

**RONALDO DE CASTRO FERNANDES**

**REAVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA DE *Hemileia vastatrix* NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F363r  
2007

Fernandes, Ronaldo de Castro, 1977-  
Reavaliação do ciclo de vida de *Hemilea vastatrix* no  
Brasil. / Ronaldo de Castro Fernandes. – Viçosa, MG , 2007.  
xii, 50f. : il. ; 29cm.

Orientador: Robert Weingart Barreto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 44-50.

1. Ferrugem-do-cafeeiro. 2. Fungos fitopatogênicos -  
Genética. 3. Vida (Biologia). 4. *Hemilea vastatrix*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.4

**RONALDO DE CASTRO FERNANDES**

**REAVALIAÇÃO DO CICLO DE VIDA DE *Hemileia vastatrix* NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de março de 2007

---

Prof<sup>a</sup>. Marisa Vieira de Queiroz  
(Co-Orientadora)

---

Pesq. Harry Charles Evans

---

Prof<sup>a</sup>. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

---

Prof. Francisco Alves Ferreira

---

Prof. Robert Weingart Barreto  
(Orientador)

Nada neste mundo pode substituir a persistência  
Nem o talento – pois nada é mais comum do que talentos fracassados  
Nem a educação – pois o mundo está cheio de pessoas cultas marginalizadas  
Só a persistência e a determinação tudo podem.

**Autor desconhecido.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser absolutamente tudo e por ter guiado meus passos em todos os momentos deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

Ao Professor Robert Weingart Barreto, pela orientação, ensinamento, dedicação, amizade, apoio e, principalmente pela paciência.

Aos meus conselheiros: Prof. Carlos Roberto de Carvalho e a Prof<sup>a</sup>. Marisa Vieira de Queiroz, pela amizade, colaboração e pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores deste Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos.

A todos os amigos do curso que contribuíram para minimizar os momentos difíceis desta caminhada

Aos amigos da Clínica de Doenças de plantas, pelo auxílio técnico, amizade, carinho e descontração.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Isabela, Milene, Fernanda, Wellington, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos meus pais Antonio e Emilia, pelo amor, carinho, incentivo e por sempre acreditarem que esse sonho pudesse ser realizado.

As minhas irmãs Valéria e Janaina, por sempre me confortarem com seu amor e amizade, mesmo que a distância.

Aos meus avós, Maria Aparecida (*in memoriam*) e Oscalino (*in memoriam*), pelo carinho e pelas orações.

Meu especial agradecimento ao meu tio Celso, pelo incentivo, pelos conselhos e pela força nos instantes difíceis.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o êxito desta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

**RONALDO DE CASTRO FERNANDES**, filho de Antônio Dornelas Fernandes e Emilia de Castro Fernandes, nasceu em Santos Dumont - MG no dia 2 de junho de 1977.

Em 1999, ingressou-se na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, graduando-se Agronomia, em julho de 2004.

Durante o curso de graduação, foi bolsista da FUNARBE (Fundação Arthur Bernardes), onde desenvolvendo atividades de pesquisa.

Em fevereiro de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese para obtenção do título de "*Magister Scientiae*" em março de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Importância econômica.....	01
1.2. Aspectos gerais da ferrugem do cafeeiro ( <i>H. vastatrix</i> ).....	02
1.3. Aspectos gerais da citometria de imagem.....	08
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Estudos sobre o estágio telial no ciclo de vida de <i>H. vastatrix</i> .....	11
3.1.1. Microscopia óptica.....	12
3.1.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	12
3.1.3. Obtenção e inoculação de basidiósporos de <i>H. vastatrix</i> em folhas de cafeeiro.....	13
3.2. Estudo do processo germinativo de urediniósporos <i>in vitro</i> .....	14

3.2.1.	Germinação de urediniósporos de <i>H. vastatrix</i> .....	14
<b>3.3.</b>	<b>Exame de eventos cariológicos em urediniósporos e produtos de sua germinação</b> .....	<b>17</b>
3.3.1.	Coloração de núcleos pelo método tradicional (Giemsa).....	17
<b>3.4.</b>	<b>Citometria de imagem</b> .....	<b>18</b>
3.4.1.	Preparo das lâminas pela técnica de esmagamento.....	18
3.4.2.	Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen.....	19
3.4.3.	Análise dos dados.....	20
<b>3.5.</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	<b>21</b>
3.5.1.	Obtenção de protoplasto.....	21
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1.</b>	<b>Estudos sobre o estágio telial no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro <i>H. vastatrix</i></b> .....	<b>22</b>
4.1.1.	Levantamentos de ocorrências de teliósporos de <i>H. vastatrix</i> em cafeeiro.....	22
4.1.2.	Microscopia óptica.....	26
4.1.3.	Microscopia eletrônica de varredura.....	28
4.1.4.	Obtenção e inoculação de basidiósporos de <i>H. vastatrix</i> em folhas de cafeeiro.....	29
<b>4.2.</b>	<b>Germinação de urediniósporos</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3.</b>	<b>Exame de eventos cariológicos</b> .....	<b>34</b>
4.3.1.	Coloração de núcleos pelo método tradicional (Giemsa).....	34

4.4. Citometria de imagem.....	34
4.5. Citometria de Fluxo.....	38
4.6. O Ciclo de Vida de <i>H. vastatrix</i> : Contribuições e implicações deste estudo.....	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44

## RESUMO

FERNANDES, Ronaldo de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Reavaliação do ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* no Brasil**. Orientador: Robert Weingart Barreto. Co-Orientadores: Carlos Roberto de Carvalho e Marisa Vieira de Queiroz.

Produziram-se evidências de que *Hemileia vastatrix*, o agente etiológico da ferrugem do cafeeiro, tem dois tipos de teliósporos no seu ciclo de vida: teliósporos globosos a napiformes de paredes finas e lisas e que germinam tipicamente pela formação de um promicélio (basídio) com quatro células, cada qual produzindo um esterigma sobre o qual um basidiósporo é produzido e teliósporos uredinóides subreniformes com parede espessa lisa ventralmente e equinulada dorsalmente. Estudos cariológicos usando corante Giemsa e citometria de imagem demonstraram que em teliósporos uredinóides a primeira divisão da meiose ocorre nos esporos e a segunda divisão ocorre apenas depois da germinação no apressório. A proposta de examinar o status cariológico de esporos de *H. vastatrix* pela citometria de fluxo não foi implementada, pois dependia do prévio isolamento de protoplastos, que foi impossível com os tratamentos testados para este

fungo. Fatores que afetam a frequência e o tipo de germinação (micelial versus apressorial) dos teliósporos uredinóides foram investigados e analisados. A maior proporção de germinação foi obtida no escuro entre 22 e 26 °C e a formação de apressórios foi obtida sob temperaturas amenas próximo de 22 °C no escuro. Teliósporos foram coletados em várias localidades em Minas Gerais, confirmando o relato, até então duvidoso, de ocorrência deste tipo de esporo no Brasil. Sua ocorrência pareceu condicionada a mudanças em condições de umidade em períodos de temperatura mais baixa no inverno e na primavera. Uma significativa proporção dos teliósporos apresentou um padrão de germinação anormal com um número de células no promicélio variando de três a sete, com ou sem produção de esterigmas e basidiósporos. O conjunto de observações efetuadas neste trabalho pode contribuir para explicar a ocorrência de um número relativamente grande de raças reconhecido para *H. vastatrix* que seria de acordo com o conceito usualmente aceito funcionalmente estritamente assexuado, produzindo basidiósporos não funcionais. A existência de um processo adicional para promoção da recombinação genética poderia explicar o aparecimento de novas raças e a continuada quebra de resistência em novas variedades de cafeeiro.

## ABSTRACT

FERNANDES, Ronaldo de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **A re-evaluation of the life cycle of *Hemileia vastatrix* in Brazil.** Adviser: Robert Weingart Barreto. Co-advisers: Carlos Roberto de Carvalho and Marisa Vieira de Queiroz,

Evidence is presented to show that *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust, has two types of teliospores in the life cycle: thin and smooth-walled, globose to napiform teliospores typically germinating with a four-celled promycelium (basidium), each cell producing a sterigma and basidiospore; thick-walled, ornamented, sub-reniform uredinioid teliospores. Caryological studies using Giemsa staining and image cytometry demonstrate that the first division of meiosis occurs in the uredinioid teliospores, and the second division only takes place after germination in the appressorium (delayed meiosis). The intent of examining the caryological status of *H. vastatrix* spores through flux cytometry was not implemented because this technique depended on protoplast isolations that proved impossible with the treatments that were attempted for this fungus. Factors affecting the frequency and type of germination (mycelial versus

apressorial) and of the uredinioid teliospores were investigated and analysed. Most germinate in the dark at temperatures between 22 and 26 °C, and apressorial formation is obtained under low temperatures (22 °C), in the dark. Teliospores were recorded from various localities in Minas Gerais, confirming the previous dubious record of the occurrence of this spore type in Brazil, and their occurrence appeared to be conditioned by the changing humidity during periods of lower temperatures in the winter and spring. A significant proportion of teliospores showed abnormal germination; the number of promycelial cells varying from three to seven, with or without the production of sterigmata and basidiospores. This body of information may explain the high number of races identified thus far in *H. vastatrix*, a supposedly functionally asexual fungus that produces non-functional basidiospores, according to the current views. The existence of an additional process allowing genetic recombination might explain the emergence of new races and the continuing breakdown of resistance in new coffee varieties

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Importância econômica**

O café é uma cultura de destaque, ocupando o segundo lugar entre as commodities mais importantes do mundo, ficando atrás somente do petróleo, em volume negociado. (Kushalappa & Eskes, 1989 a, Vega et al. 2003). Trata-se de um produto que alcança cifras internacionais totais multibilionárias.

O Brasil lidera o mercado mundial de café em produção e exportação (AIBC, 2007) e é o segundo maior consumidor, atrás somente dos Estados Unidos. Na safra de 2006/2007, o país colheu 42 milhões e 512 mil sacas de 60 quilos, o que corresponde 34,33% de todo o café consumido no mundo.

Seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e marketing propiciam empregos para milhões de pessoas, além de ser um produto importante para a economia e política de muitos países em desenvolvimento (Ferreira, 2003).

O café deve registrar alta explosiva nos próximos anos, e continuar superando todas as outras commodities agrícolas, devido ao aumento da demanda por parte da Ásia e ao clima seco, que prejudica a safra brasileira.

Ao mesmo tempo, a economia em expansão da China e da Índia está alimentando a demanda pelos grãos (Cafeicultura, 2006). O apetite por café em mercados “não-tradicionais” como a China e a Índia está aumentando progressivamente com a mudança de hábitos, com o desenvolvimento de uma nova cultura do consumo de café. O Vietnã, segundo maior produtor de café, antevendo esta tendência, tem aumentado nos últimos anos sua produção. Assumindo desde 1999 a vice-liderança mundial, tirando o posto da Colômbia de segundo maior produtor (Sindicafe, 2007). Para isso, esse país beneficiou-se de uma elevada produtividade, graças à ausência das pragas e doenças mais agressivas, que co-evoluíram com a cultura em seu centro de origem, particularmente do mais temido de todos os patógenos da cultura, a ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

## **1.2. Aspectos gerais da ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*)**

A ferrugem é a principal doença da cultura do café (Agrios, 2005), e produziu sérios impactos sócio-econômicos em regiões cafeeiras onde ela se estabeleceu. No Sri-Lanka, por exemplo, a ferrugem do cafeeiro levou ao abandono da cultura em meados do século 19 e sua subsequente substituição pela do chá (Large, 1940). Sua introdução no Brasil deu-se em 1970, causando pânico e a criação de uma comissão para coordenar as tentativas de erradicá-la (Medeiros, 1970). Entretanto, a doença já estava bem estabelecida e, por volta de 1984, já ocorria em todos os países produtores de café na América Latina (Kushalappa & Eskes, 1989 b). Plantas com ferrugem têm sua produtividade reduzida e a qualidade do café obtida é também inferior. As perdas de produção de café no Brasil, devidas

apenas a esta doença, são estimadas em 35%, mas podem atingir até 50% em anos de maior estiagem. A ferrugem causa queda prematura das folhas que prejudica o desenvolvimento das plantas jovens, causando o definhamento, o que compromete a produção. A desfolha antes do florescimento interfere no desenvolvimento dos frutos levando à formação de grãos anormais e frutos com lojas vazias, afetando sensivelmente a produção (Godoy et al., 1997). A infecção repetida pode levar a uma debilitação crônica das plantas e, eventualmente, a sua morte.

A ferrugem do cafeeiro foi constatada pela primeira vez no leste da África, onde um complexo de espécies do gênero *Coffea* é endêmico nas florestas. No entanto, o fungo *H. vastatrix* agente causal da ferrugem do cafeeiro foi descrito pela primeira vez no Ceilão (hoje Sri-Lanka) por Berkeley e Broom (Berkeley, 1869). A biologia deste fungo foi investigada pela primeira vez, também neste país (Ward, 1882 a, b) e, apesar de mais de 100 anos de pesquisas, aspectos fundamentais sobre este fungo permanecem obscuros. Em especial, o ciclo de vida do fungo, conforme proposto por Ward (1882 b) (Fig. 1) e aceito por outros autores posteriormente, sofrendo poucas alterações, apesar das lacunas significativas que permanecem ainda sem resolução. Hoje, aceita-se que as lesões alaranjadas encontradas nas folhas do cafeeiro representem o estágio assexuado do fungo, onde uredínias são produzidas através aberturas dos das estômatos, formando massas pulverulentas de esporos assexuados reniformes, equinulados dorsalmente e lisos ventralmente (urediniósporos), que funcionam como estruturas de dispersão e infecção. Ocasionalmente, esporos da fase sexuada com paredes finas e lisas

(teliósporos) são formados nestas lesões e germinam produzindo propágulos de outro tipo (basidiósporos). Os basidiósporos não tiveram até hoje sua infectividade para o cafeeiro demonstrada e nem foi, até então, descoberto um hospedeiro alternativo, suscetível para este tipo de propágulo, como ocorre para as ferrugens ditas heteróicas. O papel do estágio sexuado no ciclo de vida de *H. vastatrix* permanece, portanto, desconhecido (Agris, 2005).

