

ADELICA APARECIDA XAVIER

**HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Puccinia psidii* E VIRULÊNCIA
DE ISOLADOS DO PATÓGENO EM ESPÉCIES DE MYRTACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

ADELICA APARECIDA XAVIER

**HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Puccinia psidii* E VIRULÊNCIA
DE ISOLADOS DO PATÓGENO EM ESPÉCIES DE MYRTACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 7 de fevereiro de 2002.

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. Luiz Antonio Maffia

Prof. Kiyoshi Matsuoka
(Orientador)

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim como uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, sentido prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

A Deus.

Agradeço

Aos meus pais Neusa, Adair e Adriano (*in memoriam*).

Às minhas irmãs Geni Lúcia, Vânia e Adriana.

Aos meus sobrinhos Lohayne, Luana, João Victor, Pedro Henrique e Camila.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da bolsa.

Ao professor Kiyoshi Matsuoka, pelos ensinamentos transmitidos e pelo agradável convívio.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pelo estímulo e pela amizade durante toda a minha passagem por Viçosa.

Aos professores Luiz Antônio Maffia, Silvaldo Felipe da Silveira e Murilo Geraldo de Carvalho, pelas sugestões e críticas.

Às minhas queridas amigas Regina e Alessandra, pelos exemplos de dedicação e fé durante toda a nossa convivência.

Aos amigos de laboratório Cláudia Vanetti, Jânia Lilia Bentes e José Cristino Abreu, pelo convívio e pela amizade.

Ao Edson e à Gisele, pela amizade e pelo companheirismo sempre.

Ao meu grupo de estudo (Adriana Truta, Maurício Dutra, Valéria Dellareti e Abelmon), pela dedicação e pelo precioso tempo de aprendizado.

A Débora, Raquel e Claudine, pelos bons momentos durante nosso convívio.

Aos colegas do laboratório de Patologia Florestal, em especial ao Rodrigo Graça, pela incansável ajuda.

Aos professores, pelos valiosos ensinamentos, e a todos os amigos do Departamento, pela agradável convivência.

Ao Departamento de Fruticultura e IEF, pela doação das mudas de jaboticaba e pitanga.

A todos os funcionários, pela convivência e disposição em ajudar sempre que solicitados, em especial, a Délio e Cecília.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído com êxito.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	
HISTOLOGIA DE <i>Puccinia psidii</i> EM <i>Eucalyptus grandis</i> COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA	5
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Microscopia de luz.....	7
2.2. Microscopia de luz e eletrônica de transmissão	9
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO	20
CAPÍTULO 2	
VARIABILIDADE FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Puccinia psidii</i> EM CLONES DE <i>Eucalyptus grandis</i> E ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE.....	24
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Obtenção e condução do material vegetal	27
2.2. Coleta, isolamento, manutenção dos isolados e produção de inóculo..	28
2.3. Inoculação dos clones de eucalipto.....	30

2.4. Inoculação das plantas hospedeiras	30
3. RESULTADOS	32
4. DISCUSSÃO	38
CAPÍTULO 3	
COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO <i>Puccinia psidii</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Quantificação de componentes de agressividade.....	46
2.1.1. Frequência de infecção	46
2.1.2. Eficiência de infecção	47
2.1.3. Produção de uredíniosporos	47
2.1.4. Período latente	47
2.1.5. Período infeccioso	48
2.2. Severidade da doença.....	48
2.3. Avaliação microscópica do desenvolvimento do patógeno	49
3. RESULTADOS	50
3.1. Quantificação de componentes de agressividade	50
3.1.1. Frequência de infecção	51
3.1.2. Eficiência de infecção	51
3.1.3. Produção de uredíniosporos	52
3.1.4. Período latente	53
3.1.5. Período infeccioso	54
3.2. Severidade da doença	56
3.3. Avaliação microscópica do desenvolvimento do patógeno.....	56
4. DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES GERAIS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

XAVIER. Adelica Aparecida, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Histopatologia da interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae.** Orientador: Kiyoshi Matsuoka. Conselheiros: Acelino Couto Alfenas e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Clones de *Eucalyptus grandis* com resposta de resistência completa do tipo HR, imunidade, resistência parcial e suscetibilidade à ferrugem foram inoculados com o isolado I_{UFV}-01 de *P. psidii* e avaliados sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se maior desenvolvimento de hifas, haustórios e células-mãe do haustório (HMC) no clone suscetível (D_{UFV}-1) que nos resistentes (D_{UFV}-5, D_{UFV}-3 e D_{UFV}-4), havendo tendência de redução do número dos eventos citados com o nível de resistência. Em todos os clones, observou-se resposta celular de agregação de citoplasma e parede com intensidade de brilho, sendo mais pronunciada nos clones resistentes. Sob microscopia eletrônica de transmissão, esse desarranjo citoplasmático foi observado nos clones resistentes D_{UFV}-5, D_{UFV}-3. No clone com resposta de HR, encontraram-se haustórios totalmente encapsulados 144 horas após a inoculação (h.a.i.). No material imune D_{UFV}-4 não foram observados haustórios, e nos clones suscetível e com resistência parcial os haustórios desenvolvidos foram lobados. A patogenicidade de 32 isolados de *Puccinia psidii*, obtidos de diferentes

hospedeiras e regiões, foi avaliada em plantas da família Myrtaceae (goiabeira var. Paloma, jambeiro, jabuticabeira, eucalipto e pitangueira). A frequência de isolados patogênicos a eucalipto, jambeiro, jabuticabeira, goiabeira e pitangueira foi de 100, 87, 81, 31 e 4%, respectivamente. A virulência de 21 desses isolados de *P. psidii* foi avaliada em oito clones de eucalipto e reconheceram-se três respostas diferenciais dentro da interação, as quais foram caracterizadas como raça 1, raça 2 e raça 3, com frequência de 90,5, 4,8 e 4,8%, respectivamente. As raças 2 e 3 foram inoculadas nos clones diferenciadores e em um clone suscetível a ambos (D_{UFV-1}) e quantificaram-se os componentes de agressividade. Determinou-se diariamente o número de lesões/folha (NLF) e o número de lesões esporulando (NLE); aos 12 dias da inoculação, foram quantificados o número de soros/pústula (NSP), o tamanho de uredínia (TU) e a produção de esporos/pústula (PEP). A área foliar total e doente foi determinada por meio do *software* QD - *Quantificação de doenças de plantas*. Estimaram-se a severidade da doença, a frequência de infecção, a eficiência de infecção e a produção de esporos/lesão. Pela análise estatística, a interação clone x raça foi significativa para todas as variáveis citadas, exceto para FI. Detectou-se diferença estatística entre as raças 2 e 3 nos clones D_{UFV-3} e D_{UFV-1}, para a produção de soros/pústulas e severidade da doença. Maior tendência foi observada para a raça 3 em todas as variáveis. O período infeccioso em todos os clones foi de 16 dias. Na raça 3 observou-se um pico de produção de esporos aos 12 dias com aproximadamente 5×10^3 urediniosporos/lesão/mL, que continuou constante até o final do período infeccioso, com uma média de seis a oito pústulas ainda produzindo esporos. A raça 2 apresentou maior variação na produção de esporos e, em média, 3×10^3 urediniosporos/lesão/mL foram produzidos, com mesma tendência nos dois clones avaliados. A variabilidade de *P. psidii* ficou evidenciada nas inoculações tanto da gama de hospedeiros dentro da família Myrtaceae quanto nos diferentes clones de eucalipto utilizados, nos quais foi possível diferenciar três raças de *P. psidii*. A comparação das duas raças de menor ocorrência (raças 2 e 3) demonstrou maior agressividade da raça 3 que a raça 2 no clone suscetível às duas raças.

ABSTRACT

XAVIER, Adelica Aparecida, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2002. **Histopathology of interaction of *Puccinia psidii* and virulence of the isolates of the pathogen on species of Myrtaceae.** Advisor: Kiyoshi Matsuoka. Committee members: Acelino Couto Alfnas and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Eucalyptus grandis clones with HR type complete resistance, immunity, partial resistance or susceptible response to rust were inoculated with IUFV-01 isolate of *P. psidii* and then evaluated by the use of light and transmission electron microscope. Development of hyphae, haustoria, haustoria mother cell (HMC) was greater in the susceptible clone (DUFV-1) compared to in the resistant clones (DUFV-5, DUFV-3 and DUFV-4). The number of event occurrence showed a decreasing tendency with increasing level of resistance. There was cytoplasm aggregation in all the clones, and the cell wall brilliance was greater in the resistant clones. Under electron microscope this cytoplasm disorder was observed in resistant clone (DUFV-5, DUFV 3). In clones with HR response, totally encapsulated haustorias were found 144h after inoculation (h.a.i.). While no haustoria were observed in the immune clone DUFV-4, lobed haustoria developed in the susceptible and partially resistant clones. The pathogenicity of 32 isolates of *P. psidii*, obtained from different hosts and

regions was evaluated on plants of Myrtaceae family (guava var. paloma, jambo, jabuticaba, eucalyptus and pitanga). The frequency of isolates pathogenic on eucalyptus, jambo, jabuticaba and pitanga was 100, 87, 81, 31 and 4%, respectively. Virulence testing of 21 of these isolates on eight eucalyptus clones, showed three different interaction responses, which were characterized as race 1, race 2, and race 3, with the frequency of 90.5, 4.8 and 4.8% respectively. The components of aggressiveness of race 2 and 3 were quantified by inoculating the set differential clones and one clone (DUFV-1) susceptible to both the races. Number of lesions per leaf (NLF) and number of sporulating lesions (NSL) was quantified daily and the number of sori/pustule (NSP), the uredinia size (US) and the number of spores/pustule (NSP) was quantified 12 days after inoculation. The total and the diseased leaf area were estimated by the use of QD software - *Quantification of Plant diseases*. Disease severity, infection frequency, infection efficiency and the spore production/lesion were estimated. The interaction between clone x race was significant for all the variables except FI. The race 2 and 3 differed on clones DUFV-3 and DUFV-1, for the number of sori/pustule and disease severity, with greater tendency for race 3 in all the evaluated variable. The infectious period in all the clones was of 16 days. In the race 3 there was a peak in the spore production at 12 days with approximately 5×10^3 uredinospores/lesions/mL and remained constant till the end of the infectious period, while about 6 to 8 pustules still producing the spores. The race 2 showed a greater variation in the spore production with an average of 3×10^3 uredinospores/lesion/mL, on both the clones. The variability of *P. psidii* was evident in the inoculation of a range of the hosts in Myrtaceae family as well as on different clones of eucalyptus, which allowed for differentiation of three races of *P. psidii*. The comparison of the two less frequent races (race 2 and 3) showed greater aggressiveness of the race 3 on the two clones susceptible to both races.

INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é nativo da Austrália e tem sido a essência florestal exótica mais plantada no mundo. Esta espécie adaptou-se bem às condições edafoclimáticas; em 1985 o Brasil já possuía aproximadamente 40% da área plantada no mundo. O eucalipto atualmente possui uma área plantada de 3 milhões de hectares e contribui com 21 bilhões de dólares no PIB (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2000).

A área plantada com eucalipto no Brasil começou a expandir-se a partir da década de 70; desde então, a ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* Winter tornou-se uma doença importante para a cultura. Em 1973, no Espírito Santo, mudas de *Eucalyptus grandis* (procedentes da África do Sul) foram severamente atacadas pela ferrugem, causando perdas de mais de 400.000 mudas (FERREIRA, 1983). A prática do plantio clonal de eucalipto no final da década de 80 - de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (FERREIRA e SANTOS, 1997) - e as expansões de área plantadas em regiões sob condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno tornaram freqüentes os relatos de epidemias severas de ferrugem, principalmente no Vale do Rio Doce, na Zona da Mata de Minas Gerais e na costa do Espírito Santo (FERREIRA, 1983; FERREIRA, 1989). Mais recentemente observou-se

ocorrência generalizada em áreas de plantio nas três regiões do Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo (TAKAHASHI et al., 1997).

Puccinia psidii foi primeiramente descrita no Brasil em *Psidium pomiferum* L por Winter em 1884 e 45 anos depois foi observada em eucalipto; entretanto, somente em 1944 Joffily descreveu este patógeno ocorrendo em *Eucalyptus citriodora* (FERREIRA, 1989; COUTINHO et al., 1998). Conhecida também como ferrugem das mirtáceas, esse patógeno é capaz de infectar espécies de diversos gêneros pertencentes a Myrtaceae, como *Psidium*, *Syzygium* e *Eugenia* (VIEGAS, 1961), além de *Eucalyptus*. Esporos obtidos em diferentes espécies hospedeiras são infectivos em eucalipto (APARECIDO, 2001; COELHO, 1988; CASTRO et al., 1983; FERREIRA, 1983). Esta característica propicia a presença de inóculo primário, que, aliada à abundante esporulação e à facilidade de dispersão de urediniosporos pelo vento, torna esta doença uma ameaça para áreas de cultivo de eucalipto onde condição de ambiente favorável à doença ocorra. A ferrugem no campo tem sido bem correlacionada com as condições de ambiente e fenologia dos seus hospedeiros (APARECIDO, 2001; BLUM e DIANESE, 2001; ROCA BADO, 1999; XAVIER, 1997; RUIZ et al., 1989). A infecção por *P. psidii* ocorre principalmente em órgãos tenros da planta. Na cultura do eucalipto esta doença é particularmente importante na fase de mudas no viveiro, no campo do plantio até o estágio fenológico B (FERREIRA, 1989) e em brotações, após o corte raso, bem como em jardins e minijardins clonais.

O controle da ferrugem do eucalipto no campo pode ser realizado por meio de aplicações de fungicidas, plantios de materiais com rápido crescimento ou utilização de materiais com resistência genética (ALFENAS et al., 1993; FERREIRA, 1989). A seleção de clones resistentes à ferrugem tem sido a medida de controle mais utilizada para esta doença, sendo uma prática comum nas empresas florestais. Dentre as resistentes destacam-se as espécies de *E. pellita*, *E. microcorys*, *E. urophylla*, *E. camaldulenses*, *E. pilulares*, *E. saligna*, *E. citriodora*, *E. tereticornis*, *E. maculata*, *E. paniculata*, *E. robusta*, *E.*

propinqua, *E. torelliana* e algumas procedências de *E. grandis* (FERREIRA, 1989).

Diante da ampla gama de hospedeiros deste patógeno e da constante utilização de clones resistentes, é possível que populações mais adaptadas ao eucalipto tenham sido selecionadas e que ocorra alta variabilidade tanto em patogenicidade quanto em agressividade dentro da população de *P. psidii* em eucalipto. A respeito dos resultados dos estudos de inoculações cruzadas (CASTRO 1983; COELHO, 1988; FERREIRA, 1983; APARECIDO, 2001), pouco se sabe sobre o comportamento de diferentes isolados em diferentes genótipos de eucalipto. A variabilidade de um determinado patógeno pode ser avaliada por inoculações de diferentes isolados do fungo em materiais genéticos diferentes de um hospedeiro particular; em eucalipto, além dos trabalhos de inoculações cruzadas, apenas o trabalho de CASTRO et al. (1985) estudou a agressividade de cinco isolados em seis diferentes clones de eucalipto.

Apesar de a resistência a *P. psidii* ser considerada uma característica para seleção no melhoramento genético, pouco se sabe da genética da interação *Eucalyptus* spp.x *P. psidii*. Recentemente, foi demonstrada a existência de um gene de efeito principal, associado a genes de efeitos secundários, no clone G-21 de *E. grandis* (JUNGHANS, 2000). Entretanto, os mecanismos envolvidos na resistência são pouco estudados. Além do trabalho de XAVIER et al. (2001a), não há dados caracterizando a patogênese deste fungo em eucalipto. Nesse trabalho, os autores observaram que para os clones avaliados a resistência se dá após a formação do haustório. Essas informações são importantes para subsidiar investigações citoquímicas e imunocitoquímicas necessárias ao entendimento dos mecanismos de resistência e de expressão de genes envolvidos na resistência e podem auxiliar na compreensão da durabilidade desta.

A compreensão de aspectos envolvidos na resistência genética do hospedeiro a *P. psidii*, bem como a variabilidade genética na população do patógeno, é importante para auxiliar na seleção de materiais resistentes no programa de melhoramento genético do eucalipto e no manejo da doença no campo. Diante do exposto, elaboraram-se as seguintes hipóteses de trabalho:

- 1- A patogênese de *P. psidii* em clones com reações de resistência do tipo “flecks”, hipersensibilidade, imunidade e resistência parcial é diferenciada morfológica e temporalmente.
- 2- Ocorre variabilidade quanto à virulência de isolados de *P. psidii* a diferentes genótipos de *E. grandis* e a diferentes Myrtaceae.
- 3- Há diferença de agressividade das raças 2 e 3 de *P. psidii* em clone de *E. grandis* suscetível às raças.

CAPÍTULO 1

HISTOLOGIA DE *Puccinia psidii* EM *Eucalyptus grandis* COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem das mirtáceas, causada por *Puccinia psidii* Winter, é uma das doenças mais importantes para a cultura do eucalipto no Brasil (FERREIRA, 1989; ALFENAS et al., 1989) e tem sido considerada uma ameaça para países onde se cultiva eucalipto (*Eucalyptus* spp.), como Austrália, onde esta planta é nativa e a doença não ocorre (COUTINHO et al., 1998). Dentre os métodos de controle, a resistência constitui a medida mais utilizada, porém pouco se sabe sobre os mecanismos estruturais e citológicos que operam na sua manifestação. Em estudos sobre a herança da resistência, verificaram-se materiais com resposta de resistência do tipo hipersensibilidade ou imunidade à resistência governada por um gene de efeito principal (JUNGHANS, 2000). A caracterização histológica do desenvolvimento do patógeno em clones com diferentes níveis de resistência, como ocorre em outras interações, é de extrema importância para o entendimento dos possíveis mecanismos de resistência envolvidos. A resistência

de plantas hospedeiras a ferrugens pode ser pré ou pós-haustorial (HEATH, 1981; NIKS, 1983; NIKS e DEKENS, 1991; HOOGKAMP et al., 1998). Pela quantificação dos componentes histológicos de pós-penetração em *Melampsora lini* ((Ehrenb.) Lév.), podem-se observar diferenças no desenvolvimento fúngico em materiais com diferentes níveis de resistência (KOWALSKA e NIKS, 1999).

