

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS PARA OBTENÇÃO DE CULTURA AXÊNICA DE *Puccinia*  
*psidii* E DE MARCADORES BIOQUÍMICOS VOLÁTEIS PARA A  
RESISTÊNCIA À FERRUGEM**

**MARÍLIA PIZETTA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP

Maio – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS PARA OBTENÇÃO DE CULTURA AXÊNICA DE *Puccinia*  
*psidii* E DE MARCADORES BIOQUÍMICOS VOLÁTEIS PARA A  
RESISTÊNCIA À FERRUGEM**

**MARÍLIA PIZETTA**

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Martha Maria Passador

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP

Maio – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P695e Pizetta, Marília, 1988-  
Estudos para obtenção de cultura axênica de *Puccinia psidii* e de marcadores bioquímicos voláteis para a resistência à ferrugem / Marília Pizetta. - Botucatu : [s.n.], 2013  
xi, 62 f., fots. color., gráfs. color. : tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2013  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Coorientadora: Martha Maria Passador  
Inclui bibliografia

1. Eucalipto. 2. Fungos-da-ferrugem. 3. Mirtacea. 4. Compostos orgânicos voláteis. 5. *Puccinia psidii*. 6. Marcadores biológicos. I. Furtado, Edson Luiz. II. Passador, Martha Maria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

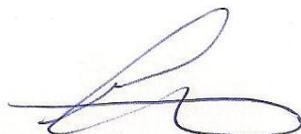
TÍTULO: “ESTUDOS PARA OBTENÇÃO DE CULTURA AXÊNICA DE *Puccinia psidii* E DE MARCADORES BIOQUÍMICOS VOLÁTEIS PARA A RESISTÊNCIA À FERRUGEM”

ALUNA: MARILIA PIZETTA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARTHA MARIA PASSADOR

Aprovado pela Comissão Examinadora



---

PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



---

PROFA. DRA. CHRISTIANE CERIANI APARECIDO



---

PROFA. DRA. JULIANA CRISTINA SODARIO CRUZ

Data da Realização: 07 de maio de 2013.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

*Ao Senhor, que proporciona todos os dias o dom da vida e fortalece minha fé...*  
*Aos meus amados pais, Maria Luíza e Pedro, pelo amor e conforto imensuráveis...*  
*Aos meus queridos irmãos, Simoni e Thiago, minha admiração e ternura...*  
*Ao meu amor, Matheus, por todo carinho, compreensão e apoio.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir alcançar mais uma conquista em minha vida.

A minha família, por todo o amor, carinho e conforto proporcionados.

Ao meu orientador Prof. Edson L. Furtado, pelo ensinamento, conhecimento e amizade ao longo desses anos.

A minha coorientadora Martha M. Passador, por todo conhecimento, dedicação e amizade.

Aos meus colegas de laboratório do Departamento de Defesa Fitossanitária pela convivência agradável e amizade.

Aos colegas da Unicamp, pela parceria e troca de experiências.

A todos os professores, funcionários e alunos dos Departamentos de Defesa Fitossanitária, Ciência Florestal e Solos e Recursos Ambientais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	8
2.1 O eucalipto e sua importância .....	8
2.2 Ferrugem do eucalipto ( <i>Puccinia psidii</i> ) .....	9
2.3 Cultivo axênico de ferrugens .....	13
2.4 Compostos voláteis foliares .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Técnicas para isolamento dos urediniósporos .....	17
3.2 Meios de cultura axênicos .....	18
3.3 Meio de cultura com folhas de jambeiro .....	21
3.4 Características avaliadas .....	23
3.4.1 Contaminação .....	23
3.4.2 Avaliação da germinação dos urediniósporos .....	23
3.4.3 Avaliação do crescimento do tubo germinativo .....	24
3.5 Extração dos compostos voláteis foliares .....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Técnicas para isolamento dos urediniósporos .....	28
4.2 Meios de cultura axênicos e naturais com folhas de jambeiro .....	29
4.2.1 Contaminação .....	29
4.2.2 Avaliação da germinação dos urediniósporos .....	33

4.2.3 Avaliação do crescimento do tubo germinativo.....	36
4.3 Extração dos compostos voláteis foliares.....	43
5. CONCLUSÕES .....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
Tabela 1. Contaminação observada para os diferentes tratamentos (média de vinte e cinco repetições).....	32
Tabela 2. Percentagens de germinação observadas nos diferentes meios de cultura (média de vinte e cinco repetições).....	33
Tabela 3. Crescimento do tubo germinativo de <i>P. psidii</i> em $\mu\text{m}$ em diferentes momentos de avaliação (média de cem repetições). ....	37
Tabela 4. Identificação dos compostos voláteis presentes em folhas sadias de <i>E. grandis</i> x <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> . Iexp.: Índice de Kovats experimental. IK lit.: Índice de Kovats da literatura (Adams, 1995; 2001).....	48

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1: Plantas de jambeiro mantidas em casa de vegetação e utilizadas como fonte de inóculo.....	17
Figura 2: A. e B. Germinação dos esporos de <i>P. psidii</i> em meio ágar-água após 24h; C. “Pesca” do esporo germinado de <i>P. psidii</i> em meio de cultura ágar; D. Deposição do esporo germinado em meio de cultura enriquecido ASZV.....	17
Figura 3: Urediniósporos recém-depositados em meio de cultura enriquecido ASZV.....	18
Figura 4: A. Pesagem dos componentes do meio de cultura; B. Agitação dos componentes da solução em água destilada autoclavada através do agitador magnético; C. mistura dos componentes; D. Ajuste do pH da solução nutritiva; E. Esterilização da solução através de filtragem em membranas de polietileno 0,45 µm e 0,22 µm. ....	19
Figura 5: A-G: Metodologia utilizada para a deposição de urediniósporos de <i>P. psidii</i> em meio de cultura enriquecido.....	21
Figura 6: A-F. Metodologia utilizada para a obtenção do meio de cultura contendo folhas de jambeiro. ....	22
Figura 7: Escala de contaminação utilizada para diferenciar os meios de cultura. ....	23
Figura 8: A. Aparato computacional utilizado para a medição do comprimento do tubo germinativo, B. Medição do tubo germinativo de um urediniósporo em µm.....	24
Figura 9: Plantas de eucalipto utilizadas para extração dos compostos voláteis foliares.....	25
Figura 10: A. Maceração das amostras; B. Pesagem das amostras; C. Sistema de pré-equilíbrio da amostra através de rotação; D. Introdução da fibra para a retenção dos compostos voláteis extraídos da amostra; E. Leitura dos compostos voláteis da amostra. ....	26
Figura 11: A-D. Urediniósporos (germinados em ágar-água após 24 horas) transferidos para o meio de cultura enriquecido ASZV. ....	28
Figura 12: Urediniósporos não germinados após 10 dias da deposição em meio de cultura enriquecido ASZV. ....	29
Figura 13: Contaminação dos meios de cultura enriquecidos. ....	30
Figura 14: Contaminação dos meios de cultura com folhas de jambeiro.....	31

Figura 15: Percentual de germinação de <i>P. psidii</i> no meio de cultura axênico I.....	34
Figura 16: Percentual de germinação de <i>P. psidii</i> no meio de cultura axênico II. ....	34
Figura 17: Percentual de germinação de <i>P. psidii</i> no meio de cultura axênico III. ....	35
Figura 18: Percentual de germinação de <i>P. psidii</i> no meio de cultura com folhas de Jambeiro em diferentes concentrações. ....	36
Figura 19: Crescimento do tubo germinativo de <i>P. psidii</i> em meio de cultura enriquecido I...38	
Figura 20: Crescimento do tubo germinativo de <i>P. psidii</i> em meio de cultura enriquecido II..39	
Figura 21: Crescimento do tubo germinativo de <i>P. psidii</i> do meio de cultura enriquecido III. 40	
Figura 22: Crescimento do tubo germinativo de <i>P. psidii</i> do meio de cultura com folhas de jambeiro. ....	41
Figura 23: Comparação dos meios de cultura e testemunha ágar-água pelo crescimento do tubo germinativo em $\mu\text{m}$ . ....	41
Figura 24: Cromatografia para os materiais de eucalipto resistentes à <i>P. psidii</i> .....	43
Figura 25: Cromatografia para os materiais de eucalipto muito suscetíveis à <i>P. psidii</i> .....	43
Figura 26: Cromatografia dos materiais de eucalipto resistentes à <i>P. psidii</i> .....	44
Figura 27: Cromatografia dos materiais de eucalipto pouco suscetíveis à <i>P. psidii</i> . ....	44
Figura 28: Cromatografia dos materiais de eucalipto moderadamente suscetíveis à <i>P. psidii</i> ..45	
Figura 29: Cromatografia dos materiais de eucalipto muito suscetíveis à <i>P. psidii</i> .....	45
Figura 30: Gráfico de escores das amostras de eucalipto resistentes e suscetíveis à <i>P. psidii</i> . 46	
Figura 31: Gráfico de pesos Modo 1. ....	46
Figura 32: Gráfico de pesos Modo 2. ....	47
Figura 33: Análise multivariada dos analitos presentes nas amostras de plantas resistentes à <i>P. psidii</i> .....	47

## RESUMO

A Ordem Pucciniales (=Uredinales) é constituída por fungos causadores de doenças conhecidas como ferrugens, que ocorrem em muitas espécies vegetais, como a ferrugem das mirtáceas (*Puccinia psidii* Winter). Diante de importantes fitopatógenos, estudos básicos sobre a biologia destas espécies, ainda são pouco realizados, o que torna os dados escassos na literatura. Cultivos axênicos facilitam tais estudos, uma vez que sendo parasitas obrigatórios, se tornam desnecessárias as constantes inoculações em espécies hospedeiras multiplicadoras para a manutenção do inóculo durante a realização de pesquisas. Desse modo, o cultivo axênico apresenta-se importante para estudos relacionados à biologia, patogenicidade e manutenção de culturas puras, sendo este um dos objetivos do presente trabalho. Com relação às doenças, alguns voláteis e metabólitos secundários produzidos, podem atuar como barreiras bioquímicas e, também estimular a germinação e o avanço de microrganismos nos tecidos vegetais. A presença de fitopatógenos e a idade do hospedeiro podem influenciar na formação e constituição dos compostos voláteis. A busca de variedades resistentes é uma alternativa de controle viável e os compostos voláteis podem ser utilizados para identificação de resistência, bem como de suscetibilidade. Foram selecionados os seguintes componentes para preparar o meio de cultura enriquecido: sais, aminoácidos, carboidratos e vitaminas, sendo produzidos três diferentes meios de cultivo axênico: ASZV, com o qual foi obtido o cultivo axênico da ferrugem do chorão (*Melampsora epitea*) e os meios propostos por Schenk e Hildebrandt e por Harvey e Grasham modificados, no qual foi

possível com o cultivo axênico da ferrugem do pinus (*Cronartium flaccidum*). Comparativamente, foram elaborados meios enriquecidos a partir de folhas de jambeiro, em quatro concentrações – 0,5g L<sup>-1</sup>; 1,0g L<sup>-1</sup>; 3,0g L<sup>-1</sup> e 5,0 g L<sup>-1</sup> (gramas de folhas para cada litro de água destilada). Além disso, foram realizadas análises dos compostos voláteis foliares em diferentes materiais de *Eucalyptus* spp., resistentes e suscetíveis a *P. psidii* para uma possível relação entre os compostos presentes nas amostras que possam estar relacionados à resistência a ferrugem das mirtáceas. Os resultados encontrados para o melhor desenvolvimento de *P. psidii* em condições controladas apontaram os meios ASZV modificado, Harvey e Grasham modificado e meio com folhas de jambeiro na concentração 0,5g L<sup>-1</sup> como os meios enriquecidos que propiciaram maior crescimento do tubo germinativo da ferrugem. Para os resultados da extração de compostos voláteis foliares em materiais resistentes e suscetíveis à doença, foram encontrados os analitos eucalyptol e terpinyl acetato- $\alpha$  que estão presentes em folhas de espécies resistentes e que não foram encontrados nas espécies suscetíveis, podendo ser identificados como possíveis biomarcadores para resistência à *P. psidii*.

---

**Palavras-chave:** Ferrugem, *Eucalyptus* spp., cultivo axênico, compostos voláteis.

STUDIES TO OBTAIN AXENIC CULTURE OF *Puccinia psidii* AND BIOCHEMICAL VOLATILE MARKERS FOR RUST RESISTANCE. Botucatu, 2013. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARÍLIA PIZETTA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

Co-adviser: MARTHA MARIA PASSADOR

## SUMMARY

The Order Pucciniales (= Uredinales) consists of fungi that cause diseases known as rust, which occur in many plant species, such as rust of Myrtaceae (*Puccinia psidii* Winter). In front of important pathogens, basic studies about the biology of these species are still little performed, which makes scarce data in literature. Axenic cultures facilitates such studies, once being obligatory parasites, become unnecessary constants inoculations in host species multipliers for maintaining the inoculum during research. This way, the axenic culture presents important for studies related to biology, pathogenicity and maintenance of pure cultures, which is one of the objectives of this work. In relation to diseases, some volatile and secondary metabolites produced may act as biochemical barriers, and also stimulate germination and advance of microorganisms in plant tissues. The presence of pathogens and age of host may influence the formation and constitution of volatile compounds. The search for resistant varieties is a viable alternative to control and the volatile compounds may be used for identification of resistance as well as susceptibility. The following components were selected to prepare the culture medium enriched: salts, amino acids, carbohydrates and vitamins, which produced three different axenic culture media: medium ASZV with which it was obtained axenic culture of rust willow (*Melampsora epitea*), and others two media proposed by Schenk and Hildebrandt and Harvey and Grasham

modified, that succeeded the axenic culture of rust pine (*Cronartium flaccidum*). Comparatively, enriched media were prepared from leaves of Jambeiro at four concentrations - 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1,0 g L<sup>-1</sup>, 3,0 g L<sup>-1</sup> and 5,0 g L<sup>-1</sup> (grams of leaves to each one liter of distilled water). In addition, were made analyses of leaves volatile compounds in different materials *Eucalyptus*, resistant and susceptible to *P. psidii* for a possible relationship between the compounds present in the samples that may be related to the rust of Myrtaceae. The results found for the optimal development of *P. psidii* under controlled conditions showed the culture media ASZV modified, Harvey and Grasham modified and the medium with leaves of Jambeiro with concentration 0,5 g L<sup>-1</sup> as the enriched media which promoted greater growth germinative tubes of rust. For the results of extraction of leaves volatile compounds in materials susceptible and resistant to the disease, were found the analytes eucalyptol and terpinyl acetate- $\alpha$  which are present in leaves of resistant species and which were not found in susceptible species, may be identified as potential biomarkers for resistance to *P. psidii*.

---

**Keywords:** Rust, *Eucalyptus* spp., axenic culture, volatile compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do eucalipto, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, teve seu primeiro relato no Brasil em 1929 (Gonçalves, 1929), e foi formalmente descrita em 1944, no Rio de Janeiro (Joffily, 1944). O fungo *Puccinia psidii* tem sua origem na América do Sul, ocorrendo desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina, sendo considerada uma das doenças mais severas para a cultura do eucalipto no Brasil (Aparecido, 2001). Essa doença incide tanto em mudas no viveiro, quanto em plantas jovens no campo, até os estádios fenológicos A e B (Ferreira, 1989), aproximadamente, nos dois primeiros anos de plantio, em brotações após o corte raso e em jardins e minijardins clonais.

Poucos ciclos vitais de ferrugens verdadeiramente tropicais, mesmo daquelas ferrugens economicamente importantes, foram até hoje, demonstrados por estudos de inoculações experimentais, e a necessidade de estudos de campo e de laboratório tem sido enfatizada por diversos uredinologistas (Petersen, 1974; Savile, 1976; Hennen et al., 1990). É o caso de alguns ciclos desconhecidos, por exemplo, das ferrugens do café (*Hemileia vastatrix*), milho (*Puccinia polysora* e *Phakopsora zae*), soja (*Phakopsora pachyrizi* e *P. meibomiae*), amendoim (*P. arachidis*), das mirtáceas (*P. psidii* – ciclo vital parcialmente esclarecido) e de muitas outras plantas cultivadas (Aparecido, 2001; Figueiredo e Passador, 2008).