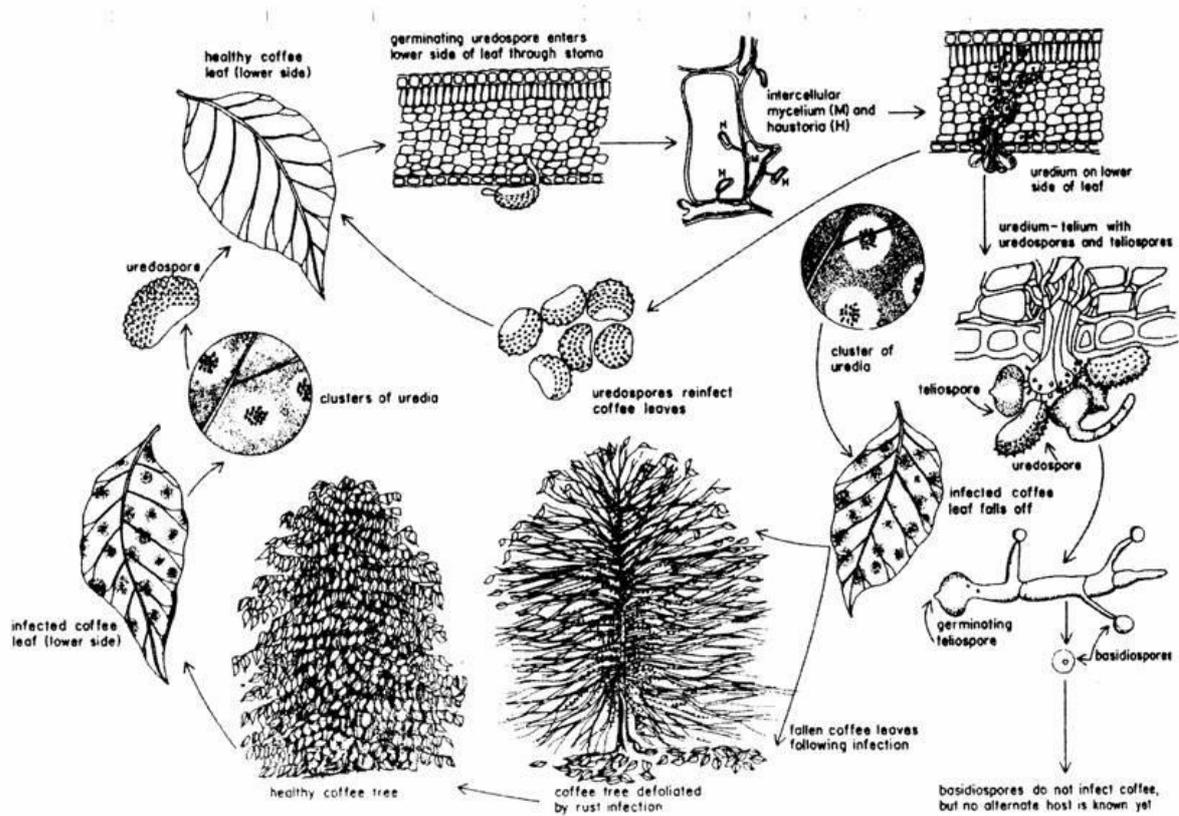


Fig. 1: Esquema do ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* de acordo com a concepção de Ward em 1882, e mantida até os dias de hoje (extraído de Agris, 2005).

Teoricamente, *H. vastatrix* seria um fungo estritamente clonal, posto que a cariogamia e meiose, que ocorre na fase sexuada da maioria das ferrugens, não estariam ocorrendo em *H. vastatrix*. Não haveria então um

mecanismo consistente para a troca de genes e recombinação genética pela reprodução sexuada. Entretanto, há uma crescente evidência de troca de genes nesta espécie pelo aparecimento de novas raças virulenta do fungo, que agora atacam praticamente todos os híbridos originados do híbrido natural *Coffea arabica* x *Coffea canephora* (híbrido do Timor) desenvolvidos no Brasil, Colômbia e Índia, supostamente portadores de resistência durável à ferrugem (Rodrigues *et al.* 2001; Agrios, 2005). Este fenômeno (variabilidade para patogenicidade na ferrugem do cafeeiro) já era, no entanto, conhecido desde os anos 30 (Rodrigues *et al.*, 1975).

Rodrigues *et al.* (2001) considerou que novas raças fisiológicas de *H. vastatrix* poderiam surgir como resultado de mutações ao invés de resultando de recombinação genética. Mais recentemente, Gouveia *et al.* (2005) e Ribeiro *et al.* (2005) usando marcadores RAPD encontraram um alto grau de polimorfismo em *H. vastatrix*. No entanto, estranhamente, estes autores também concluíram que o fungo tem uma estrutura populacional consistente com a reprodução assexuada. Estes autores reconheceram que a metodologia utilizada por eles não teria sido capaz de detectar o número de alelos por locus, uma medida muito mais acurada da diversidade genética. Eles também concluíram que a considerável variabilidade encontrada nas populações sul americanas de ferrugem sugere uma elevada taxa evolutiva para o fungo, o que explicaria a freqüente quebra de resistência em genótipos de cafeeiro. Estas considerações estão em claro conflito com a proposta dos mesmos autores sobre a variação por meio de mutação durante a reprodução assexuada. No entanto, hipóteses alternativas precisam ser testadas para melhor explicar o funcionamento do

ciclo de vida de *H. vastatrix* e para que a evolução deste patógeno seja melhor compreendida. Isso teria implicações diretas para o manejo deste patossistema, particularmente com a finalidade de reorientação estratégica dos programas de melhoramento do cafeeiro. Entre as hipóteses possíveis está a de que os urediniósporos assexuados sejam, na verdade, propágulos versáteis que serviriam a diversos propósitos, funcionando para dispersão, sobrevivência e infecção, mas, além disto, também para a recombinação sexuada. Esta hipótese é baseada na descoberta, que ainda requer confirmação, de que cariogamia e meiose ocorrem nos urediniósporos de *H. vastatrix* (Rajendren, 1967a, b, c). Essas observações receberam pouco apoio (Rayner, 1972), no entanto, evidência citológica similar à produzida por Rajendren foi recentemente apresentada para explicar o ciclo de vida de uma outra espécie de Uredinales relacionada filogeneticamente à ferrugem do cafeeiro – *Maravalia cryptostegiae* (Cummins) Ono (Evans, 1993). As observações, feitas por Evans, sobre esta ferrugem, durante os seus estudos de embasamento científica na iniciativa de sua utilização como agente de controle biológico da planta invasora *Cryptostegia grandiflora* Roxb. ex R. Br. na Austrália o levaram a conjecturar que tal fenômeno também poderia ser válido para o ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro. Estudos preliminares, envolvendo coloração de núcleos de urediniósporos (não germinados e germinados com tubo germinativo apressorial) pelo método tradicional com o corante Giemsa mostraram urediniósporos com um dois núcleos e quatro núcleos no tubo germinativo revelando desta forma resultados sugestivos de ocorrência de cariogamia e meiose possa esta ocorrendo nos urediniósporos de *H. vastatrix* (Evans, 1993) (Fig. 2).

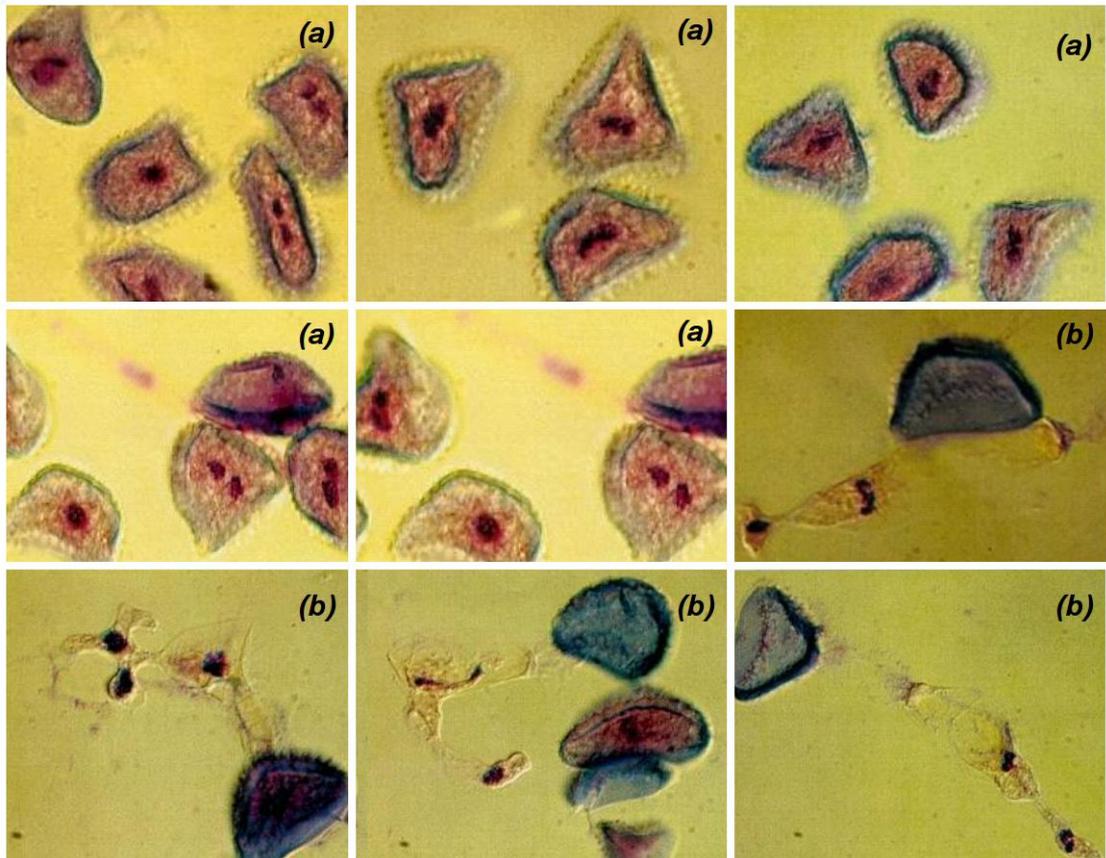


Figura 2. Urediniósporos de *Hemileia vastatrix* com núcleos corados com Giemsa num estudo preliminar com aparente ocorrência de cariogamia e meiose. Mostrando a presença de urediniósporos não germinados com um e dois núcleos (a); e quatro núcleos no tubo germinativo de urediniósporos germinados (b).

Para se determinar de forma inequívoca que os urediniósporos funcionam, de fato, como teliósporos uredinióides, técnicas mais sofisticadas que as usadas por Rajendren (1967a, b, c) são necessárias para confirmar o ciclo cariológico antes e durante a germinação dos urediniósporos sob condições controladas.

Com o advento de metodologias que se baseavam na análise de núcleos individuais, estimativas mais precisas do conteúdo de DNA foram alcançadas (Dolezel & Bartos, 2005). Dentre essas metodologias, a citometria de fluxo (CF) e a citometria de imagem (CI) tem sido amplamente empregadas para determinar o tamanho de genoma (Moscone et al., 2003).

### 1.3. Aspectos gerais da citometria de imagem

A citometria de imagem, inicialmente conhecida como citofotometria ou ainda densitometria, surgiu com os estudos realizados por Caspersson em 1936. Ele quantificou o conteúdo de DNA nuclear não corado (Chieco e Derenzini, 1999). Como um marco importante para o desenvolvimento da citometria, na segunda metade da década de 1980 e com o advento das vídeo-câmeras digitais e o aumento da disponibilidade de computadores, foi possível obter uma instrumentação adequada para os estudos em citometria de imagem com custos mais acessíveis (Wied *et al.* 1983). Desta forma, o sistema de análise de imagens passou a substituir os equipamentos anteriormente utilizados, determinando a ampla disseminação da citometria de imagem como técnica adequada para a quantificação de DNA na medicina, por possibilitar o diagnóstico de tumores malignos, e em estudos de ploidia e ciclo celular (Mellin, 1990; Bocking *et al.*, 1995; Cohen, 1996, Vilhar *et al.*, 2001). A reação de Feulgen é específica para DNA por basear-se na hidrólise dos ácidos nucléicos, criando radicais aldeídos na cadeia de DNA por meio da depuração dessa, seguida da ligação desses grupos formados a moléculas de fucsina básica, presentes no reativo de Schiff (Chieco e Derenzini, 1999). O conteúdo de DNA nuclear pode ser calculado, em termos absolutos e relativos, por meio da determinação da densidade óptica integrada (DOI) (Kiss *et al.*, 1992). Para que as medidas sejam feitas, é necessária a captura da imagem observada ao microscópio por uma vídeo-câmera digital. Essa imagem é convertida em pixels, que estão relacionados a uma cor e uma intensidade em específico, que podem ser

convertidas pelo programa de análise de imagens em valores de absorbância (Hardie *et al.*, 2002).