Em *P. psidii* o processo de pré-penetração foi caracterizado em jambeiro (*Eugenia jambos* L) (HUNT, 1968); em eucalipto o processo de infecção foi descrito em clone suscetível e resistente de eucalipto (XAVIER et al., 2001a), bem como em folhas jovens e velhas de clone suscetível (XAVIER, 1997). Este patógeno penetra entre as paredes anticlinais das células da epiderme (XAVIER et al., 2001a; HUNT, 1968), ao contrário da maioria das ferrugens, em que a penetração ocorre via estômato. No mesófilo, o fungo desenvolve uma vesícula intra-epidermal e, a partir desta, surgem hifas de infecção primárias e secundárias (XAVIER, 1997; HEATH, 1997). Após o desenvolvimento de hifas primárias e secundárias, forma-se a célula-mãe do haustório (CMH), a qual, em contato com a superfície da célula hospedeira, forma uma hifa que penetra na parede e invagina a plasmalema da célula hospedeira sem rompê-la, chamada de pescoço haustorial. O corpo haustorial desenvolve-se na extremidade distal do pescoço haustorial e assume formas variadas, dependendo da espécie de ferrugem, e possui função básica de nutrição (BUSHNELL, 1972). O haustório é envolvido pela membrana citoplasmática da célula hospedeira e uma matriz extra-haustorial é formada na sua extremidade. Esse padrão de desenvolvimento é observado na maioria das ferrugens de clima temperado, porém em ferrugens de clima tropical, em particular, o desenvolvimento ultra-estrutural de *P. psidii* não é conhecido. Informações dessa natureza poderão subsidiar estudos bioquímicos e moleculares necessários para entender os mecanismos envolvidos na resistência. Assim, este trabalho teve como objetivos estudar o desenvolvimento de *P. psidii* em clones de *E. grandis* com diferentes graus de resistência e caracterizar ao microscópio de luz e transmissão as estruturas de infecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados clones de *E. grandis* suscetível (D_{UFV-1}) e resistente (D_{UFV-5}, D_{UFV-3} e D_{UFV-4}) e o isolado (I_{UFV-1}) de *P. psidii* mantidos no banco clonal e na micoteca do laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e adubadas a cada 15 dias com 20 g.L⁻¹ de fertilizante contendo N, P, K e micronutrientes. Mensalmente as plantas eram podadas, para induzir novas brotações.

Isolado I_{UFV-1}, monopustular de *P. psidii*, obtido de *E. grandis*-Itapetininga-SP foi multiplicado em folhas jovens de jambeiro e utilizado no preparo da suspensão aos 12 dias após a inoculação, conforme descrito por RUIZ et al. (1989).

2.1. Microscopia de luz

Folhas novas (primeira folha semi-expandida do galho apical) de plantas de eucalipto suscetíveis (D_{UFV-1}) e resistente (D_{UFV-4}, D_{UFV-3} e D_{UFV-5}), com resposta a *P. psidii* caracterizada na Tabela 1, foram inoculadas por atomização de uma suspensão concentrada a 10⁵ uredíniosporos/mL, para facilitar a análise do material sob microscópio.

As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro, sob escuro nas primeiras 24 horas (RUIZ et al., 1989) e posteriormente sob fotoperíodo de 12 horas e $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Após 48 e 96 horas, coletaram-se fragmentos retangulares de aproximadamente 1 x 0,5 cm das folhas inoculadas, que foram submetidos ao clareamento em cloral hidratado (5:2 v/v) durante cinco dias em ambiente de laboratório (LONGO et al., 1994). Os fragmentos clareados foram montados em lâminas contendo lactofenol e avaliados em microscópio de luz, utilizando-se a técnica de contraste de interferência diferencial de Normarski (BENCHIMOL, 1996). Avaliaram-se a presença e a forma de vesícula, o número de ramificação de hifas e o número de células-mãe do haustório (CMH) e de haustórios. As células do fungo em associação com células hospedeiras e com septo bem delimitado, porém sem formação de haustórios, foram quantificadas como células-mãe-do-haustório (CMH). Quantificaram-se os sítios de infecção associados a células hospedeiras com agregação de citoplasma e parede celular com maior refração. Essas manifestações foram consideradas alterações em resposta à presença do patógeno (Célula Alterada em Resposta à Presença do Patógeno - CARPP).

Tabela 1 - Reação de clones de *Eucalyptus grandis* a *Puccinia psidii* de acordo com a escala de notas de JUNGHANS et al. (2000)

Grau de severidade na escala	Clone	Reação
S0: Imunidade ou reação de hipersensibilidade (HR) ou “fleck”.	D _{UFV} -3 D _{UFV} -4	R-HR R-I
S1: Pústulas puntiformes, menores que 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias.	D _{UFV} -5	R-S1
S2: Pústulas medianas, variando de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias.	-----	S
S3: Pústulas grandes, maiores que 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 20 uredínias, podendo ocorrer em pecíolos e hastes.	D _{UFV} -1	S-S3

R-HR = hipersensibilidade; R-I = imunidade; R-S1 = resistência do tipo S1; S-S3 = suscetibilidade com resposta tipo S3.

Os tratamentos foram constituídos da combinação genótipo x período de coleta com três repetições, e uma planta/repetição. Avaliaram-se 20 sítios de infecção/repetição, totalizando 60 sítios/tratamento. Calcularam-se a média e os desvios-padrões dos eventos avaliados. O ensaio foi repetido, mas na primeira vez realizou-se apenas avaliação qualitativa.

2.2. Microscopia de luz e eletrônica de transmissão

Plantas dos genótipos D_{UFV-1}, D_{UFV-5}, D_{UFV-3} e D_{UFV-4} foram inoculadas (RUIZ et al., 1989). Fragmentos de 2 mm foram coletados 48, 96 e 144 horas após a inoculação (h.a.i.) em glutaraldeído 2,5%, em tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, pH 6,9. Estes fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5% por 12 horas temperatura de 4°C. Em seguida, foram lavados em tampão de cacodilato 0,05 M, pH 6,9, durante uma hora e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato, por quatro horas em geladeira (4°C). Os fragmentos foram lavados novamente no mesmo tampão, durante uma hora, desidratados em série alcoólica, infiltrados em resina Epoxi Spurr e polimerizados a 70°C. Os blocos foram submetidos a cortes de aproximadamente 0,5-1 µm de espessura com navalha de vidro, corados com azul-de-toluidina e observados ao microscópio de luz. Os cortes ultrafinos (90 nm) foram obtidos em ultramicrotomo, com navalha de diamante, e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. Em seguida, os cortes foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão e voltagem de aceleração de 80 KV (MATSUOKA e VANETTI, 1993).

3. RESULTADOS

Pontuações diminutas no limbo foliar foram observadas 48 h.a.i. nos clones resistentes D_{UFV-3} (R-HR); essas reações evoluíram e, a 96 h.a.i. os “flecks” visíveis foram caracterizados por lesões com descoloração de limbo e halo amarelado. Decorridas 144 h.a.i. estas lesões tornaram-se necróticas. Os clones D_{UFV-1} (S-S3) e D_{UFV-5} (R-S1) apresentaram pontuações diminutas e levemente salientes no limbo foliar a 48 h.a.i. Com a evolução da infecção a 96 h.a.i. observou-se uma expansão na lesão, e a 144 h.a.i. o clone D_{UFV-1} apresentava esporulação no limbo. No clone imune D_{UFV-4} (R-I) nenhuma reação foi observada no limbo foliar.

Acima de 70% dos sítios de infecção avaliados, em todos os clones, formaram vesícula 48 h.a.i. (Figuras 1 e 2). Esse percentual foi relativamente menor para o clone imune (D_{UFV-4}), que a 96 h.a.i. apresentava aproximadamente metade do número de vesículas observado em relação aos demais clones (Figura 1). As vesículas geralmente se desenvolviam imediatamente abaixo das células epidérmicas e eram predominantemente circulares e raramente alongadas. A partir das vesículas surgiam as hifas de infecção, e imediatamente após a formação da vesícula observou-se o desenvolvimento de um haustório na célula adjacente à vesícula. Nos clones

D_{UFV-1}, D_{UFV-5} e D_{UFV-3} não se observaram estruturas de pré-infecção e início de colonização.

O desenvolvimento da colônia, estimado pelo número de ramificação de hifas, foi similar nos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-5} e D_{UFV-3}, com média de duas ramificações/sítio em aproximadamente 60% dos sítios avaliados 48 h.a.i. A 96 h.a.i. esse número foi 40% superior no clone suscetível (D_{UFV-1}) em relação aos clones D_{UFV-5} e D_{UFV-3}. O número médio de hifas no clone suscetível foi de 14 hifas/sítio de infecção e aproximadamente 7 e 4 hifas/sítio nos clones resistentes D_{UFV-5} e D_{UFV-3}, respectivamente. No clone imune (D_{UFV-4}), o número de ramificações por sítio de infecção foi muito reduzido, sendo a avaliação dificultada pela alta incidência do número de células alteradas em resposta à presença do patógeno (CARPP) nos sítios avaliados.

Em aproximadamente 50% dos sítios de infecção dos clones resistentes com resistência parcial (D_{UFV-5}) e com resposta HR (D_{UFV-3}), pelo menos um haustório se estabeleceu a 48 h.a.i., ao passo que no clone D_{UFV-1} (S-S3) apenas 35% dos sítios possuíam haustórios, e no clone imune (D_{UFV-4}) o percentual ficou em torno de 14%. Os clones suscetíveis (D_{UFV-1}) e com resistência parcial (D_{UFV-5}) a *P. psidii* apresentaram 87 e 64% de sítios de infecção com haustórios, respectivamente (Figura 1). A 96 h.a.i., registraram-se aproximadamente quatro, sete e treze haustórios/sítio de infecção nos clones D_{UFV-3}, D_{UFV-5} e D_{UFV-1} respectivamente (Tabela 2). Não foi possível quantificar o número de haustórios/sítio em D_{UFV-4} em função da morte das células.

Tanto nos clones resistentes quanto no suscetível observou-se um adensamento de citoplasma nas células associadas ao desenvolvimento micelial do patógeno. Aproximadamente 15% dos sítios de infecção do clone suscetível (D_{UFV-1}) apresentaram esse adensamento de citoplasma. Em torno de 28% de células com essa reação foram observadas no clone D_{UFV-5} (R-S1), e nos clones com resposta de HR necrótico (D_{UFV-3}) e imunidade (D_{UFV-4}) observaram-se 50 e 81%, respectivamente, evoluindo nestes para 90 e 100% a 96 horas da inoculação.

Tabela 2 - Número médio de vesículas, células-mãe do haustório (CMH), haustórios e ramificação de hifas/sítio de infecção de *Puccinia psidii* nos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-3}, D_{UFV-4} e D_{UFV-5} de *E. grandis* 48 e 96 horas após a inoculação

Evento/tempo	Clones com reação de resistência diferenciada *			
	D _{UFV-1}	D _{UFV-5}	D _{UFV-3}	D _{UFV-4}
Vesícula				
48 h.a.i.	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,97 ± 0,04	1,00 ± 0,00
96 h.a.i.	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,30 ± 0,00
C.M.H.				
48 h.a.i.	1,25 ± 0,17	1,70 ± 0,27	1,27 ± 0,18	0,42 ± 0,56
96 h.a.i.	6,93 ± 0,74	4,57 ± 1,04	1,86 ± 1,24	0,00 ± 0,00
Haustório				
48 h.a.i.	1,76 ± 0,02	1,57 ± 0,44	1,04 ± 0,05	0,89 ± 0,59
96 h.a.i.	13,74 ± 2,31	6,80 ± 2,23	3,70 ± 2,46	0,00 ± 0,00
Nº de hifas				
48 h.a.i.	2,64 ± 0,09	2,37 ± 0,48	2,29 ± 0,47	0,67 ± 0,89
96 h.a.i.	14,21 ± 1,89	6,57 ± 2,66	4,11 ± 2,74	0,00 ± 0,00
CARPP				
48 h.a.i.	9,72 ± 1,28	10,40 ± 2,26	13,13 ± 3,24	> 30 Células
96 h.a.i.	19,18 ± 5,44	2,81 ± 0,80	3,88 ± 5,18	> 30 Células

*D_{UFV-1} – suscetível; D_{UFV-5} – resistência parcial; D_{UFV-4} – imunidade e D_{UFV-3} – hipersensibilidade.

Na avaliação de microscopia eletrônica de transmissão, o fungo não foi observado associado à célula hospedeira do clone D_{UFV-4} (R-I), provavelmente em razão das limitações da técnica de clareamento usada e do reduzido desenvolvimento do patógeno nesse genótipo. Entretanto, nos demais clones, foram constatadas alterações de células do fungo e da planta (Figura 3C e D) nos

cortes semifinos e ultrafinos obtidos. Essas alterações constituem estruturas de infecção de *P. psidii* ainda não relatadas para essa espécie.

Glóbulos lipídicos foram observados em hifas intercelulares e na célula-mãe do haustório (HMC). Esta célula foi caracterizada pela presença de um septo separando-a da hifa intercelular. Septos de hifas de infecção de *P. psidii* são perfurados e caracterizados pela presença de um poro central com um prolongamento da membrana citoplasmática em cada lado do poro (Figura 3B).

Nos sítios contendo CMH observou-se uma camada eletrodensa (Figura 4B) na superfície de contato com a célula hospedeira responsável pela adesão desta célula fúngica com o ponto de penetração do haustório. Uma hifa de infecção mais afilada origina-se da célula-mãe do haustório e atravessa a parede da célula hospedeira sem penetrar na plasmalema. Esta hifa dilata-se, formando o pescoço haustorial (Figura 6A). Na parte distal do pescoço, observou-se a banda do pescoço (Figura 6A), caracterizada por uma região de coloração mais densa. Associados ao pescoço, corpos eletrodensos foram encontrados (Figura 4A), os quais são transferidos para o haustório. Dois núcleos foram observados na célula-mãe do haustório (Figura 5B), porém estes não foram visualizados no haustório.

Os haustórios inicialmente são globosos e, aos 6 d.a.i., lobados e ramificados (Figura 5A). Intracelularmente, a hifa ramifica-se e associa-se intimamente com a plasmalema do hospedeiro. Na interface entre o citoplasma do hospedeiro e o haustório forma-se uma região delgada de baixa densidade eletrônica, denominada matriz extra-haustorial (Figura 6B). No clone D_{UFV-3} resistente (R-HR) observou-se desorganização celular no ponto de penetração (Figura 7A) e, posteriormente, o encapsulamento do haustório com material amorfo e eletrodense (Figura 7B) e a desagregação do conteúdo citoplasmático da célula hospedeira.

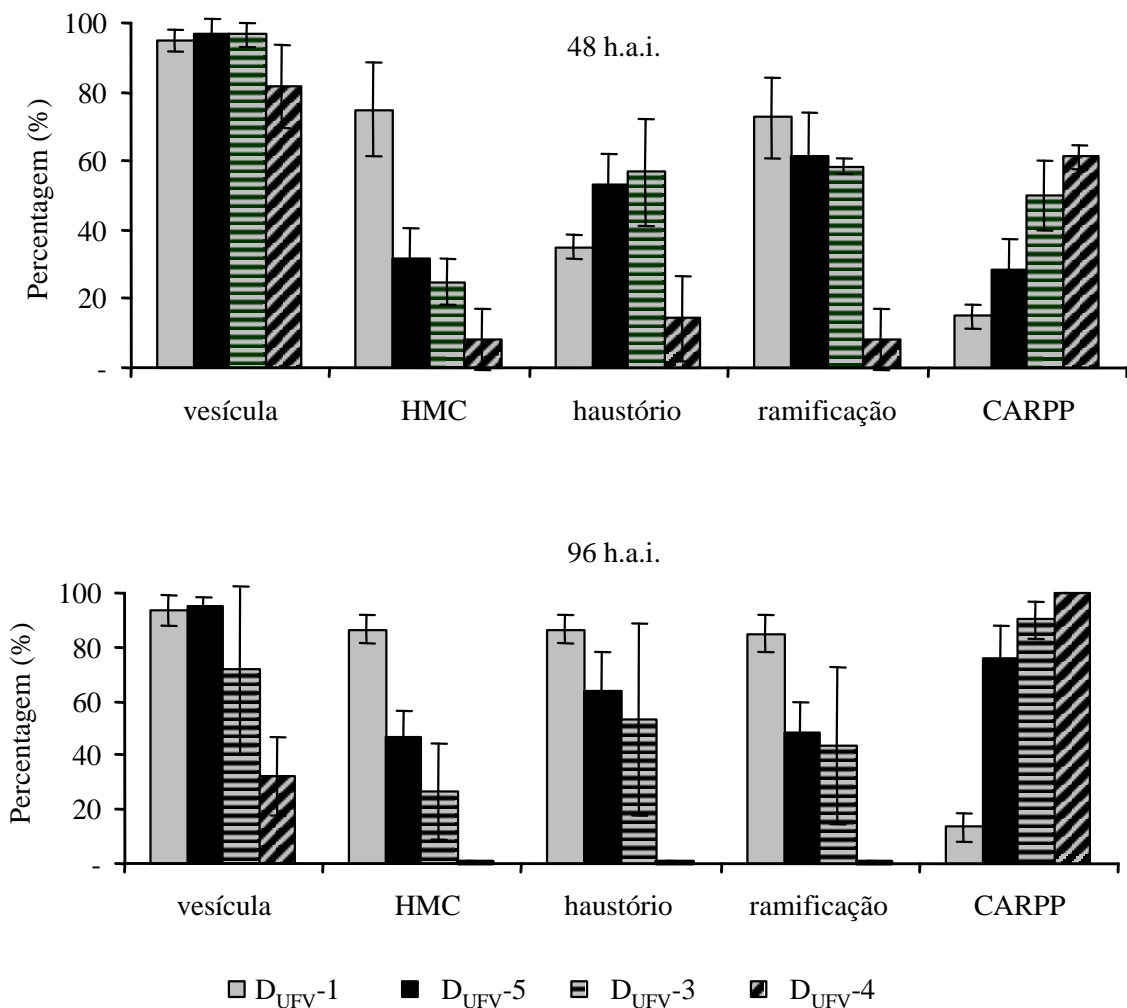


Figura 1 - Percentagem de sítios de infecção com formação de vesículas, células-mãe do haustório (HMC), haustórios, ramificação de hifas e células alteradas em resposta à presença do patógeno (CARPP) a 48 e 96 h.a.i., em quatro clones de *E. grandis* com diferentes graus de resistência a *Puccinia psidii*. (D_{UFV}-3, D_{UFV}-4 e D_{UFV}-5 – clones resistentes; e D_{UFV}-1 – clone suscetível).