Apesar da importância destes fitopatógenos, certas particularidades de sua biologia ainda são desconhecidas ou pouco conhecidas. Isto se dá devido à dificuldade de

cultivá-los em laboratório, juntamente com a falta de metodologias adequadas para o progresso das pesquisas. Como resultado destas dificuldades, dados básicos sobre a biologia desses microrganismos são escassos nas literaturas, dificultando o manejo das doenças por eles provocadas (Aparecido, 2001).

Com a finalidade de aprimorar os conhecimentos relacionados aos agentes causais de ferrugens, foram desenvolvidos estudos envolvendo o cultivo axênico de algumas espécies, como por exemplo, *Gymnosporangium juniperi virginianae*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Melampsora lini*, *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, *Phragmidium mucronatum*, *Uromyces*, *Pucciniastrum*, *Endocronartium*, e *Phragmidium*, *Peridermium pini*, *Cronartium flaccidum*, *Melampsora epitea* e *Melampsora larici-tremulae* (Hotson e Cutter Jr., 1951; Cutter Jr., 1959; Williams et al., 1966; Turel, 1969; Hollis, et al., 1972; Rahbar Bhatti e Shattock, 1980; Maclean, 1982; Yamaoka e Katsuya, 1984a; Pei e Gibbs, 1992; Moricca e Ragazzi, 1994; Carvalho Jr. et al., 1998; Moricca, et al. 2000).

O cultivo axênico *in vitro* pode refinar o conhecimento sobre o metabolismo de agentes causais de ferrugens, dados genéticos, modo de ação do fungo na planta hospedeira, (biologia, infecção, produção de metabólitos, sinalização celular, etc.). Segundo Moricca (2010), devido a estas características, trabalhar com os micélios puros de fungos da Ordem Pucciniales, poderá gerar um grande impulso nas pesquisas genéticas mais avançadas.

De acordo com Aparecido (2001), em decorrência da habilidade em enfrentar condições ambientais adversas, pode-se perceber a considerável importância das Pucciniales, no que se refere aos significativos prejuízos que podem causar à agricultura.

Pelo fato dos fungos biotróficos sobreviverem apenas em tecido vegetal vivo e da dificuldade para mantê-los em ambiente controlado cultivado em meios artificiais, torna-se necessário a realização de pesquisas relacionadas a métodos de isolamento destes fitopatógenos, em cultivo axênico, corroborando estudos do ciclo biológico, variabilidade, testes de resistência clonal, entre outros, que auxiliam no manejo de doenças.

Estes componentes presentes nos meios de cultura enriquecidos têm a finalidade de imitar ou de se aproximar do efeito dos nutrientes químicos naturais presentes nas folhas das plantas, a fim de se obter um efeito semelhante de crescimento como aquele observado na natureza.

Um exemplo dessas substâncias químicas naturais são os compostos fenólicos que têm sido estudados como forma de controle de doenças, pelas características antimicrobianas quando sintetizados (Nascimento et al., 2000), mas também podem estimular o crescimento de microrganismos. Desse modo, espera-se que o estudo dessas substâncias naturais, com efeito fungitóxico ou não, contribua para identificar qual(is) componente(s) estão relacionados à doença em plantas.

O estudo teve como objetivos: trabalhar com o cultivo de urediniósporos *in vitro* da ferrugem do eucalipto, *Puccinia psidii*, utilizando-se diferentes meios de culturas e, realizar a quantificação e identificação de substâncias voláteis em dezesseis materiais sadios de eucalipto resistentes e suscetíveis a *P. psidii*, e sua possível relação com a resistência à ferrugem das mirtáceas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O eucalipto e sua importância

O gênero *Eucalyptus* spp. ocorre naturalmente na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, tais como Flores, Alor e Wetar e pertence à família Myrtaceae. Com um pouco mais de 600 espécies e sub-espécies, apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem. Menos de 1 % dessas 600 espécies têm sido usadas com propósitos industriais. Assim, o uso do eucalipto na indústria mundial é baseado em duas espécies principalmente: *E. globulus*, *E. grandis* e seu híbrido *E. urophylla* (Cotterill e Brolin, 1997).

A importância da cultura do eucalipto para o Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. Os produtos florestais participam com 2,9% do Produto Interno Bruto Brasileiro e representam 4,2% das exportações nacionais, geram cerca de setecentos mil empregos diretos e quatro milhões de indiretos (Painel Florestal, 2010; Abraf, 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - ABRAF (2010; 2012), o Brasil tem, aproximadamente, 6,6 milhões de hectares de florestas plantadas, (sendo 74,8% de eucalipto), esta área equivale a 0,77% do território do País. Além da importância econômica, as florestas plantadas também servem como fonte de energia

renovável de biomassa e de produtos ambientalmente corretos, recuperam áreas degradadas, conservam importantes ecossistemas e espécies ameaçadas de extinção e são responsáveis pela geração de riquezas em áreas distantes de centros urbanos do País.

Atualmente, as áreas de florestas com eucalipto estão em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura deste grupo de espécies como as Regiões Sul e Sudeste, bem como, em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura, como Maranhão, Tocantins, Piauí e Mato Grosso do Sul (Abraf, 2012). Porém, com tamanha expansão da cultura, não existem materiais genéticos totalmente resistentes a pragas e doenças, inclusive à ferrugem do eucalipto.

As espécies *Eucalyptus grandis*, *E. cloeziana*, *E. phaeotricha*, *E. globulus* e *E. nitens* são as mais suscetíveis à ferrugem. Além do eucalipto, a ferrugem incide em várias outras espécies nativas ou exóticas da família Myrtaceae, como goiabeira, jambeiro, jabuticabeira, jamelãozeiro, melaleuca e calistemon, entre outras (Furtado e Marino, 2003; Alfenas et al., 2004).

## 2.2 Ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*)

A ferrugem das mirtáceas é uma doença causada pelo fungo basidiomiceto *Puccinia psidii* Winter pertencente à Ordem Pucciniales (syn. Uredinales). Tais microorganismos são parasitos ecologicamente obrigados, uma vez que algumas poucas espécies puderam ser mantidas em laboratório, graças ao desenvolvimento de culturas axênicas (Coffey, 1975; Cutter Jr., 1959; Figueiredo e Coutinho, 1994; Katsuhiko e Katsuya, 1985; Martins et al., 1995).

Com mais de 6.000 espécies, distribuídas por todo o mundo, as Pucciniales (Ferrugens) constituem uma das maiores ordens naturais de fungos, compreendendo mais de um terço de todos os basidiomicetos conhecidos (Ainsworth, 1971). Os fungos da ordem Pucciniales são considerados como de distribuição mundial, e responsáveis por algumas das mais devastadoras doenças de plantas cultivadas. Nenhum outro grupo de fitopatógenos apresenta a capacidade de infectar um número tão grande de plantas de interesse econômico como as Pucciniales (Hiratsuka, 1983).

A doença apresenta potencial de causar perdas em áreas tropicais e subtropicais que possuem florestas de eucalipto (Coutinho et al., 1998). Em estudos realizados no Brasil, estimou-se que, de pelo menos 3.000 espécies de ferrugens provavelmente existentes no país (Hennen et al., 1982), são conhecidas apenas 725 espécies e das quais pouco se sabe sobre a biologia e ciclos de vida dos patógenos, devido à dificuldade de cultivá-los em laboratório (Figueiredo e Passador, 2008).

As ferrugens estão distribuídas em regiões temperadas e tropicais úmidas, tendo o vento como o seu principal disseminador a longas distâncias (até mesmo intercontinentais). A sobrevivência destes patógenos, devido ao parasitismo obrigatório, ocorre em hospedeiros intermediários principalmente na forma de urediniósporos, mas geralmente os teliósporos atuam como estrutura de resistência e garantem a sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro (Krugner, 1980).

A infecção ocorre em brotações do hospedeiro, com o patógeno atacando tecidos jovens como folhas, inflorescências e gemas, sendo observado tanto em plantas adultas no campo, como em mudas na fase de viveiro (Silveira, 1951; Galli, 1980; Souza, 1985; Ferreira, 1989). As condições favoráveis para a ocorrência da infecção compreendem fatores como: temperatura na faixa de 18-25°C, períodos prolongados de molhamento foliar (orvalho noturno ou garoas por períodos superiores à 6h) e a existência de órgãos juvenis (folhas jovens e terminais de crescimento). Porém, órgãos maduros, ausência de molhamento e temperatura acima de 30°C e abaixo de 10°C desfavorecem a infecção (Ruiz e Alfenas, 1989). Quando as plantas atingem o estágio fenológico B (Ferreira, 1989), ou seja, atingem cerca de 3-4 m de altura, elas se tornam mais resistentes à doença, provavelmente por causa da diminuição das condições favoráveis à infecção nas partes jovens suscetíveis (Alfenas et al., 2004).

Portanto, a infecção ocorre quando os esporos (predominantemente urediniósporos) atingem a planta hospedeira suscetível, germinando quando a umidade do ar está alta. Desse modo, ocorre a formação do apressório sobre a planta havendo penetração através dos estômatos e a colonização através de micélio intercelular e emissão de haustórios para o interior das células e quando o patógeno inicia sua reprodução, ocorre um rompimento da epiderme foliar ficando exposta a massa de uredósporos. Estas pústulas são geralmente

salientes e podem coalescer, tomando uma parte considerável do limbo foliar (Figueiredo e Carvalho Jr., 1994).

De acordo com Alfenas e colaboradores (2004), a principal característica para sua diagnose é a esporulação uredinospórica, pulverulenta e de coloração amarela sobre os órgãos afetados. Em materiais altamente suscetíveis, causa deformações, necroses, hipertrofia, minicancros e morte das porções terminais de crescimento. Embora a fase uredinial seja a mais comum e a principal forma de disseminação da doença, em épocas mais quentes, teliósporos também podem ser produzidos.

Quando não há condições favoráveis, ocorre a formação de estruturas denominadas teliósporos, que possibilitam a sobrevivência do patógeno. Estas estruturas, apresentam ainda, em suas paredes, substâncias auto-inibidoras da germinação que possibilitam a sobrevivência do esporo na ausência do hospedeiro, porque impedem que ocorra a germinação de todos os esporos ao mesmo tempo (Figueiredo e Carvalho Jr., 1994, 1995). Tais substâncias podem ser removidas pelas águas das chuvas ou irrigação. Como resultado dessas “estratégias” de sobrevivência, a infecção primária pode ocorrer assim que as condições tornam-se favoráveis, devido à liberação dos basidiósporos infectivos produzidos em decorrência da germinação dos teliósporos, dando continuidade à disseminação da doença (Ferreira, 1983).

O clima é um fator essencial para exercer influência marcante sobre o desenvolvimento de doenças, podendo atuar sobre o patógeno, sobre o hospedeiro e sobre a interação patógeno x hospedeiro. O conhecimento das exigências climáticas dos fitopatógenos é de grande importância para o entendimento da evolução da doença no campo, e para se prever, com certa precisão, a ocorrência de epidemias em determinadas condições climáticas e agrícolas de uma região. Contudo é na fase de germinação e penetração que o clima pode atuar mais diretamente sobre o patógeno, pois este ainda não ganhou o interior do hospedeiro e está mais exposto à ação do ambiente (Krugner, 1980).

Observa-se, portanto que o ataque de *P. psidii* depende de condições ambientais favoráveis associadas à fenologia do hospedeiro. Devido a tais dependências, é provável que o patógeno possua mecanismos de sobrevivência altamente eficientes, uma vez que ambas as condições não ocorrem, ao mesmo tempo, em qualquer época do ano.

Em condições de infecção natural, altos níveis de intensidade da ferrugem do eucalipto são, geralmente, esporádicos sobre procedências e progênes suscetíveis, podendo ocorrer durante um mês apenas, ou de cinco ou mais meses durante o ano (Carvalho et al., 1994). Esta ocorrência é dada, segundo Ruiz et al. (1989a; 1989b), quando prevalecem, durante um período mínimo de oito horas, as temperaturas noturnas entre 18° e 25°C e umidade relativa superior ou igual à 90%. Posto isso, no Brasil, as condições favoráveis para a ocorrência da ferrugem ocorrem nos meses de maio a agosto, períodos em que foram registrados altos índices da doença no campo (Ruiz et al., 1989a; Takahashi et al., 1999).

Os severos ataques do patógeno podem provocar perda total da produção (Junqueira et al., 1997). Com relação ao eucalipto, a ferrugem é uma doença muito comum e severa em plantações de procedências muito suscetíveis e com menos de dois anos de idade (Ferreira, 1989; Demuner e Alfenas, 1991).

Bergamin Filho e Amorim (1996) definem epidemia como sendo o aumento da intensidade e/ou extensão (área geográfica) da doença em uma dada população de plantas, que no caso da ferrugem, esta pode acarretar danos de até 25%, em média, na produção no Estado de São Paulo (Furtado et al., 2001). O dano é definido como qualquer redução na quantidade ou na qualidade da produção devido a injúrias causadas pelo patógeno (Nutter et al., 1991). Desse modo, as estimativas confiáveis dos prejuízos provocados por microrganismos são um pré-requisito para o desenvolvimento de qualquer programa bem sucedido de controle de doença (Walker, 1983).

Takahashi (2002) quantificou e avaliou os danos da ferrugem sobre o eucalipto e observou que existe diferença significativa entre plantas infectadas e plantas não infectadas, avaliadas aos 11 meses de idade. Os dados foram bem expressivos, para a altura média (a diferença entre plantas sadias e infectadas foi de 35,81%), para o diâmetro à altura do peito (50,49%) e, para o volume individual (98%). Os danos em árvores que apresentaram sintomas da ferrugem variaram de 19,79 a 41%, resultados estes, consideráveis para o manejo desta cultura.

Desse modo, diante da importância da ferrugem em causar danos à silvicultura, tornam-se necessárias pesquisas para manter este fitopatógeno isolado em cultivo

artificial e aprimorar estudos do ciclo biológico, variabilidade, testes de resistência clonal, entre outros, que auxiliam no manejo de doenças.

### 2.3 Cultivo axênico de ferrugens

Os estudos sobre cultivo axênico de fungos fitopatogênicos começaram a partir de 1950, com o desenvolvimento de trabalhos relacionados aos meios de cultura enriquecidos com extratos vegetais e compostos suplementares de crescimento, obtendo-se informações importantes sobre os fatores responsáveis pelo parasitismo obrigatório das Pucciniales (Cutter Jr., 1959).

Na literatura, alguns pesquisadores obtiveram culturas axênicas de algumas espécies de ferrugens, como exemplo: Hotson e Cutter (1951) iniciaram os estudos com *Gymnosporangium juniperi virginianae* obtendo sucesso, Williams et al. (1966) que estabeleceram um meio de cultura para o crescimento de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Ericss. & Henn. Turel (1969) obteve cultura axênica da ferrugem *Melampsora lini*, responsável por causar danos em linho; Hollis et al. (1972) conseguiram cultivar a ferrugem *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* em meio artificial e Rahbar Bhatti e Shattock, (1980) obtiveram um meio axênico para a ferrugem *Phragmidium mucronatum* que é patogênica a várias espécies do Gênero *Rosa*.

No Japão, Yamaoka e Katsuya (1984a) obtiveram êxito, a partir de fragmentos de folhas infectadas e cuidadosamente tratadas para evitar contaminações, em cultivar *Melampsora epitea* e outras ferrugens em meio artificial. Na Europa, Pei e Gibbs (1992) obtiveram o cultivo axênico da *Peridermium pini*, ferrugem do Pinus a partir de aeciósporos, Moricca e Ragazzi (1994) conseguiram obter o cultivo em meio artificial da ferrugem *Cronartium flaccidum* em Pinus e Moricca et al. (2000) isolaram *Melampsora larici-tremulae* patogênica ao Pinus em meio artificial. Em North Dakota, Walla (2003) obteve culturas de *Peridermium harknessii*, *Cronartium quercuum* f.sp. *banksianae* e *C. comandrae*, depois de testados nove meios axênicos.

No Brasil, os primeiros trabalhos com cultivos axênicos realizados por Carvalho Júnior e colaboradores (1998) foram desenvolvidos com a ferrugem do Chorão (*Salix babylonica*) causada por *Melampsora epitea*. Os autores obtiveram o sucesso a partir

dos urediniósporos de *M. epitea* depositados em meio ASZV modificado, resultando em colônias circulares ou esféricas regulares, compactas, pigmentadas em cor laranja brilhante e compostas de hifas curtas, vesiculosas, irregulares, com produção de urediniospóros e paráfises morfológicamente semelhantes aos desenvolvidos na planta hospedeira. Quando inoculados em *S. babylonica*, os urediniósporos desenvolvidos nas culturas axênicas mostraram-se infectivos, reproduzindo os sintomas da ferrugem. As colônias apresentaram o maior crescimento em pH 6.0, entre as temperatura de 18 – 24°C.