A grande parte das análises realizadas, via citometria de imagem, tem utilizado luz processada de câmeras analógico/digitais monocromática, ou de câmeras policromáticas (RGB), mas com a utilização apenas do canal de comprimento de onda na faixa verde. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos em humanos e plantas têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 Bits (256 tons de cinza) ou 12 Bits (4096 tons de cinza). São tomados, então, valores tanto de regiões contendo núcleos, como de regiões com ausência de material celular na lâmina, e calcula-se a densidade óptica integrada (DOI) por meio da seguinte equação:

$$DOI = \sum - \log_{10} \frac{I_f}{I_b}$$

*n*: número total de pixels no núcleo;  
*I<sub>f</sub>*: intensidade dos pixels do núcleo;  
*I<sub>b</sub>*: intensidade dos pixels da área limpa da lâmina.

Os critérios utilizados para análises relativas, em termos da quantificação do valor C para cada ploidia. Desta forma, padrões com valor 2C previamente estabelecido, servirão como controle na comparação das análises de densidade do material nuclear a ser testado. A preparação e análise dos padrões e testes devem ser processados conjuntamente, de tal forma que as células de referência passem pelos mesmos processos que as das amostras. O coeficiente de variação (CV) entre as medidas obtidas, tanto para as amostras quanto para os padrões deve ser inferior a 5% (Cohen *et al.*, 1992).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de fazer um estudo sobre o ciclo telial de *H. vastatrix* e testar a hipótese de que a recombinação genética ocorra dentro das estruturas supostamente assexuadas (os urediniósporos).

Os objetivos específicos foram:

- Recoletar e reexaminar os estádios teliospórico e basidiospórico deste fungo;
- Determinar como condições ambientais interferem sobre o tipo de germinação de urediniósporos (micelial, apressorial) e elaborar um protocolo com germinação do tipo promicelial para observar os eventos cardiológicos na fase supostamente assexuada de *H. vastatrix*.
- Integrar as observações feitas neste estudo numa revisão do ciclo de vida *H. vastatrix*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Estudos sobre o estágio telial no ciclo de vida de *H. vastatrix***

##### **3.1.1. Levantamentos de ocorrências de teliosporos de *H. vastatrix***

Foram realizadas coletas nas principais regiões cafeeiras do Estado de Minas Gerais, especificamente nos municípios de Araponga, Alto Caparaó, Coimbra, Guaraciaba, Machado, Manhuaçu, Patrocínio, Varginha e Viçosa, no período de maio a dezembro de 2006. O procedimento utilizado neste levantamento consistiu na coleta de uma amostra (30-100 folhas de cafeeiro com sintomas de ferrugem) em pelo menos três propriedades diferentes de cada município. As amostras foram levadas para o Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Viçosa para exame de estruturas fúngicas. Pelo menos 30 folhas de cada amostra foram examinadas cuidadosamente sob microscópio estereoscópico Olympus SZ 11, e contabilizada a porcentagem de folhas examinadas que apresentavam teliosporos. Destas folhas, foram selecionadas algumas contendo uma quantidade particularmente abundante de teliosporos de *H. vastatrix* para exames mais detalhado sob microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. Partes das amostras com

teliósporos e basidiósporos foram herborizadas e depositadas no herbário (VIC) da Universidade Federal de Viçosa para estudos futuros.

Informação sobre a evolução das variáveis climáticas (pluviosidade e temperatura máxima e mínima) na micro região de Viçosa, durante o período de realização do trabalho, foi utilizada para se inferir como o clima se relacionava com a ocorrência de teliósporos de *H. vastatrix*.

### **3.1.2. Microscopia óptica**

Para observação ao microscópio ótico foram utilizados materiais frescos. Lâminas de raspagem foram confeccionadas utilizando-se lactofucsina como meio de montagem e seladas com esmalte incolor. As observações das estruturas do fungo foram efetuadas em um microscópio Olympus BX 50, sendo as imagens registradas com uma câmara fotográfica Olympus SC 35 acoplada ao microscópio.

Condições de calibração e iluminação segundo Köhler foram feitas, garantindo condições ópticas necessárias e reproduzíveis da intensidade luminosa.

### **3.1.3. Microscopia eletrônica de varredura**

No exame de tecidos infetados e de estruturas fúngicas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram efetuados cortes em tecidos frescos, medindo 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup>, os quais foram transferidos para recipientes contendo uma solução fixadora de glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8 (1:1). Os recipientes foram tampados e mantidos em geladeira a 5 °C, por 24 horas e, em seguida foram feitas seis lavagens sucessivas de 10 min cada na mesma solução tampão e água destilada (1:1). A seguir o

material foi desidratado em uma série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 95% e 100%). Os fragmentos permaneceram em cada solução por 10 minutos, sendo que para garantir a total desidratação dos tecidos foram realizadas duas imersões em etanol 100%.

Em seguida, procedeu-se a secagem do material, em um aparelho de ponto crítico (“Critical Point Dryer”) Marca Bal-tec, modelo CPD 030, utilizando-se dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) líquido. Os fragmentos de tecidos secos foram presos a suportes metálicos (stubs), os quais foram cobertos com uma fina camada de ouro por meio de pulverização catódica em um aparelho marca Balzers Union, modelo FDU 010, composto de controle de: de secagem por congelamento (“Freeze Drying Control”) modelo FDC 020 e as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP no Núcleo de Microscopia e Microanálise - CCB/UFV. As imagens geradas foram registradas digitalmente, em aumentos variáveis de acordo com o detalhamento exigido.

#### **3.1.4 Obtenção e inoculação de basidiósporos de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro**

Para a obtenção de basidiósporos livres da mistura com urediniósporos, foram utilizadas duas metodologias:

- 1) A utilização de um pequeno aparelho denominado “germinatélio” descrito por Figueiredo & Coutinho (1984) que, em decorrência da germinação indireta dos teliósporos produzindo basídios, permite a coleta de basidiósporos totalmente livres de urediniósporos.
- 2) Pedacos de folhas com pústulas contendo teliósporos foram fixadas com vaselina na tampa de placas de Petri (estéreis) e colocada sobre

meio de cultura Agar-água por 12 a 24 horas no escuro a 20 °C para favorecer a ejeção de basidiósporos.

As inoculações foram realizada em plantas jovens com 4 a 6 pares de folhas, inoculando-se somente na parte abaxial das duas últimas folhas. Os basidiósporos ejetados foram colocados sobre as folhas pela deposição de discos de meio de cultura sobre os quais haviam basidiósporos germinados e não germinados.

Após a inoculação, as plântulas permaneceram por 24 horas em câmara de nevoeiro, sendo depois transferidas para a casa de vegetação, sob as condições normais de ambiente.

As avaliações foram feitas por observação semanal da presença de sintomas típicos de ferrugem por um período de sessenta dias.

### **3.2. Estudo do processo germinativo de urediniósporos *in vitro***

Todos os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.2.1. Germinação de urediniósporos de *H. vastatrix***

Urediniósporos foram obtidos a partir de folhas de cafeeiro, infectadas naturalmente no campo por *H. vastatrix*, provenientes de Viçosa e imediações. Estes urediniósporos foram coletados apenas de plantas que não haviam sido tratadas com fungicidas. As folhas coletadas foram examinadas sob microscópio estereoscópico e selecionadas apenas aquelas contendo uredínias sadias (livres de ácaros, larvas de dípteros, colônias de fungos hiperparasitos, etc). Os urediniósporos foram removidos das folhas com o auxílio de um pincel e acumulados em uma bandeja plástica

previamente desinfestada com álcool. Após esta etapa foram preparados grupos de três lâminas de microscopia, limpas com álcool, que foram colocadas em caixas de gerbox sobre papel toalha umedecido e usadas como anteparos para a deposição dos urediniósporos. Os tratamentos combinaram tipos diferentes de fornecimento de umidade, regimes de luz e temperaturas. Para o fornecimento de umidade, as seguintes condições foram avaliadas:

- 1) Depósito de urediniósporos sobre lâminas secas (dls);
- 2) Depósito de urediniósporos sobre lâminas recobertas com filme de água (dfa);
- 3) Depósito de urediniósporos sobre lâminas em suspensão aquosa (dsa).

Para os tratamentos um e dois os urediniósporos foram polvilhados a seco sobre as lâminas com um auxílio de um pincel nº. 6. As lâminas usadas como anteparo no tratamento dois foram previamente fixadas em tampas de caixas gerbox com vaselina e colocadas na geladeira por 3 minutos para estimular a condensação de um filme úmido de água, simulando assim, uma condição de orvalho. Os urediniósporos foram então espalhados sobre estas lâminas umedecidas. Para o tratamento três, uma alíquota de 0,5 ml da suspensão aquosa em água destilada de urediniósporos foi depositada sobre as lâminas e estas foram colocadas em gerbox conforme descrito acima.

Para o regime de luz, as seguintes condições foram avaliadas:

- 1) Escuridão contínua – caixas gerbox envoltas em papel alumínio durante todo o teste;
- 2) Fotoperíodo de 12 de horas.

As temperaturas avaliadas foram de 18, 22, 26 e 30 °C.

Após 24 horas, as lâminas foram retiradas dos gerbox, montadas usando-se lactofucsina como meio de montagem e examinadas ao microscópio. Os 100 primeiros urediniósporos encontrados na varredura de cada lâmina foram examinados. Avaliou-se, então, para cada tratamento a porcentagem de urediniósporos com germinação do tipo aqui convencionalizado como micelial (com tubos germinativos filamentosos e de comprimento indeterminado Fig. 3a) e do tipo aqui convencionalizado como apressorial (com tubos germinativos engrossados e curtos Fig. 3b).

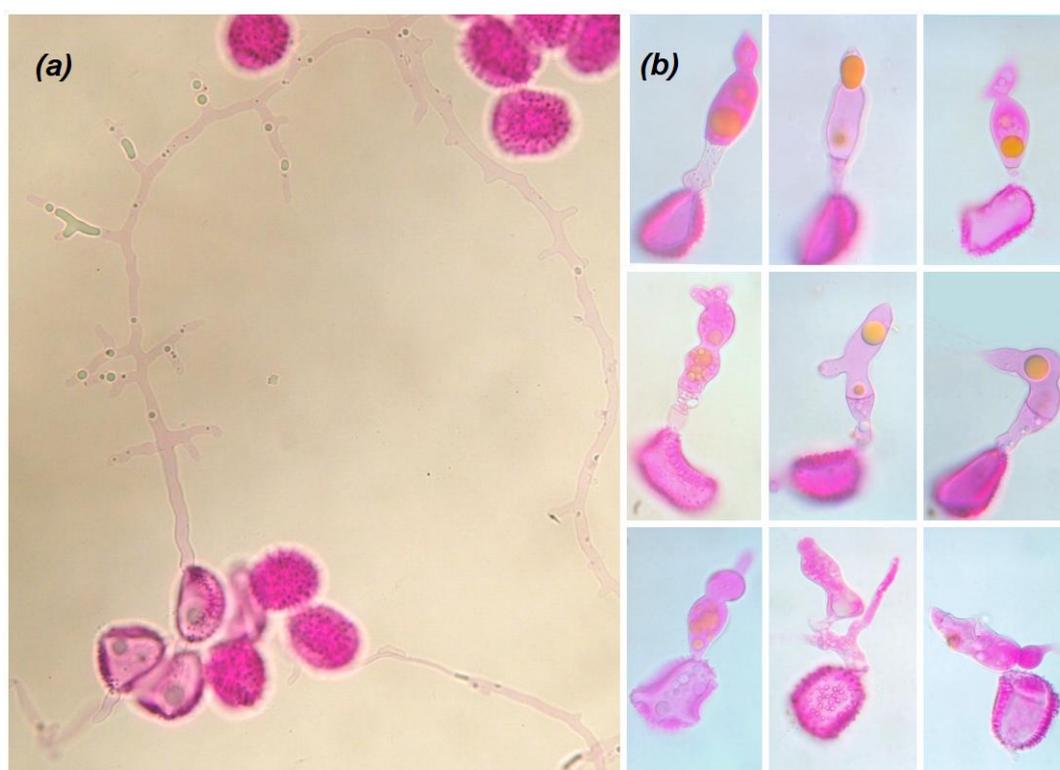


Fig. 3. Urediniósporos de *H. vastatrix* com germinação do tipo micelial (a) e apressorial (b).

Utilizou-se para todas as observações e registros fotográficos de um microscópio óptico Olympus BX 50 equipado com câmera fotográfica.

O delineamento experimental seguiu um esquema fatorial 4 x 3 x 2, correspondendo a quatro condições de temperatura; três condições de umidade e dois regimes de luz com 3 repetições. Para análise estatística, houve a necessidade de transformação dos dados em  $\arcsin \sqrt{x}$ , a seguir procedeu-se a análise de variância (teste F) e de regressão. No caso de significativo a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

A análise dos dados foi feita utilizando-se o programa SAS para Windows, versão 8.0 (SAS Institute, Inc., NC).

### **2. 3. Exame de eventos cariológicos em urediniósporos e produtos de sua germinação**

#### **2. 3. 1. Coloração de núcleos pelo método tradicional (Giemsa)**

Para a coloração de núcleos dos urediniósporos de *H. vastatrix*, foram utilizados os procedimentos descritos por Robinow (1975) citado por Labory *et al.* (2003), com algumas modificações.