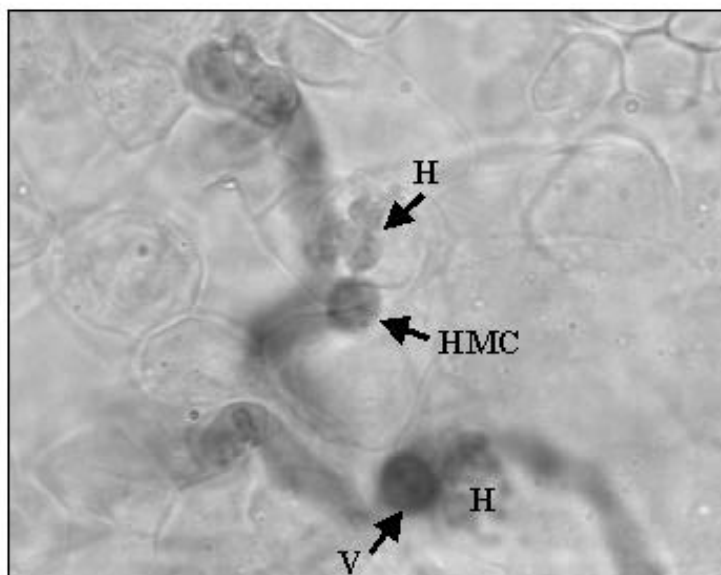


Figura 2 - Desenvolvimento de estruturas de infecção de *Puccinia psidii* em clone suscetível de *Eucalyptus grandis* sob microscopia de luz. Formação de micélio ramificado, vesícula (V), célula-mãe do haustório (HMC) e haustório lobado (H).

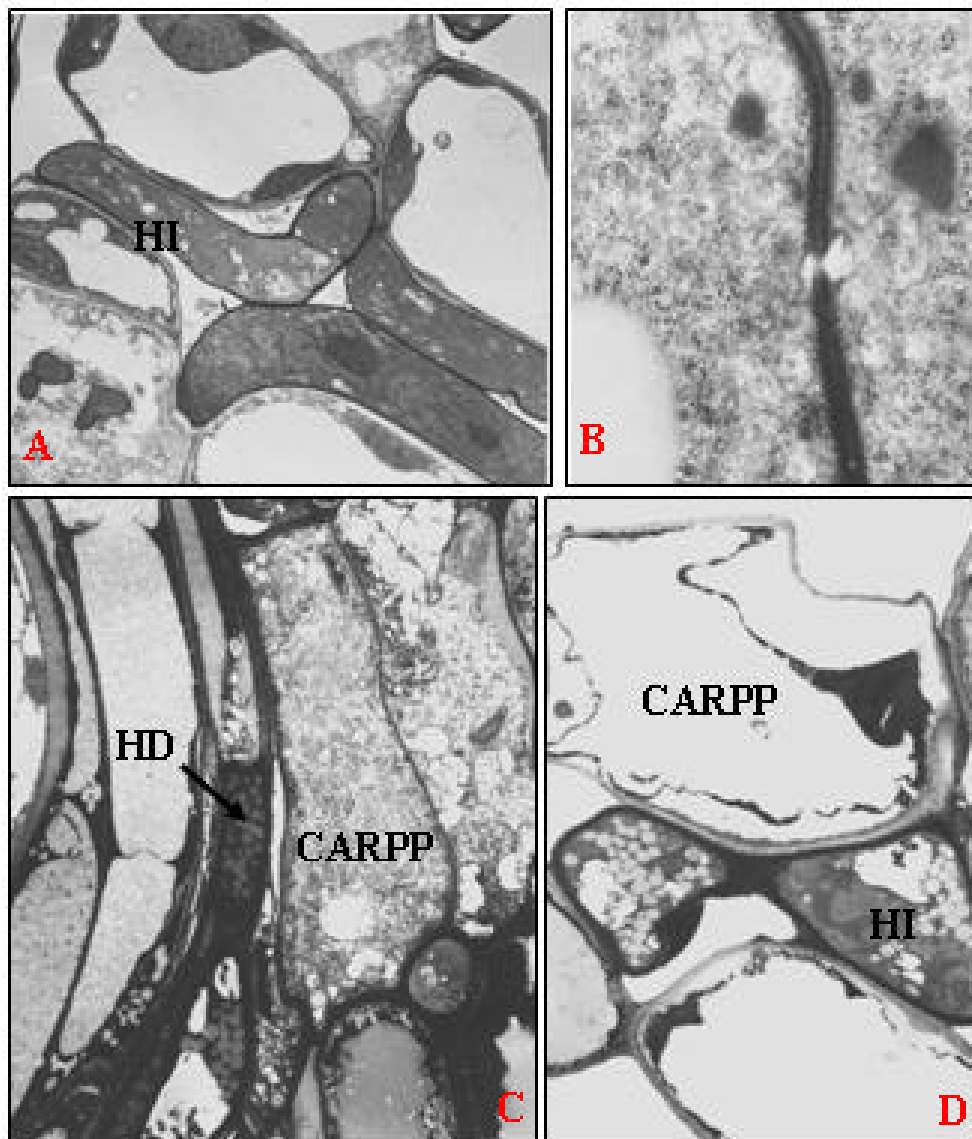


Figura 3 - Hifas intercelulares (HI) no clone D_{UFV-5} parcialmente resistente a 144 h.a.i. (A). Poro septal de hifa intercelular de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis* (A). Hifas intercelulares no clone D_{UFV-3} apresentando resposta de resistência do tipo HR com hifas totalmente degeneradas (HD) (C) e células alteradas em resposta à presença do patógeno (CARPP) (D). (A x 10.320; B e C x 963; D x 3370,5).

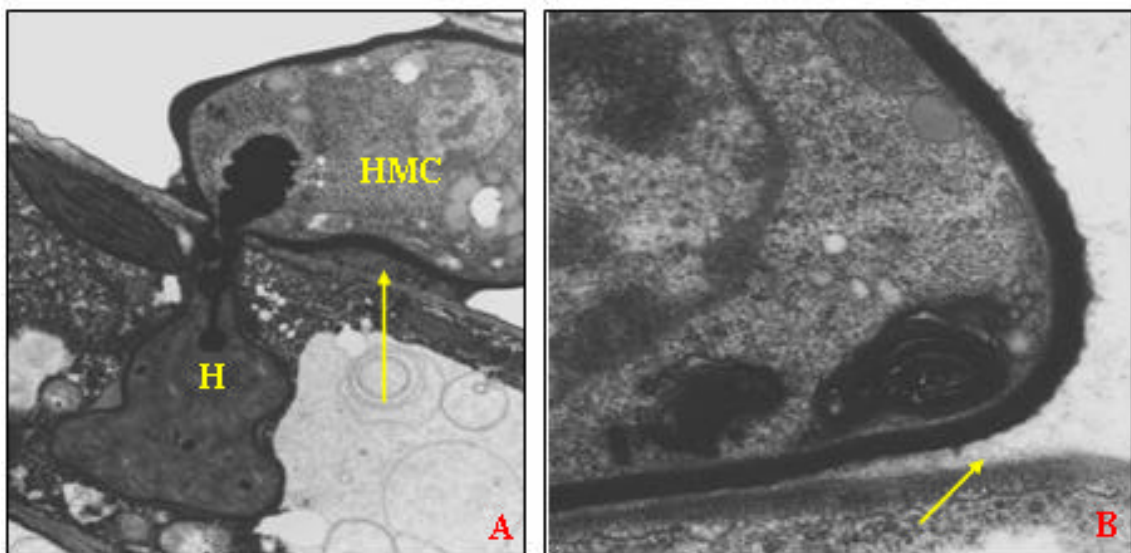


Figura 4 - Célula-mãe do haustório e haustório de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis*. Haustório em clone suscetível (H) (D_{UFV-1}) com presença de material amorfo no ponto de contato com a célula hospedeira (A) (x 75.600). Deposição de material eletrodense entre célula-mãe do haustório (HMC) com a célula hospedeira (B) (x 36.000).

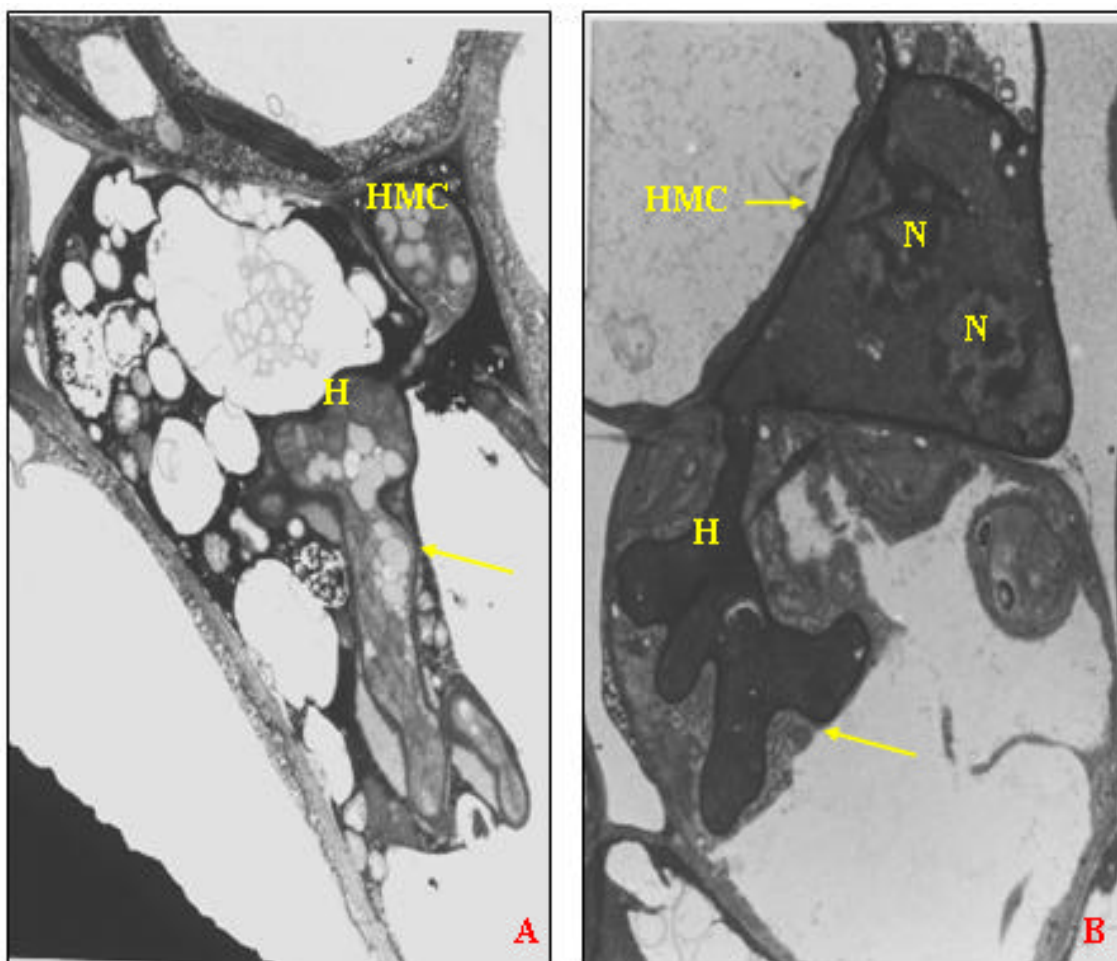


Figura 5 - Haustório tipicamente ramificado de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis*. Haustório formado em células hospedeiras do clone parcialmente resistente (D_{UFV-5}) (A) quando comparado ao clone suscetível (D_{UFV-1}) (B). HMC - célula-mãe do haustório; H - haustório; N - núcleo. (x 4.882,5).

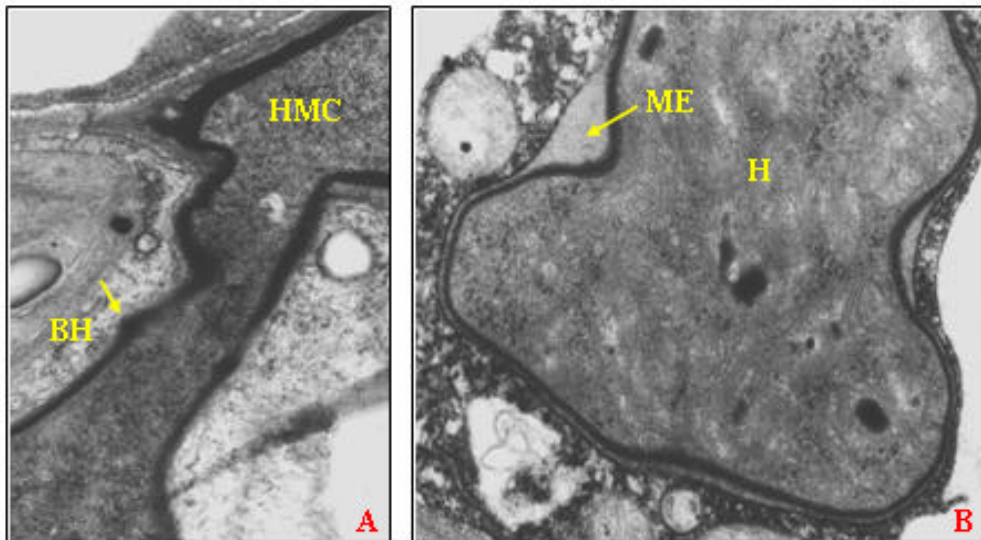


Figura 6 - Região do pescoço haustorial de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis* com formação de região eletrodensa na parte distal denominada banda do pescoço haustorial (A) (x 14.385). Detalhe da matriz extra-haustorial (M) (B) (x 21.000). HMC – célula-mãe do haustório; H – haustório; BH – banda do pescoço haustorial; ME – matriz extra-haustorial.

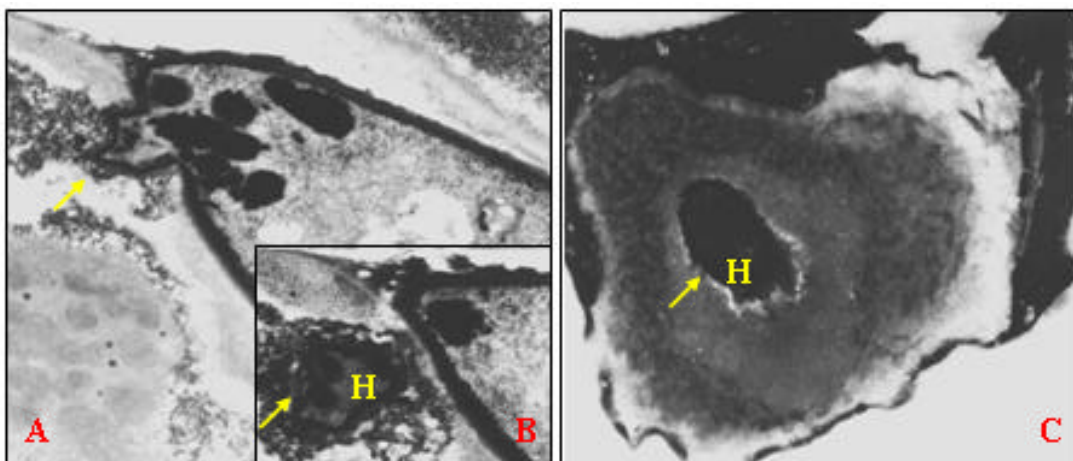


Figura 7 - Haustório em formação de *Puccinia psidii* no clone D_{UFV-3} de *Eucalyptus grandis* com resposta de resistência do tipo HR (x 14.595) (A), com presença de material eletrodense no tecido fúngico impedindo desenvolvimento normal do haustório (x14.595) (B). Haustório degenerado encapsulado com papila (x 14.385) (C).

4. DISCUSSÃO

A análise histológica em clones com diferentes níveis de resistência a *P. psidii* mostrou a redução do desenvolvimento do patógeno em diferentes fases do processo de infecção. Após a penetração, o fungo formou uma vesícula e iniciou a expansão de hifas de colonização. Estas hifas, em contato com células hospedeiras, diferenciavam-se, formando na sua extremidade a célula-mãe do haustório (CMH), a qual é separada da hifa por um septo. A CMH apresentou-se firmemente aderida à parede da célula hospedeira, como ocorre comumente em outras ferrugens (MATSUOKA e VANETTI, 1993; HEATH, 1997). No entanto, em nenhum dos cortes foi observado espessamento da parede interna da célula-mãe do haustório no ponto de contato com a célula hospedeira. Em outras ferrugens esse espessamento é comumente encontrado; a partir do centro deste espessamento é que normalmente se forma uma hifa de penetração. Este espessamento é típico da fase dicariótica de ferrugens, estando frequentemente ausente na fase monocariótica (HARDER e CHONG, 1991; CLASSEN et al., 2001; GRAY et al., 1982). Acredita-se que sua função esteja ligada à penetração na célula hospedeira (HARDER e CHONG, 1991). Após a formação da hifa de infecção na célula hospedeira com formação do haustório, na maioria dos casos lobados (RAJENDREN, 1972). A resistência foi associada a um menor estabelecimento de haustórios no tecido do hospedeiro, como previamente relatado em vários patossistemas (NIKS, 1983; NIKS e DEKENS, 1991; ORTELLI et al., 1996; NIKS e KUIPER, 1983).