As culturas axênicas facilitam os estudos, uma vez que se tornam desnecessárias as constantes inoculações de grande quantidade de hospedeiros para a manutenção do patógeno durante a realização de pesquisas (Aparecido, 2001). O cultivo axênico permite estudos mais profundos sobre a biologia e genética do patógeno e suas relações com o hospedeiro, possibilitando o detalhamento do ciclo de vida da espécie patogênica e suas particularidades. Esta ferramenta também auxilia no manejo de doenças, proporcionando um controle eficaz desses patógenos de grande importância.

## **2.4 Compostos voláteis foliares**

Na natureza, para um patógeno infectar uma planta é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa das plantas. Para isso, os patógenos utilizam, principalmente, substâncias tais como enzimas, toxinas e hormônios, cuja importância varia grandemente nas interações hospedeiro-patógeno. Por outro lado, as plantas necessitam se defender dos microrganismos potencialmente invasores.

Com base em estudos realizados na área que envolve a fisiologia e a bioquímica fitopatológica, estudos permitiram o conhecimento de diferentes mecanismos de resistência utilizados pelos vegetais contra os fitopatógenos. Alguns destes mecanismos são pré-formados pelo hospedeiro, estando presentes antes da chegada do patógeno, como os fenóis, alcalóides, glicosídeos fenólicos. Outros mecanismos são os pós-formados, ou seja, aqueles ativados após a chegada do patógeno, como as proteínas relacionadas a patogênese, fitoalexinas e espécies ativas de oxigênio (Romeiro e Garcia, 2009).

Vários extratos de espécies vegetais têm sido utilizados no controle de doenças, pelas características antimicrobianas de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (Nascimento et al., 2000).

Uma técnica recente que vem sendo muito utilizada para a extração de compostos voláteis em plantas denomina-se Micro Extração em Fase Sólida (Solid-Phase Micro-extraction – SPME) (Arthur e Pawliszyn, 1990), que consiste em uma técnica rápida e simples para extração e pré-concentração das substâncias voláteis de diversas partes de um vegetal, como frutos e folhas. Para a análise da liberação dos voláteis extraídos das plantas, o sistema utiliza-se a técnica SPME aliado à cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-MS), por apresentar um maior incremento na detectabilidade destes compostos (Dallüge et al., 2003).

A principal vantagem de se utilizar o perfil metabólico obtido por SPME combinado a GC×GC-MS é a possibilidade de se diagnosticar a doença na planta, ainda em seus estágios iniciais. Entretanto, muitas outras fontes causadoras de estresse na planta também podem influenciar no perfil cromatográfico medido (Hantao, et al., 2013).

Análises e diferenciação de compostos voláteis presentes nas folhas de materiais sadios obtidas pela utilização da técnica de Micro Extração em Fase Sólida com a extração do headspace do material vegetal, podem oferecer informações importantes relacionadas à resistência ou suscetibilidade de diferentes materiais de *Eucalyptus* a ferrugem, apenas pela presença ou ausência de determinados compostos quando comparados e que possam favorecer o estabelecimento do fungo no interior do hospedeiro.

Desse modo, espera-se que a descoberta dessas substâncias naturais, com efeito fungitóxico ou não, contribua para identificar qual(is) componente(s) estão relacionados à doença em plantas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de cultivo axênico foi conduzido na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas, localizada no município de Botucatu, Estado de São Paulo. O município de Botucatu tem como coordenadas geográficas da região central 22°51'03"S e 48°25'37"W e altitude de 786m.

A coleta do material vegetal com os urediniósporos necessários para o experimento deu-se a partir de folhas de jambeiro, planta pertencente à Família das Myrtaceae.

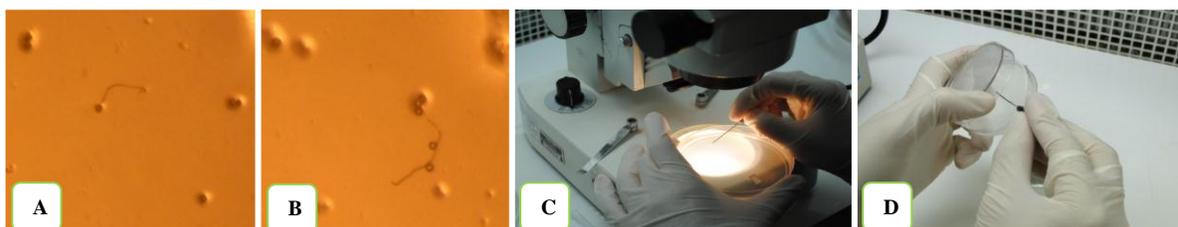
As folhas de jambeiro (Figura 1) foram escolhidas como principal fonte de inóculo de urediniósporos de *P. psidii* por ser um hospedeiro universal da doença, ou seja, apresentar produção de urediniósporos durante o ano todo comparado à mesma doença em eucalipto, que apresenta maior intensidade em campo entre os meses de maio a agosto (Takahashi, 1999). As mudas de jambeiro doentes foram mantidas em casa de vegetação, como fonte de inóculo, a uma temperatura próxima a 25°C e com irrigação controlada.



**Figura 1:** Plantas de jambeiro mantidas em casa de vegetação e utilizadas como fonte de inóculo.

### 3.1 Técnicas para isolamento dos urediniósporos

Foram utilizadas duas técnicas para conseguir isolar os esporos de ferrugem em meio de cultura. Primeiramente, foi utilizada uma metodologia baseada no isolamento monosporórico que consistiu em transferir um único urediniósporo de *P. psidii* previamente germinado em ágar-água (AA) para o meio de cultura enriquecido e para o meio AA como testemunha, conforme Figura 2.



**Figura 2:** **A. e B.** Germinação dos esporos de *P. psidii* em meio ágar-água após 24h; **C.** “Pesca” do esporo germinado de *P. psidii* em meio de cultura ágar; **D.** Deposição do esporo germinado em meio de cultura enriquecido ASZV.

Outra técnica utilizada consistiu na transferência de uma porção de urediniósporos para o meio de cultura enriquecido e testemunha AA (Figura 3), acreditando-se que o desenvolvimento dos urediniósporos de *P. psidii* não ocorre com esporos únicos e precisam do estímulo de outros urediniósporos para se desenvolverem. Para isso, foram transferidos cerca de 20 esporos para cada placa, porém ainda não germinados, com o intuito de observar a ocorrência de algum estímulo no crescimento do patógeno.



**Figura 3:** Urediniósporos recém-depositados em meio de cultura enriquecido ASZV.

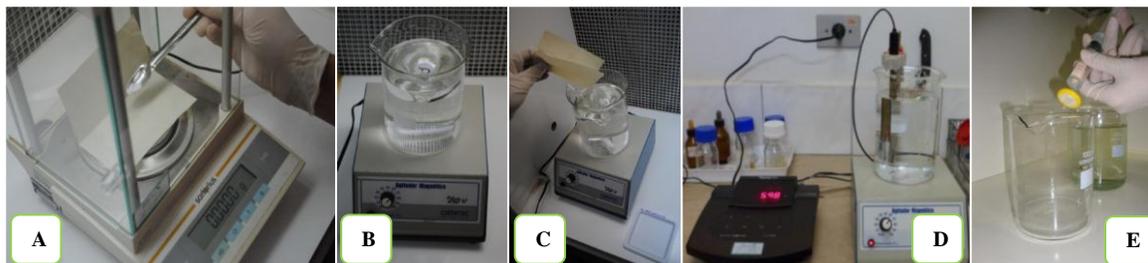
### 3.2 Meios de cultura axênicos

Foram utilizadas três diferentes composições, sendo os meios enriquecidos descritos a seguir como Meios I, II e III, e para os quais já foi obtido sucesso quanto ao cultivo de algumas espécies de ferrugens (Carvalho Jr., et al., 1998; Moricca e Ragazzi, 1994).

➤ Meio I - Meio de cultura ASZV sugerido por Kuck (1979) e modificado, tendo sido utilizado para o cultivo axênico de *Melampsora epitea*, ferrugem do chorão (Carvalho Jr., et al., 1998). O referido meio contém os seguintes componentes nas concentrações finais ( $L^{-1}$  de água destilada autoclavada): sais minerais:  $NaNO_3$  (0,5 g),  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (0,328 g), KCl (0,125 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,125 g),  $FeSO_4$  (0,0025 g); os carboidratos: glucose (7,5 g), frutose (3,75 g) e sacarose (3,75 g); dos L-aminoácidos: Tyr (32 mg), Ala (214 mg), Trp (30 mg), Asp (50 mg), Asn (100 mg), Thr (72 mg), Ser (206 mg), Glu (274 mg), Gln (150 mg), Pro (30 mg), Gly (74 mg), Cys-HCl (150 mg), Val (42 mg), Met (25 mg), Ile (30 mg), Leu (32 mg), Phe (34 mg), GABA (402 mg), Lys-HCl (60 mg), His (6 mg) e Arg (44 mg); as vitaminas: mio-inositol (0,175 g), ácido nicotínico (1 mg), tiamina-HCl (10 mg) e piridoxina-HCl (1 mg); do tampão MES (3,9 g). Também foram adicionados: 0,5% de extrato de levedura, ácido indol acético (1 mg), cinetina (1 mg) e os antibióticos Oxitetraciclina e Claforan (25 mg).

O pH do meio foi ajustado para 6,0, de acordo com Carvalho Jr. e colaboradores (1998). Em seguida, o meio foi submetido a uma esterilização através de uma pré-filtragem em membrana de polietileno com porosidade de  $0,45 \mu m$  e de outra filtragem em

membrana de polietileno com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . Ao meio estéril foi acrescentado ágar-água estéril 2% a 60°C, sendo a mistura distribuída em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (Figura 4).



**Figura 4:** A. Pesagem dos componentes do meio de cultura; B. Agitação dos componentes da solução em água destilada autoclavada através do agitador magnético; C. mistura dos componentes; D. Ajuste do pH da solução nutritiva; E. Esterilização da solução através de filtragem em membranas de polietileno 0,45  $\mu\text{m}$  e 0,22  $\mu\text{m}$ .

➤ Meio II - Meio de cultura Schenk e Hildebrandt (1972) modificado, utilizado para o cultivo axênico de *Cronartium flaccidum*, ferrugem do pinus (Moricca e Ragazzi, 1994). O referido meio contém os seguintes componentes nas concentrações finais ( $\text{L}^{-1}$  de água destilada autoclavada):  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (300 mg),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (5 mg),  $\text{CaCl}_2$  (151 mg),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,2 mg),  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 mg),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (15 mg),  $\text{MgSO}_4$  (195,4 mg),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10 mg), KI (1mg),  $\text{KNO}_3$  (2500 mg),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1 mg),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 mg), Bacto-Ágar (20g) com adição de alguns componentes para enriquecer o meio, de acordo com Moricca e Ragazzi (1994), tais como: extrato de carne (3 g), extrato de malte (1 g), sacarose (30 g), cinetina (2 mg), 2,4-D (0,5 mg).

➤ Meio III - meio axênico Harvey e Grasham (1974) modificado por Pei e Pawsey (1990), por Pei e Gibbs (1992) e por Moricca e Ragazzi (1994), utilizado para o cultivo axênico de *Cronartium ribicola* e *Cronartium flaccidum*, ferrugem do pinus (Harvey e Grasham (1974); Moricca e Ragazzi (1994)). O referido meio contém os seguintes componentes nas concentrações finais ( $\text{L}^{-1}$  de água destilada autoclavada):  $\text{CaCO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (500 mg),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (281,73 mg),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (25 mg),  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (250 mg),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (140 mg),  $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (4,14 mg), Bacto-Ágar (20g) com adição de alguns componentes para

enriquecer o meio, de acordo com Moricca e Ragazzi (1994), tais como: extrato de carne (4 g) e sacarose (30 g).

O pH dos meios II e III foi ajustado para 5.7-5.8, de acordo com Moricca e Ragazzi (1994), Figura 4 (A – D). Em seguida, os meios foram autoclavados a 120°C por 20 minutos (tempo menor que o comumente utilizado para preservar os componentes da desnaturação) e distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Para todos os meios de cultivo enriquecidos foram avaliadas duas concentrações, sendo uma de 50% de solução nutritiva na proporção 1:1 (meio axênico: meio ágar-água) e outra concentração de 80% de solução nutritiva na proporção 4:1 (meio axênico: meio ágar-água). Pelo fato do Meio de cultura I não poder ser autoclavado, devido à forma de esterilização ocorrer pelo método de filtração em membranas, foram preparadas soluções nutritivas em diferentes concentrações a fim de avaliar qual seria mais favorável para o crescimento do patógeno, ou seja, qual dosagem seria mais adequada para *P. psidii* sem haver falta ou excesso de sais minerais, vitaminas, aminoácidos e carboidratos, sendo o mesmo princípio tratado para os Meios II e III. Para fins de comparação o meio de cultura padrão ágar-água (AA) foi utilizado como testemunha.

Portanto, os experimentos com meios de cultura enriquecidos foram constituídos por seis tratamentos, sendo uma espécie de ferrugem (*P. psidii*), três meios enriquecidos (Meios I, II e III) e duas concentrações de meios enriquecidos (50% e 80%).

Após o preparo dos meios, os urediniosporos foram coletados das folhas de jambeiro com o auxílio de uma agulha histológica estéril, sendo suspensos em solução salina 0,8% autoclavada, a fim de se evitar contaminação por bactérias. Desta suspensão, foram depositados 20µL em placas de Petri nos meios de cultura ágar-água e enriquecidos I, II e III, contendo cinco réplicas (gotas de suspensão) para cada placa, somando 5 repetições (placas) para cada tratamento.

Após a absorção total da parte líquida da suspensão dos meios ágar-água e enriquecidos, as placas foram vedadas e acondicionadas na câmara de temperatura controlada B.O.D. a 21-22°C, que corresponde a temperatura média de crescimento (Carvalho Jr. et al.,1998) sem fotoperíodo a fim de proporcionar a germinação dos esporos de ferrugem.



**Figura 5: A-G:** Metodologia utilizada para a deposição de urediniósporos de *P. psidii* em meio de cultura enriquecido.

Na Figura 5 está apresentada a descrição da metodologia utilizada, de modo que as Figuras A e B apresentam os urediniósporos de *P. psidii* coletados da folha de jambeiro com o auxílio de uma agulha histológica estéril, depositados em tubo eppendorf (Figura C) contendo solução salina 0,8%, até a obtenção de uma suspensão levemente amarelada (Figura D). Em câmara de fluxo laminar, foram depositados 20µL (Figura E) da suspensão contendo os urediniósporos (Figura F) com um micropipeta em cinco pontos da placa de Petri (Figura G), contendo os meios de cultura enriquecidos e AA como testemunha (controle).

### 3.3 Meio de cultura com folhas de jambeiro

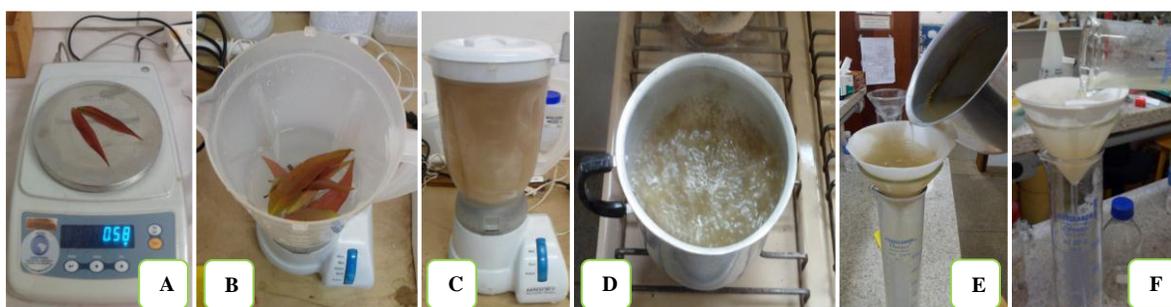
Para complementar o presente estudo e comparar a germinação e o crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* nos meios de cultura enriquecidos com um meio de cultura mais próximo de folhas do hospedeiro, foram elaborados meios de cultura naturais contendo folhas de jambeiro, divididos em diferentes concentrações de folhas, contendo os nutrientes necessários para o estabelecimento da ferrugem em campo. Para a elaboração destes meios de cultura contendo folhas de jambeiro, fez-se a coleta das folhas mais jovens da planta (até o terceiro par de folhas) que são mais suscetíveis a ocorrência da ferrugem. Estas folhas

foram pesadas em balança (Figura 6. A) ajustando as quatro concentrações utilizadas no ensaio para 0,5g; 1g; 3g e 5g por 1 L de água destilada.

