6, 1988.
- SONG, C.; YU, J.; BAI, D. H.; HESTER, P. Y.; KIM, K. Antibodies to the α -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J. Immunology*, Baltimore, 135:3354-9, 1985.
- SPIRO, R. G. Study of the carbohydrates of glycoproteins. In: GINSBURG, V., ed. *Complex carbohydrates part B. Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1972, vol. 28, p.3-43.
- THALHAMER, J. & FREUND, J. Cascade immunization: a method of obtaining polyspecific antisera against crude fractions of antigens. *J. Immunol. Meth.*, Amsterdam, 66:245- 51, 1984.

- TEMPEL, A. Serological studies on *Fusarium oxysporum* Schl. emend Sn. et H. *Nature*, London, 180:1483, 1957.
- VANDERPLANK, J. E. *Host-pathogen interactions in plant disease*. New York, Academic Press, 1982. 207p.
- VIEIRA, J. G. H.; OLIVEIRA, M. A. D.; MACIEL, R. M. B.; MESQUITA, C. H.; RUSSO, E. M. K. Development of an homologous radioimmunoassay for the synthetic amino terminal (1-34) fragment of human parathyroid hormone using egg yolk-obtained antibodies. *J. Immunoassay*, New York, 7:57-72, 1986.
- VIEIRA, J. G. H.; OLIVEIRA, M. A. D.; RUSSO, E. M. K.; MACIEL, R. M. B.; PEREIRA, A. B. Egg yolk as a source of antibodies for human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay. *J. Immunoassay*, New York, 5:121-9, 1984.
- WIMALAJEewa, D. L. S. & DEVAY, J. E. The occurrence and characterization of a common antigen relationship between *Ustilago maydis* and *Zea mays*. *Physiol. Plant Pathol.*, London, 1:523-35, 1971.
- WYCOFF, K. L. & AYERS, A. R. Monoclonal antibodies to surface and extracellular antigens of a fungal plant pathogen, *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* recognize specific arbohydrate epitopes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, London, 37:55-79, 1990.
- WYCOFF, K. L.; JELLISON, J.; AYERS, A. R. Monoclonal antibodies to glycoproteins antigens of a fungal plant pathogen, *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiol.*, Lancaster, 85:508-15, 1987.