A principal manifestação de incompatibilidade foi a agregação citoplasmática, bem como intensidade de brilho nas células afetadas e parede celular mais espessada nas células circunvizinhas à infecção pelo patógeno. Neste trabalho, optou-se por denominar tais células como células alteradas em resposta à presença do patógeno (CARPP), as quais ocorreram tanto no clone suscetível quanto nos resistentes, porém numa frequência muito maior nos clones resistentes com reação de hipersensibilidade e imunidade. Associada a essa manifestação histológica houve restrição do desenvolvimento fúngico, pela redução de todos os componentes avaliados (clone imune). Neste clone, a reação estabelecida pelas células impossibilitou a quantificação dos componentes a 96 h.a.i. Além disso, o número de CMH quantificado neste clone pode ser estar subestimado, uma vez que a visualização do septo que separa a célula-mãe do haustório e a hifa intercelular foi dificultada. Além disso, os haustórios formados foram diminutos e as células hospedeiras apresentavam-se com brilho maior, a parede celular exibiu espessamento posteriormente, entraram em colapso. Essa reação é característica de resposta hipersensível que resulta da interação gene-a-gene (FLOR, 1955). Com o desenvolvimento do haustório, o fungo associa-se à célula do hospedeiro, e essa adaptação confere ao fungo habilidade para nutrir-se da célula hospedeira sem danificá-la. Acredita-se que a resposta de resistência pós-haustorial dos clones resistentes (R-H e R-I), observada neste trabalho, seja em função do reconhecimento do produto gênico do fungo que se expressa durante esta fase, ativando genes no hospedeiro envolvidos na resistência, o que resulta na inibição do desenvolvimento do patógeno (KOBAYASHI, 1995; AGRIOS, 1997). A intensidade e o tempo de desenvolvimento desta resposta têm sido associados ao grau de resistência apresentado pela planta (LITTLEFIELD e ARONSON, 1969). Analisando esses dois aspectos da resposta de hipersensibilidade e comparando-os com os componentes histológicos e macroscópicos apresentados pelos clones D_{UFV-3} e D_{UFV-4}, evidenciaram-se dois diferentes padrões da expressão de resistência pós-haustorial. No clone com resistência do tipo imunidade (D_{UFV-4}) a resposta de resistência é desencadeada antes do processo de estabelecimento de hifas de colonização, e no clone com

resistência do tipo HR observou-se o estabelecimento de maior percentual de sítios com hifas e haustórios, bem como maior média desses eventos/sítio. A paralisação do crescimento fúngico após formação de um a três haustórios, observada neste trabalho, mostra uma diferença temporal na resposta de resistência durante o processo de patogênese, evidenciando diferenças na expressão da resistência. Esse tipo de reação foi observado 24 horas após a inoculação de uredíniosporos de *P. pisidii* em genótipo resistente de *E. grandis* e, macroscopicamente, foi constatado como HR 48 horas após a inoculação (XAVIER et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por ORTELLI et al. (1996) no patossistema *Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz-trigo, cujos cultivares utilizados possuíam o gene Lr9 de resistência.

O clone D_{UFV}-5 com resistência parcial mostrou redução de pelo menos metade do número médio dos componentes histológicos apresentados no clone suscetível. Essa redução pode explicar o estabelecimento de pústulas menores e menor esporulação, de acordo com a caracterização de severidade na escala de JUNGHANS et al. (2000). Resultados semelhantes foram obtidos por JACOBS et al. (2000), demonstrando que a resistência parcial de trigo a *P. recondita* Roberge ex Desmz. f.sp. *tritici* E. Henn.) de cevada a *Puccinia hordei* Otth., e em *Melampsora lini* (Ehrenb.) Lév. em linho está associada ao baixo desenvolvimento de haustório e à redução de crescimento do patógeno (LEE e SHANER, 1984; NIKS, 1986; KOWALSKA e NIKS, 1999).

Hipersensibilidade tem sido a resposta mais comumente observada em interações incompatíveis envolvendo ferrugens (LITTLEFIELD e HEATH, 1979; HEATH, 1997; HEATH, 1981). Todavia, associadas a essa resposta existem algumas formações estruturais em nível celular que podem ser formadas de modo a prevenir a formação de haustório (BUSHNELL, 1972), como papilas, halos, agregações citoplasmáticas, depósito de sílica e de materiais fibrilar na matriz extracelular, calose, materiais fenólicos na parede celular da planta e lignina (AIST, 1976; BUSHNELL, 1972). Ultra-estruturalmente, observou-se a deposição de material eletrodense no ponto de penetração da célula hospedeira do clone com resposta de HR-necrótico, o que confirma as observações

microscópicas e posteriormente o encapsulamento de haustório, tornando-o não-funcional. A velocidade de formação da papila foi considerada por MATSUOKA e VANETTI (1993) um fator importante na determinação da resistência. Os autores observaram que a papila era formada antes ou durante a fase de penetração, impedindo a formação do corpo haustorial; quando este se desenvolvia, era encapsulado e a célula hospedeira era degenerada. No entanto, essas respostas podem variar consideravelmente, dependendo do nível de resistência do hospedeiro. Em feijão infectado por *Uromyces phaseoli* var. *vignae* ocorre a formação de papila tanto em hospedeiro resistente quanto em planta não-hospedeiras, e em plantas suscetíveis nunca formam papila após a penetração e colonização do patógeno (EHRlich e EHRlich, 1971).

A quantificação dos componentes histológicos foi exclusivamente baseada nas avaliações de clareamento, em razão do maior número de sítio de infecção/área que a técnica permite avaliar. Comparativamente, a área utilizada para obtenção dos cortes histológicos é relativamente menor, e a obtenção de cortes, extremamente difícil. Entretanto, as duas técnicas forneceram informações que se complementaram, confirmando a hipótese de que em materiais com resposta de resistência imune a expressão da resistência ocorre numa fase inicial da patogênese e, nos materiais com respostas de resistência do tipo HR-necrótico e parcial, o desencadeamento da resistência ocorre numa fase mais adiantada da patogênese. Nos três clones resistentes avaliados, a resposta de resistência foi tipicamente pós-haustorial, porém a resistência foi expressa em diferentes períodos do desenvolvimento do processo de infecção.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Puccinia psidii* EM CLONES DE *Eucalyptus grandis* E ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do eucalipto, também conhecida como ferrugem das mirtáceas, é causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter. Além do eucalipto, esse fungo infecta a maioria das espécies de plantas da família Myrtaceae, como goiabeira, jambeiro, jabuticabeira, pitangueira e jamelãozeiro, entre outras (ALFENAS, 1989; VIEGAS, 1961). A doença foi descrita pela primeira vez no Brasil por Winter em *Psidium pomiferum* L (COUTINHO et al., 1998). A primeira descrição do fungo em eucalipto foi feita por Joffily (1944) em mudas de *Eucalyptus citriodora* no Estado do Rio de Janeiro (FERREIRA, 1989). Na Austrália, centro de origem do eucalipto, e em outros países que cultivam o eucalipto, onde não ocorre a ferrugem, *P. psidii* tem sido considerada uma ameaça para a cultura (COUTINHO et al., 1998).

No Brasil, com a expansão da área plantada na década de 70 e com a utilização de jardins clonais para produção de mudas (ALFENAS et al., 1989) a partir dos anos 80, a ferrugem tornou-se uma das doenças de maior importância para a cultura do eucalipto. No campo, o controle da doença tem sido feito mediante o uso de materiais resistentes. Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos e citológicos da resistência no patossistema *P. psidii*-*Eucalyptus*. Recentemente, estudos sobre a genética da resistência de eucalipto a *P. psidii* demonstraram que a resistência do clone G-21 de *E. grandis* segue o modelo de herança mendeliana, sendo determinada por gene de efeito principal *Ppr1* (JUNGHANS, 2000).

A pressão de seleção pela utilização de clones com resistência monogênica em grandes povoamentos pode favorecer o surgimento de raças fisiológicas. No campo, sob condições favoráveis a infecção alguns clones tem se comportado como resistente em uma região e suscetível em outra. Além disso, clones que apresentam reação de resistência, sob condições controladas, têm se comportado como suscetíveis no campo (A. Alfenas, informação pessoal), o que sugere a existência de variabilidade quanto à virulência em *P. psidii*.

Estudos de variabilidade de *P. psidii* realizados por diversos autores, por meio de inoculações cruzadas, entre espécies de Myrtaceae têm mostrado que os isolados oriundos de diversas plantas hospedeiras são virulentos a eucalipto e jambeiro. No entanto, há alguns relatos de reação incompatível em jambeiro (CASTRO et al., 1983; FERREIRA, 1983). Os isolados oriundos de eucalipto e jambeiro têm mostrado comportamento variável em goiabeira, e todos os isolados de goiabeira têm sido virulentos ao hospedeiro de origem (CASTRO, 1983; COELHO, 1988; FERREIRA, 1983; APARECIDO, 2001). Considerando que *P. psidii* é um patógeno biotrófico de ampla distribuição geográfica, capaz de infectar diferentes espécies de Myrtaceae, é possível que genes de virulência a hospedeiros específicos tenham sido selecionados dentro da população do fungo. Apenas um estudo foi realizado por CASTRO et al. (1985) para avaliar a virulência de isolados de *P. psidii* em seis clones de *E. grandis*. Os autores evidenciaram diferenças na quantidade de doença, sem constatar respostas

diferenciais que sugerissem a existência de raças fisiológicas. Esses trabalhos subsidiam a hipótese de existência de especialização fisiológica em *P. psidii*.

O conhecimento de variabilidade fisiológica e estabilidade genética na população de *P. psidii* é fundamental para embasar os programas de melhoramento do eucalipto e avaliar a estabilidade da resistência. Assim, neste trabalho objetivou-se avaliar a virulência de isolados de *P. psidii* obtidos de diferentes hospedeiras e regiões a clones de eucalipto e em seis hospedeiras diferentes da família Myrtaceae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e condução do material vegetal

Utilizaram-se quatro clones (D_{UFV}-1, D_{UFV}-2, D_{UFV}-3 e D_{UFV}-4) das Empresas Aracruz Celulose S.A. e quatro clones (D_{UFV}-5, D_{UFV}-6, D_{UFV}-7 e D_{UFV}-8) da Suzano Bahia Sul Celulose S.A., os quais foram estabelecidos em um banco de clones do laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

No ensaio de gama de plantas hospedeiras, foram utilizadas plantas do clone D_{UFV}-6 de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill), de goiabeira var. Paloma (*Psidium guajava* L), de jabuticabeira (*Myrciaria jaboticaba* Berg.), de pitangueira (*Eugenia uniflora* Berg.) e de jambeiro (*Syzygium jambos* L.). As mudas de goiabeira var. Paluma e de jambeiro utilizadas foram multiplicadas por estaquia, e as de jabuticabeira e pitangueira foram propagadas por sementes, obtidas no Departamento de Fruticultura da UFV e no viveiro do Instituto de Estadual de Florestas (IEF).

As plantas utilizadas nas inoculações foram cultivadas em vasos contendo uma mistura de solo e esterco (3:1), previamente esterilizado, e mantidas em casa de vegetação. Periodicamente, as mudas foram podadas, com

objetivo de induzir brotações jovens, e adubadas a cada 15 dias com 20 g/L de adubo Ouro Verde (N, P, K e micronutrientes).

2.2. Coleta, isolamento, manutenção dos isolados e produção de inóculo

Urediniosporos de *P. psidii* foram coletados de várias espécies de hospedeiras, com infecção natural, em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). Em laboratório, os urediniosporos foram transferidos, a seco, para folhas jovens (primeira ou segunda) de jambeiro e, sempre que possível, para a planta de origem, com auxílio de pincel de cerdas macias. O jambeiro foi a multiplicadora utilizada, em razão da sua suscetibilidade a *P. psidii* (FERREIRA, 1989). Os isolados que induziram lesões necróticas e pústulas puntiformes em jambeiro foram mantidos e multiplicados na hospedeira de origem.

Alguns isolados obtidos de goiabeira silvestre foram perdidos na fase inicial de inoculações, por terem sido avirulentos a jambeiro e à variedade Paluma de goiabeira. Assim, os novos isolados coletados foram inoculados no jambeiro e nas variedades Paluma, Kumagai, Ogawa e Pirassununga Vermelha; quando o inóculo não era suficiente, somente no jambeiro e na variedade Paluma.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas, no escuro e em câmara de nevoeiro a 25°C (RUIZ et al., 1989) e, em seguida, transferidas para casa de vegetação e mantidas em compartimentos individualizados. Os urediniosporos obtidos da primeira inoculação foram reinoculados nos respectivos hospedeiros e, aos 12 dias desta segunda inoculação, coletados e transferidos para tubos Eppendorff e armazenados a - 20°C. Nessas condições, permaneceram viáveis por no mínimo três meses. Antes do uso, os urediniosporos foram novamente multiplicados nos respectivos hospedeiros e coletados aos 12 dias após a inoculação. Os isolados de eucalipto e jabuticabeira foram multiplicados em jambeiro, com exceção do isolado E_{UFV}-6, que, inicialmente, não esporulou nesse hospedeiro.

Tabela 1 - Relação de isolados, hospedeiras de origem e local de coleta de 34 isolados de *P. psidii* obtidos de diferentes hospedeiras em diversas regiões do Brasil

Isolado	Hospedeira de origem (Nome Comum)	Hospedeira de origem (Nome Científico)	Local de Coleta	Coletor
E _{UFV} -01	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Suzano – SP	Davi Junghans
E _{UFV} -02	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Guaíba – RS	Acelino C. Alfenas
E _{UFV} -03	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Guaíba – RS	Acelino C. Alfenas
E _{UFV} -04	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Aracruz – RS	Rivalvalve G.Coelho
E _{UFV} -05	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Foz do Iguaçu – PR	Acelino C. Alfenas
E _{UFV} -06	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Aracruz – ES	Acelino C. Alfenas
E _{UFV} -07	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Guanhães – MG	Adelica A. Xavier
E _{UFV} -08	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Ipatinga – MG	Adelica A. Xavier
E _{UFV} -09	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Ipatinga – MG	Adelica A. Xavier
E _{UFV} -10	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Ipatinga – MG	Adelica A. Xavier
E _{UFV} -11	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Ipatinga – MG	Adelica A. Xavier
E _{UFV} -12	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Aracruz – ES	Acelino C. Alfenas
E _{UFV} -13	Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i>	Curvelo – MG	-
J _{UFV} -01	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Viçosa – MG	Adelica A. Xavier
J _{UFV} -02	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Guaíba – RS	Acelino C. Alfenas
J _{UFV} -03	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Porto Alegre – RS	Acelino C. Alfenas
J _{UFV} -04	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Viçosa – MG	Débora T. do Amaral
J _{UFV} -05	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Mogi Guaçu – SP	Acelino C. Alfenas
J _{UFV} -06	Jambeiro	<i>Syzygium jambos</i>	Brasília – DF	Acelino C. Alfenas
G _{UFV} -01	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Luís Antônio – SP	Davi Junghans
G _{UFV} -02	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Lavras – MG	Alessandra J. Boari
G _{UFV} -03	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Foz do Iguaçu - PR	Acelino C. Alfenas
G _{UFV} -04	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Sta Maria do Jetibá - RS	Ricardo T. Casa
G _{UFV} -05	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Passo Fundo – RS	Ricardo Trezzi Casa
G _{UFV} -06	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Tijucas – SC	Ailton Reis
G _{UFV} -07	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Eunápolis – BA	Edval Zauza
G _{UFV} -08	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Tijucas – SC	Ailton Reis
G _{UFV} -09	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Belo Oriente – MG	Adelica A. Xavier
G _{UFV} -10	Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	Macaé – RJ	Adelica A. Xavier
A _{UFV} -01	Araçazeiro	<i>Eugenia stipitata</i>	Manaus – AM	Acelino C. Alfenas
C _{UFV} -01	Cerejeira	<i>Eugenia involucrata</i>	Porto Alegre – RS	Acelino C. Alfenas
C _{UFV} -02	Cerejeira	<i>Eugenia involucrata</i>	Niteroi - RJ	Bernardo A. H. Vieira
P _{UFV} -01	Pitangueira	<i>Eugenia uniflora</i>	Viçosa – MG	Adelica A. Xavier
Jb _{UFV} -01	Jaboticabeira	<i>Myrciaria jaboticaba</i>	Tijucas - SC	Ailton Reis

Aos 12 dias após a inoculação, uredíniosporos de *P. psidii* foram coletados das folhas da planta multiplicadora, com o auxílio de pincel de cerdas macias, transferidos para tubo de ensaio contendo água + Tween 80 a 0,05% e homogeneizados em agitador magnético tipo Vortex por cinco minutos.

2.3. Inoculação dos clones de eucalipto

As duas primeiras folhas jovens de galhos terminais de cada planta foram marcadas e, em seguida, inoculadas com suspensão a 2×10^4 uredíniosporos/mL, mediante uso de um atomizador De Vilbs (n.15) acionado por compressor elétrico a 7 kgf/cm^2 de pressão. As plantas inoculadas foram mantidas no escuro, em câmara de nevoeiro, por 24 horas, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e em seguida transferidas para câmara de crescimento.

A avaliação foi realizada aos 12 d.a.i., utilizando a escala de notas de severidade da doença conforme JUNGHANS et al. (2000) (Tabela 2). Os resultados foram transformados em dados binomiais, em que a nota 0 representa a ausência total de esporulação e a nota 1, presença de esporulação. Foram consideradas raças os isolados que diferiram em virulência nos clones de *Eucalyptus* utilizados. As notas de severidade de doença foram usadas para avaliar a agressividade dos isolados. Consideraram-se agressivos aqueles isolados que provocaram maior severidade (níveis S2 e S3) nos genótipos avaliados (VANDERPLANK, 1968).

2.4. Inoculação das plantas hospedeiras

Folhas jovens de plantas de eucalipto (clone D_{UFV-6}), goiabeira, jabuticabeira, jambeiro e pitangueira foram selecionadas, marcadas e, posteriormente, inoculadas por pincelamento com diferentes isolados de *P. psidii*. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro

Tabela 2 - Escala de severidade de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis* de acordo com JUNGHANS et al. (2000)

Grau de severidade	Tipo de reação da planta hospedeira
S0: Imunidade ou reação de hipersensibilidade (HR) com necrose ou “fleck”.	R
S1: Pústulas puntiformes, menores que 0,8 mm de diâmetro, com uma ou duas uredínias.	R
S2: Pústulas medianas, variando de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro, com aproximadamente 12 uredínias.	S
S3: Pústulas grandes, maiores que 1,6 mm de diâmetro, com 20 ou mais uredínias, podendo ocorrer em pecíolos e hastes.	S

por 24 horas, no escuro, a 25°C (RUIZ et al., 1989), e em seguida transferidas para câmara de crescimento a 22 ± 1°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 36 μmol.m⁻².s⁻¹, sob luz fluorescente. Aos 12 d.a.i avaliou-se a virulência dos isolados. Foi considerado virulento o isolado com habilidade de causar doença nas plantas (SHURTLEFF e AVERRE III, 1997).

Alguns isolados de goiabeira que durante a fase de multiplicação mostraram reações diferenciadas nas variedades utilizadas foram, após a multiplicação no hospedeiro multiplicador, reinoculados nas variedades Paluma, Ogawa e Kumagai. As condições de inoculação e incubação foram as mesmas descritas anteriormente.

Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, em que cada tratamento se constitui da combinação hospedeiro x isolado. Cada tratamento constou de três repetições, sendo cada repetição representada por uma planta. O ensaio foi repetido duas vezes no tempo.

3. RESULTADOS

Pelo menos três respostas diferenciais foram observadas (Tabela 3). A maioria dos isolados testados foi virulenta aos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-5}, D_{UFV-6}, D_{UFV-7} e D_{UFV-8} e avirulenta a D_{UFV-3}, D_{UFV-2} e D_{UFV-4}; estes isolados foram designados como raça 1. O isolado G_{UFV-07} induziu reação S1 no clone D_{UFV-2}, que para os demais isolados apresenta reação (S0) tipo “Fleck”; este isolado foi denominado raça 2. O isolado E_{UFV-6} foi virulento ao clone D_{UFV-3}, o qual apresentava reação de hipersensibilidade para os demais isolados, e foi denominado raça 3. Diante desses resultados, é evidente a capacidade dos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-2} e D_{UFV-3} de diferenciação de isolados de *P. psidii* dentro da população, podendo constituir uma diferenciadora para raças em eucalipto.

A agressividade dos isolados, avaliada pela severidade da doença nas interações compatíveis, foi muito variável (Tabela 4). Nos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-6} e D_{UFV-7} obteve-se resposta de severidade entre S2 e S3 para mais de 50% dos isolados oriundos de eucalipto. Resposta similar foi observada no clone D_{UFV-7} tanto para os isolados de *P. psidii* originário de goiabeira quanto para os de jameiro, e acima de 80% dos isolados desenvolveram pouca doença no clone D_{UFV-5}, apresentando severidade na classe S1. O clone D_{UFV-1} foi o mais suscetível aos 21 isolados testados. Acima de 85% dos isolados induziram reação

Tabela 3 - Virulência de 21 isolados de *Puccinia psidii* obtidos de diversos hospedeiras em várias regiões do Brasil, em oito clones de *Eucalyptus grandis*

Isolado	Clones diferenciadores								Raças
	D _{UFV-1}	D _{UFV-2}	D _{UFV-3}	D _{UFV-4}	D _{UFV-5}	D _{UFV-6}	D _{UFV-7}	D _{UFV-8}	
E _{UFV-01}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-02}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-03}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-04}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-05}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-06}	1	0	1	0	1	1	1	1	3
E _{UFV-08}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-09}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-10}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-11}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
E _{UFV-13}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
G _{UFV-01}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
G _{UFV-02}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
G _{UFV-04}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
G _{UFV-07}	1	1	0	0	1	1	1	1	2
G _{UFV-08}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
J _{UFV-03}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
J _{UFV-05}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
J _{UFV-06}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
C _{UFV-01}	1	0	0	0	1	1	1	1	1
C _{UFV-02}	1	0	0	0	1	1	1	1	1

0 = interação incompatível; 1 = interação compatível.

Tabela 4 - Severidade de doença obtida nas inoculações de 21 isolados de *Puccinia psidii* oriundos de diversas hospedeiras em várias regiões do Brasil, em oito clones de *Eucalyptus grandis*

Isolado	Clones							
	D _{UFV-1}	D _{UFV-2}	D _{UFV-3}	D _{UFV-4}	D _{UFV-5}	D _{UFV-6}	D _{UFV-7}	D _{UFV-8}
E _{UFV-1}	S2	I	HR	I	S1	S3	S3	S2
E _{UFV-02}	S3	F	S3	I	S1	S2	S2	S2
E _{UFV-03}	S2	I	HR	I	S1	S2	S2	S1
E _{UFV-04}	S3	I	HR	I	S1	S3	S3	S2
E _{UFV-05}	S2	I	HR	I	S2	S2	S1	S2
E _{UFV-06}	S3	F	S3	I	S1	S2	S2	S3
E _{UFV-08}	S3	F	HR	I	S1	S3	S2	S3
E _{UFV-09}	S3	I	HR	F	S2	S2	S3	S3
E _{UFV-10}	S2	F	HR	I	S1	S3	S3	S2
E _{UFV-11}	S2	I	HR	F	S1	S3	S3	S3
E _{UFV-13}	S3	I	HR	I	S1	S3	S3	S2
G _{UFV-01}	S3	F	HR	HR	S2	S3	S3	S3
G _{UFV-02}	S1	I	HR	F	S1	S3	S2	S2
G _{UFV-04}	S1	I	HR	F	S1	S3	S3	S1
G _{UFV-07}	S3	I	HR	I	S1	S3	S3	S2
G _{UFV-08}	S3	S1	HR	HR	S1	S3	S3	S3
J _{UFV-03}	S3	I	HR	F	S1	S3	S3	S2
J _{UFV-05}	S2	F	HR	I	S1	S3	S3	S2
J _{UFV-06}	S2	I	HR	I	S1	S2	S3	S2
C _{UFV-01}	S1	I	HR	F	S1	S3	S2	S1
C _{UFV-02}	S1	I	HR	I	S1	S1	S1	S1

I- reação imune; HR- hipersensibilidade; F- “fleck”.

de suscetibilidade, nos graus entre S2 e S3, na escala de JUNGHANS et al. (2000).

A coexistência de raças no mesmo local foi evidenciada para E_{UFV}-4 (raça 1) oriundo do clone D_{UFV}-1, que foi obtido do mesmo local de coleta de E_{UFV}-6 (raça 3) infectando o clone D_{UFV}-3 (Tabelas 1 e 3). Essas clones estão plantados lado a lado no campo. A inoculação de E_{UFV}-4 e E_{UFV}-6 no clone diferenciador D_{UFV}-3 apresentou resposta de resistência completa e S3, respectivamente. As reações desses isolados no clone D_{UFV}-1 foram classificadas como S2 para E_{UFV}-4 e S3 para E_{UFV}-6, mostrando que as duas raças - 1 e 3 - ocorriam naquela região concomitantemente.

Com relação às inoculações na gama de hospedeiras, todos os isolados testados foram virulentos ao clone D_{UFV}-6 de *E. grandis*, mas variaram quanto à virulência às demais espécies inoculadas. Dentre os 32 isolados testados, 28 foram virulentos ao jambeiro, 26 à jabuticabeira e apenas 10 à goiabeira (Tabela 5). O isolado originário da pitangueira foi avirulento apenas à goiabeira. Por outro lado, pitangueira só foi compatível ao isolado desta espécie. Somente 50% dos isolados de goiabeira infectaram a variedade Paluma de goiabeira (Tabela 5).

Acima de 50% dos isolados, de cada origem testada, foram virulentos a pelo menos três espécies distintas, mostrando que a maioria dos isolados de *P. psidii* multiplica-se em outra hospedeira que não a de origem.

Os isolados diferenciados como raças E_{UFV}-6 e G_{UFV}-7, bem como os isolados de goiabeira G_{UFV}-2 e G_{UFV}-6, quando inoculados em jambeiro pela primeira vez induziram inicialmente reação de hipersensibilidade do tipo lesão necrótica, mas de 20 a 25 d.a.i. apresentaram pústulas puntiformes (pouco esporulantes). A reinoculação desses uredíniosporos no jambeiro resultou em infecções com esporulação mais abundantes. Entretanto, nas reinoculações utilizando uredíniosporos das hospedeiras de origem, o jambeiro apresentou a mesma reação. Para o isolado G_{UFV}-7, os uredíniosporos produzidos no jambeiro, após várias reinoculações, foram inoculados no hospedeiro de origem (goiabeira

Tabela 5 - Virulência de 32 isolados de *Puccinia psidii* obtidos de diferentes hospedeiras em diversas regiões do Brasil, em cinco hospedeiras da família das mirtáceas

Isolado	Hospedeira de origem	Hospedeiras inoculadas				
		Eucalipto	Goiaba	Jambo	Jaboticaba	Pitanga
E _{UFV} -01	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -02	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -03	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -04	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -05	Eucalipto	1	0	1	0	0
E _{UFV} -06	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -07	Eucalipto	1	0	1	0	0
E _{UFV} -08	Eucalipto	1	0	1	1	---
E _{UFV} -09	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -10	Eucalipto	1	1	1	1	0
E _{UFV} -11	Eucalipto	1	1	1	1	0
E _{UFV} -12	Eucalipto	1	0	1	1	0
E _{UFV} -13	Eucalipto	1	1	1	1	0
J _{UFV} -01	Jambeiro	1	1	1	0	0
J _{UFV} -02	Jambeiro	1	0	1	1	0
J _{UFV} -03	Jambeiro	1	0	1	0	0
J _{UFV} -04	Jambeiro	1	0	1	1	0
J _{UFV} -05	Jambeiro	1	0	1	1	---
G _{UFV} -01	Goiaba	1	0	1	0	---
G _{UFV} -02	Goiaba	1	1	1	1	0
G _{UFV} -03	Goiaba	1	1	1	1	---
G _{UFV} -04	Goiaba	1	0	1	1	---
G _{UFV} -05	Goiaba	1	1	1	1	---
G _{UFV} -06	Goiaba	1	1	1	1	0
G _{UFV} -07	Goiaba	1	0	1	1	0
G _{UFV} -08	Goiaba	1	0	1	1	0
G _{UFV} -09	Goiaba	1	1	1	1	0
G _{UFV} -10	Goiaba	1	0	1	1	0
A _{UFV} -01	Araça	1	1	1	1	0
C _{UFV} -01	Cereja	1	1	1	0	---
P _{UFV} -01	Pitanga	1	0	1	1	1
Jb _{UFV} -01	Jaboticaba	1	0	1	1	0

0= isolados avirulentos; 1= isolados virulentos.

var. Paluma) e observou-se esporulação no mesmo padrão quando se inoculou uredíniosporos oriundos desta hospedeira.

A inoculação dos isolados G_{UFV}-01, G_{UFV}-04, G_{UFV}-05 e G_{UFV}-10 nas variedades Ogawa, Kumagai e Paluma apresentou respostas diferenciais. Os isolados G_{UFV}-01, G_{UFV}-04 e G_{UFV}-10 foram virulentos à variedade Paluma, e o isolado G_{UFV}-05, avirulento. Na variedade Ogawa, os isolados G_{UFV}-04 e G_{UFV}-10 foram virulentos, e G_{UFV}-05 e G_{UFV}-01 avirulentos; todos os isolados testados em Kumagai foram virulentos. Além dessas variações qualitativas, esses isolados variaram quanto à intensidade de esporulação, porém isso não foi quantificado.

4. DISCUSSÃO

O reconhecimento de raças é baseado na resposta diferencial de hospedeiros com diferentes fontes de resistência qualitativa conhecida (CATEN, 1987; BRIGGS e JOHAL, 1994). Com base nessa reação, pelo menos três raças foram definidas neste trabalho. Em interações envolvendo fungos biotróficos, a associação entre patógeno e hospedeiro possui alto grau de especialização, e a reação de resistência é resultado da interação de produtos gênicos entre hospedeiro e patógeno; a maioria dessas interações segue a relação gene-a-gene (FLOR, 1955). Entretanto, em alguns casos, mais de um gene de resistência e avirulência podem estar envolvidos no reconhecimento de um isolado específico (AGRIOS, 1997) e, conseqüentemente, na reação diferencial. Em muitos patossistemas a série diferenciadora é geneticamente bem definida (MARTENS et al., 1979; LEFEVRE et al., 1998; KOLMER, 1999), porém em alguns sistemas florestais as tentativas de se estudar a variabilidade intra-específica tem sido feitas utilizando reação de materiais genéticos de uma mesma espécie e, muitas vezes, o gene envolvido nesta reação não é determinado (PEI et al., 1996; RAMSTEDT, 1999; EDWARDS et al., 1999).

Em eucalipto, os clones utilizados não possuem genes de resistência definidos, e as reações de compatibilidade eram conhecidas somente para D_{UFV-1} a D_{UFV-4} com base em inoculações anteriores com E_{UFV-1} (ALFENAS et al.,

1997). Os demais foram fornecidos como resistentes (D_{UFV-5} e D_{UFV-8}) e suscetíveis (D_{UFV-6} e D_{UFV-7}), com base em observações de campo. Os clones D_{UFV-1} , D_{UFV-2} e D_{UFV-3} foram capazes de diferenciar as variantes entre os isolados testados; assim, propõe-se a manutenção destes como diferenciadores das raças 1, 2 e 3 de *P. psidii*; no futuro se uma série diferencial baseada em um único gene de resistência for estabelecida, possivelmente mais raças serão encontrados. A diferença no grau de virulência de *P. psidii* observada nos clones inoculados reflete a variabilidade deste patógeno a que os clones de eucalipto no campo estão expostos; essa variabilidade também foi observada no trabalho de CASTRO et al. (1983). É possível que essas raças possuam vários genes de virulência, pois, segundo GROTH e ROELFS (1989), o desenvolvimento de raças com múltiplos genes de virulência parece ser derivado do desenvolvimento do fungo sob condição de pressão de seleção, constituído principalmente pela resistência do hospedeiro. Em eucalipto, o plantio de povoamentos utilizando clones com resistência a *P. psidii* constitui-se numa pressão de seleção. Entretanto, essa hipótese pode ser contestada, pois a ampla gama de hospedeiras de *P. psidii* poderia contribuir para reduzir a pressão de seleção dentro da população do patógeno (FERREIRA, 1989; FERREIRA, 1883). Por outro lado, isolados mais adaptados fisiologicamente, principalmente ao eucalipto e à goiabeira, podem ocorrer no campo e dentro desta população isolados capazes de infectar somente determinados genótipos. Os resultados nas inoculações em goiabeira mostraram a evidência dessa hipótese, porém seria necessário um estudo utilizando número maior de isolados e clones de diferentes variedades de goiabeira para comprová-la.

A detecção da raça 2 em eucalipto, originalmente obtida de goiabeira, torna questionável a origem dessas raças encontradas, ou seja, é possível que a raça 3 seja um variante da população existente em eucalipto, ou, da mesma forma que a raça 2, teria sua origem em outra hospedeira. Estudos adicionais de inoculações e o uso de marcadores moleculares poderão ser úteis para elucidar a estrutura genética da população de *P. psidii* nas hospedeiras cultivadas e silvestres. Um dos mecanismos mais importantes para o surgimento de

variabilidade dentro de uma população é a recombinação durante o ciclo sexual, porém o ciclo de vida de *P. psidii* foi parcialmente observado em jambeiro (FIGUEIREDO et al., 1984); isso, todavia, ainda não foi demonstrado inequivocamente. No caso de *P. psidii*, outra forma de gerar variantes dentro da população poderia ser a ocorrência de mutações, parassexualismo, como sugere WATSON (1970) para *Puccinia striiformis* e *P. recondita* f.sp. *tritici* em trigo. No entanto, a ocorrência e a importância desses mecanismos neste patossistema não são conhecidas.

A detecção de raças na interação *P. psidii* x *E. grandis* é importante para subsidiar o manejo de clones no campo e para estudos genéticos relacionados à virulência nesse patossistema. A coexistência de raças no mesmo local de cultivo de eucalipto observada neste trabalho constitui-se, também, numa importante informação para estratégia de manejo de clones, pois esta deverá considerar a potencialidade de infecção desses clones pelas duas raças. Além disso, essa estratégia define os clones diferenciadores como fonte de resistência a estas raças detectadas e poderão ser utilizados em programas de melhoramento.

Apesar de a raça 2 ter induzido reação S1 no clone D_{UFV}-2 na escala de JUNGHANS et al. (2000), deve-se considerar que o curto período de geração, a alta produção de uredíniosporos e a reprodução assexuada deste patógeno, aliada ao plantio clonal nesta cultura, poderão possibilitar o aumento desses variantes dentro da população do patógeno, aumentando os riscos de uma epidemia. Segundo ANTONOVICS e ALEXANDER (1989), indivíduos que são mais adaptados contribuem grandemente para próximas gerações, produzindo grande número de propágulos. Entretanto, a adaptabilidade desta raça 2 deverá ser comprovada para se testar essa hipótese.

Apesar de ter sido inoculado um número de isolados bem maior que os números utilizados em outros trabalhos, testaram-se relativamente poucos isolados de *P. psidii* para fazer generalizações sobre a especialização fisiológica dessa ferrugem. No entanto, os resultados aqui obtidos confirmam essa resposta dos isolados do patógeno oriundos de eucalipto e jambeiro são mutuamente virulentos a ambos os hospedeiros, conforme tem sido citado na literatura

(APARECIDO, 2001; COELHO, 1988; CASTRO et al., 1983; FERREIRA, 1983). As variações em virulência de *P. psidii* inoculado em goiabeira foram também observadas neste trabalho. A frequência relativamente baixa (31,25%) de isolados virulentos à goiabeira e as reações diferenciais obtidas nas inoculações das variedades Paluma, Kumagai e Ogawa indicam a ocorrência de especialização fisiológica na população do patógeno em goiabeira, conforme havia sido sugerido por FERREIRA (1983).

Diante dos resultados de infecção cruzada de uredíniosporos de diversas plantas hospedeiras, as variações tanto em virulência quanto em agressividade podem refletir a variabilidade genotípica deste patógeno em condição natural e corresponder à diversidade de genética do hospedeiro (LEONARD e CZOCHOR, 1980; LENNÉ e WOOD, 1991).

A resposta de HR-necrótico em jambeiro, principalmente para os isolados de goiabeira, mostrou que esse hospedeiro não é um bom multiplicador para os isolados de *P. psidii* oriundos de goiabeira. Essas observações também foram relatadas por CASTRO et al. (1983) e FERREIRA (1983). Com base nesses dados, a utilização de jambeiro como multiplicador deve ser feita com cautela para estudos de variabilidade do patógeno e resistência no hospedeiro. A produção de lesões necróticas com poucas uredínias em jambeiro, quando inoculado com os isolados G_{UFV-2}, G_{UFV-7} e E_{UFV-6} em jambeiro, e o aumento de uredíniosporos produzidos nas inoculações subseqüentes demonstram que ocorre mistura de genótipos do patógenos no campo e que é possível a seleção de isolados dentro da população de *P. psidii*. A resposta compatível de pitangueira apenas ao isolado de pitanga e a imunidade contra os 24 isolados de *P. psidii* testados podem indicar a provável existência de uma população do patógeno adaptada a esta hospedeira. Todavia, um maior número de isolados oriundos desta espécie deve ser testado para comprovar essa hipótese. Ressalta-se, contudo, que lesões com pústulas pouco esporulantes foram observadas nas inoculações cruzadas realizadas por APARECIDO (2001).