Inicialmente, as concentrações utilizadas basearam-se no teor de sacarose (presente em todos os meios de cultura enriquecidos, variando de 3,75g L<sup>-1</sup> para o Meio I e 30g L<sup>-1</sup> para os Meios II e III), sendo dispostos nas seguintes concentrações: 3g; 15g e 30g de folhas por 1L de água destilada, porém, não foram obtidos resultados para a germinação e crescimento do tubo germinativo nas concentrações 15g e 30g, sendo observados alguns resultados somente para a menor concentração (3g). Desta forma, o teste foi realizado novamente ajustando as concentrações para 0,5g, 1g, 3g e 5g de folhas de jambeiro por 1L de água destilada.

Em seguida, as folhas foram trituradas em liquidificador com um litro de água destilada estéril (Figuras B e C) até obter uma solução bem uniforme. Esta solução permaneceu em fervura por cerca de cinco minutos (Figura D) para que os compostos presentes nas folhas fossem transferidos para a solução. Atingido o tempo de fervura, a solução foi filtrada através de papel filtro (Figura E), repetindo-se o processo três vezes, a fim de retirar todos os resquícios das folhas trituradas da solução (Figura F).

Após percorrer todas as etapas descritas, foi acrescentado ágar-água na solução de folhas de jambeiro e, esta foi autoclavada a 120°C por 20 minutos, sendo distribuídas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.



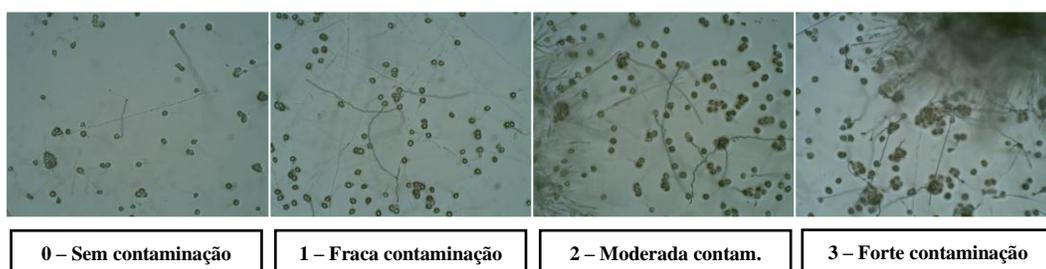
**Figura 6: A-F.** Metodologia utilizada para a obtenção do meio de cultura contendo folhas de jambeiro.

### 3.4 Características avaliadas

#### 3.4.1 Contaminação

Após a deposição da suspensão contendo os urediniósporos para os meios de cultura enriquecidos nas diferentes concentrações e para o meio ágar-água, foi observado o grau de contaminação das placas durante o período de avaliação, comparando-os com a riqueza dos meios de cultura e o crescimento do tubo germinativo. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento contendo cinco réplicas para cada repetição.

Esta característica foi observada, de modo a evidenciar a possível relação da contaminação do meio de cultura com a riqueza dos componentes empregados nos mesmos. Para isso, foi realizada uma escala que atribuiu valores para diferenciar os diferentes níveis de contaminação (fúngica e bacteriana) presentes nos meios de cultura nos diferentes períodos de avaliação (Figura 7), sendo nota 0 - meio de cultura sem contaminação, nota 1 – contaminação fraca, nota 2 – contaminação moderada e nota 3 – forte grau de contaminação presente no meio de cultura.



**Figura 7:** Escala de contaminação utilizada para diferenciar os meios de cultura.

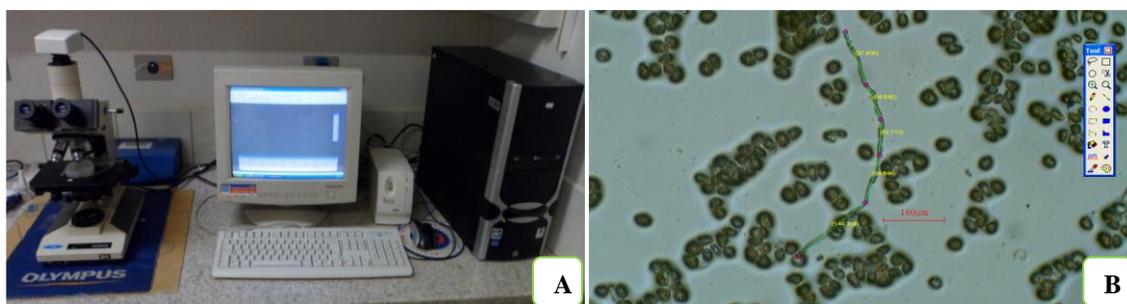
#### 3.4.2 Avaliação da germinação dos urediniósporos

Esta variável foi avaliada após 24 horas da deposição dos esporos em meio de cultura devidamente acondicionados em câmara de temperatura controlada B.O.D. a 21°C. A avaliação do experimento foi realizada em microscópio óptico, observando-se a ocorrência ou não da germinação e o crescimento do tubo germinativo produzido a partir dos urediniósporos. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento contendo cinco

réplicas para cada repetição. Em cada réplica foram contados 100 esporos, separando-os em germinados e não germinados. Foram considerados germinados, os esporos que apresentaram crescimento do tubo germinativo igual e/ou superior ao tamanho do esporo.

### 3.4.3 Avaliação do crescimento do tubo germinativo

Neste experimento, foi avaliado o crescimento do tubo germinativo dos urediniósporos durante um prazo de 72 horas, dividindo-se em três períodos de avaliações (1º, 2º e 3º dia após a deposição dos esporos para os meios de cultura enriquecidos e com folhas de jambeiro) e comparados com o crescimento em meio de cultura ágar-água utilizado como testemunha. Foram cinco repetições para cada tratamento, contendo cinco réplicas para cada repetição, sendo medidos quatro esporos para cada réplica, sendo vinte esporos por repetição e cem esporos por tratamento. As medições dos tubos germinativos foram realizadas através do Programa Computacional EDN-2, utilizando a unidade de medida  $\mu\text{m}$  (micrômetro), conforme Figura 8.



**Figura 8:** **A.** Aparato computacional utilizado para a medição do comprimento do tubo germinativo, **B.** Medição do tubo germinativo de um urediniósporo em  $\mu\text{m}$ .

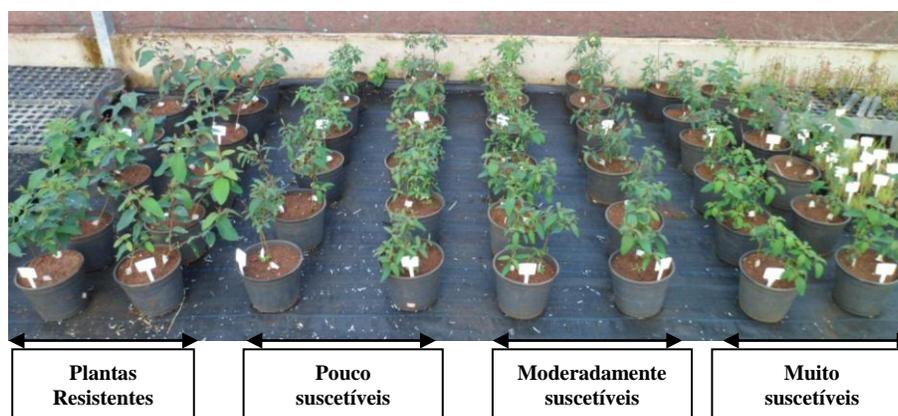
### 3.5 Extração dos compostos voláteis foliares

Concomitantemente ao estudo envolvendo o cultivo axênico para *P. psidii* em ambiente controlado, foram realizadas análises visando o conhecimento de compostos voláteis presentes em plantas de eucalipto resistentes e suscetíveis ao patógeno, com o objetivo de identificar possíveis compostos fenólicos relacionados à doença.

O experimento relacionado aos compostos voláteis foliares foi conduzido no Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Química da UNICAMP, localizada no município de Campinas, Estado de São Paulo. O município de Campinas tem como coordenadas geográficas da região central 22°54'21''S e 47°43'39''W e altitude de 685m.

Para a obtenção dos compostos voláteis das folhas de diferentes progênes de eucalipto (*E. grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla*), previamente testados quanto à resistência à ferrugem causada por *P. psidii*, foram utilizadas folhas sadias de quatro materiais resistentes e de doze materiais suscetíveis avaliados em diferentes níveis de suscetibilidade. A princípio, os materiais suscetíveis encontravam-se doentes e foram avaliados quanto à suscetibilidade ao patógeno através do uso de uma escala diagramática para ferrugem proposta por Junghans (2003) e, separados em três níveis de suscetibilidade, sendo dispostos em: quatro materiais pouco suscetíveis ao patógeno, quatro materiais com moderada suscetibilidade e quatro materiais com muita suscetibilidade à doença.

Os materiais foram cortados, a fim de ocorrer a rebrota de folhas sadias e foram transplantados para vasos com a finalidade de propiciar o crescimento destas plantas. Os materiais resistentes foram cedidos pela Empresa Duraflora S.A. e os materiais suscetíveis cedidos pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). Cada vaso continha duas plantas, sendo três vasos para cada material e, portanto, doze vasos para cada tratamento (24 plantas por tratamento). A Figura 9 apresenta os diferentes materiais separados em resistentes e suscetíveis.

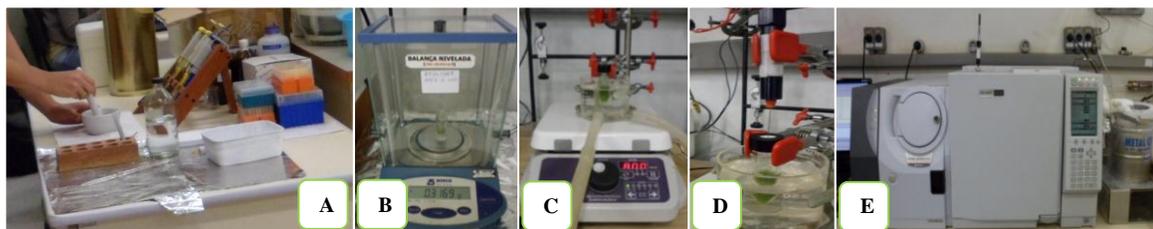


**Figura 9:** Plantas de eucalipto utilizadas para extração dos compostos voláteis foliares.

Os compostos voláteis extraídos foram analisados pela técnica da Micro Extração em Fase Sólida (Solid-Phase Micro-extraction – SPME) (Arthur e Pawliszyn, 1990). Esta técnica de extração de compostos voláteis vem sendo muito empregada, é rápida e simples para extração e pré-concentração das substâncias voláteis de diversas partes de um vegetal, como frutos e folhas. Este procedimento foi realizado no Laboratório do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, SP.

Foram utilizadas folhas sadias de clones de eucalipto que após coletadas, foram congeladas em  $N_2$ , e mantidas a  $\pm 4^\circ C$  até sua utilização.

O sistema de análise para liberação de voláteis consistiu em um sistema pré-equilibrado. Neste experimento, foi empregada a técnica SPME aliada à cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-MS), por apresentar um maior incremento na detectabilidade (Dallüge et al., 2003), cujo objetivo é separar, detectar e identificar os analitos encontrados. A principal vantagem de se utilizar o perfil metabólico obtido por SPME combinado a GC×GC-MS é a possibilidade de se diagnosticar a doença na planta, ainda em seus estágios iniciais. Entretanto, muitas outras fontes causadoras de estresse na planta também podem influenciar no perfil cromatográfico medido.



**Figura 10:** A. Maceração das amostras; B. Pesagem das amostras; C. Sistema de pré-equilíbrio da amostra através de rotação; D. Introdução da fibra para a retenção dos compostos voláteis extraídos da amostra; E. Leitura dos compostos voláteis da amostra.

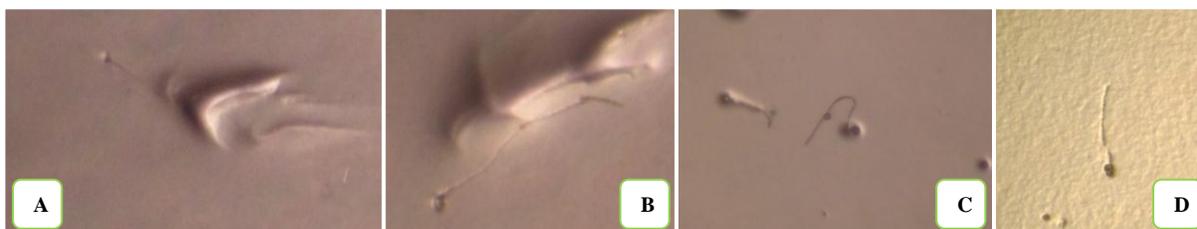
A técnica apresentada na Figura 10 consiste em macerar, inicialmente, as amostras de folhas sadias de eucalipto (Figura 10 A) em  $N_2$  líquido. Em seguida, as amostras foram pesadas e padronizadas para 0,3g (Figura 10 B), e foi acrescentado 2 mL de NaCl 18,5% na amostra a fim de diminuir a solubilidade dos voláteis em água, facilitando a fase gasosa. As amostras foram submetidas a um sistema de pré-equilíbrio por dez minutos a

80 rpm, pelo aparelho SPME (Figura 10 C) e, em seguida, com a mesma rotação, foi introduzida a fibra (Figura 10 D) no frasco da amostra para obtenção dos compostos voláteis extraídos da amostra por um período de trinta minutos, sendo que a medida que a amostra libera os voláteis, estes sobem e são absorvidos pela fibra instalada no frasco. Passado o tempo, a fibra foi, imediatamente, acoplada no aparelho GCxGC – MS (Cromatógrafo a gás bidimensional abrangente) (Figura 10 E) que faz a leitura dos compostos voláteis que estão aderidos à fibra transferindo os dados para o computador.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Técnicas para isolamento dos urediniósporos

Os resultados obtidos para a técnica de cultivo monospórico não puderam comparar o percentual de germinação e o crescimento do tubo germinativo nos diferentes meios testados, o que se pode verificar foi uma estagnação no desenvolvimento do tubo germinativo após a transferência de um único esporo já germinado para o meio de cultura enriquecido. Isso pode ter provocado um estresse no esporo coletado, devido à mudança de ambiente, isto é, de um meio de cultura para outro (Figura 11). Esta técnica, também, resultou em alto grau de contaminação das placas.



**Figura 11: A-D.** Urediniósporos (germinados em ágar-água após 24 horas) transferidos para o meio de cultura enriquecido ASZV.

No que se refere à transferência de vários urediniósporos para os meios de cultura, também não foram registrados resultados significativos. Foram realizadas oito repetições em laboratório com o objetivo de avaliar o percentual de germinação, o crescimento do tubo germinativo e observar, frequentemente, algum possível crescimento do patógeno em meio de cultura. Os resultados encontrados foram que após a transferência dos esporos para o meio de cultura, mesmo não tendo iniciado o processo de germinação, os esporos foram submetidos a um estresse e estagnaram o crescimento, não sendo possível avaliar os indicadores (Figura 12).