Os urediniósporos foram obtidos em folhas de café com ferrugem no campo. Os quais foram fixados em etanol 70% e conservados em tubos “Eppendorf” por 30 minutos. Para o procedimento de coloração dos núcleos dos urediniósporos, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 2540 rpm, sendo o sobrenadante descartado com ajuda de uma pipeta. Ao “pellet” foi adicionado 1 mL de HCl 1N para hidrólise e o tubo foi colocado em “banho-maria” por 15 minutos a 63 °C. Após a centrifugação, o HCl foi retirado e os urediniósporos foram ressuspensos em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, sendo lavados por duas vezes por centrifugação em tampão fosfato 100 mM

pH 7,0 a temperatura ambiente. Após a última centrifugação, foi adicionado o corante Giemsa ao “pellet” numa concentração de 3:1 (tampão fosfato 100 mM pH 7,0 / Giemsa) deixando-se a suspensão em repouso por 1 hora. Após a centrifugação o corante foi retirado e os urediniósporos foram ressuspensos em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, sendo lavados por duas vezes por centrifugação no mesmo tampão e uma vez por centrifugação em água destilada.

Uma vez corados, os urediniósporos foram observados em microscópio óptico Olympus BX 50, sendo então observados o número de núcleos dos urediniósporos em diferentes estádios de desenvolvimento.

### **3.4. Citometria de imagem**

Esta parte do trabalho foi conduzida no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.4.1. Preparo das lâminas pela técnica de esmagamento**

Em exames prévios do material ficou clara a dificuldade para a análise sob citometria de imagem, devido à parede rígida e espessa dos urediniósporos. Estes esporos mantêm suas estruturas túrgidas mesmo após a deposição da lamínula sobre o material, dificultando a observação acurada dos núcleos em diferentes, posições e estruturas que ficavam em planos diferentes não permitindo uma observação adequada.

Os urediniósporos de *H. vastatrix*, utilizados nos estudos de citometria de imagem foram colocados para germinar conforme descrito no item 2.2. Após a germinação, as lâminas formam secas ao ar e em chapa quente por

10 minutos e, colocadas em recipientes contendo solução fixadora de etanol 70% e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

As lâminas submetidas ao etanol foram secas ao ar e sobre cada uma, foi adicionada em uma gota de ácido acético 45% sobre os urediniósporos. Uma lamínula previamente limpa foi colocada sobre o material, e esse conjunto foi imobilizado com auxílio de um papel filtro. O esmagamento das estruturas fúngicas foi feito comprimindo-se fortemente com os dedos o papel filtro sobre o conjunto. Após o esmagamento, as lâminas foram incubadas em uma temperatura de -20 °C, durante 30 minutos sobre uma placa metálica, e em seguida efetuou-se a retirada da lamínula com auxílio de uma lâmina de barbear e as lâminas foram novamente secas ao ar e em placa aquecedora.

Subseqüentemente aos 5 minutos em placa aquecedora, cada lâmina foi colocada em uma cubeta contendo solução fixadora de metanol-formalina-ácido acético (17:5:1) por 12 horas, para preservação da morfologia e integridade dos cromossomos.

### **3. 4. 2. Hidrólise e coloração pela reação de Feulgen**

As lâminas contendo as estruturas fúngicas foram retiradas do fixador, lavadas por 10 minutos em água corrente e hidrolisada em HCL 5 M em temperatura ambiente por tempos variados ( 14, 16, 18 e 20 minutos), para padronizar um protocolo de hidrolise.

Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos, secas ao ar e recobertas com 2 mL de reativo de Schiff (5g de Fucsina Básica, 15 ml de HCL 1N, 2,23 g de  $K_2S_2O_5$ , 0,703g de carvão ativo

em 85 ml de água destilada), e deixadas por 12 horas no escuro. Após a etapa de coloração, cada lâmina foi submetida a duas lavagens com duração de 2 minutos cada, uma em água sulfurosa (2 ml de metabissulfito 10% (p/v) em 36 ml água destilada) e outra em água destilada. As lâminas foram secas ao ar e os locais onde estavam às estruturas fúngicas foram cobertos com óleo de imersão (Carl Zeiss L 25, com índice de refração = 1,525), subseqüentemente uma lamínula previamente limpa foi colocada sobre o óleo e esta foi selada com esmalte incolor.

### **3. 4. 3. Análise dos dados**

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio Olympus™, modelo BX 60 com fonte de luz estabilizada, acoplado com uma câmera monocromática com sensor *charge coupled device* (CCD) de 12 bits e de 1392x1040 de resolução, do “kit de análise de imagem Cool SNAP™”. Utilizaram-se um filtro de interferência de cor verde (IF 550) e um filtro de densidade neutra (ND). Antes de cada captura ajustes de microscopia, foram feitos pelo método de *Köhler*, citado por Hardie *et al.* (2002), garantindo condições ópticas necessárias e reproduzíveis de intensidade luminosa.

As imagens dos núcleos foram capturadas e processadas com o auxílio das ferramentas do software do “Kit” (Imagem Pro-Plus® 4.5 Media Cybernetics), no qual uma tabela de calibração com valores de densidade conhecidos foram empregados para processar as imagens. A curva de calibração foi padronizada com filtros Edmund Industrial Optics, de densidade óptica (DO) conhecida (escala DO = 0,15; 0,30; 0,40; 0,60; 0,90; 2,5), O processamento da imagem foi segmentado para correção do

background e os valores da densidade óptica integrada (DOI), calculada automaticamente pelo software,

Para a de CI em núcleo de urediniósporos germinados e não germinados de *H. vastatrix*, foram analisadas 30 imagens (10 com um núcleo, 10 com dois núcleos e 10 com quatro núcleos no tubo germinativo de urediniósporos germinados). A diferença de DOI encontrada com relação a um, dois e quatro núcleos, foi submetida a análise de variância. O programa SAS para Windows, versão 8.0 (SAS Institute Inc., NC) foi utilizado na análise estatística.

### **3. 5. Citometria de fluxo**

#### **3. 5. 1. Obtenção de protoplasto**

Quatro miligramas de urediniósporos de *H. vastatrix* foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de estabilizador osmótico (KCl 0,6 M em tampão fosfato 10 mM, pH 5,8) em 250 e 500 mg da enzima (lysing enzymes -Sigma Chemicals Co., L1412). As preparações foram mantidas a 37 °C, sob agitação de 80 rpm por 12 a 24 horas. A liberação de protoplasto foi monitorada de três em três horas por observações ao microscópio com a finalidade de se aprimorar um protocolo de obtenção de protoplasto visando à otimização do procedimento.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Estudos sobre o estágio telial no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro *H. vastatrix***

#### **4.1.1. Levantamentos de ocorrências de teliósporos de *H. vastatrix* em cafeeiro**

As coletas propostas foram efetuadas conforme previsto durante os meses de maio a dezembro de 2006. Os resultados referentes à incidência média de folhas com ferrugem em que foram encontrados teliósporo de *H. vastatrix* oriundas de diferentes regiões cafeeiras de Minas Gerais, estão representados na tabela 1 e as variáveis climáticas (pluviosidade e temperatura média) ocorrida na micro região de Viçosa durante o estudo, encontram-se na tabela 2.

Tabela 1 - Incidência média (%) de folhas com ferrugem em que foram encontrados teliosporos de *H. vastatrix* em amostras oriundas de diferentes regiões cafeeiras de Minas Gerais, no período de maio a dezembro de 2006.

Municípios	Inc. média de folhas com teliosporos (%)							
	mai.	jun.	jul.	ago.	set.	out.	nov.	dez.
Araponga	-	-	-	1,72	-	-	-	-
Alto Caparaó	-	-	-	-	-	5	-	-
Coimbra	-	-	20	15	5	0	0	0
Guaraciaba	-	-	-	15,23	-	-	-	-
Machado	-	-	-	-	-	-	-	0
Manhuaçu	-	-	-	-	-	3,67	-	-
Patrocínio	0	-	-	-	-	-	-	-
Varginha	-	-	-	-	-	-	-	0
Viçosa	0	-	9,07	-	15	0	0	0

**Obs.:** A Incidência média de folhas com teliosporos corresponde ao percentual do número médio de folhas com teliosporos, coletadas em cada mês; (-) nenhuma coleta foi realizada no mês.

Apesar de preliminar e parcial, este estudo demonstrou que a ocorrência de teliosporos em diferentes regiões cafeeiras e épocas do ano foram muito variáveis com incidência variando de nula a 20% de folhas infectadas contendo télias com teliosporos. Sua presença restringiu-se aos meses de julho a outubro. A partir de novembro não foi mais registrada a sua presença em nenhuma das localidades visitada. Os teliosporos foram apenas encontrados na região da Zona da Mata. Estes não foram detectados no material coletado em outras importantes regiões cafeeiras de Minas Gerais (Sul de Minas e Alto Paranaíba).

Nos municípios de Coimbra, Guaraciaba e Viçosa, a incidência média de teliosporos foi maior do que a observada nos outros municípios. Notou-se também que a maior parte de folhas com teliosporos ocorreram em dias após um período de pouca chuva, combinado com a presença de temperaturas

baixas (Tab. 2). Acredita-se ser esta a condição ideal para a formação de teliósporos. No verão, mesmo em períodos chuvosos, sua ocorrência não foi mais registrada. É provável que a aparente ausência de teliósporos em municípios do Sul de Minas (Varginha e Machado) e Triângulo Mineiro (Patrocínio) tenha resultado apenas do fato de que a visita a estas localidades para coleta ocorreu em um período de clima desfavorável para sua formação.

Tabela 2 – Variação climática (pluviosidade e temperatura média) da micro região de Viçosa obtidos na estação meteorológica de Viçosa, Minas Gerais no período de maio a dezembro de 2006.

<b>Variáveis climáticas</b>			
<b>Meses</b>	<b>Pluviosidade</b>	<b>Temperatura média do mês</b>	
		<b>T. max</b>	<b>T. min</b>
<b>maio</b>	7,25	24,27	10,36
<b>junho</b>	6,25	23,60	8,45
<b>julho</b>	7,75	25,06	6,22
<b>agosto</b>	9,00	25,49	9,95
<b>setembro</b>	63,50	25,05	11,14
<b>outubro</b>	232,25	26,21	15,50
<b>novembro</b>	238,5	26,09	16,98
<b>dezembro</b>	203,5	28,45	18,37

Fonte: CPTEC – Centro de Previsão de tempo e estudos climáticos

Embora exista uma suposta documentação anterior de ocorrência de teliósporos de *H. vastatrix* no Brasil (Sugimori *et al.*, 1976), um exame das ilustrações apresentadas pelos autores (Fig.4) revela que nenhum dos esporos ali ilustrados tem a morfologia napiforme típica dos teliósporos de *H. vastatrix*. Estes têm ainda paredes espessas e parecem ser ligeiramente equinulados. Além disto, ao contrário do que foi observado no presente

trabalho, de forma consistente não se percebe nas ilustrações de Sugimori *et al.* (1976) qualquer vestígio de promicélio enquanto que em todo o material coletado neste estudo sempre havia teliósporos germinados. É provável que as estruturas ali representadas sejam apenas urediniósporos imaturos de *H. vastatrix*.

Assim sendo, este é o primeiro relato autêntico documentado com ilustrações de teliósporos de *H. vastatrix* no Brasil (Figs. 5 e 6)

Os indícios produzidos neste trabalho indicam que os teliósporos de *H. vastatrix* não são estruturas tão raras como sugerido na literatura. Neste mesmo estudo pode-se observar que os teliósporos são estruturas, relativamente comuns ao final de períodos de clima frio.

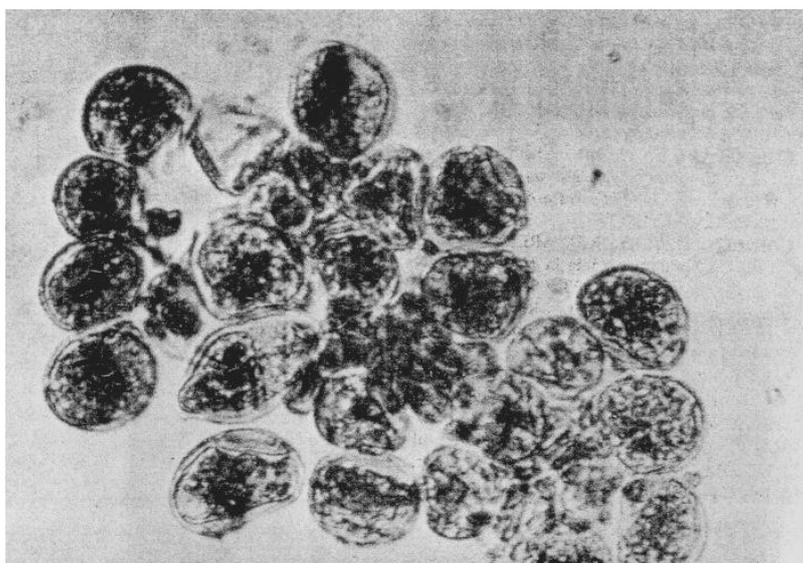


Fig.4. Figura apresentada em Sugimori *et al.* (1976) supostamente representando teliósporos de *H. vastatrix*.

Sua detecção em folhas infectadas pode ser difícil, pois a cor e a aparência das télias se confundem com a das urédias e muitas vezes teliósporos e urediniósporos são formados juntos numa mesma pústula. Uma forma prática para se encontrar os teliósporos, conforme observado

durante este estudo, é atentar, durante o exame das folhas infectadas sob o microscópio estereoscópico, para as pústulas que apresentem esporos germinados e ainda presos aos soros. Enquanto os urediniósporos geralmente não germinam em grupos, isto ocorre comumente com os teliósporos.