Um estudo mais amplo, em nível de genética de populações, seria importante para compreender a estrutura, a evolução e a adaptação de *P. psidii*

família Myrtaceae. A detecção de raças dentro da interação *Eucalyptus* x *P. psidii*, bem como a possibilidade de inóculo produzido em outras mirtáceas constituir-se em inóculo primário para eucalipto, devem ser consideradas, tanto na seleção de materiais resistentes quanto na adoção de estratégia de controle. Assim, são recomendadas a seleção de materiais resistentes por inoculações, sob condições controladas, e a diversificação de material genético no campo.

CAPÍTULO 3

COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO

Puccinia psidii x *Eucalyptus grandis*

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii* Winter, é uma das doenças de maior importância para esta cultura. Desde a década de 70, quando as primeiras perdas econômicas causadas por *P. psidii* foram registradas (FERREIRA, 1989), mudanças no manejo da cultura foram necessárias. A principal medida adotada foi a seleção e utilização de materiais resistentes (ALFENAS et al., 1989). Entretanto, o fato de esse patógeno possuir capacidade de infectar várias espécies em Myrtaceae (VIEGAS, 1961) lhe confere versatilidade em termos de parasitismo e, conseqüentemente, variabilidade. Estudos de variabilidade dessa ferrugem são freqüentemente relacionados à potencialidade de uredíniosporos de outras mirtáceas constituírem inóculo primário a eucalipto (FERREIRA, 1983; COELHO, 1988; APARECIDO, 2001; XAVIER et al., 2001b). Estudos sobre a agressividade de isolados em clones de

eucalipto são restritos, ou quase inexistentes. Apenas CASTRO et al. (1985) estudaram a agressividade de cinco isolados em seis clones de eucalipto; desde então nenhum estudo foi conduzido dentro dessa interação específica.

Três raças em eucalipto já foram detectadas por inoculações de *P. psidii* em quatro clones (XAVIER, capítulo 2): a raça 1, de ocorrência mais abrangente, e as raças 2 e 3 de frequência relativamente baixa, constituídas de apenas um isolado para a raça 2 e um para a raça 3. A raça 1 é originária de vários hospedeiros (XAVIER et al., 2000); a 2, de goiabeira; e a 3, de eucalipto. A raça 2 foi virulenta, ainda que em baixa intensidade, a um clone de eucalipto que comumente apresenta reação de resistência (tipo *fleck*), quando inoculado com as raças 1 e 3. A raça 3 foi caracterizada pela sua virulência no clone, que, para a maioria dos isolados testados, apresentou reação de resistência (HR necrótico). Essas raças apresentaram reações diferenciadas nos clones de eucalipto e tiveram agressividade classificada em S1 e S3 nos clones suscetíveis às raças 2 e 3, respectivamente. Diante dessas observações, é pertinente especular quanto à possibilidade de estas raças causarem epidemias no campo. A agressividade é um atributo do isolado do patógeno importante para que este persista na população (NELSON, 1979) e, segundo SHURTLEFF e AVERRE III (1997), descreve a variação na severidade da doença entre raças virulentas de um patógeno num hospedeiro. A quantificação de componentes epidemiológicos relacionados a esse atributo, como produção de esporos, período latente e eficiência de infecção, poderá ser utilizada para estimar a agressividade de isolados e a possibilidade de aumento da sua frequência no campo em clones suscetíveis. Além disso, como esses componentes são resultantes da interação genética de isolado x hospedeiro (PARLEVLIET, 1985; WATSON, 1970; ZADOKS e SCHEIN, 1979), sua quantificação poderá mostrar, de forma mais acurada, diferenças da agressividade dessas duas raças. Adicionalmente, esses dados poderão subsidiar o melhoramento de eucalipto no sentido de selecionar clones resistentes, bem como o seu manejo no campo. Assim, este trabalho teve como objetivo comparar a agressividade de duas raças de *P. psidii* em clones de *Eucalyptus grandis* por meio da quantificação dos componentes epidemiológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os clones e os isolados utilizados pertencem ao banco clonal de eucalipto e à micoteca do Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Utilizaram-se três clones de *E. grandis* (D_{UFV}-1, D_{UFV}-2 e D_{UFV}-3) e duas raças de *P. psidii* (raça 2 e raça 3) originalmente isolados da variedade Paluma de goiabeira e do clone D_{UFV}-3 de *E. grandis*, respectivamente (XAVIER, capítulo 2). A raça 2, virulenta ao clone D_{UFV}-2, e a raça 3, virulenta ao clone D_{UFV}-3, foram caracterizadas como S1 e S3, respectivamente (XAVIER, capítulo 2). O clone D_{UFV}-1 foi utilizado como suscetível às duas raças, com resposta de severidade S3 na escala de JUNGHANS (2000).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, adubadas a cada 15 dias com 20 g.L⁻¹ do fertilizante Ouro Verde (N, P, K e micronutriente) e podadas mensalmente para induzir novas brotações.

Uredíniosporos de ambas as raças foram multiplicados em folhas jovens nos hospedeiros de origem e, 12 dias após a inoculação (d.a.i.), coletados, para preparo da suspensão de acordo com a metodologia descrita por RUIZ et al. (1989).

2.1. Quantificação de componentes de agressividade

Duas folhas jovens de dois ramos laterais dos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-2} e D_{UFV-3} foram marcadas e inoculadas com uma suspensão de 2×10^4 uredíniosporos/mL de cada raça, utilizando-se um atomizador De Vilbis (n^o 15) acoplado a um compressor elétrico (7 kgf/cm²). As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas, no escuro, e em seguida transferidas para câmara de crescimento a 22 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas (RUIZ et al., 1989), com intensidade luminosa média de $36 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-2}$ (luz fluorescente). Aos 5 d.a.i., com o início do desenvolvimento dos sintomas, iniciaram-se as avaliações diárias.

Plantas de jambeiro foram dispostas entre as plantas dos tratamentos, para monitorar possível contaminação de uredíniosporos de uma raça de um tratamento para outro. A irrigação das plantas foi realizada de forma que não se tocasse nelas, a fim de evitar possíveis perdas de uredíniosporos no ensaio de período infeccioso. Os ensaios de frequência de infecção, período latente médio e produção de uredíniosporos foram repetidos duas vezes no tempo.

Os tratamentos constaram da combinação de dois clones e dois isolados; cada tratamento foi constituído por cinco repetições, e cada repetição constou da média de leitura em duas folhas/planta. O delineamento estatístico foi em blocos casualizados, analisado em um esquema fatorial.

2.1.1. Frequência de infecção

Para se determinar a frequência de infecção (FI) foi realizada diariamente, com auxílio de lupa manual (50x), a contagem do número de lesões em área total do limbo foliar. Os dados foram transformados em número de lesão/cm², sendo consideradas lesões as áreas do limbo foliar que apresentaram coloração verde-clara.

2.1.2. Eficiência de infecção

A eficiência de infecção (EI) foi calculada como a razão entre o número de lesões esporulando/cm² no limbo foliar aos 12 dias da inoculação e o número de esporos depositados (140 uredíniosporos/cm²) (SACHE e ZADOKS, 1995).

2.1.3. Produção de uredíniosporos

Retiraram-se 10 discos foliares de aproximadamente 1 cm² de diâmetro, contendo apenas uma lesão esporulando do limbo foliar. Os discos foram divididos em dois tubos de ensaio contendo 2 mL de água mais Tween 20 a 2%, agitados por três minutos em velocidade constante. Em seguida, a produção de uredíniosporos (PE) foi estimada efetuando-se pelo menos três contagens/tubo, em hemacitômetro sob microscópio de luz. Para estimar o erro dessa avaliação, quantificou-se o número de uredíniosporos retidos na superfície dos discos de lavagem em microscópio de luz incidente. Nesses discos foi ainda quantificado o número de uredínias presentes nas lesões.

O tamanho médio das uredínias (mm²) de cada tratamento foi calculado medindo-se, sob microscópio estereoscópio (50x), dois diâmetros ortogonais de 60 uredínias/tratamento selecionadas ao acaso. Os dados foram transformados usando a fórmula $\pi \times \text{comprimento} \times \text{largura}/4$, de acordo a metodologia utilizada por BENDER e PRETORIUS (1997). O número de uredínias/lesão foi estimado aos 12 d.a.i..

2.1.4. Período latente

Diariamente, as uredínias visíveis nas folhas previamente marcadas foram quantificadas em área foliar total. A contagem do número de lesões esporulando foi realizada diariamente a partir do quinto dia da inoculação e seguiu até 12 dias após a inoculação.

A média do número de lesões e de uredínias visíveis e errumpentes foi calculada nas avaliações diárias, e o período latente médio (PL) foi determinado como o número de horas em que 50% das uredínias esporulantes foram detectadas.

2.1.5. Período infeccioso

A estimativa do período infeccioso (PI) foi realizada em outro ensaio utilizando a mesma metodologia de inoculação, isolados e de plantas. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições, sendo cada uma representada por uma planta. O delineamento estatístico foi em blocos casualizados, num esquema fatorial.

Dez pústulas individualizadas na face abaxial do limbo foliar dos clones D_{UFV}-1 e D_{UFV}-3, aos 8 d.a.i., e no clone D_{UFV}-2, aos 12 d.a.i., foram identificadas com uma caneta esferográfica. Em intervalos de três a quatro dias, as pústulas foram individualmente lavadas com de 50 µL de água mais Tween 20 (2%) e, com o auxílio de um pincel de cerdas finas, retirou-se o máximo de uredíniosporos, sem danificar o tecido hospedeiro. Em seguida, as pústulas foram novamente lavadas, para retirar os uredíniosporos retidos no tecido foliar. A água das lavagens foi transferida para um tubo de ensaio, o volume completado para 2 mL e então as pústulas foram levemente secas com papel absorvente. Foram feitas três contagens do número de uredíniosporos em hemacitômetro, sob microscópio de luz. O número de lesões produzindo uredíniosporos foi observado ao longo das avaliações.

2.2. Severidade da doença

Aos 12 dias da inoculação, as folhas de todos os tratamentos foram fotografadas com câmera digital (Olympus Camedia D46 Zoom). Estimou-se a área foliar total e doente (área das lesões) utilizando-se o *software* QD -

Quantificação de Doenças (VALE et al., 2001); a proporção de área doente foi estimada.

2.3. Avaliação microscópica do desenvolvimento do patógeno

Folhas jovens dos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-2} e D_{UFV-3} foram inoculadas com suspensão concentrada de inóculo (10^5 uredíniosporos/mL) das raças, para facilitar as observações microscópicas. A inoculação e incubação das plantas foram realizadas como descrito no item 2.1.

Fragmentos de 6x10 mm do tecido foliar foram coletados 48 e 120 horas após a inoculação (h.a.i.) e clareados em cloral hidratado (LONGO et al., 1994). Após cinco dias, os fragmentos foram montados em lactofenol e observados em microscópio de luz, utilizando-se a técnica de contraste interferencial de Nomarski (BENCHIMOL, 1996). Os tratamentos foram constituídos por três repetições, e cada repetição constituiu-se de uma planta. Em cada repetição, avaliaram-se aproximadamente 20 sítios de infecção, individualizados no limbo foliar. Na avaliação, foram quantificados o número de células-mãe do haustório (HMC) e o número de haustórios e de ramificações de hifas/sítio de infecção. As HMCs foram contadas quando as células estavam em íntima associação com células hospedeiras e que apresentavam septo bem delimitado, porém sem formação de haustórios.

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação de componentes de agressividade

Pela análise estatística dos componentes, a interação foi significativa ($p=0,01$) para todas as variáveis testadas, com exceção de frequência de infecção (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de F obtidos na análise de variância para as variáveis: número médio de lesões/cm², lesões esporulando/cm², soros/cm², uredíniosporos x 10³/ lesões, uredíniosporos retidos no disco e severidade da doença (%)

	Frequência de infecção	Eficiência de infecção	Nº de soros/cm ²	Produção de uredíniosporos (10 ³ /lesão)	Estimativa de uredíniosporos retidos no disco	Severidade (%)
Clone	2,95 n.s	6,92 n.s	17,64 n.s	11,90 *	11,95 *	36,57 *
Raça	2,29 n.s	7,79 n.s	1,55 *	25,44 *	24,45 *	1,64 n.s
ClonexPatótipo	0,98 n.s	16,50 *	39,31 *	14,37 *	17,90 *	29,79 *

* Significativo pelo teste F ($p=0,01$); n.s – não-significativo.

3.1.1. Freqüência de infecção

Independentemente da combinação clone x raça avaliada, não houve diferença quanto à freqüência de infecção. Entretanto, houve tendência de maior número de lesões pela raça 2 nos clones D_{UFV}-1, D_{UFV}-2 e D_{UFV}-3 e da raça 3 no clone D_{UFV}-3 (Figura 1). Histologicamente, em todos os clones, independentemente do isolado inoculado, observaram-se no mínimo 10 haustórios/sítio, e de 10-15 hifas/sítio foram estabelecidas 120 h.a.i., à exceção do clone D_{UFV}-2/raça 3, em que os números de haustórios e de hifas foram menores que 2 (Figura 6).

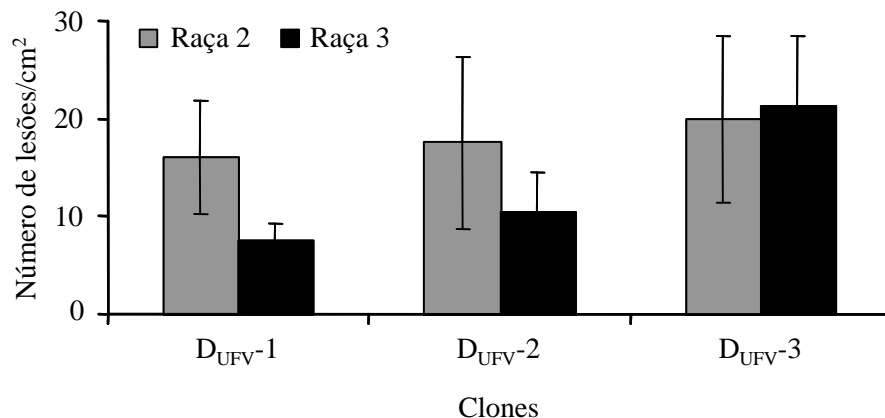


Figura 1 - Freqüência de infecção das raças 2 e 3 de *P. psidii* nos clones D_{UFV}-1, D_{UFV}-2 e D_{UFV}-3 de *E. grandis*, 12 dias após a inoculação. Clones D_{UFV}-1 e D_{UFV}-2; suscetíveis à raça 2; e D_{UFV}-1 e D_{UFV}-3, à raça 3.

3.1.2. Eficiência de infecção

Diferenças significativas para os valores de eficiência de infecção foram obtidas para as combinações entre clone e raças (p=0,01). As médias obtidas para a raça 2 em todos os clones não diferiram entre si pelo teste de Tukey (p=0,05).

Os valores obtidos na combinação da raça 3 com o clone D_{UFV}-3 foram três vezes maiores que os obtidos pela referida raça no clone D_{UFV}-1 (Tabela 2).

Tabela 2 - Eficiência de infecção* das raças 2 e 3 nos clones D_{UFV}-1, D_{UFV}-2 e D_{UFV}-3, 12 dias após a inoculação. Clones D_{UFV}-1 e D_{UFV}-2, suscetíveis à raça 2; e D_{UFV}-1 e D_{UFV}-3, à raça 3

Clone	Eficiência de infecção	
	Raça 2	Raça 3
D _{UFV} -2	0,0336 a	0,0000 b
D _{UFV} -1	0,0483 a	0,0505 b
D _{UFV} -3	0,0059 a	0,1472 a

Médias dos tratamentos nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p=0,05).

*Cada valor representa a razão entre média do número de pústula/cm⁻² e número médio de uredíniosporos inoculados/cm².

3.1.3. Produção de uredíniosporos

Pelo teste de Tukey (p=0,05), detectaram-se diferenças significativas para as combinações incompatíveis (D_{UFV}-3/raça 2 e D_{UFV}-2/raça 3) (Tabela 3) e para número de soros/pústulas produzidos pela raça 3 nos três clones testados (Tabela 4).

O mesmo padrão de variação foi observado para o número de uredíniosporos produzidos e retidos no disco utilizado. Analisando o comportamento do clone suscetível D_{UFV}-1 às raças 2 e 3, a produção de esporos e os valores de área da uredínia foram duas e cinco vezes maior para a raça 3, quando comparado com os valores obtidos na raça 2 (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Número médio da área de uredínias (mm^2), número de uredínias/pústula e número de uredíniosporos/pústula para a raça 2 nos clones $D_{\text{UFV-1}}$, $D_{\text{UFV-2}}$ e $D_{\text{UFV-3}}$

Clone	Área de uredínia (mm^2)	Número de soros/pústula	Número de uredíniosporos x 10^3 /pústula	Número de uredíniosporos retido no disco
$D_{\text{UFV-1}}$	$0,0165 \pm 0,0044$	$12,56 \pm 3,73$ a	$2,70 \pm 0,30$ a	$74,80 \pm 25,80$ a
$D_{\text{UFV-2}}$	$0,0156 \pm 0,03$	$15,39 \pm 3,74$ a	$1,70 \pm 0,60$ a	$49,00 \pm 7,12$ a
$D_{\text{UFV-3}}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ b	$0,00 \pm 0,00$ b	$0,00 \pm 0,00$ b

*Médias dos tratamentos nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

Tabela 4 - Número médio da área de uredínias (mm^2), número de uredínias/pústula e número de uredíniosporos/pústula para a raça 3 nos clones $D_{\text{UFV-1}}$, $D_{\text{UFV-2}}$ e $D_{\text{UFV-3}}$

Clone	Área de uredínia (mm^2)	Número de soros/pústula	Número de uredíniosporos x 10^3 /pústula	Número de uredíniosporos retido no disco
$D_{\text{UFV-1}}$	$0,0548 \pm 0,0054$	$13,90 \pm 2,24$ a	$6,60 \pm 1,30$ a	$178,80 \pm 53,80$ a
$D_{\text{UFV-2}}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ c	$0,00 \pm 0,00$ b	$0,00 \pm 0,00$ b
$D_{\text{UFV-3}}$	$0,0529 \pm 0,0025$	$9,65 \pm 1,22$ b	$7,60 \pm 2,00$ a	$212,87 \pm 70,10$ a

*Médias dos tratamentos nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

3.1.4. Período latente

No clone $D_{\text{UFV-1}}$, as raças 2 e 3 apresentaram diferença de 24 horas no período latente médio. Maiores valores foram observados nas combinações com a raça 3, com 24 e 48 horas de diferença no período latente nos clones $D_{\text{UFV-1}}$ e

D_{UFV-2} , respectivamente (Figura 2). Principalmente nos tratamentos com a raça 2, observou-se grande variação nas leituras, provavelmente em decorrência da descontinuidade no período de esporulação das lesões nestes tratamentos. Na repetição do ensaio esse componente não ficou claramente definido em função desse padrão de esporulação.