**Figura 12:** Urediniósporos não germinados após 10 dias da deposição em meio de cultura enriquecido ASZV.

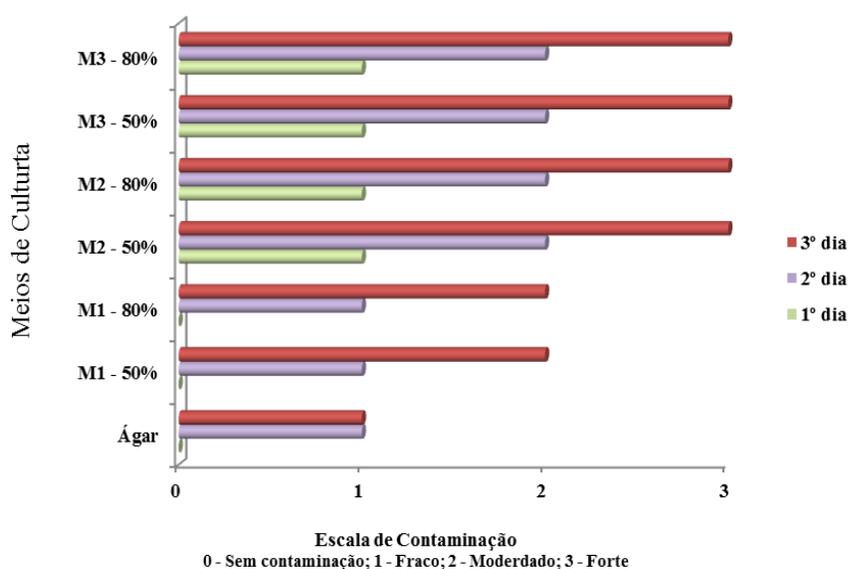
Diante da dificuldade para o isolamento do patógeno em meio de cultura pelas técnicas anteriormente utilizadas, foi implantada outra técnica, descrita na metodologia (item 3.2 Meios de cultura axênicos), para a obtenção de dados referentes ao percentual de germinação e crescimento do tubo germinativo, podendo comparar a eficácia de um meio de cultura para outro e concluir qual meio de cultura estava mais adequado para o crescimento de *P. psidii in vitro*.

## **4.2 Meios de cultura axênicos e naturais com folhas de jambeiro**

### **4.2.1 Contaminação**

A Figura 13 ilustra a contaminação dos meios de cultura no decorrer dos três dias avaliados. Observou-se que no meio de cultura testemunha ágar-água, considerado um meio de cultura com escassez de nutrientes, não foram observadas contaminações no primeiro dia de avaliação e, seguiram-se com uma fraca contaminação nos

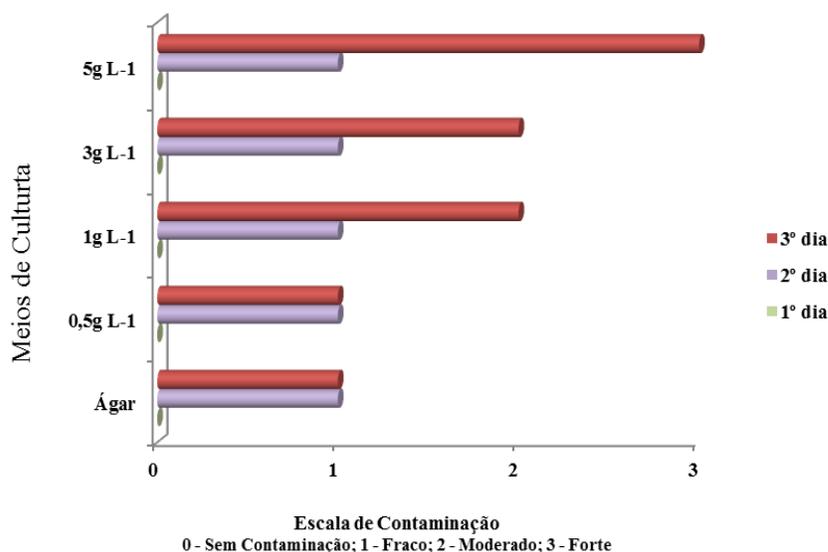
outros dois dias do ensaio, comparado aos demais meios enriquecidos. O Meio I, a 50% e 80%, não apresentou contaminação no primeiro dia, e contaminação baixa no segundo, aumentando para moderada no terceiro dia. Já os Meios II e III, ambos a 50% e 80%, apresentaram contaminação fraca logo no primeiro dia, seguindo para moderada no segundo dia e forte no terceiro dia de avaliação. Os Meios II e III nas duas concentrações utilizadas contaminaram mais que o Meio I, pelo fato de conterem muitos nutrientes presentes na solução. Porém, o excesso desses nutrientes pode dificultar o crescimento do patógeno em meio artificial.



**Figura 13:** Contaminação dos meios de cultura enriquecidos.

A Figura 14 apresenta a contaminação dos meios de cultura compostos por folhas de jambeiro. Neste caso, observou-se que nenhum meio de cultura apresentou contaminação no primeiro dia do ensaio e, o meio ágar-água, utilizado como testemunha, manteve o mesmo comportamento daquele visto anteriormente, ou seja, não apresentando contaminação no primeiro dia de avaliação, seguindo-se com uma fraca contaminação nos outros dois dias, sendo os mesmos resultados observados para o meio de cultura com concentração 0,5g de folhas  $L^{-1}$ . Os meios com concentrações 1g  $L^{-1}$  e 3g  $L^{-1}$  apresentaram fraca contaminação no segundo dia de avaliação e moderada no terceiro dia. Quanto ao meio 5g  $L^{-1}$  ocorreu contaminação fraca no segundo dia passando para forte no terceiro dia

avaliado. Estes resultados podem indicar que o meio de cultura com concentração  $5\text{g L}^{-1}$  contaminou mais que os demais, pelo fato de ser mais nutritivo em sua composição, pela riqueza encontrada no material vegetal. Mas, é importante ressaltar que este excesso de nutrientes pode afetar no crescimento do patógeno em meio de cultura artificial.



**Figura 14:** Contaminação dos meios de cultura com folhas de jambeiro.

A variável contaminação dos meios de cultura não correlacionou riqueza dos nutrientes contidos nos meios nutritivos com o grau de contaminação, por exemplo, o meio testemunha AA é conhecido como um meio de cultura com poucos nutrientes, porém o meio com folha de jambeiro é um meio com muitos nutrientes, por ser de origem de material vegetal, mas, mesmo assim, neste também não foi observada contaminação elevada. O mesmo ocorreu para o meio enriquecido I que é bastante rico e que também não mostrou uma forte contaminação durante os ensaios (Tabela 1).

**Tabela 1.** Contaminação observada para os diferentes tratamentos (média de vinte e cinco repetições).

Tratamentos	Períodos de avaliação		
	1º dia	2º dia	3º dia
Ágar	Sem contaminação	Fraco	Fraco
Meio I – 50%	Sem contaminação	Fraco	Moderado
Meio I – 80%	Sem contaminação	Fraco	Moderado
Ágar	Sem contaminação	Fraco	Fraco
Meio II – 50%	Fraco	Moderado	Forte
Meio II – 80%	Fraco	Moderado	Forte
Ágar	Sem contaminação	Fraco	Fraco
Meio III – 50%	Fraco	Moderado	Forte
Meio III – 80%	Fraco	Moderado	Forte
Ágar	Sem contaminação	Fraco	Fraco
Meio 0,5g L <sup>-1</sup>	Sem contaminação	Fraco	Fraco
Meio 1g L <sup>-1</sup>	Sem contaminação	Fraco	Moderado
Meio 3g L <sup>-1</sup>	Sem contaminação	Fraco	Moderado
Meio 5g L <sup>-1</sup>	Sem contaminação	Fraco	Forte

No trabalho com cultivo axênico de *Cronartium flaccidum*, ferrugem do Pinus, Moricca e Ragazzi (1994) notaram que mesmo seguindo os procedimentos assépticos em laboratório, o percentual de contaminação do experimento ficava em torno de 40%.

De um modo geral, os meios de cultura contendo folhas de jambeiro apresentaram menor contaminação, quando comparados aos meios de cultura enriquecidos, com exceção do meio enriquecido I, no qual ocorreu baixa contaminação e o meio de cultura 5 g L<sup>-1</sup> que apresentou contaminação acentuada.

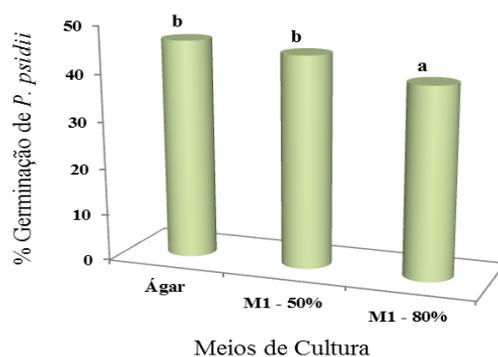
#### 4.2.2 Avaliação da germinação dos urediniósporos

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos nesse estudo.

**Tabela 2.** Percentagens de germinação observadas nos diferentes meios de cultura (média de vinte e cinco repetições).

Tratamentos	% germinação
Ágar	46,56
Meio I – 50%	44,84
Meio I – 80%	40,32
Ágar	46,60
Meio II – 50%	45,44
Meio II – 80%	46,12
Ágar	42,96
Meio III – 50%	43,00
Meio III – 80%	43,04
Ágar	41,12
Meio 0,5 g L <sup>-1</sup>	48,52
Meio 1,0 g L <sup>-1</sup>	48,48
Meio 3,0 g L <sup>-1</sup>	48,64
Meio 5,0 g L <sup>-1</sup>	49,96

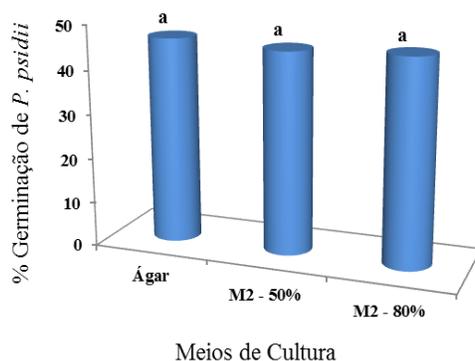
Como pode ser observado na Tabela 2 e Figura 15, o percentual de germinação do meio de cultura I na concentração 50% não diferiu do meio de cultura testemunha, sendo estatisticamente diferente do meio I a 80% que obteve percentagem de germinação inferior. Apesar da diferença estatística, os valores de percentual de germinação encontram-se próximos uns dos outros, com uma variação de 6% entre os valores extremos, sendo 46,56% para o meio ágar-água, 44,84% para o meio I a 50% e 40,32 para o meio I a 80%.



\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficiente de variação = 12,9%.

**Figura 15:** Percentual de germinação de *P. psidii* no meio de cultura axênico I.

Já na Figura 16, o percentual de germinação para o meio de cultura II nas duas concentrações não diferiu do meio de cultura testemunha e pouco variaram entre si (menos de 1%). Os percentuais ficaram em torno de 46,6% para o meio ágar-água, 45,44% para o meio II a 50% e 46,12 para o meio II a 80%.

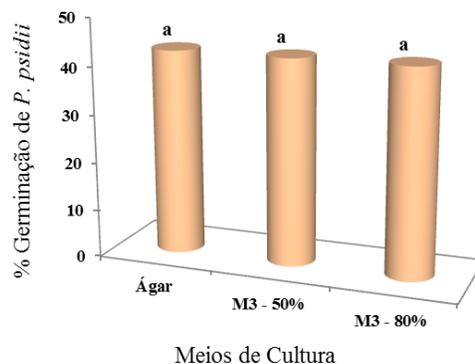


\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficiente de variação = 17,5%.

**Figura 16:** Percentual de germinação de *P. psidii* no meio de cultura axênico II.

O mesmo foi observado para o meio de cultura axênico III (Figura 17), cujos tratamentos não obtiveram diferença significativa entre si para o percentual de

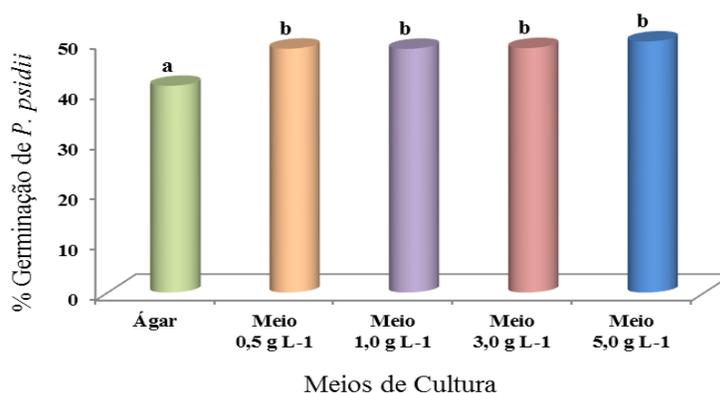
germinação, sendo os valores muito próximos distribuídos em 42,96% para o meio ágar-água, 43% para o meio III a 50% e 43,04 para o meio III a 80%.



\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficiente de variação = 11,02%.

**Figura 17:** Percentual de germinação de *P. psidii* no meio de cultura axênico III.

Para o meio de cultura contendo folhas de jambeiro observaram-se diferenças significativas entre o meio de cultura testemunha (ágar-água) e os meios de cultura com folhas de jambeiro nas diferentes concentrações (Figura 18), notando-se um incremento próximo a 9% entre os tratamentos testados, sendo 41,12% para o meio ágar-água, 48,52% para o meio de cultura a 0,5g L<sup>-1</sup>, 48,48% para o meio de cultura a 1,0g L<sup>-1</sup>, 48,64% para o meio de cultura a 3,0g L<sup>-1</sup>, 49,96% para o meio de cultura a 5,0g L<sup>-1</sup>. A diferença significativa ocorreu apenas para a testemunha que obteve percentual menor para germinação, mas entre os tratamentos com meio de cultura com folhas de jambeiro, o percentual de germinação não diferiu.



\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficiente de variação = 12,12%.

**Figura 18:** Percentual de germinação de *P. psidii* no meio de cultura com folhas de Jambeiro em diferentes concentrações.

Essas evidências permitiram observar que mesmo ocorrendo variações entre o percentual de germinação de uredinósporos de *P. psidii* (6% para o meio de cultura I e quase 9% para o meio de cultura com folhas de jambeiro em diferentes concentrações), não apresentou um resultado significativo que possibilite determinar um meio de cultivo axênico adequado e que estimule o desenvolvimento de *P. psidii* em condições artificiais.

Já o estudo de Reis e Richter (2007), que avaliava o estímulo de crescimento de *Puccinia triticina* (ferrugem da folha do trigo) em nove diferentes meios de cultura, observou uma diferença de 22% na germinação do patógeno entre os meios de cultura testados, avaliados 24 horas após a incubação dos esporos, sendo o meio de cultura com infusão de folhas de trigo-ágar o que mais estimulou a germinação comparado à testemunha ágar-água (26%) e o meio de cultura frutose-ágar o que menos estimulou (24% inferior comparado ao meio ágar-água).

#### 4.2.3 Avaliação do crescimento do tubo germinativo

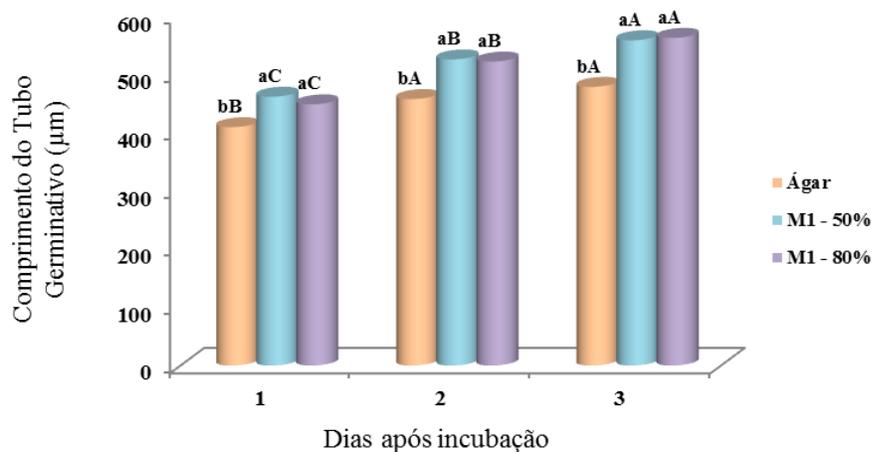
Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* em  $\mu\text{m}$  em diferentes momentos de avaliação (média de cem repetições).