#### **4.1.2. Microscopia óptica**

Os teliósporos apresentavam as seguintes características: esféricos a napiformes, pedicelados, com paredes lisas e finas e uma papila terminal, seu tamanho varia de 12-27  $\mu\text{m}$  de comprimento e 15-27  $\mu\text{m}$  de largura.

Estes teliósporos germinam *in situ* produzindo um promicélio cilíndrico em seu ápice, medindo 20-88  $\mu\text{m}$  de comprimento e 7-12  $\mu\text{m}$  de largura, com 0 a 7 septos. A presença de um número maior do que 3 septos no promicélio é anormal para as Uredinales, mas relativamente freqüente em *H. vastatrix*, de acordo com Chinnappa & Sreenivasan (1965). Os basidiósporos apresentam formas irregulares e são revestidos por uma membrana lisa, sem espinhos, com diâmetro em média de 5-12  $\mu\text{m}$ . A variação de tamanho observada em basidiósporos de *H. vastatrix* foi muito significativa, e pode refletir uma variação no número de núcleos contidos nos mesmos. Observações de núcleos de basidiósporos de *H. vastatrix* montados em corante fluorescente, feitas paralelamente a este estudo, mostraram que os basidiósporos podem ter um ou dois núcleos. Nos estudos de Vishveshwan & Nag Raj (1962) e Chinnappa & Sreenivasan (1968), a maioria dos basidiósporos também tinha um ou dois núcleos, mas também existiam basidiósporos sem núcleos ou com até quatro núcleos.

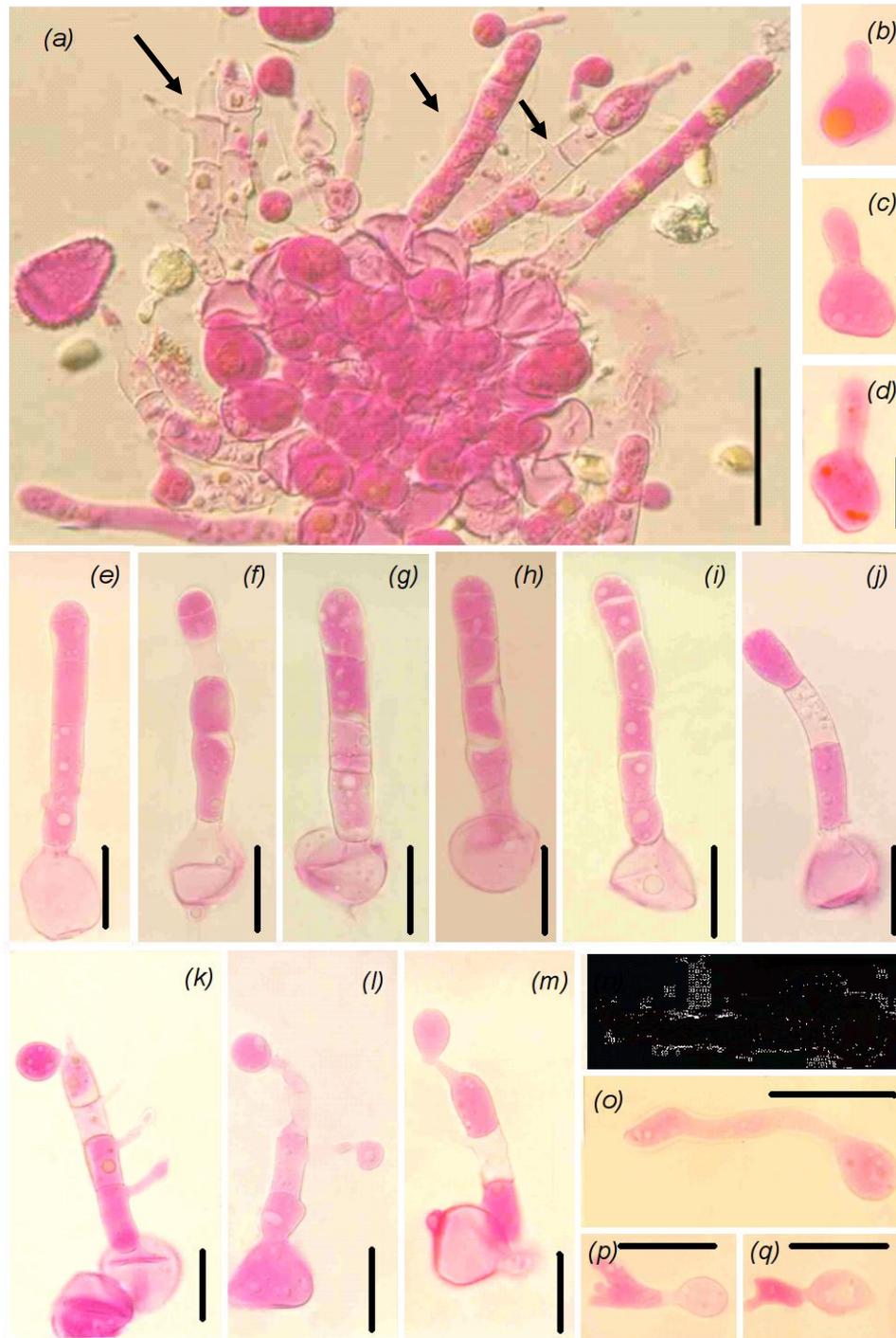


Fig. 5: Germinação dos teliósporos e basidiósporos de *H.vastatrix*: (a) aspecto geral do soro, predominantemente em teliósporos: germinação típica com 4 células e 4 esterigmas (flecha maior) e atípica – 5 a 6 células (flecha menor) barra = 50  $\mu$ m; (b-d) início da germinação dos teliósporos com saída promicelial; (e-i) promicelio com 5 até 6 células com ausência de esterigmas; (j) promicelio com 3 células; (k) promicelio típico; (l-m) promicelio com 3 células com uma ou duas esterigmas; (n-q) basidiósporos germinados (nota-se a formação de estruturas parecidas com apressórios). (b-q) – barra = 20  $\mu$ m.

#### 4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura

Os teliósporos são formados em agrupamentos compactos geralmente achatados entre os urediniósporos (Fig. 6 a, b, e, f), mas eles podem ser formados ocasionalmente em télias contendo apenas teliósporos (Fig.6 c, d)

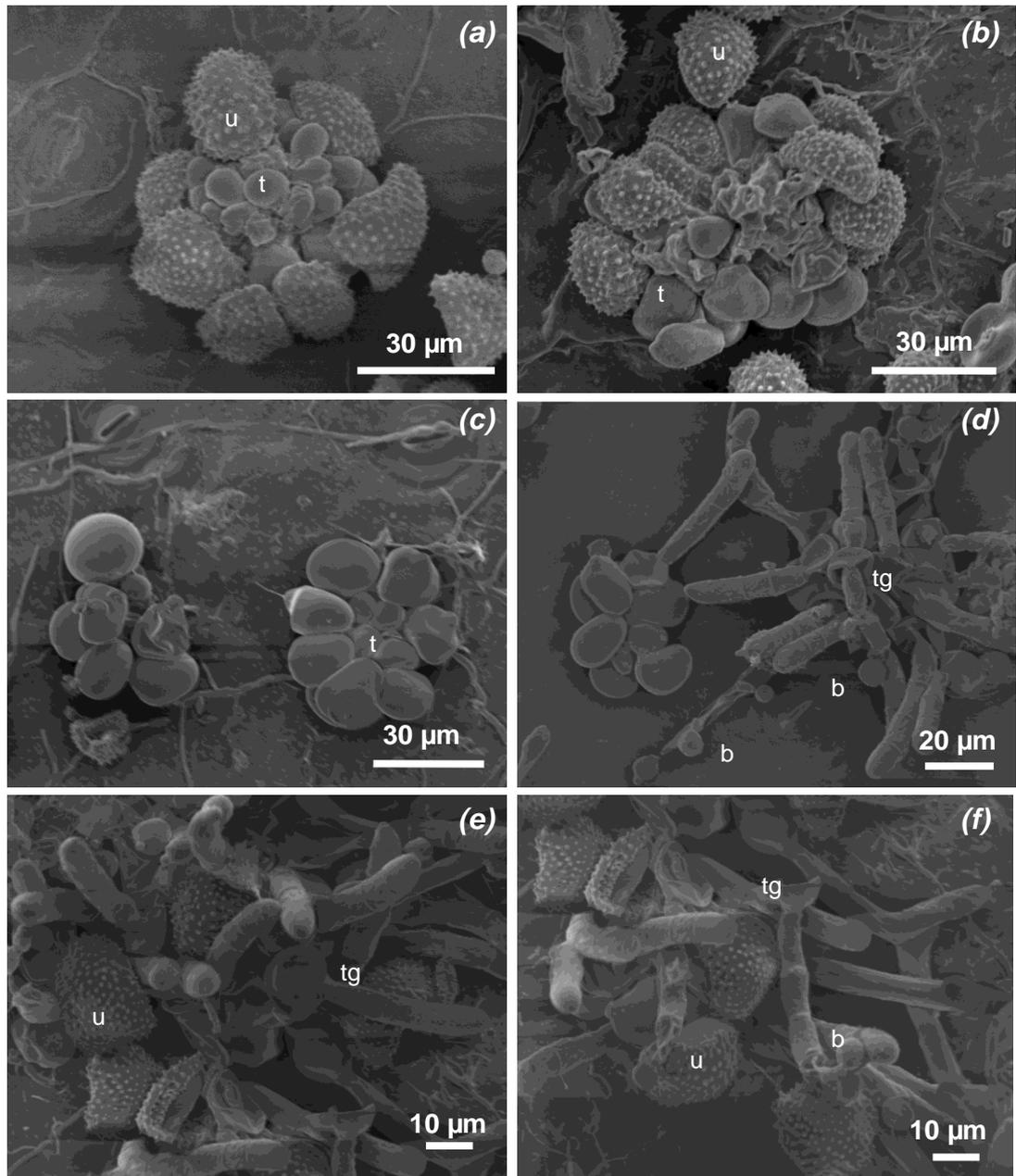


Fig.6. Teliósporos e urediniósporos de *H. vastatrix*: (a-b) teliósporos jovens (*t*) agrupados e achatados entre os urediniósporos (*u*); (c) télia contendo apenas teliósporos jovens sem papilas; (d) télias com teliósporos germinados; (e-f) teliósporos germinados (*tg*) e basidiósporos (*b*) agrupados e achatados entre os urediniósporos (*u*).

A formação de teliósporos em agrupamento com urediniósporos ou em soros separados também foi observado por Gopalkrishnan (1951). Os teliósporos imaturos não apresentam papilas

#### **4.1.4 Obtenção e inoculação de basidiósporos de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro**

Basidiósporos puros de *H. vastatrix* foram obtidos apenas uma vez em pequena quantidade pelo método envolvendo a fixação de fragmentos de folhas com télias no interior da tampa de placas de Petri, sobre Agar-água. Com o germinatélío não houve a desejada separação de basidiósporos e urediniósporos. Embora seja uma técnica empregada com sucesso para outras ferrugens como *Puccinia psidii* Wint. e *Puccinia pampeana* Speg. (Figueiredo e Coutinho, 1984), não foi bem sucedida para *H. vastatrix*. Isso pode estar relacionado à pequena quantidade de teliósporos e basidiósporos produzida por *H. vastatrix* quando comparada às outras espécies.

Uma inoculação feita, em duas plantas de cafeeiro com os basidiósporos coletados sobre o meio de cultura Agar-água, não resultou sintomas de qualquer espécie durante o período de sessenta dias. Permanecendo dessa forma desconhecida a infectividade através dos basidiósporos em plantas de cafeeiro.

#### **4.2. Germinação de urediniósporos**

Análise de variância dos dados de germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* submetidos a quatro temperaturas, revelaram valores de F significativos para todos os fatores e suas interações (Tab. 3).

Tabela. 3. Análise de variância dos dados de germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamento (Trat.)	2	0,430	0,215	77,17 *
Regime (Reg.)	1	0,742	0,742	265,96 *
Temperatura (Temp)	3	1,575	0,525	188,18 *
Trat. x Reg.	2	0,099	0,494	17,73 *
Trat. x Temp.	6	0,579	0,096	34,60 *
Reg. x Temp	3	0,329	0,109	39,36 *
Trat. x Reg x Temp.	6	0,314	0,052	18,78 *
Resíduo	48	0,134	0,002	
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>4,203</b>		

\*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados da avaliação do percentual de germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*, submetidos a diferente temperatura estão representados nas Figuras de 7 a 9. Como a análise de regressão na maioria dos dados resultaram em baixo  $r^2$ , procedeu-se à comparação entre as médias dos tratamentos através da análise do intervalo de confiança, associado a um teste t, a 5% de probabilidade.

O percentual de germinação (micelial e apressorial) foi influenciado pela temperatura na qual os urediniósporos foram colocados para germinar em diferentes regimes de luz. Os resultados indicam que a germinação apressorial tem maior tendência de ocorrer entre as temperaturas de 22 e 26 °C nos dois regimes de luz. Aos 18 e 30 °C o percentual de germinação foi muito baixo nos dois regimes de luz. Enquanto que a germinação micelial tem maior tendência a ocorrer entre as temperaturas de 18 a 26 °C, sendo seu ótimo próximo de 22 °C. Observa-se ainda uma queda no percentual de germinação micelial na presença de luz nas temperaturas de 18, 22 e 30 °C em todos os tratamentos.