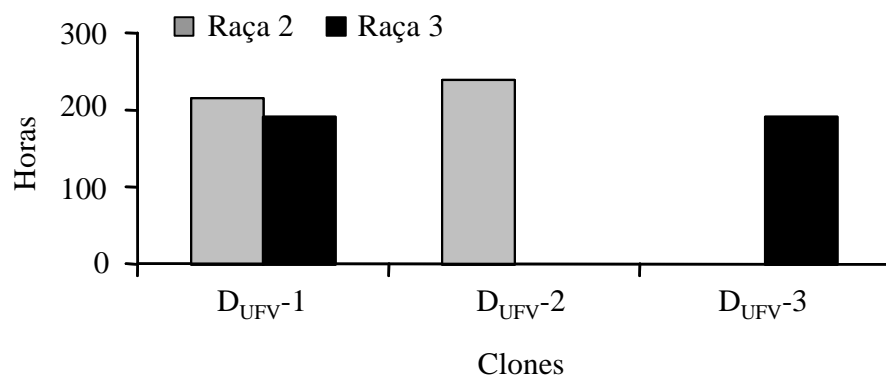


Figura 2 - Período latente (horas) de duas raças de *P. psidii* em três clones de *Eucalyptus grandis*. Clone D_{UFV-1} , compatível com as duas raças; e D_{UFV-2} e D_{UFV-3} , diferenciadores das raças 2 e 3, respectivamente.

3.1.5. Período infeccioso

Na combinação D_{UFV-1} /raça 2 houve um número de pústula com uredíniosporos mais irregular que na combinação D_{UFV-2} /raça 2 e naquelas envolvendo a raça 3 (Figura 3A, B). Em todas as interações compatíveis, o período médio de produção de uredíniosporos foi de 16 dias.

Maiores variações e menores médias foram observadas nas interações envolvendo a raça 2 (Figura 3A). A descontinuidade de lesões produzindo esporos ficou também evidenciada nesse ensaio, gerando grande variação nos dados de produção de uredíniosporos (Figura 4A). A raça 3 manteve uma

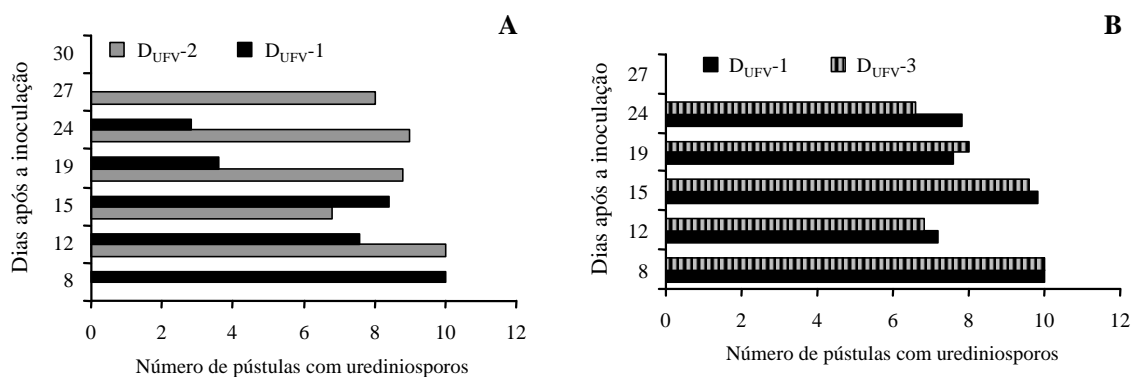


Figura 3 - Número de pústulas com urediniosporos das raças 2 (A) e 3 (B) de *Puccinia psidii* nos clones D_{UFV-1}, D_{UFV-2} e D_{UFV-3} de *Eucalyptus grandis*, após cinco lavagens em intervalos de três a quatro dias, durante 15 dias.

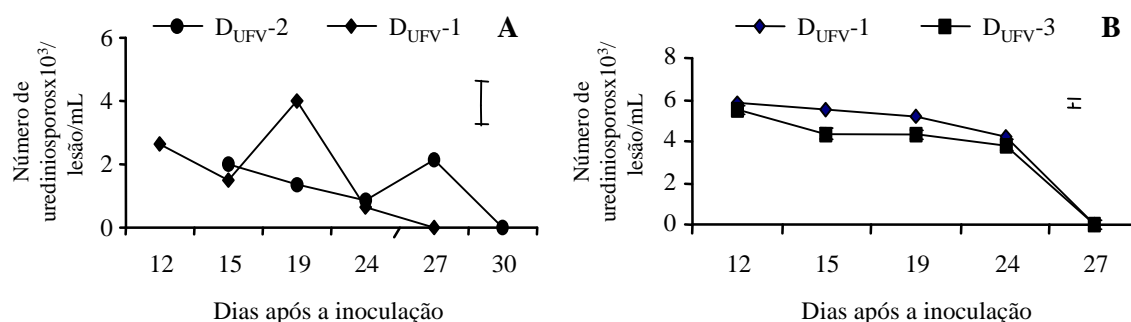
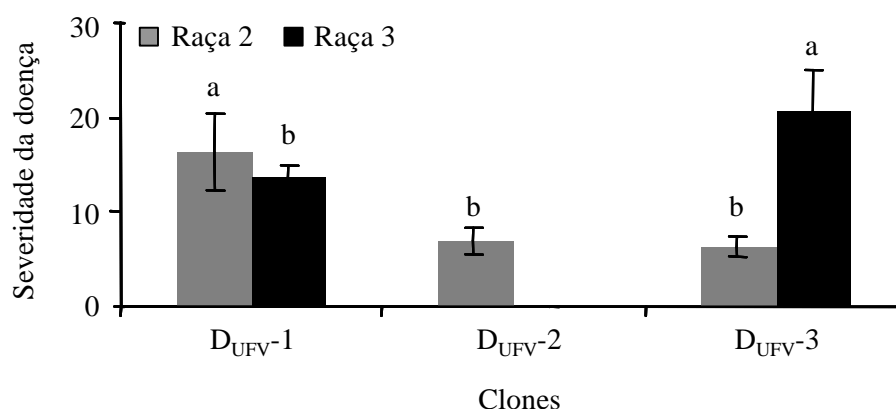


Figura 4 - Número de urediniosporos produzido por pústula em interações das raças 2 e 3 de *Puccinia psidii* em clones de *Eucalyptus grandis*, após cinco lavagens em intervalos de três a quatro dias, durante 15 dias. Clones D_{UFV-1} e D_{UFV-2}, compatíveis com a raça 2 (A); e clones D_{UFV-1} e D_{UFV-3}, compatíveis com a raça (B). As barras correspondem ao desvio-padrão do ensaio.

produção média de 4×10^3 urediniosporos/mL da segunda até a última lavagem das pústulas (Figura 4B). Esses dados corroboram os dados de produção de urediniosporos apresentados no ensaio de produção de urediniosporos.

3.2. Severidade da doença

Efeitos significativos foram observados entre raças nos clones avaliados ($p=0,01$). O desdobramento das interações mostrou diferenças significativas para as duas raças nos clones D_{UFV-1} e D_{UFV-3} . Maiores médias foram observadas para a severidade nas interações D_{UFV-3} /raça 3 e D_{UFV-1} /raça 2 (Figura 5).



Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

Figura 5 - Severidade de doença nos clones D_{UFV-1} , D_{UFV-2} e D_{UFV-3} de *Eucalyptus grandis* inoculados com as raças 2 e 3 de *Puccinia psidii* e quantificada aos 12 d.a.i. Clones D_{UFV-1} e D_{UFV-2} , compatíveis com a raça 2; e clones D_{UFV-1} e D_{UFV-3} , compatíveis com a raça 3.

Severidade estatisticamente igual foi observada nos clones D_{UFV-2} suscetível à raça 2 e D_{UFV-3} que apresenta resposta de resistência do tipo HR para esta raça.

3.3. Avaliação microscópica do desenvolvimento do patógeno

Em todos os clones, independentemente da raça inoculada, o fungo estabeleceu vesícula de infecção, pelo menos uma ramificação da hifa e um

haustório, 48 horas após a inoculação. Com exceção da interação D_{UFV-2} /raça 3, aproximadamente 10 haustórios/sítio e 10-15 ramificações de hifas/sítio haviam se formado em todos os tratamentos avaliados. Na interação D_{UFV-3} /raça 2, caracterizada por S0 (reação HR-necrótico), o número de haustórios e hifas de infecção foi semelhante ao observado nas interações compatíveis (Figura 6).

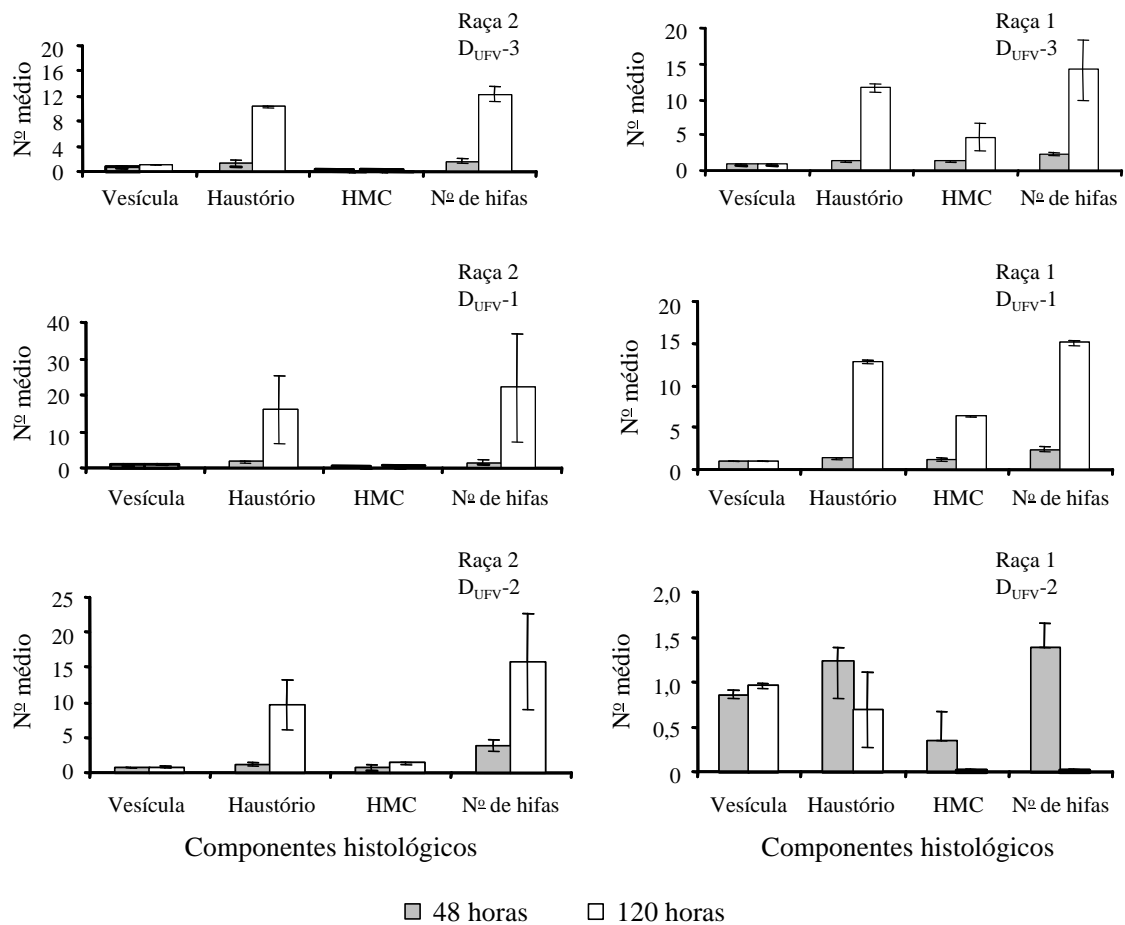


Figura 6 - Número médio de vesícula, haustórios, HMC e número de hifas formados pelas raças 2 e 3 de *Puccinia psidii* nos clones D_{UFV-1} , D_{UFV-2} e D_{UFV-3} de eucalipto após 48 e 96 horas da inoculação.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do patógeno em um hospedeiro é resultado da interação genética entre ambos durante o processo de infecção (ZADOKS e SCHEIN, 1979) e, dependendo da resistência da planta e virulência do patógeno, pode resultar em maior período latente, menor número de pústulas e pústulas com menor produção de esporos (PARLEVLIET, 1985). Neste trabalho, observou-se tendência de menor desenvolvimento para todos os componentes avaliados nos clones inoculados com o isolado oriundo de goiabeira nas condições ambientes testadas, exceto para o período latente, indicando que este isolado pode ser menos adaptado ao eucalipto que o isolado oriundo de eucalipto.

Diferenças na frequência de infecção não foram detectadas em nenhuma das interações testadas, pois a resistência nesses genótipos é tipicamente pós-haustorial (XAVIER, 2001a). Assim, o patógeno desenvolve estruturas de infecção no limbo foliar antes que os mecanismos de resistência atuem restringindo o desenvolvimento deste. Esse início de infecção é observado como pontuações de área verde-clara, e nas interações resistentes essas lesões não evoluem, permanecendo como “flecks”, ou tornam-se necrosadas. Os valores obtidos para FI neste trabalho foram muito superiores àqueles determinados por CASTRO et al. (1983), provavelmente em virtude da determinação em amostragem, ao contrário deste trabalho, que ocorreu em área total.

Os valores de eficiência de infecção para *P. psidii* variaram de 0,04 a 0,1 e coincidem com os valores obtidos para *Uromyces viciae-fabae* (STATLER e McVEY, 1987). A maior eficiência de infecção detectada na combinação da raça 3 com o clone D_{UFV-3} reflete a habilidade deste isolado em produzir propágulos no maior número de sítios de infecção estabelecidos e, indiretamente, indica maior eficiência em colonizar o tecido do hospedeiro, nutrir-se e reproduzir-se. Comparativamente, o valor obtido nessa interação foi de três a quatro vezes maior que nas demais combinações compatíveis. O desenvolvimento de uredínias em lesões na combinação raça 2/D_{UFV-3}, caracterizada como incompatível, associado à quantificação de severidade, e os dados histológicos demonstram que a raça 2, da mesma forma que a 3, colonizou o clone D_{UFV-3}, porém não pôde finalizar seu ciclo neste hospedeiro. A classe S0 e S1 no trabalho de JUNGHANS (2000) está associada à presença de um gene de efeito principal e outros genes de efeito menores em *Eucalyptus grandis*. Esses genes possivelmente podem atuar na redução do desenvolvimento do patógeno no hospedeiro e na restrição da esporulação.

O período latente é um dos principais componentes indicadores do sucesso reprodutivo do patógeno e constitui bom indicativo de adaptação do isolado ao hospedeiro (NELSON, 1979; ANTONOVICS e ALEXANDRE, 1989). A sua determinação permite estimar o número de gerações do patógeno e a possibilidade de desenvolvimento de epidemia severa num hospedeiro sob condições favoráveis. Analogamente a este trabalho, períodos latentes mais longos foram também observados por CASTRO et al. (1985) e CASTRO et al. (1983) para os isolados de goiaba inoculados em diferentes clones e espécie de eucalipto. A irregularidade no número de pústulas esporulando diariamente dificultou a determinação do PL nas combinações com a raça 2.

O período infeccioso reflete a capacidade do patógeno em gerar novos indivíduos; no caso de ferrugens, constitui um fator importante para aumentar a taxa de progresso da doença no campo (ANTONOVICS e ALEXANDRE, 1989). Estatisticamente, a produção de uredíniosporos não foi diferente nas interações testadas, entretanto, no clone D_{UFV-1} suscetível e com tipo de reação S3 às duas

raças, a média foi três vezes maior na interação com a raça 3, quando comparada aos valores obtidos com a raça 2. A efêmera duração de esporulação/pústula observada nas avaliações diárias para determinação de período latente contribuiu para aumentar a variabilidade nessa estimativa e, possivelmente, mascarou essa diferença. A produção de uredíniosporos é um componente fortemente influenciado pela densidade de uredínias (PARLEVLIET, 1985), porém neste trabalho o número de uredínias foi semelhante. No entanto, quando se relacionam os dados de produção de esporos com o tamanho de uredínia, uma associação entre o maior tamanho de uredínias e o maior número de uredíniosporos nas interações envolvendo a raça 3 foi observada. A mesma associação foi detectada por WILSON e SHANER (1989) em cultivares de triticale inoculados com *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. *tritici* e por THOMÉ et al. (1997) em *Puccinia coronata* Cda. F.sp. *avenae* em aveia. O número de soros foi associado ao tamanho de pústula na escala desenvolvida por JUNGHANS (2000). Contudo, neste trabalho, clones compatíveis com a raça 3 e agrupados na mesma classe de severidade diferiram para esse componente, e em ambos os clones os tamanhos de uredínias foram semelhantes. O uso da escala é baseado em tamanho de pústula, e esse parâmetro não foi estimado neste trabalho. Determinou-se somente o tamanho de uredínias, porém nos clones compatíveis com as duas raças não houve diferença quanto a esta variável. Nesse caso, um efeito de compensação de maior área de uredínia em lesões com menor número de soros pode explicar o mesmo número de uredíniosporos produzido pelo clone D_{UFV}-3 (ZADOKS e SCHEIN, 1979).

A quantificação do número de hifas e haustórios não reflete diretamente a área doente, pois na mensuração da área lesionada considerou-se a presença de halos amarelados, e esta região não necessariamente está associada à presença de estruturas do patógeno. A área lesionada no clone D_{UFV}-3 inoculado com a raça 2 foi semelhante aos valores observados nas interações compatíveis desta raça. A avaliação histológica apresentou valores semelhantes aos obtidos nas demais interações compatíveis, mostrando que as duas raças possuem capacidade de colonizar o hospedeiro; no caso da interação com a raça 2, o processo de infecção

é interrompido na fase inicial de esporogênese. Dados histológicos deste mesmo clone quando inoculado com a raça 1 apresentaram números muito menores para desenvolvimento de estruturas do patógeno (XAVIER, capítulo 1) e, macroscopicamente, apresentaram uma resposta de HR-necrótico. A observação de uredínias diminutas e posteriormente necrose no centro desta lesão, aliada à diferença de desenvolvimento histológico na interação D_{UFV}-3/raça 2, indica que este isolado possui uma combinação de genes que confere maior capacidade de colonizar o tecido hospedeiro que a raça 1.