Tratamentos	Crescimento do Tubo Germinativo ( $\mu\text{m}$ )		
	1º dia	2º dia	3º dia
Ágar-Água	409,14	457,41	478,29
Meio I – 50%	461,43	525,41	558,28
Meio I – 80%	448,31	521,80	562,31
Ágar-Água	417,54	474,57	470,80
Meio II – 50%	238,77	276,14	253,15
Meio II – 80%	220,50	245,23	239,10
Ágar-Água	412,45	421,17	465,21
Meio III – 50%	508,81	498,88	496,87
Meio III – 80%	446,59	444,17	443,07
Ágar-Água	481,59	499,40	505,99
Meio 0,5 g L <sup>-1</sup>	531,05	532,73	534,70
Meio 1,0 g L <sup>-1</sup>	499,49	500,15	497,35
Meio 3,0 g L <sup>-1</sup>	484,79	482,34	475,21
Meio 5,0 g L <sup>-1</sup>	388,62	386,08	384,56

O crescimento do tubo germinativo nos meios de cultura I quando comparado à testemunha mostrou-se significativo nos três períodos de avaliação, de modo que na testemunha o crescimento foi inferior aos meios I a 50% e a 80%. Mesmo com o aumento no crescimento do tubo germinativo no meio ágar-água no segundo e terceiro dias, os valores foram inferiores aos demais tratamentos. Para o meio I 50% o crescimento foi rápido, logo no primeiro dia de observação e seguiu até o terceiro dia avaliado, o mesmo ocorreu para o meio I 80%, cujos resultados foram semelhantes ao meio I 50%, que mesmo obtendo valores mais baixos, não foram significativos. Isso permite observar que o meio enriquecido I mesmo com uma concentração maior de solução nutritiva (80% comparado ao de 50%), não obteve resultados significativos para a variável de crescimento do tubo germinativo. O meio

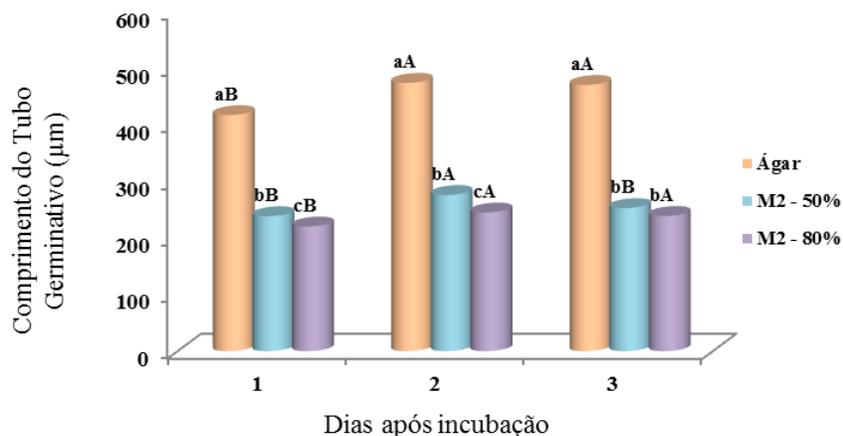
enriquecido I, a 50% e 80%, apresentou aumento significativo no crescimento do tubo no decorrer dos três dias avaliados, obtendo crescimento superior em 16,7% e 17,6%, respectivamente, maior que a testemunha no terceiro dia de avaliação, conforme Figura 19.



\* Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada momento de avaliação (dias) e maiúscula entre os momentos de avaliação dentro dos mesmos tratamentos não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficientes de variação = 17,3%, 17,54%, 17,59% para letras minúsculas, 16,78%, 18,67%, 16,83% para letras maiúsculas.

**Figura 19:** Crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* em meio de cultura enriquecido I.

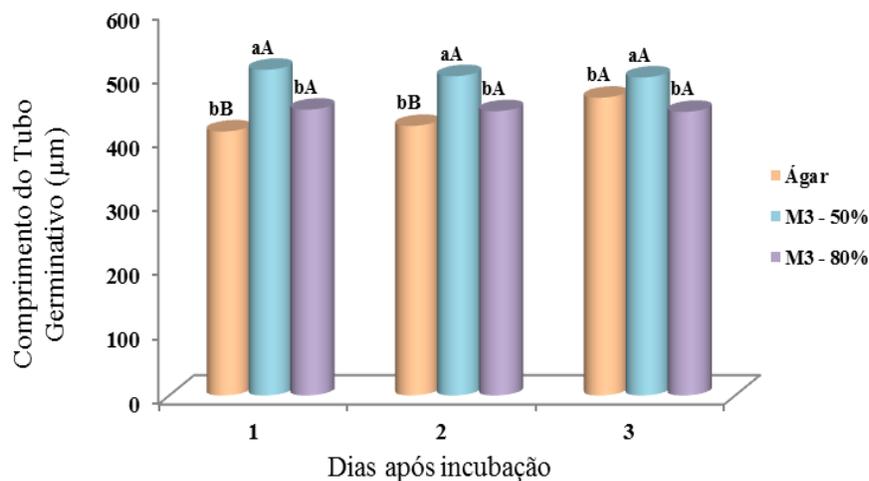
A Figura 20 mostra os resultados para o meio de cultura II. Os resultados encontrados foram diferentes daquele anteriormente descrito. A testemunha obteve as mesmas condições de crescimento, aumentando no segundo e terceiro dias mesmo não sendo significativo. Porém, o meio II, nas concentrações 50% e 80%, obteve crescimento inferior à testemunha nos três dias avaliados (crescimento inferior de 46,2 % e 49,2%, respectivamente, menor comparado à testemunha) e progresso no crescimento muito baixo nos dias subsequentes. Mesmo com os valores baixos de crescimento do tubo germinativo, o meio II 50% obteve maior crescimento dos tubos comparado ao meio II 80% nos primeiro e segundo dias, aproximando estes valores no terceiro dia. Isso permite a mesma observação encontrada no meio enriquecido I, pois mesmo com uma concentração maior de solução nutritiva (80% comparado ao de 50%), os resultados encontrados foram menores quanto maior a solução nutritiva.



\* Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada momento de avaliação (dias) e maiúscula entre os momentos de avaliação dentro dos mesmos tratamentos não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficientes de variação = 19,91%, 20,55%, 18,44% para letras minúsculas, 14,29%, 26,99%, 21,52% para letras maiúsculas.

**Figura 20:** Crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* em meio de cultura enriquecido II.

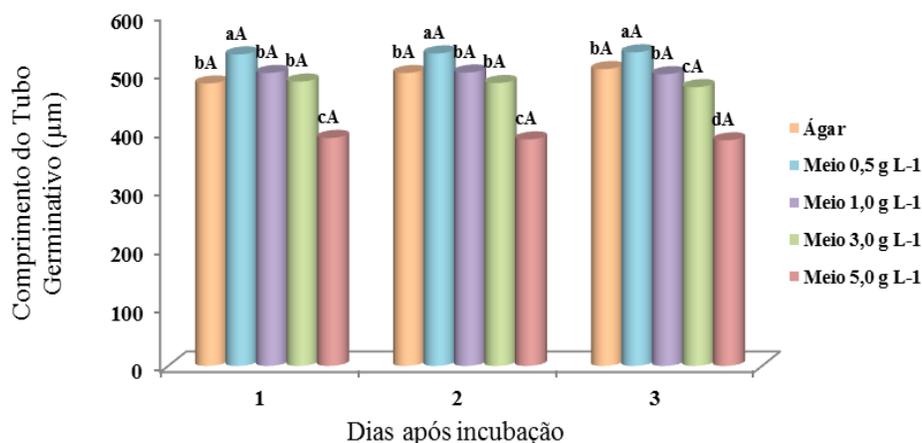
Para o meio de cultura III (Figura 21), a testemunha obteve crescimento inferior ao meio de cultura III 50% nos três dias avaliados, porém esta não diferiu do crescimento do meio de cultura III 80% no mesmo período observado. O meio ágar-água obteve um acréscimo no crescimento do tubo germinativo significativo durante o período de avaliação, resultado semelhante aos demais meios descritos acima, mas o mesmo não pode ser apresentado para os meios III 50% e 80% que estabilizaram o crescimento logo no primeiro dia, porém, obtiveram um crescimento inicial do tubo germinativo de 23,4% e 8,3%, respectivamente, no primeiro dia avaliado comparado à testemunha.



\* Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada momento de avaliação (dias) e maiúscula entre os momentos de avaliação dentro dos mesmos tratamentos não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficientes de variação = 27,46%, 24,03%, 22% para letras minúsculas, 25,92%, 22,13%, 25,96% para letras maiúsculas.

**Figura 21:** Crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* do meio de cultura enriquecido III.

O meio elaborado com folhas de jambeiro, apresentou resultados distintos nas diferentes concentrações utilizadas. As concentrações 1,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup> não diferiram da testemunha nos dois primeiros dias avaliados e a concentração 3,0 g L<sup>-1</sup> no terceiro dia obteve crescimento inferior à testemunha e a concentração 1,0 g L<sup>-1</sup>. O meio com a concentração 5,0 g L<sup>-1</sup> obteve o menor crescimento de tubo germinativo de todas as concentrações testadas nos três dias de avaliação (22,7% inferior à testemunha) e a concentração 0,5 g L<sup>-1</sup> obteve o maior crescimento do tubo germinativo (chegando a 10,3% superior à testemunha no primeiro dia de avaliação, diminuindo a diferença para 5,7% no terceiro dia), diferindo dos demais no período avaliado. Nenhuma concentração testada obteve aumento significativo no crescimento do tubo germinativo durante o período avaliado.



\* Médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada momento de avaliação (dias) e maiúscula entre os momentos de avaliação dentro dos mesmos tratamentos não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade / Coeficientes de variação = 17,73%, 16,07%, 14,69% para letras minúsculas, 16,01%, 14,75%, 15,63%, 16,37%, 18,96% para letras maiúsculas.

**Figura 22:** Crescimento do tubo germinativo de *P. psidii* do meio de cultura com folhas de jambeiro.

Estes resultados permitiram concluir que os meios enriquecidos e os meios contendo folhas de material vegetal suscetível à ferrugem estimularam o crescimento do tubo germinativo de *Puccinia psidii*, com destaque para o meio de cultura I 50% e 80% e meio III 50% e o meio de cultura com folhas de jambeiro na concentração 0,5 g L<sup>-1</sup>, que levaram a bons resultados no que se refere ao crescimento do tubo germinativo dos esporos do fungo.

A Figura 23 ilustra uma escala em percentagem de crescimento do tubo germinativo observado nos diferentes tratamentos, apresentando aqueles que induziram maior crescimento até aqueles que resultaram em menor crescimento (da esquerda para a direita, respectivamente) comparando-os à testemunha ágar-água.



**Figura 23:** Comparação dos meios de cultura e testemunha ágar-água pelo crescimento do tubo germinativo em µm.

Reis e Richter (2007) também avaliaram o crescimento do tubo germinativo de *Puccinia triticina* e, em medições realizadas após 24 horas de incubação dos esporos, observaram que houve diferença no crescimento do tubo germinativo entre os nove meios testados, sendo que o meio de cultura frutose-ágar apresentou o menor crescimento, 9,6  $\mu\text{m}$  (41% inferior à testemunha ágar-água) e o meio de cultura com infusão de folhas de trigo-ágar apresentou o maior crescimento do tubo (52,03  $\mu\text{m}$ ). Estes foram os mesmos meios de cultura que apresentaram menor e maior percentual de germinação no mesmo ensaio, respectivamente.

Kuhl et al. (1971) elaboraram uma escala para cultivo axênico de espécies de *Puccinia* sp. com base no sucesso de estudos realizados anteriormente pelos autores. A escala apresenta o desenvolvimento de um esporo até a formação de um micélio em meio de cultura enriquecido e, encontra-se dividida em quatro níveis, sendo:

- ✓ Estágio de crescimento 0 – tubo germinativo ou hifa não ramificados;
- ✓ Estágio de crescimento 1 – ramificação primária do tubo germinativo ou hifa;
- ✓ Estágio de crescimento 2 – ramificações secundárias e terciárias das hifas saprofitas;
- ✓ Estágio de crescimento 3 – ramificações superiores, micélio está visível a olho nu.

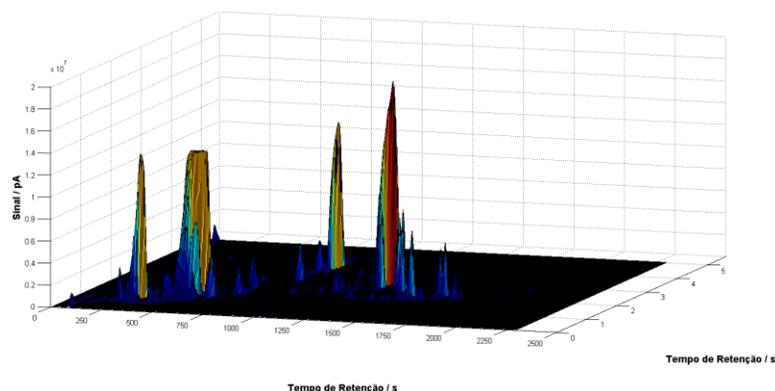
No presente estudo, foi verificado apenas o primeiro estágio da escala (estágio de crescimento 0), não apresentando continuação no desenvolvimento de *Puccinia psidii* em meio de cultura enriquecido artificialmente.

Algumas características são indispensáveis para o sucesso do cultivo axênico, tais como: densidade adequada de inóculo, modo de aplicação do inóculo no meio de cultura, quantidade de nutrientes presentes no meio de cultura e condições de incubação (Kuhl et al., 1971). Portanto, não há um meio de cultura ou um método de inoculação padrão para se cultivar ferrugem em meio artificial, é preciso estudar as necessidades nutricionais do patógeno, bem como, os métodos de inoculação e a densidade ideal de esporos, pois estes estimulam o crescimento uns dos outros para a formação do micélio (Kuhl et al., 1971).

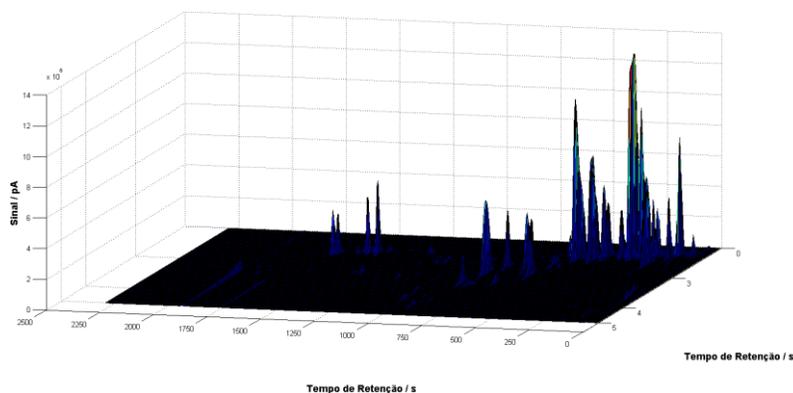
### 4.3 Extração dos compostos voláteis foliares

As análises cromatográficas obtidas pela cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (GCxGC-MS) estão apresentadas nas figuras abaixo. Os resultados referentes às análises de compostos voláteis em plantas de eucalipto contêm os cromatogramas em forma de “montanhas” com os analitos presentes nas amostras resistentes e muito suscetíveis ao patógeno.

Conforme é possível observar nas Figuras 24 e 25, encontram-se os analitos presentes nas amostras sadias de plantas resistentes (Figura 24) e muito suscetíveis (Figura 25). Cada pico no gráfico representa um analito e, ao serem comparados podem ser observadas diferenças entre os dois tratamentos, ou seja, as plantas resistentes apresentam certos analitos não presentes nas plantas suscetíveis, sendo o inverso verdadeiro.