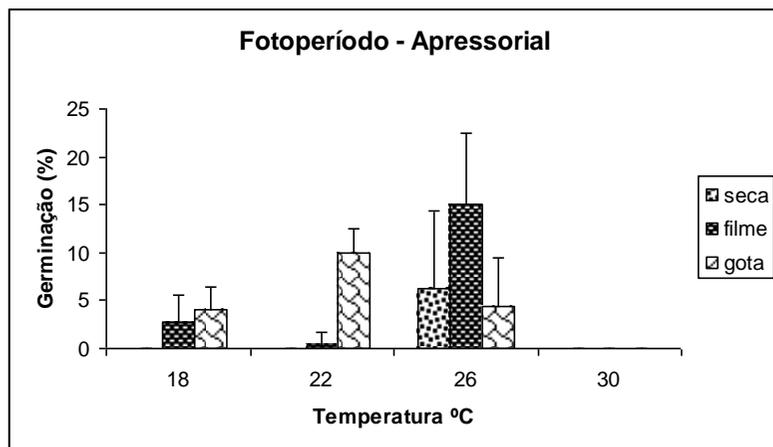


FIG. 7 – Percentagem de germinação apressorial de urediniósporos de *H. vastatrix* em fotoperíodo sob diferentes condições de umidade, luz e temperatura. As barras representam o intervalo confiança, associado ao teste t a 5% de probabilidade. Médias transformadas para  $\text{arc sen } \sqrt{x}$

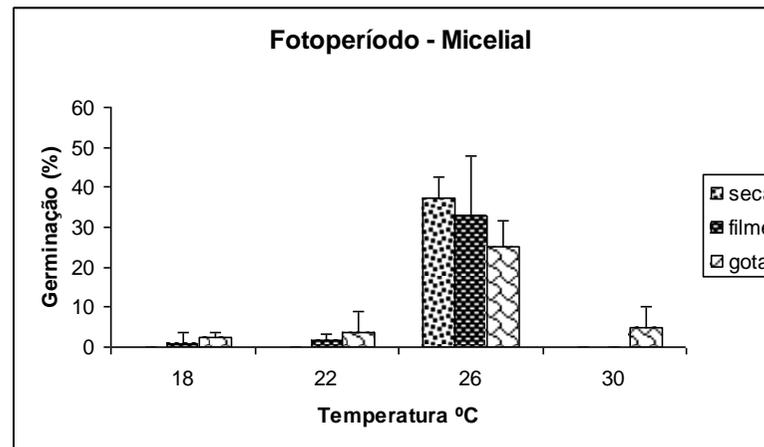


FIG. 8 - Percentagem de germinação micelial de urediniósporos de *H. vastatrix* em fotoperíodo sob diferentes condições de umidade, luz e temperatura. As barras representam o intervalo confiança, associado ao teste t a 5% de probabilidade. Médias transformadas para  $\text{arc sen } \sqrt{x}$

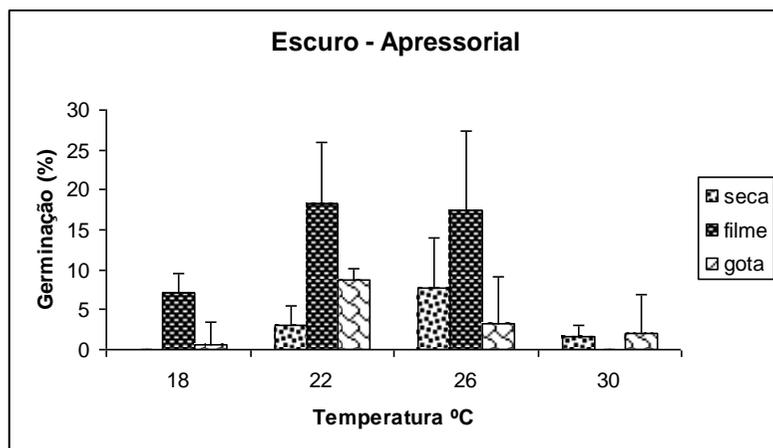


FIG. 9 – Percentagem de germinação apressorial de urediniósporos de *H. vastatrix* no escuro sob diferentes condições de umidade, luz e temperatura. As barras representam o intervalo confiança, associado ao teste t a 5% de probabilidade. Médias transformadas para  $\text{arc sen } \sqrt{x}$

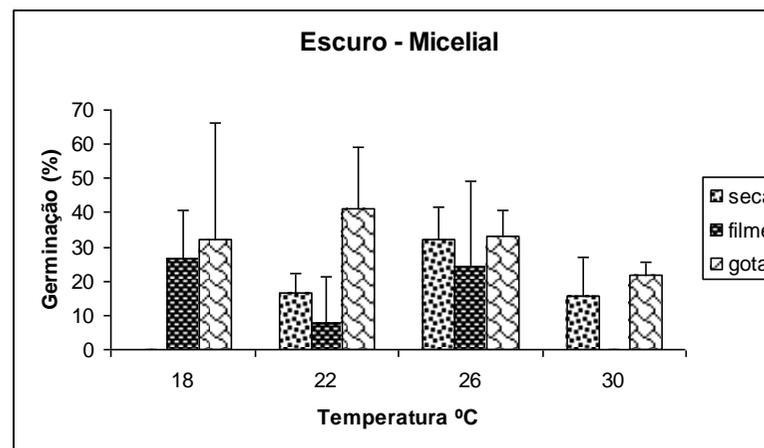


FIG. 10 – Percentagem de germinação micelial de urediniósporos de *H. vastatrix* no escuro sob diferentes condições de umidade, luz e temperatura. As barras representam o intervalo confiança, associado ao teste t a 5% de probabilidade. Médias transformadas para  $\text{arc sen } \sqrt{x}$

Os resultados da interação tratamento X temperatura (Tab. 4 e 5) referentes ao percentual de germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* em dois regimes de luz e quatro temperaturas indicam que o percentual de germinação de tipo micelial ocorre com maior freqüência em lâminas com suspensão aquosa (Tab. 4). Enquanto que a germinação promicelial ocorre com maior freqüência em lâminas com filme de água (Tab. 5).

Observando ainda as tabelas 4 e 5, referentes a germinação dos urediniósporos. Observa-se na análise das medias obtidas na interação regime x temperatura, dos urediniósporos colocados em diferentes condições de umidade e temperaturas que o percentual de germinação ocorre com maior freqüência em lâminas colocadas no escuro para os dois tipos de germinação.

Considerando-se os dados apresentados das figuras de 7 a 10 e os das tabelas 4 e 5, podemos concluir que a germinação apressorial tem maior tendência de ocorrer em lâminas com urediniósporos depositados sobre filme de água, no escuro sob as temperaturas de 22 e 26 °C. Por outro lado, a germinação micelial ocorre com maior freqüência em lâminas com urediniósporos em suspensão aquosa, no escuro e com temperaturas variando de 18 a 26 ° C, sendo temperatura ótima a 22 °C para este tipo de germinação.

Tabela. 4 - Medias da (%) **germinação micelial** de urediniósporos de *H.vastatrix* sob diferentes condições de umidade (dls - depósito em lâmina seca, dfa – depósito sobre lâmina com filme de água e dsa – depósito sobre lâmina em suspensão aquosa); regimes de luz (fotoperíodo e escuro) em diferentes temperaturas (18, 22, 26 e 30°C).

Tratamento	Temperatura (°C)							
	18		22		26		30	
	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro
dls	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b B	16,33 b A	37,33 a A	32,33 a A	0,00 b B	15,67 a A
dfa	1,00 ab B	26,33 a A	1,67 a A	7,67 b A	32,67 ab A	24,33 a A	0,00 b A	0,00 b A
dsa	2,33 a B	32,33 a A	3,67 a B	41,33 a A	25,33 b B	33,00 a A	5,00 a B	21,67 a A
CV (%)	55,86	21,52	32,10	17,00	6,63	12,06	35,98	12,28

Tabela. 5 - Medias da (%) **germinação apressorial** de urediniósporos de *H.vastatrix* sob diferentes condições de umidade (dls - depósito em lâmina seca, dfa – depósito sobre lâmina com filme de água e das – depósito sobre lâmina em suspensão aquosa); regimes de luz (fotoperíodo e escuro) em diferentes temperaturas (18, 22, 26 e 30°C).

Tratamento	Temperatura (°C)							
	18		22		26		30	
	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro	Fotoperíodo	Escuro
dls	0,00 b A	0,00 b A	0,00 b B	3,00 c A	6,33 b A	7,67 b A	0,00 a B	1,67 a A
dfa	2,67 a B	7,00 a A	0,33 b B	18,33 a A	15,00 a A	17,33 a A	0,00 a A	0,00 a A
dsa	4,00 a A	0,67 b B	10,00 a A	8,67 b A	4,33 b A	3,33 b A	0,00 a A	2,00 a A
CV (%)	20,31	46,63	29,67	9,31	18,89	18,23	0,00	75,74

**Tabela 1 e 2** - Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem os tratamentos entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem os regimes de luz entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*Valores transformados para  $\text{arc sen } \sqrt{x}$

### 4.3. Exame de eventos cariológicos

#### 4.3.1. Coloração de núcleos pelo método tradicional (Giemsa)

A coloração de núcleos de urediniósporos com Giemsa permitiu a visualização dos núcleos em compartimentos bem definidos (Fig. 11). Confirmando as observações preliminares feitas por Evans, 1993 (Fig. 2).

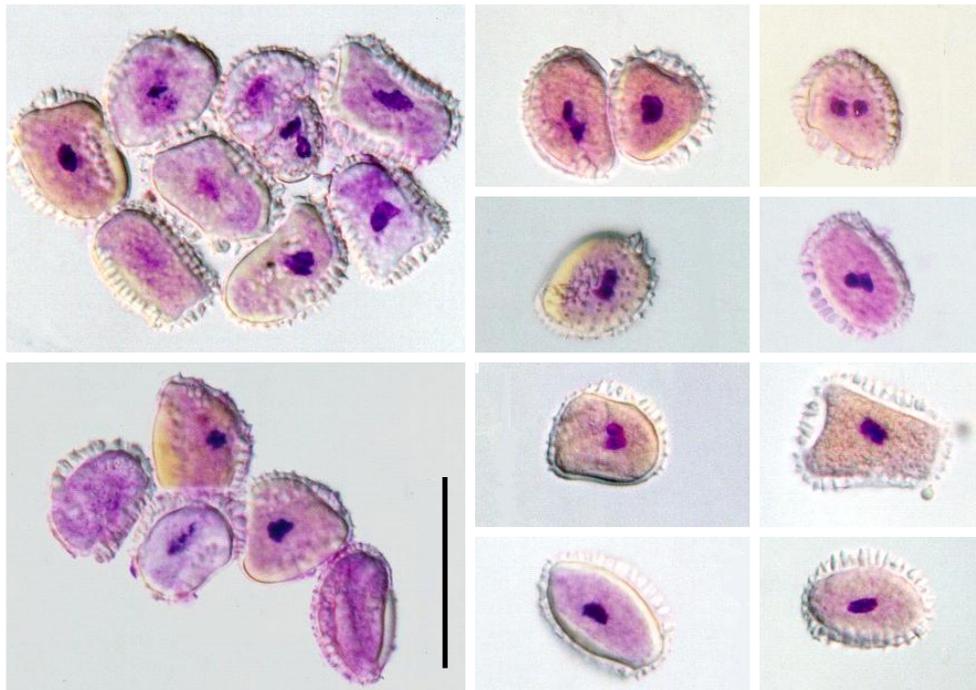


Fig. 11 Urediniósporos de *H. vastatrix* com núcleos corados com giemsa Barra = 50  $\mu$ m.

#### 4.4. Citometria de imagem

A coloração com Feulgen considerada mais adequada foi obtida em amostras hidrolisadas em solução HCl 5 M por 18 minutos a 25 °C e expostas ao corante por 12 horas. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram em lâminas em que os núcleos estavam fracamente corados ou não puderam ser visualizados.

Nos teliósporos uredinióides não germinados a coloração com Felgen permitiu a visualização de urediniósporos com um e dois núcleos (Fig. 12) e

e quatro núcleos no tubo germinativo dos teliósporos uredinióides germinados (Fig. 13). Dez teliósporos uredinióides em cada estágio, foram selecionados e mensurados e determinados os valores de DOI (Fig. 14).

A média dos valores de DOI dos núcleos de teliósporos uredinióides foram iguais a 12,38; 13,80 e 13,96 para um, dois e quatro núcleos, respectivamente (Tab. 6).

Para verificar se as diferenças de DOI observadas entre os teliósporos uredinióides com um, dois e quatro núcleos eram significativas, as médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de variância (Tab. 7). O teste F não foi significativo a 5% de probabilidade para as características avaliadas, podendo-se concluir que as médias de DOI de teliósporos uredinióides com um, dois e quatro núcleos não diferem entre si. O que demonstra uma forte evidência da redução do conteúdo de DNA em cada uma das divisões, típicas para a meiose. Isto indica que as estruturas observadas, embora morfológicamente equivalentes a urediniósporos e tradicionalmente interpretadas como assexuadas, podem funcionar como teliósporos uredinióides.