A análise conjunta dos componentes avaliados demonstra menor desenvolvimento em algumas fases do estabelecimento e da reprodução do patógeno. Essas diferenças possuem base genética e a interferência nas diferentes fases é determinada por diferentes genes (ZADOCKS e SCHEIN, 1979; WATSON, 1970). A resistência em *E. grandis* à ferrugem conferida por um gene de efeito principal e por genes de efeito secundário (JUNGHANS, 2000) indica que plantas com gene de efeito principal e uma combinação favorável de genes de efeito secundário teriam provavelmente efeito de reduzir o desenvolvimento do patógeno e retardar o início da manifestação da doença. A influência de genes de efeito secundário é evidenciada neste trabalho, principalmente, na produção de uredíniosporos. Analogamente, pode-se inferir a existência de diferentes genes nas raças testados que possibilitam o desenvolvimento diferenciado dentro do mesmo clone.

A produção de esporos foi o componente mais variável para a raça 2 de *P. psidii*. A produção abundante de uredíniosporos, a existência de outros hospedeiros, o curto ciclo de vida e o potencial de disseminação deste patógeno pelo vento a longas distâncias são aspectos epidemiológicos extremamente importantes e podem contribuir para aumentar a frequência das raças 2 e 3 no campo.

Os resultados mostraram que, comparativamente, a raça 3 apresentou valores superiores no clone diferenciador aos da raça 2. No clone compatível às duas raças (D_{UFV}-1), a raça 3 apresentou capacidade maior de produção de uredíniosporos do que a raça 2. Entretanto, a severidade de doenças neste clone

foi superior para a raça 2, e tanto eficiência de infecção como período infeccioso foram semelhantes. Isso demonstra a potencialidade destas raças em causar doença no campo. Todavia, a ocorrência e a agressividade destas raças em clones no campo devem ser monitoradas para que se possa inferir o desenvolvimento de doença no campo e subsidiar a seleção e o manejo de clones a serem plantados, a fim de evitar aumento dessas populações.

CONCLUSÕES GERAIS

Avaliaram-se o desenvolvimento de *P. psidii* e as alterações morfológicas de células de clones de *Eucalyptus grandis* com resistência completa do tipo HR e imunidade, resistência parcial e suscetível quando inoculados com a raça 1. Observou-se uma tendência de menor desenvolvimento de estruturas de infecção do patógeno com o aumento do nível de resistência e um maior número de células do hospedeiro, reagindo a presença do patógeno. Nos clones resistentes, a reação de resistência ocorreu após a formação do haustório, caracterizando-a como pós-haustorial. Estruturas de *P. psidii* foram observadas ultra-estruturalmente pela primeira vez e evidenciou-se a ausência de espessamento da parte interna da célula-mãe do haustório, comumente formada na fase dicariótica de outras espécies ferrugem. Os haustórios observados foram tipicamente ramificados. No clone D_{UFV}-3 com resposta do tipo HR haustórios totalmente degenerados foram observados 96 horas após a inoculação.

Foram inoculados 21 isolados de *P. psidii* numa série de oito clones de eucalipto e, pela reação nestes clones, identificaram-se três reações diferenciais. Os isolados que incitaram essas reações foram denominados raças 1, 2 e 3; duas destas raças foram oriundas de eucalipto e uma de goiabeira. A agressividade de todos os isolados inoculados nos oito clones utilizados foi variável e, de maneira geral, os isolados de eucalipto foram mais agressivos que os demais. Inocularam-

se 32 dos isolados obtidos em uma gama de plantas hospedeiras constituídas de: jambeiro, eucalipto, goiabeira, jabuticabeira e pitangueira. As inoculações cruzadas mostraram que os isolados de eucalipto e jambeiro são mutuamente virulentos. Os isolados de goiabeira foram 100% virulentos ao eucalipto, e apenas 50% foram virulentos à goiabeira (variedade Paluma). Adicionalmente, observou-se neste ensaio a capacidade desses isolados testados em produzir-se em diferentes hospedeiras, possibilitando a presença constante de inóculo primário no campo. Para eucalipto essa informação é extremamente importante, pois o clone inoculado desta espécie comportou-se como suscetível a todos os isolados testados nas inoculações cruzadas.

Isolados oriundos de goiabeira foram inoculados em clones das variedades de Ogawa, Paluma e Kumagai e também apresentaram comportamento diferencial.

As raças 2 e 3 encontradas neste trabalho ocorreram numa frequência relativamente baixa, e a possibilidade de essas variantes de *P. psidii* de causar uma epidemia foi estimada pela comparação epidemiológica dos componentes de agressividade nas interações D_{UFV-1}, D_{UFV-2}, D_{UFV-3} inoculados com as raças 2 e 3. As raças 2 e 3 apresentaram severidade de doença nos clones diferenciadores (D_{UFV-2} e D_{UFV-3}), caracterizados como S1 e S3, respectivamente. Redução dos componentes de produção de esporos foi observada no clone diferenciador da raça 2 (D_{UFV-2}). Maior período latente também foi observado nessa interação. Maior número de uredíniosporos e severidade de doença e menores períodos latentes foram observados nos clones (D_{UFV-1} e D_{UFV-3}) inoculados com a raça 3. Análise conjunta dos dados indicam que tanto a raça 2 como a raça 3 são capazes de causar doença no campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. **Plant pathology**. London: Academic Press, 4^a ed., 1997. 635p.
- AIST, J.R. Papillae and related wound plugs of plant cells. **Annual Review Phytopathology**, v. 14, p.145-163. 1976.
- ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. e SARTORIO, R. Eficiência de triadimenol, oxicarboxim e diniconazole para o controle da ferrugem, *Puccinia psidii*, em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. **Revista Árvore**, v.17, p.247-263. 1993.
- ALFENAS, A.C., DEMUNER, N.L., BARBOSA, M.M. O eucalipto: A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**, v.1, p.18-20, 1989.
- ANTONOVICS, J., ALEXANDER, H.M. The concept of fitness in plant pathogen systems. In: LEONARD, K., FRY, W. (Eds.) **Plant disease epidemiology: genetics, resistance and management**. McGraw-Hill. 1989. p.185-214.
- APARECIDO, C.C. **Estudo ecológicos sobre *Puccinia psidii* Winter – ferrugem das mirtáceas**, Botucatu, SP: UNESP, 2001. 66p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. 2001.
- BENCHIMOL, M. et al. Métodos de estudo da célula Ed. Benchimol, M. Rio de Janeiro: Editora FENORTE/UENF, 1996. 143p.

- BENDER, C.M., PRETORIUS, Z.A. Assessment of microscopic components of leaf rust resistance in wheat genotypes containing Lr 12 and Lr 13. **S. Afr. J. Plant Soil**. v.14, p. 71-80, 1997.
- BLUM, L.E.B, DIANESE, J.C. Padrões de liberação de uredíniosporos e desenvolvimento da ferrugem do jambeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1-10. 2001.
- BRIGGS, S.P., JOHAL, G. Genetic patterns of plant host-parasite interactions. **Trends in Genetics**, v.10, p.12-16. 1994.
- BUSHNELL, W.R. Physiology of fungal haustoria. **Annual Review of Phytopatology**, v.10, p.151-176. 1972.
- CASTRO, H.A, KRUGNER, T.L., BERGAMIN FILHO. A. Especialização fisiológica no sistema *Eucalyptus grandis*. W. Hill ex Maiden- *Puccinia psidii* winter. **Ciência Prática de Lavras**, v. 9, p. 80-92. 1985.
- CASTRO, H.A. de, KRUGNER, T.L., IDERIHA, C.H.F., CAPPELLO, M.S.C., MARCHI, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jambeiro (*Syzygium jambos*) com *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.491-7. 1983.
- CATEN, C.E. The concept of race in plant pathology. In: WOLFE, M.S., CATEN, C.E. (Eds.) **Populations of plant pathogens: dynamics and genetics**. Oxford: Blakwell Scientific Publications, 1987. p. 21-37.
- CLASSEN, B., AMELUNXEN, F., BLASCHEK, W. Ultrastructural observations on the rust fungus *Puccinia malvacearum* in *Malva silvestre* ssp. *Mauritana* (L). **Plant Biology**, v.3, p.437-442. 2001.
- COELHO, L. **Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii*** Winter – ferrugem do eucalipto. Viçosa, MG: UFV, 1988. 68p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J, ALFENAS, A.C., CROUS, P.W. *Eucalyptus* rust: A disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, v. 82, p. 819-825, 1998.
- EDWARDS, J., HALLORA, G.M., PARBERY, D.G, TAYLOR, P.A. Physiologic specialization in *Puccinia menthae* on peppermint and other host in Victoria, Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.205-211. 1999.
- EHRlich, M. A., EHRlich, H.G. Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparasitism. **Annual Review of Phytopatology**, v.9, p.155-184. 1971.

- FERREIRA, F.A. Ferrugem do Eucalipto. In: FERREIRA, F.A. (Ed.) **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais - SIF, 1989. p. 129-152.
- FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, v.7, p.91-109, 1983.
- FERREIRA, M., SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil - Breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONGRESS ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador, BA. **Proceedings...**, Colombo: EMBRAPA-CNPQ. V.1, p.14-34.
- FIGUEIREDO, M.B., COUTINHO, L.N., HENNEN, J.F. Estudos para a determinação do ciclo vital de *Puccinia psidii* Winter. **Summa Phytopathologica.**, v.10, p.53-54, 1984.
- FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, v.45, p.680-685. 1955.
- GRAY, D.J., AMERSON, H.V., C.G. DYKE. An ultrastructural comparison of monokaryotic and dikaryotic haustoria formed by fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme fusiforme*. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p.2914-2922. 1982.
- GROTH, J., ROELFS, A. P. The analysis of genetic variation in populations of rust fungi. In: LEONARD, K., FRY, W. (Eds.) **Plant disease epidemiology: genetics, resistance and management**. McGraw-Hill, 1989. p.318-339.
- HARDER, D.E., CHONG, J. Rust haustoria. In: MENDGEN, K., LESEMANN, D.E.(Eds.) **Electron microscopy of plant pathogens**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. p.235-250.
- HEATH, M. Resistance of plants to rust infection. **Phytopatology**, v.9, p.971-974. 1981.
- HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistance or susceptible host plants. **Annals of Botany**, v.80, p.713-720. 1997.
- HOOBKAMP, T.J.H., CHEN, W.Q., NIKS, R.E. Specificity of prehaustorial resistance to *Puccinia hordei* and to two inappropriate rust fungi in barley. **Phytopatology**, v.88, p. 856-861. 1998.
- HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredospores. **Transactions British Mycological Society**, v.51, p. 103-112. 1968.

- JACOBS, A.S., PRETORIUS, Z.A., COUTINHO, T.A. Quantification of early infection structures of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat with leaf rust resistance derived from *Triticum monococcum*. **South African Journal of Science**, v.96, p. 86-90. 2000.
- JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, v.8, p.475-487. 1944.
- JUNGHANS, D.T. **Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores Rapt ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV, 2000. 44p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- JUNGHANS, D.T., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. Escala de notas para quantificação da ferrugem do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, 313. (Suplemento). 2000.
- KOBAYASHI, I., MURDOCH, L.J., KUNOH, H., HARDHAM, A.R. Cell biology of early events in the plant resistance response to infection by pathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.S418-S425. (Suppl. I). 1995.
- KOLMER, J.A. Virulence dynamics, phenotypic diversity, and virulence complexity in two populations of *Puccinia triticina* in Canada from 1987 to 1997. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.333-338, 1999.
- KOWALSKA, A, NIKS, R.E. Histology of quantitative resistance in flax to the flax rust fungus (*Melampsora lini*). **Canadian Journal Plant Pathology**, v.21, p. 354-360. 1999.
- LEE, S.T., SHANER, G. Infection processes of *Puccinia recondite* slow- and fast-rusting wheat cultivars. **Phytopathology**, v.74, p.1419-1423. 1984.
- LEFEVRE, F. et al. A single gene cluster controls incompatibility and partial resistance to various *Melampsora laurici-populina* races in Hybrid poplars. **Phytopathology**, v.88, n 2, p.156-163. 1998.
- LENNÉ, J.M., WOOD, D. Plant disease and use of wild germplasm. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p.35-63. 1991.
- LEONARD, K.J., CZOCHOR, R.J. Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.237-258. 1980.
- LITTLEFIELD, L.J., HEATH, M.C. **Ultrastructure of rust fungi**. New York: Academic Press, 1979. 277p.

- LITTLEFIELD, L.J., ARONSON, S.J. Histological studies of *Melampsora lini* resistance in flax. **Canadian Journal of Botany**, v.47, p.1713-1717. 1969.
- LONGO, N., NALDINI, B., DROVANDI, F., GONNELLI, T., TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bulb) Maire on *Mercuriales annua* L. **Cariologia**, v. 47, p. 207-222, 1994.
- MARLATT, R.B., KIMBROUGH, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in South Florida. **Plant Disease Report**, v.63, n.6, p.510-512. 1979.
- MARTENS, J.W. et al. System of Nomenclature for races of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. **Phytopathology**, v.69, p.293-294. 1979.
- MATSUOKA, K., VANETTI, C.A. Mudanças histopatológicas causadas por *Hemileia vastatrix* em cafeeiros apresentando diferentes níveis de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.484-493. 1993.
- NELSON, R.R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J.G., COWLING, E.G (Eds.) **Plant disease: an advanced treatise**. Vol. IV. Academic Press. 1979. p. 23-46,
- NIKS, R.E., DEKENS, R.G. Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedlings. **Phytopathology**, v.81, p.847-851. 1991.
- NIKS, R.E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistance, and nonhost plant genotypes. **Phytopathology**, v.73, p.64-66. 1983.
- NIKS, R.E., KUIPER, H.J. Histology of the relationbetween minor and major genes for resistance of barley to leaf rut. **Phytopathology**, v.73, p. 55-59. 1983.
- NIKS, R.E. Failure of haustorial development as a factor in slow growth and development of *Puccinia hordei* in partially resistant barley seedlings. **Physiological and Molecular Pathology**, v.28, p.309-322. 1986.
- ORTELLI, S., GIEZENDANNER, U., NOSBERGER, J. Effect of the Lr9 resistance gene on pathogenesis of the Wheat leaf rust fungus. **Plant Disease**, v.80, p.14-18. 1996.
- PARLEVLIET, J.E. Resistance of the non-race-specific type. In: **The cereal rust**. Academic Press. 1985. p. 501-525.

- PEI, M.H., ROYLE, D.J., HUNTER, T. Pathogenic specialization in *Melampsora epitea* var. *epitea* on *Salix*. **Plant Pathology**, v 45, p.679-690. 1996.
- RAJENDREN, R.B. Evolution of haustoria in tropical rust fungi. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **99**, v.2, p. 84-88. 1972.
- RAMSTEDT, M. Rust disease on willows – virulence variation and resistance breeding strategies. **Forestry Ecology and Management**, v.121, p. 101-111. 1999.
- ROCABADO, J.M.A. **Progresso da ferrugem da goiabeira causada por *Puccinia psidii* Winter em São Francisco de Itabapoana-RJ**. Campos dos Goytacazes, RJ: UENF. 1999. 36p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense. 1999.
- RUIZ, A.R.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., VALE, F.X.R. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.55-61, 1989.
- RUIZ, R.A.R. ALFENAS, A.C. , MAFFIA, L.A. E BARBOSA, M.M. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.73-81. 1989.
- SACHE, I., ZADOKS, J.C. Life-table analysis of faba bean rust. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p. 431-439, 1995.
- SHURTLEFF, M.C., AVERRE III, C.W. **Glossary of plant-pathology terms**. St Paul: APS Press The American Phytopathological Society. 1997. 361p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. 2000. www.sbs.org.br/secure/estatisticas.htm. (Acesso em: 23/01/02. 15:42).
- STATLER, G.D., McVEY, M.A. Partial resistanceto *Uromyces appendiculatus* in dry edible beans. **Phytopathology**, v.77, p.1101-1103, 1987.
- THOMÉ, G.C.H, MILACH, S.C.K., VOLK, L.B.S., FEDERIZZI, L.C. Tamanho de pústula: um componente importante da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p.262-264, 1997.
- TAKAHASHI, S.S., FURTADO, E.L., CAMARGO, F.R.A., RAMIRO, G.A. Avaliação de clones e procedências de Eucalipto à ferrugem na região do Vale do Paraíba-SP. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.313. 1997. (Suplemento).

- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I., LIBERATO, J.R., ZAMBOLIM, L. QUANT. A software to quantify plant disease severity. IN: **International Workshop on Plant Disease Epidemiology**, 8, 2001. Ouro Preto. proceedings. Ouro Preto, International Society of Plant Pathology, 2001. p.160.
- VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968.
- VIEGAS, A.P. **Índice de fungos da América do Sul**. Campinas: Ed. Instituto Agronômico, 1961. 921 p.
- WATSON, I.A. Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, p. 209-230, 1970.
- WILSON, J., SHANER, G. Individual and cumulative effects of long latent period and low infection type reactions to *Puccinia recondita* in triticale. **Phytopathology**, v. 79, p.101-108, 1989.
- XAVIER, A.A. **Patogênese da ferrugem (*Puccinia psidii*) em folhas e genótipos suscetíveis e resistentes de *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV. 1997. 112 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- XAVIER, A.A., ALFENAS, A.C., MATSUOKA, K., HODGES, C.S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniosporos of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, v.30, p. 277-281, 2001a.
- XAVIER, A.A., A.C. ALFENAS, MATSUOKA, K., GRAÇA, R.N. Variabilidade fisiológica de isolados de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.435. 2000. (Suplemento).
- XAVIER, A.A., MATSUOKA, K., ALFENAS, A.A. Variabilidade fisiológica de isolados de *Puccinia psidii* em diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.443. 2001b. Suplemento.
- ZADOKS, J.C., SCHEIN, R.D. Relation in epidemiologic process. In: **Epidemiology and plant disease management**. Oxford University Press. 1979. p. 29-64.