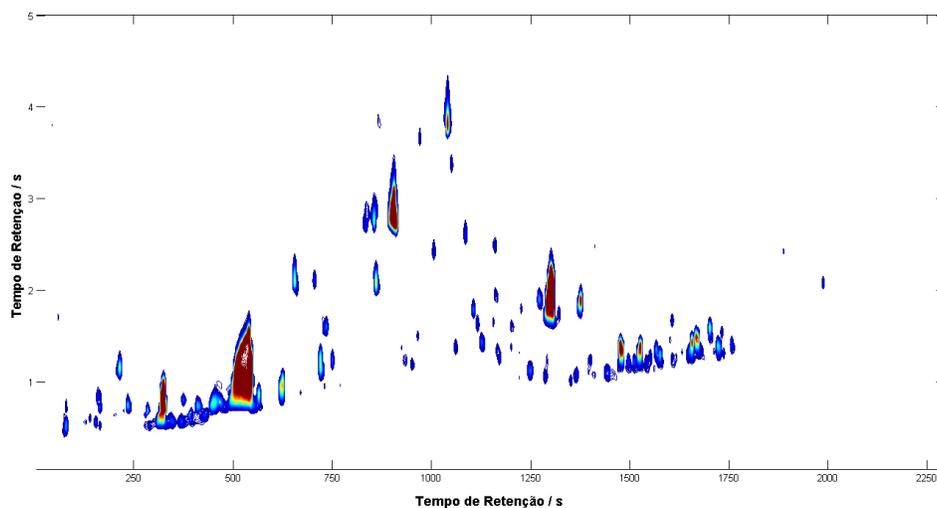


**Figura 24:** Cromatografia para os materiais de eucalipto resistentes à *P. psidii*.



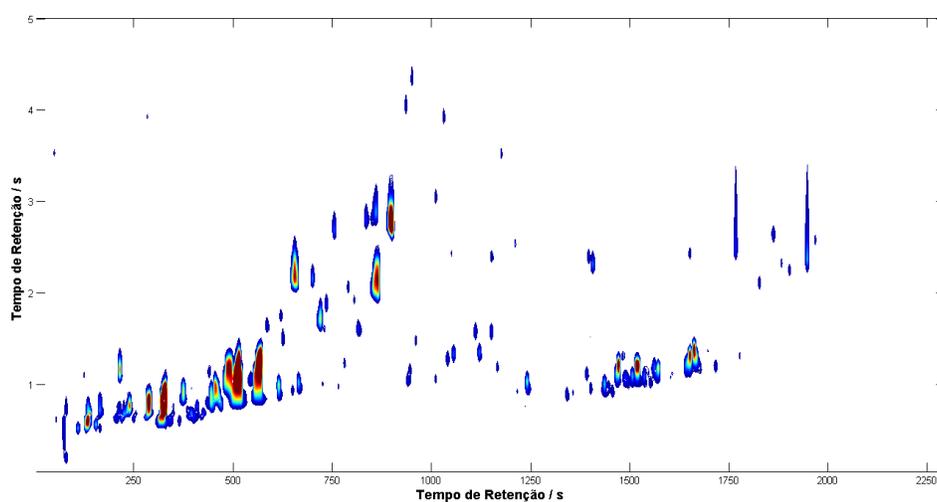
**Figura 25:** Cromatografia para os materiais de eucalipto muito suscetíveis à *P. psidii*.

Para ilustrar todos os tratamentos, segue a sequência das cromatografias dos analitos encontrados. A Figura 26 representa a mesma cromatografia da Figura 24, sendo que cada “mancha” representa um analito.



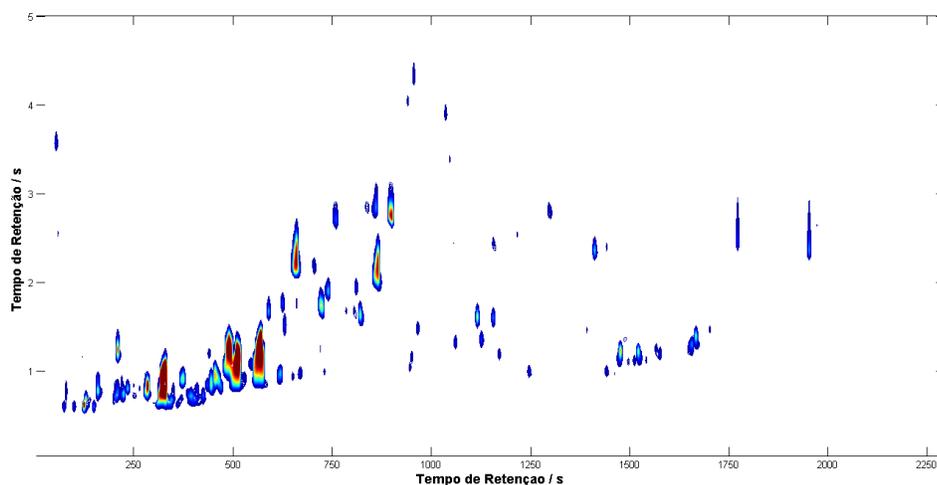
**Figura 26:** Cromatografia dos materiais de eucalipto resistentes à *P. psidii*.

A Figura 27 representa os analitos encontrados para o grupo dos materiais pouco suscetíveis à *P. psidii*.



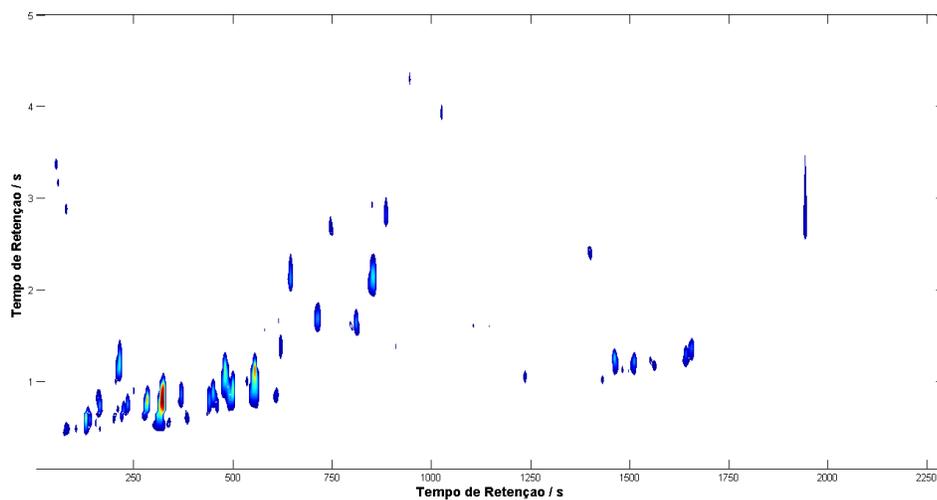
**Figura 27:** Cromatografia dos materiais de eucalipto pouco suscetíveis à *P. psidii*.

A Figura 28 representa os analitos encontrados para o grupo dos materiais moderadamente suscetíveis à *P. psidii*.



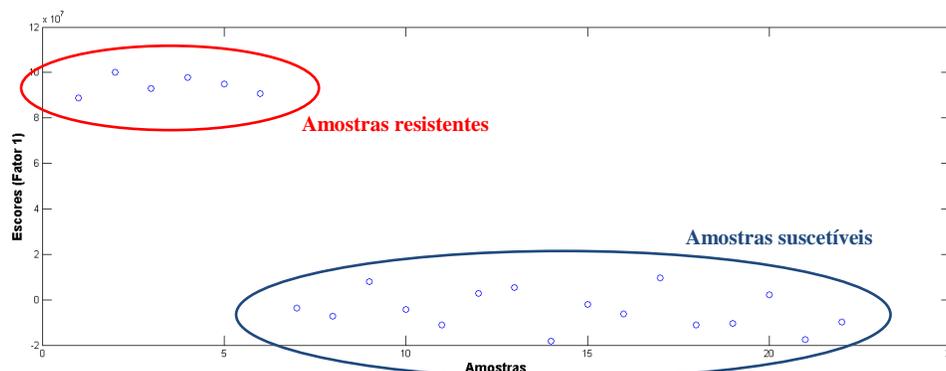
**Figura 28:** Cromatografia dos materiais de eucalipto moderadamente suscetíveis à *P. psidii*.

A Figura 29 representa os analitos encontrados para os materiais muito suscetíveis à *P. psidii* (idem Figura 25).



**Figura 29:** Cromatografia dos materiais de eucalipto muito suscetíveis à *P. psidii*.

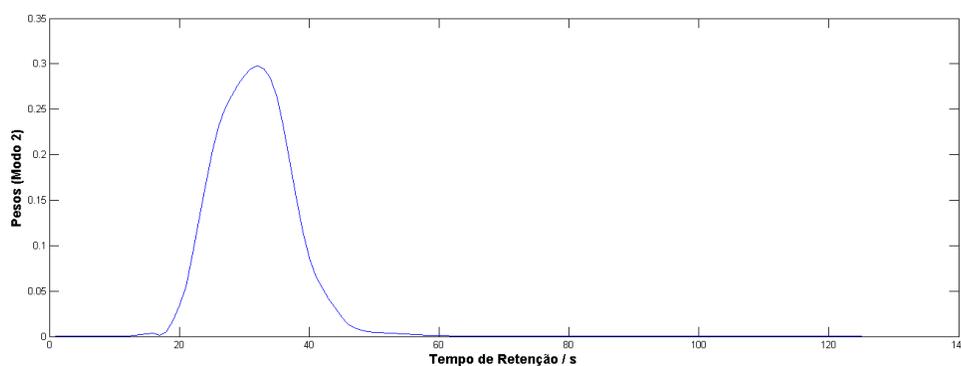
A análise multivariada dos dados foi realizada pela técnica de análise de fatores paralelos (PARAFAC) cujo objetivo é fazer o reconhecimento de padrões. O gráfico de escores abaixo apresenta a tendência dos dados.



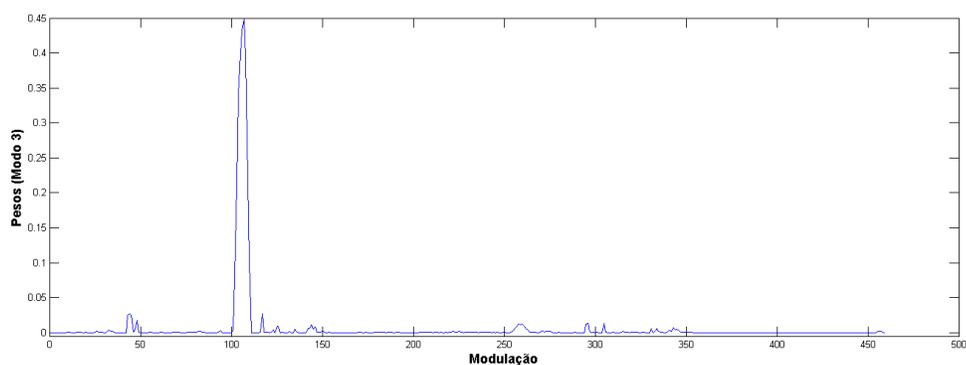
**Figura 30:** Gráfico de escores das amostras de eucalipto resistentes e suscetíveis à *P. psidii*.

De acordo com a Figura 30, é possível observar que as amostras resistentes estão separadas das amostras suscetíveis (independente do nível de suscetibilidade), isso ocorre pelo fato dos analitos encontrados não serem os mesmos.

As análises foram efetuadas por meio do gráfico de pesos, que permite justificar a semelhança entre as amostras e ainda verificar semelhanças e correlações entre variáveis. Os gráficos de pesos (Modo 1 e Modo 2) a seguir tem a função de determinar os possíveis analitos que podem atuar como biomarcadores para resistência em plantas de eucalipto à ferrugem quando comparados à cromatografia dos materiais resistentes.

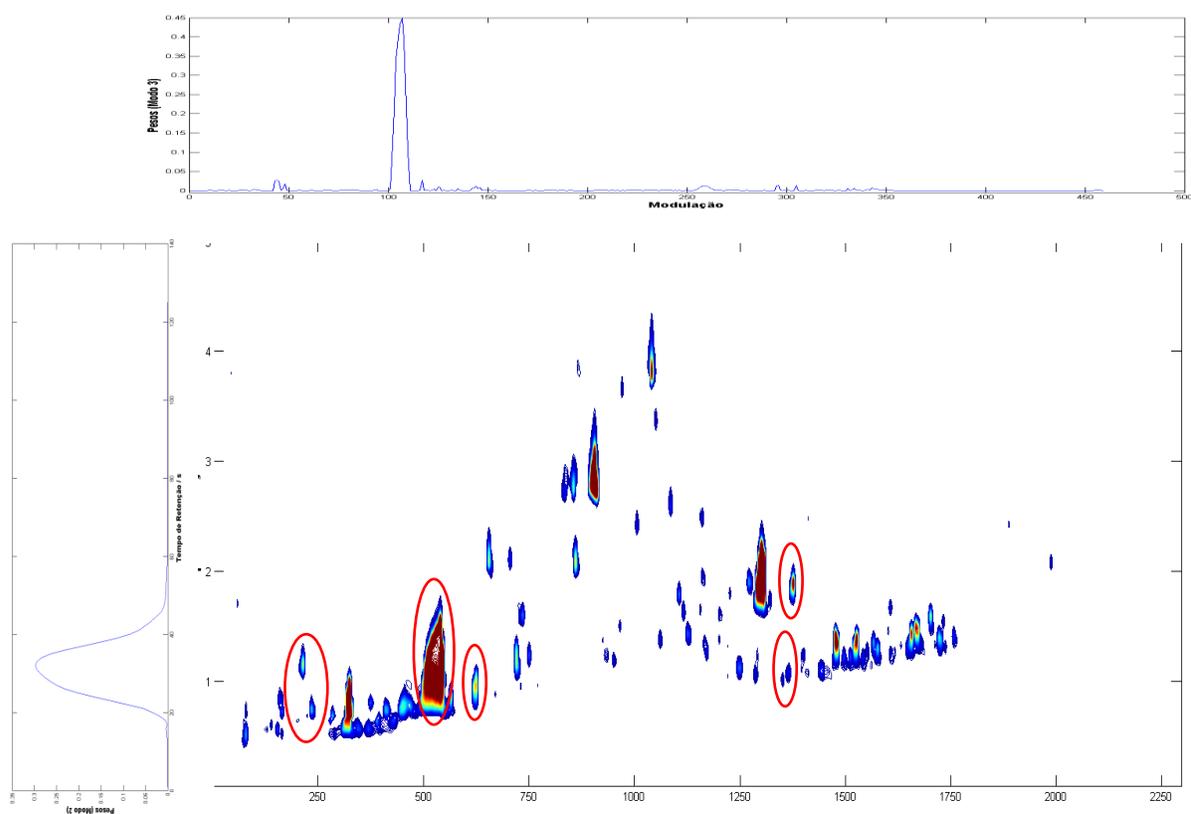


**Figura 31:** Gráfico de pesos Modo 1.



**Figura 32:** Gráfico de pesos Modo 2.

Por meio de comparação dos gráficos de pesos com o cromatograma das amostras dos materiais sadios resistentes à *P. psidii*, observa-se a ocorrência de determinados analitos que não foram encontrados nas amostras suscetíveis a ferrugem, podendo ser os possíveis analitos indicadores de resistência à doença (Figura 33).



**Figura 33:** Análise multivariada dos analitos presentes nas amostras de plantas resistentes à *P. psidii*.

Na tabela 4, estão listados os compostos voláteis encontrados nas amostras de eucalipto resistentes e suscetíveis à *P. psidii*, construídos a partir do gráfico de pesos. Com destaque para os compostos grifados, eucalyptol e terpinyl acetato- $\alpha$ , indicados como possíveis biomarcadores para a resistência à ferrugem em plantas. Estes dois compostos foram encontrados em maior quantidade apenas nas amostras resistentes.

Dois parâmetros foram utilizados durante as identificações dos compostos voláteis encontrados, a similaridade e o índice de retenção. O parâmetro similaridade (expresso em %) indica a chance daquele espectro de massas pertencer àqueles compostos – margem mínima trabalhada de 80%. O índice de retenção é o segundo parâmetro considerado durante as identificações, sendo que cada composto volátil tem seu índice característico e, portanto, selecionando compostos com similaridade mínima de 80% e comparando os índices de retenção, a probabilidade de obter erros nas identificações é mínima.

**Tabela 4.** Identificação dos compostos voláteis presentes em folhas sadias de *E. grandis* x *E. grandis* e *E. urophylla*. Iexp.: Índice de Kovats experimental. IK lit.: Índice de Kovats da literatura (Adams, 1995; 2001).