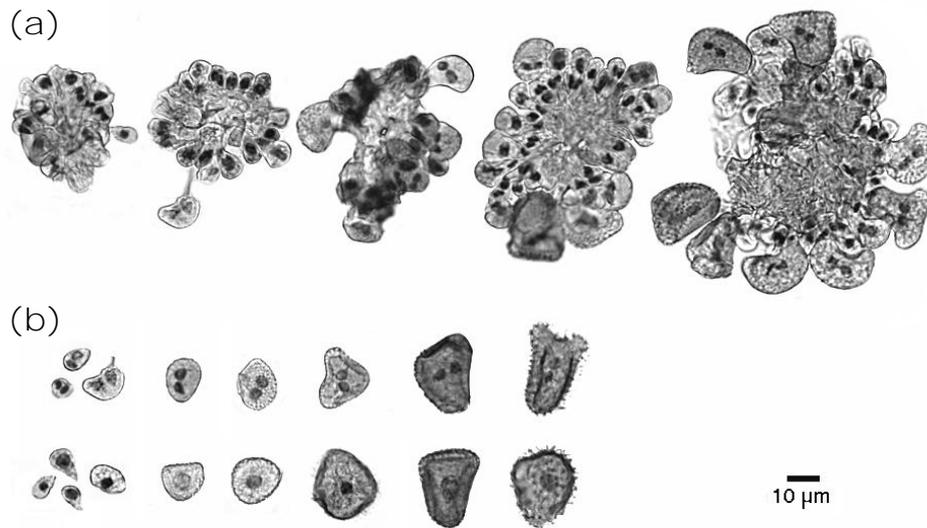


Fig. 12. Amostras de Uredínias de *H. vastatrix* em estádios crescentes de desenvolvimento (a); Teliósporos uredinióides de *H. vastatrix* em várias etapas do ciclo cariológico com um ou dois núcleos (b).

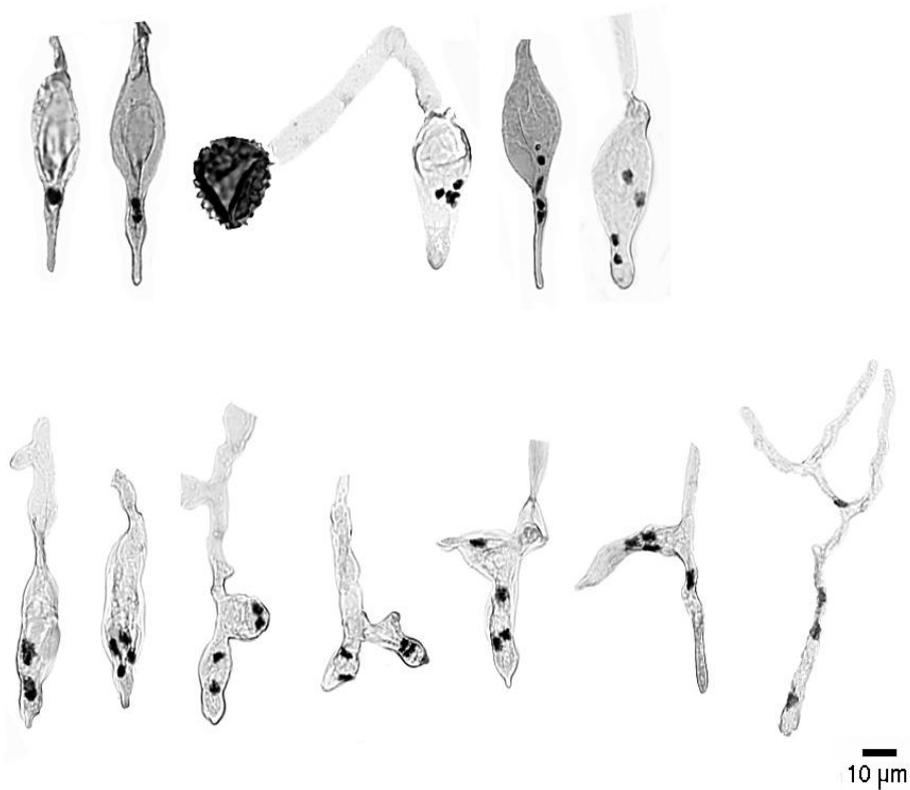


Fig.13. Produtos de germinação de teliósporos uredinióides de *H. vastatrix* (tubo germinativo, apressório ou ápice de micélio formado a partir do apressório) com dois ou quatro núcleos.

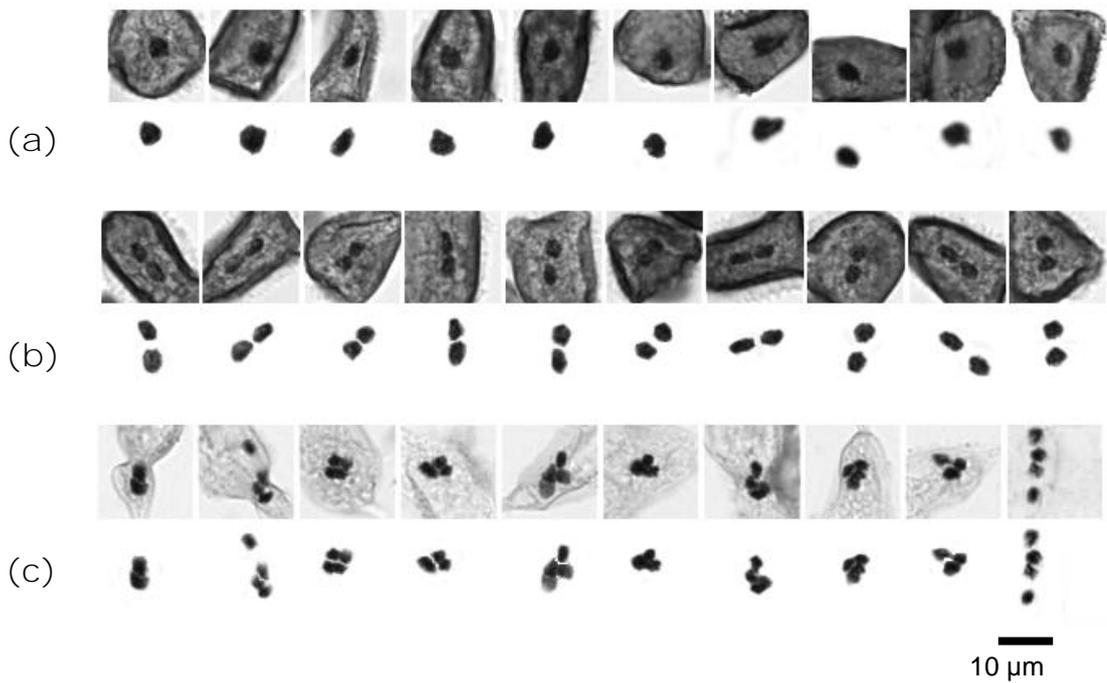


Fig.14. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de teliósporos uredinióides de *H. vastatrix*, utilizados para fazer a média da densidade óptica integrada (DOI): (a) Teliósporos uredinióides com núcleos diplóides; (b) Teliósporos uredinióides com dois núcleos após a primeira divisão da meiose; (c) Ápice de apressórios com quatro núcleos haplóides após a segunda divisão da meiose.

Tabela. 6. Valores de densidade óptica integrada (DOI) das amostras de núcleos de teliosporos uredinióides de *H. vastatrix*, obtidos em um núcleo, dois núcleos e quatro núcleos, acompanhados das respectivas médias.

Amostragem	Densidade Óptica Integrada (DOI)		
	1 Núcleo	2 Núcleos	4 Núcleos
1	11,13	13,13	12,77
2	15,61	12,67	14,66
3	10,97	11,49	14,01
4	12,02	14,28	11,92
5	13,47	14,27	15,93
6	11,00	14,21	13,17
7	14,79	14,84	13,73
8	11,22	14,63	13,31
9	13,02	14,75	13,46
10	10,58	13,68	16,67
<b>Média</b>	<b>12,38</b>	<b>13,80</b>	<b>13,96</b>

Tabela. 7. Análise de variância da densidade óptica integrada (DOI) dos núcleos de teliosporos uredinióides de *H. vastatrix*, obtidos em um núcleo, dois núcleos e quatro núcleos.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	15,10	7,55	3,58 <sup>ns</sup>
Resíduo	27	57,02	2,11	
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>72,12</b>		

<sup>ns</sup> Significativo a 5% de probabilidade.

#### 4.5. Citometria de Fluxo

Estudos em citometria não foram possíveis devido à dificuldade em se extrair protoplasto dos urediniósporos de *H. vastatrix*. A enzima (lysing

enzymes -Sigma Chemicals Co., L1412), usada na extração, foi testada em diferentes tempos e concentrações, mas só removeu parcialmente a parede dos urediniósporos. A escarificação da parede obtida não foi suficiente para análise por citometria de fluxo. Na literatura não foi encontrado nenhum registro de extração de protoplasto de Uredinales ou qualquer outro fungo biotrófico e os poucos exemplos encontrados para fungo eram de fungos cultiváveis em meio de cultura, como *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer Santos (2001)

#### **4.6. O Ciclo de Vida de *H. vastatrix*: contribuições e implicações deste estudo**

Pelas evidências obtidas durante o presente trabalho, vislumbram-se avanços rumo a uma interpretação mais objetiva em lugar de uma formulação puramente hipotética sobre o ciclo de vida de *H. vastatrix*. O ciclo de vida proposto em função destes estudos é apresentado na Fig. 15.

A configuração proposta não representa a completa diversidade de variações no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro, conforme indicado em estudos na Índia, que mostram teliósporos uredinióides germinando com a formação de basídias com esterigmas e basidiósporos (Rajendren, 1997 b). Há indícios de que este ciclo de vida represente uma recente adaptação evolutiva surgida quando o hospedeiro selvagem de *H. vastatrix*, possivelmente a forma tetraplóide *Coffea arábica*, emergiu de um habitat florestal para um ecossistema mais seco e sazonal, estimulando o desenvolvimento de novas estratégias para o patógeno num processo de co-evolução. Isso teria levado *H. vastatrix* a concentrar suas energias propagativas num único tipo de propágulo multifuncional, os urediniósporos,

agora com funções de dispersão, sobrevivência e geração de variabilidade. É possível que os teliósporos, de paredes finas e sem dormência tenham, na prática, se tornado dispensáveis, redundantes e geneticamente e morfológicamente instáveis. Embora basidiósporos ainda sejam comumente observados como produto da sua germinação, sua viabilidade e função como propágulos infectivos permanece obscura. É possível que teliósporos e basidiósporos sejam ainda comuns e funcionais em floresta úmidas no leste da África, atacando espécies endêmicas de *Coffea* spp.

A suspeita de tal instabilidade genética é reforçada pela ocorrência freqüente de eventos germinativos anormais observados durante este estudo (Fig. 5) e estudos prévios sobre *H. vastatrix*, feitos, sobretudo na Índia (Vishveshwara & Nag Raj, 1962; Chinnappa & Sreenivasan, 1965). Evidência citológica demonstrando que os basidiósporos contêm quantidades variáveis de cromatina de acordo com Chinnappa & Sreenivasan (1965). Estes, então, sugeriram que isto seria devido à instabilidade no processo meiótico e que, portanto, a função dos teliósporos no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro seria limitada. Testes feitos no passado envolvendo inoculação de cafeeiros com basidiósporos não resultaram em infecção (Ward, 1882a; Thirumalachar & Narasimhan, 1947; Gopalkrishnan, 1951). O mesmo ocorreu com a tentativa feita durante o presente estudo, reforçando as conclusões de Chinnappa & Sreenivasan (1965).

A evidência citológica de que cariogamia e meiose ocorrem nos teliósporos uredinióides de *H. vastatrix* apresentadas neste estudo confirma os resultados de Rajendren (1967a e 1967c) que foi o primeiro a sugerir que

os urediniósporos poderiam funcionar também como teliósporos e denominou este tipo especial de ciclo de vida de “Kamat type”. No entanto, este tipo de ciclo não é exclusivo de *Hemileia*, posto que um ciclo similar, com teliósporos e basidiósporos não funcionais, foram também descrito por Evans (1993) para *Maravalia cryptostegiae*. Esta espécie de fungo produz esporos com morfologia muito próxima à dos urediniósporos de *H. vastatrix*. Em função destas observações, Evans (1993) sugeriu que estas duas ferrugens seriam muito próximas filogeneticamente e teriam se originado em florestas tropicais, produzindo originalmente apenas teliósporos simples, com paredes finas, sem dormência e basidiósporos. Além disto, estas ferrugens ancestrais teriam ciclos de vida autóico e não expandido (microcíclico) ou parcialmente expandido. Esta suposta afinidade filogenética foi recentemente comprovada em estudos de sistemática molecular (Wingfield *et al.*, 2004; Aime, 2006). Estes dois estudos indicam que os gêneros *Hemileia* e *Maravalia* estão na base da árvore filogenética de Uredinales na família Chaconiaceae e representam o grupo mais primitivo entre as linhagens de ferrugens.

Em contraste, outros autores questionaram a existência do ciclo “Kamat-type” (Chinnappa & Sreenivasan, 1968), enquanto que outros propuseram que *H. vastatrix* seria uma espécie heteróica (Rodrigues, 1990), havendo inclusive sugestões de que os “estádios perdidos” – aqueles ainda desconhecidos para a ciência (pícnio e écio) deveriam ser procurados em hospedeiros da família Orchidaceae (Rayner, 1972). Entretanto, Hennen & Figueiredo (1984) apresentaram evidências circunstanciais bastante convincentes de que *H. vastatrix* seria uma ferrugem macrocíclica autóica.

Os resultados apresentados aqui dão suporte a esta hipótese, mas, até que o papel dos teliósporos e basidiósporos no ciclo de vida seja completamente esclarecido não se pode dizer que o ciclo de *H. vastatrix* tenha sido totalmente elucidado.

Até hoje, 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas (Van der Vossen, 2005) e 37 destas foram relatadas na Índia. Essa elevada diversidade é atribuída às condições favoráveis para *H. vastatrix* durante todo o ano nesta região e à pressão de seleção sobre o fungo resultante da contínua introdução de materiais resistentes ao longo dos anos (Prakash *et al.*, 2005); Rodrigues *et al.* (2001) sugeriram que essas raças surgem como resultado de mutações e não de recombinações genéticas. Entretanto, tal mecanismo seria inadequado para explicar a recente quebra de resistência de diversas variedades melhoradas de cafeeiro, especialmente no caso dos híbridos tetraplóides inter-específicos, na Ásia e América Latina (Van Der Vossen, 2005; Várzea & Marques, 2005; Silva *et al.*, 2006). Várzea & Marques (2005), apontam como causa para tal instabilidade a variabilidade e heterogeneidade das populações de *H. vastatrix* e concluem a falta de conhecimento sobre os mecanismos e dinâmica da variação em populações de *H. vastatrix* representa uma grande preocupação para os melhoristas”. Os resultados apresentados aqui representam um avanço no esclarecimento destas questões. O mecanismo desconhecido gerando variabilidade em *H. vastatrix* pode ser a recombinação genética que ocorre cripticamente nos teliósporos uredinióides, conforme aqui demonstrado.

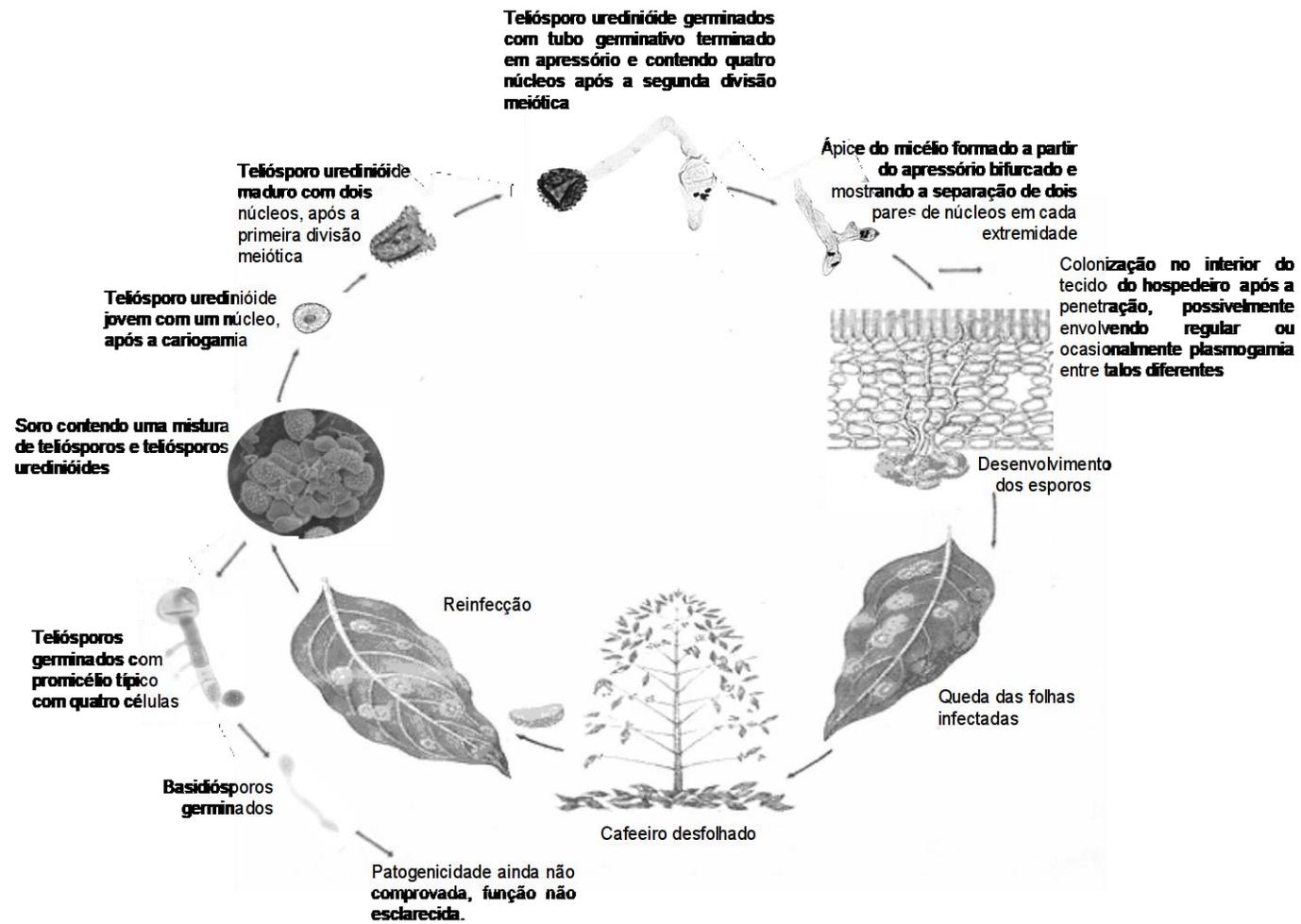


Fig. 15. Ciclo de vida parcial da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) proposto neste estudo

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. 2005. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press: Amsterdam.

ABIC 2007. **Estatística - Exportações**. Consulta no dia 17 de março de 2007. [http://www.abic.com.br/estat\\_exporta\\_ppaises.html#topo](http://www.abic.com.br/estat_exporta_ppaises.html#topo).

AIME, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). **Mycoscience**, 47: 112-122.

BERKELEY, M. J. 1869. (sem título). **Gardener's Chronicle**, 45: 1157.

BOCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. 1995. Consensus report of ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, 8: 67-74.

CAFEICULTURA – **A revista do Agronegócio café**. Consulta no dia 17 de março de 2007. <http://www.revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=5519>

CHIECO, P. & DERENZINI, M. 1999. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry and Cellular Biology**, 111: 345-358.

CHINNAPPA, C. C.; SREENIVASAN, M. S. 1965. Cytological studies on germinating teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Caryologia**, 18 (4): 625-631.

CHINNAPPA, C. C.; SREENIVASAN, M. S. 1968. Cytology of *Hemileia vastatrix*. **Caryologia**, 21 (1): 75 - 82.

COEN, H.; PAUWELS, M.; ROELS, F. 1992. The rat liver cell nuclear imprinting as a standart for DNA measurements. **Analytical Cellular Pathology**, 4: 273 - 285.

COHEN, C. 1996. Image cytometric analysis in pathology. **Human Pathology**, 27: 482 - 493.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95: 99 -110

EVANS, H. C. 1993. Studies on the rust *Maravalia cryptostegiae*, a potential biological control agent of rubber-vine weed *Cryptostegia grandiflora* (Asclepiadaceae: Periplocoideae), in Australia.I: Life-cycle. **Mycopathologia**, 124: 163 - 174.

FERREIRA, A. 2003. Índice de seleção e análise de fatores na predição de ganhos genéticos em *Coffea canephora* var. Conilon. Viçosa, MG: UFV, 132. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).

FIGUEIREDO, M. B & COUTINHO, L. N. 1984. A germination chamber for obtaining purê basidiospores of rust fungi. In: SIMPOSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO. Oeiras. Port. *Comunicações*. Oeiras, Centro de Invest. Ferrugens do Cafeeiro. 57 - 65.

GODOY, C. V.; BERGAMIM FILHO, A.; SALGADO, C. L. 1997. Doenças do cafeeiro. In: **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas (Vol. 2). KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. E. A.; REZANDE, J. M. (Eds). São Paulo: Editora Ceres. 184 – 200.

GOPALKRISHNAN, K. S. 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. **Mycologia**, 43: 271 - 282.

GOUVEIA, M. M.; RIBEIRO, A.; VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES Jr., C.J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia**, 97: 396-404.

HARDIE, D. C., GREGORY, T. R., HEBERT, P. D. N. 2002. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 50: 735-749.

HENNEN, J. F.; FIGUEIREDO, M. B. 1984. The life cycle of *Hemileia vastatrix*. **Simpósio sobre Ferrugem do Cafeeiro**. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Instituto de Investigação Científica Tropical: Oeiras, Portugal. P. 47-56

Kiss, R.; Gasperin, P.; Verhest, A.; Pasteels, J. L. 1992. Modification of tumor ploidy level via the choice of tissue taken as diploid reference in digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei. **Modern Pathology**, 5 (6): 655-660.

KUSHALAPPA, A. C; ESKEES, A. B. 1989 a. Advances in coffee rust research. **Annual Review of Phytopathology**, 27: 503 - 531.

KUSHALAPPA, A. C; ESKEES, A. B. 1989b. **Coffee Rust: Epidemiology, Resistance, and Management**. CRC Press Inc: Boca Raton, Florida.

LABORY, C. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F; DAVIDE, L.C.; WENZEL, I. M. 2003. Coloração de núcleos de esporos e hifas do cogumelo *Agaricus blazei*. **Ciência e Agrotecnologia**, 27: 471-474.

LARGE, E. C. 1940. **The Advance of the Fungi**. Jonathan Cape: London.

MEDEIROS, A. G. 1970. **Informe sobre *Hemileia vastatrix* em café na Bahia, Brasil**. Comis. Exec. PI. Recup. Econ. Lav Cacaueira, Rio de Janeiro.

MELLIN, W. 1990. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. **Pathol. Res. Pract**, 186: 213-229,

MOSCONE, E.; BARANYI, M.; EBERT, L.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; 2003. Analyses of active nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feugen desitometry. **Annals of Botany**, 92: 21-29.

PRAKASH, N. S.; GANESH, D. & BHAT, S. S. 2005. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M. & VÁRZEA, V.M.P. **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. DFP, UFV: Viçosa, Brasil. 411 - 442.

RAJENDREN, R. B. 1967 a. A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Mycologia**, 59: 279 - 285.

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

RAJENDREN, R. B. 1967 c. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Nature (Lond)**, 213: 105-106.

RAYNER, R. W. 1972. Micologia, historia y biologia de la roya del cafeto. **Publicación Miscelânea**, 94: 1-68. Instituto Interamericano de Ciencia Agrícola: Turrialba.

RIBEIRO, A.; VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES Jr. C. J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia**, 97: 396-404.

RODRIGUES Jr., C. J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO, L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, 13: 49-70.

RODRIGUES Jr. C. J. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9.

RODRIGUES Jr., C. J.; VÁRZEA V. M. P.; SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; ROCHETA, M.; MARQUES, D. V. 2001. Recent advances on coffee leaf rust. In: Prakash, N.S. Raghuramulu, Y; Devasia, J. (eds). **Proceedings of the International Scientific Symposium on Coffee. Bangalore Central Coffee Research Institute**, Coffee Board of India. 179 - 193.

SANTOS, J. K.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. 2001. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis perniciosus* (STÄHEL) SINGER, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. In: **47º Congresso Nacional de Genética**, 2001, Água de Lindóia/SP. CD do 47º Congresso Nacional de Genética.

SILVA, M. C.; VARZEA, V.; GUIMARAES, L. G.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 119-147.

ABIC 2007. **Estatística - Exportações**. Consulta no dia 17 de março de 2007. [http://www.abic.com.br/estat\\_exporta\\_ppaises.html#topo](http://www.abic.com.br/estat_exporta_ppaises.html#topo).

SINDICAFÉ - **Sindicato da Indústria do Café do Estado de Minas Gerais**. Consulta no dia 17 de março de 2007. [http://www.sindicafesp.com.br/nota\\_ofertam\\_jan07.html](http://www.sindicafesp.com.br/nota_ofertam_jan07.html)

SUGIMORI, M. H.; SOAVE, J.; PARADELA FILHO, O.; MORAES, S.A., RIBEIRO, I. J. A.; FUMIKO ITO, M. 1976. Constatação de teliosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 2 (4): 299-302.

THIRUMALACHAR, M. J. & NARASIMHAN, M. J. 1947. – Studies on the morphology and parasitism of *Hemileia* species on Rubiaceae in Mysore. **Annals of Botany . N. S.**, 11: 77 - 89.

VAN DER VOSSSEN, H. A. M. 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in Crop Plants, such as coffee leaf-rust. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M. & VÁRZEA, V. M. P. **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. DFP, UFV: Viçosa, Brasil. 1-29.

VÁRZEA, V. M. P. & MARQUES, D. V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.;

ZAMBOLIM, E. M. & VÁRZEA, V. M. P. **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. DFP, UFV: Viçosa, Brasil. 53-74.

VEGA, F.E.; ROSENQUIST, E.; COLLINS, W. 2003. Global Project needed to tackle coffee crisis. **Nature**, 425: 343.

VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, 87: 719 -728.

VISHVESHWARA, S. & NAG RAJ, T. R. 1962. Some abnormalities of teliospore germination in *Hemileia vastatrix*. **Phyton**. 18 (1): 75 - 79.

WARD, M. H. 1882 a. Researches on the life-history of *Hemileia vastatrix*, the fungus of the "Coffee-leaf Disease". **Journal of the Linnaean Society Botany**, 19: 299-335.

WARD, M. H. 1882 b. On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. (The fungus of the coffee disease of Ceylon). **Quarterly Journal of Microscope Science**, 22: 1-11.

WIED, G.L., BARTELS, P.H., DYTCH, H.E., BIBBO, M. 1983. Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis. **Acta Cytologica**, 27 (1): 33-37.

WINGFIELD, B.D.; ERICSON, L.; SZARO, T.; BURDON, J. J. 2004. Phylogenetic patterns in the Uredinales. **Australasian Plant Pathology**, 33: 327-335.