#	Nomes dos compostos	Fórmula	LTPRI*		Similaridade (%)
			Exp.	Lit.	
1	(Z)-3-Octene	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	821	824	82
2	n-Propylcyclopentane	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	858	859	83
3	$\alpha$ -Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	946	948	96
4	Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	996	991	92
5	3-Hexen-1-ol	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1010	1008	95
6	Eucalyptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1036	1032	92
7	Terpinene- $\gamma$	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1064	1058	91
8	Terpinolene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1091	1086	94
9	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1104	1101	94
10	1,3,3-trimethyl-bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1123	1123	91
11	2,6-dimethyl-, (4E,6Z)-2,4,6-Octatriene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1130	1128	92
12	-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 2,2,3-trimethyl-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1129	1126	90

13	2-Isopropylidene-3-methylhexa-3,5-dienal	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1140	1141	81
14	Pinocarveol <trans->	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1144	1141	89
15	Pinocarvone	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1165	1164	83
16	Borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1175	1173	88
17	β-Citronellol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	1183	1179	82
18	Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1184	1180	91
19	Terpineol-γ	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1202	1200	81
20	2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1225	1228	83
21	Neral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1239	1238	85
22	Geraniol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1253	1255	92
23	β-Phenethyl acetate	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1254	1259	89
24	Geranial	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1267	1268	91
25	Bornyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1283	1285	92
26	Isobutyric acid, benzyl ester	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1295	1294	94
27	Geranyl formate	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1297	1300	92
28	α-Cubebene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1344	1344	97
29	Terpinyl acetate-α	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1350	1349	93
30	Neryl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1359	1361	84
31	Geranyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1378	1380	93
32	Elemene-β	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1387	1390	91
33	Gurjunene-α	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1404	1406	88
34	Chenopodene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1418	1422	86
35	Elemene-γ	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1432	1432	84
36	Selina-5,11-diene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1444	1445	84
37	Humulene-α	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1454	1454	88
38	Z,Z)-α-Farnesene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1456	1458	87
39	δ-Cadinene,	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1467	1469	89
40	Viridiflorene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1487	1491	91
41	Bicyclogermacrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1491	1497	92
42	Geranyl isobutyrate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	1505	1507	93
43	Terpineol-δ	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1171	1170	81
44	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimethyl-, acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1218	1219	84

\*LTPRI – Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura (do inglês, “Linear Temperature Programming Retention Index”).

Os compostos fenólicos ou voláteis são metabólitos secundários de plantas presentes em vegetais, folhas, sementes, flores e cascas. Sua função é proteger as plantas, contra o estresse biológico e ambiental, portanto, são sintetizados em resposta ao ataque patogênico de insetos, bactérias, fungos e vírus, ou em resposta a exposição de energia de alta radiação, como a luz ultravioleta (Taiz e Zeiger, 2004).

Alguns compostos voláteis podem estar presentes nos óleos essenciais e a importância de tais compostos se deve às funções que desempenham nos processos evolutivos, na defesa contra predadores e na comunicação bioquímica intra-espécies (Dudareva et al., 2004).

Algumas substâncias químicas sintetizadas pelas plantas podem estar envolvidas com a doença, podendo facilitar ou impedir o desenvolvimento do patógeno nos seus tecidos (Wink, 1988), bem como serem utilizadas como defesa, isto pode ser deduzido pela diferença na quantidade de monoterpenos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) analisados, visto que monoterpenos podem ter sua cadeia quebrada mais facilmente (Taiz e Zeiger, 1998).

Os compostos voláteis encontrados nas amostras resistentes, eucalyptol ou 1,8-cineole e o terpinyl acetato- $\alpha$ , identificados como biomarcadores para resistência de plantas de eucalipto a ferrugem, são monoterpenos e uma das características deste grupo de compostos é possuir atividade antimicrobiana (Beier e Nigg, 1992).

O eucalyptol é encontrado em plantas como o alecrim, sálvia, louro, manjeriço, eucalipto, entre outras e, está bastante difundido na indústria sendo utilizado para fins medicinais, farmacêuticos, alimentícios, cosméticos e perfumaria. O terpinyl acetato- $\alpha$  presente em várias composições de óleos essenciais de plantas, como sálvia, manjerona, eucalipto, entre outras, é utilizado, principalmente, para usos medicinais e farmacêuticos (Seigler, 1998).

Os monoterpenos estão muito disseminados em plantas, presentes tanto em algas, quanto em angiospermas mono e dicotiledôneas, podendo também ser encontrados em fungos, bactérias e insetos (Charlwood e Charlwood, 1991a; Nahrstedt, 1982). Estes compostos são muitas vezes responsáveis pela essência e/ou odor de plantas. Ocorrem livres nas plantas, geralmente associados com estruturas de armazenamento especializadas, como canais secretores, cavidades, tricomas glandulares, células oleríferas especiais (Croteau,

1981; Croteau e Johnson, 1984; Gershenzon e Croteau, 1991; Johnson e Croteau, 1987; Rodríguez, et al., 1984).

Geralmente, os monoterpenos são sintetizados nas células epiteliais que revestem os dutos ou cavidades em que se encontram, onde também são sequestrados. A produção de monoterpenos ocorre com frequência em tecidos não fotossintéticos, sendo altamente dependente de carboidratos tanto para a importação de carbono como de energia (Croteau e Johnson, 1985).

Em decorrência das análises (Figuras 24 e 26), pode-se extrair que as plantas resistentes possuem analitos ou compostos voláteis que não foram encontrados nas plantas suscetíveis (pouco, moderado e altamente suscetíveis) e, os compostos voláteis identificados como biomarcadores podem auxiliar no controle de *P. psidii* em eucalipto, como pela busca por materiais genéticos mais resistentes a doença.

Outro fator importante são os compostos expressos em maior quantidade pelas amostras muito suscetíveis (Figuras 25 e 29) e que não estavam presentes nas amostras resistentes, desse modo, podem ser utilizados em condições controladas para estudar a interação do patógeno em ambiente controlado, como confecção de meios de cultura artificiais contendo nutrientes necessários e compostos voláteis diretamente relacionados à doença, buscando substituir as condições naturais presentes nas folhas para condições artificiais nos meios de cultura.

Hantao et al. (2013), realizaram um estudo de cromatografia gasosa bidimensional abrangente e análise de dados multivariados para determinar biomarcadores para a doença *Teratosphaeria nubilosa* em *Eucalyptus globulus*. Foram analisadas amostras de folhas de *E. globulus* sadias e doentes, sendo encontrados mais de quarenta compostos como biomarcadores para *T. nubilosa* em eucalipto através desta técnica.

Este passo é importante para o cultivo axênico de fungos biotróficos em meio artificial de importância para culturas florestais e agronômicas, bem como outras áreas de interesse, como medicina, farmacologia, biologia, tecnologia de alimentos, ecologia, microbiologia, entre outras.

## 5. CONCLUSÕES

✓ A variável germinação de urediniósporos (40,32% a 49,96%) não se mostrou significativa para o estudo de diferentes meios enriquecidos de *Puccinia psidii*;

✓ A contaminação foi menor nos meios de cultura I (ASZV) e meio de cultura com folhas de jambeiro a  $0,5\text{g L}^{-1}$  nos quais os urediniósporos se desenvolveram melhor;

✓ O meio de cultura I (ASZV) nas duas concentrações utilizadas (50% e 80%) e meio de cultura com folhas de jambeiro a  $0,5\text{g L}^{-1}$  obtiveram os melhores resultados para o crescimento do tubo germinativo de ferrugem;

✓ O aumento da concentração da solução nutritiva nos meios enriquecidos de 50% para 80% não se mostrou significativo para as variáveis estudadas (contaminação, percentagem de germinação e crescimento do tubo germinativo);

✓ Os estudos com compostos voláteis em plantas permitiram distinguir substâncias que estão presentes ou ausentes em materiais resistentes e suscetíveis a um patógeno;

✓ Os analitos eucalyptol e terpinyl acetato- $\alpha$  são possíveis marcadores bioquímicos voláteis para a resistência à ferrugem em eucalipto.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas 2012 ano base 2011. **ABRAF** – Brasília, 150 p., 2012.

ABRAF, Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas 2010 ano base 2009. **ABRAF** – Brasília, 140 p., 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. 4. Ed. Carol Stream, Illinois: *Allured Publishing Corporation*, 1995.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. 4. Ed. Carol Stream, Illinois: *Allured Publishing Corporation*, 2001. 804 p.

AINSWORTH, B.C. *Ainsworth & Bisbys Dictionary of the fungi*. New Surrey: **Commonwealth Mycological Institute**, 1971. 663p.

ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, UFV, 2004. 442 p.

APARECIDO, C. C. Estudo ecológicos sobre *Puccinia psidii* Winter – ferrugem das mirtáceas. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 2001.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J.; **Anal. Chem.** 1990, 62, 2145.

BEIER, R. C., NIGG, H. N. Natural toxicants in foods, in **Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture** (H. N. Nigg, D. S. Seigler, eds) Plenum Press, New York, p. 272-292, 1992.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico.** São Paulo, Agronômica Ceres, 1996. 299p.

CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., CARMO, M.G.F. Avaliação do progresso da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana* no sudeste da Bahia, de 1987 a 1991. **Revista Árvore**, v. 3, n.º 18, p. 265-74, 1994.

CARVALHO JR., A.A., MARTINS, E.M.F., FIGUEIREDO, M.B. Cultura axênica de *Melampsora epitea*, ferrugem do chorão (*Salix babylonica*), a partir de urediniósporos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 379-85, 1998.

CHARLWOOD, B. V., CHARLWOOD, K. A. **Monoterpenes**, in Terpenoids (B. V. Chalwood and D. V. Banthorpe, eds.), v. 7, of Modern Methods in Plant Biochemistry (J. B. Harborne and P. M. Dey, eds.), Academic Press, London, p. 43-98, 1991a.

COFFEY, M.B. Obligate parasites of higher plants, particularly rust fungi. Symp. **Soc. Exp. Biol.**, v. 29, p. 297-323, 1975.

COTERRIL, P.P.; BROLIN, A. Improving *Eucalyptus* wood, pulp and paper quality by genetic selections. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT

OF EUCALYPT, 1997, Salvador. Proceedings. Colombo: EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Florestas**, p.1-13.

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. 819-925, 1998.

CROTEAU, R. **Biosynthesis of monoterpenes**, in Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, v. 1 (J. W. Porter, and S. L. Spurgeon, eds.) Wiley, New York, p. 225-282, 1981.

CROTEAU, R., JOHNSON, M. A. **Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes**, in Biology and Chemistry of Plant Trichomes (E. Rodríguez, P. L. Healey, I. Mehta, eds.), Plenum Press, New York, p. 133-185, 1984.

CROTEAU, R., JOHNSON, M. A. **Biosynthesis of terpenoids wood extractives**, in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (T. Higuchi, ed.), Academic Press, Orlando - FL, p. 379-439, 1985.

CUTTER JR., V.M. Studies on the isolation and growth of plant rusts in host tissue cultures and upon synthetic media I Gymnosporangium. **Mycologia**, v. 51, p. 248-95, 1959.

DALLÜGE, J. BEENS, U.A.TH. BRINKMAN, J. Comprehensive two dimensional gas chromatography: A powerful and versatile analytical tool. **Journal of chromatography**, n. 1000, p. 69-108, 2003.

DEMUNER, N.L., ALFENAS, A.C. Fungicidas sistêmicos para controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em *Eucalyptus cloeziana*. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.3, p.174-7, 1991.

DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. Biochemistry of Plants Volatiles. **Plant Physiology**, v. 35, n. 4, p.1893-1902, 2004.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do Eucalipto. **Revista Árvore**, 7 (2): 92-109. 1983.

FERREIRA, F.A. Patologia Florestal, principais doenças no Brasil. Viçosa: **Sociedade de Investigações Florestais**, 570 p., 1989.

FIGUEIREDO, M.B., CARVALHO Jr., A.A. Efeito da lavagem dos soros na germinação dos soros telióides de *Puccinia pampeana*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 101-4, 1994.

FIGUEIREDO, M.B., CARVALHO Jr., A.A. Presença de um auto-inibidor nos teliósporos telióides de *Puccinia pampeana* e o seu papel na sobrevivência da espécie. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 200-5, 1995.

FIGUEIREDO, M.B., COUTINHO, L.N. Avaliação da capacidade de produção de basidiósporos pelos soros teliais de *Puccinia mogiphanes* Arthur. In: **REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO**, 7, São Paulo. Resumos. São Paulo, 1994, p.26.

FIGUEIREDO, M.B., PASSADOR, M.M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.117-134, jan./mar., 2008.

FURTADO, E.L., MARINO, C.L. *Eucalyptus* rust management in Brazil. **Forest Research**, New Zealand, v. 16 (suppl.), p. 118-124, 2003.

FURTADO, E.L., SANTOS, C.A.G., TAKAHASHI, S.S. & CAMARGO, F.R.A. Doenças de *Eucalyptus* em viveiro e plantio: diagnose e manejo. (**Votorantim Celulose e Papel, Unidade Florestal – Boletim técnico**), 48p., 2001.

GALLI, F. Doenças da goiabeira. In: **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980, v. 2, p. 335-7.

GERSHENZON, J., CROTEAU, R. **Terpenoids**, in *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, v. 1 (G. A. Rosenthal, M. R. Berenbaum, eds.), Academic Press, San Diego - CA, p. 165-219, 1991.

GONÇALVES, S. Lista preliminar das doenças das plantas do estado do Espírito Santo. Rio de Janeiro. **Ministério da Agricultura**. pp 1-12. 1929.

HARVEY, A. E., GRASHAM, J. L. Axenic culture of the mononucleate stage of *Cronartium ribicola*. **Phytopathology** 64, 1028-1033, 1974.

HANTAO, L. W.; ALEME, H. G.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E. L.; RIBEIRO, F. A. L.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Determination of disease biomarkers in *Eucalyptus* by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1279, p. 86-91, 2013.

HENNEN, J.F., HENNEN, M., FIGUEIREDO, M.B. Índice das ferrugens (Uredinales) do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 49 (Supl.), 201 p. 1982.

HENNEN, J.F.; SOTÃO, H.; FIGUEIREDO, M.B. Plant rust fungi (Uredinales) in the Brazilian Amazon área. In: **CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTÂNICA**, 5., Ciudad de Habana, Cuba. Resumos. Ciudad de Habana: 1990. p.198.

HIRATSUKA, ATSUKA, Y.; CUMMINS, G.B. Morphology of spermogonia of the rust fungi. **Mycologia**, v.55, p.487-507, 1983.

HOLLIS, C. A., SCHMIDT, R. A., KIMBROUGH, J. W. Axenic culture of *Cronartium fusiforme*. **Phytopathology**, 64, 1028-1033, 1972.

HOTSON, H.H., CUTTER JR., V.M. The isolation and culture of *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw. **Proceedings Nacional Academy of Sciences**, v. 27, p. 400- 3, 1951.

JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, 4 (8): 475-487. 1944.

JOHNSON, M. A., CROTEAU, R. **Biochemistry of conifer resistance to bark beetles and their fungal symbionts**, in Ecology and Metabolism of Plant Lipids (G. Fuller and W. D. Nes, eds.), American Chemical Society, ACS Symposium Series 325, Washington, DC, p. 76-92, 1987.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.184-188, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V., FIALHO, J.F., RAMOS, V.H.V., LEÃO, A.J.P. Doenças e potencial de produção do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) nos cerrados. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (Supl.), p. 272, 1997.

KATSUHIRO, A., KATSUYA, K. Occurrence of different races during axenic culture of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* race 45. **Ann. Phytopat. Soc. Jap.**, v. 51, p. 421-5, 1985.

KRUGNER, T.L. Doenças do eucalipto. In: GALLI, F. (Ed.) Manual de Fitopatologia, volume 2, 2a ed., São Paulo, **Agronômica Ceres**, p.275-96, 1980.

KUCK, K.H. **Über dieinfektionsbedingten Veräderungen der Aminosäuren und Fettsäuren in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, Rasse 32, infizierten Weizenblättern und die "in vitro" Sporulation des Pilzes.** Aachen. Ph. D Thesis. Rheinisch- Westfälischen Technischen Hochschule. 1979.

MACLEAN, D.J. Axenic culture and metabolism of rust fungi. In: SCOTT, K.J., CHAKRAVORTY, A.K. The rust fungi. Minnesota: **Academic Press Inc. St. Paul**, p. 37-120, 1982.

MARTINS, E.M.F., CARVALHO Jr., A.A., FIGUEIREDO, M.B. Obtenção de culturas axênicas esporulantes de *Melampsora epitea* Thüm, ferrugem do chorão (*Salix* sp), a partir de uredíniosporos puros. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 62 (Supl.), p. 58, 1995.

MORICCA, S., RAGAZZI, A. Axenic culture of the aecial state of *Cronartium flaccidum* from Italy. **Mycological Research**, v. 98, p. 1258-62, 1994.

MORICCA, S., RAGGAZZI, A., LONGO, B. N. "In vitro growth of the aspen rust *Melampsora larici-tremulae*". **Mycological Research**, v. 104, p. 1250-1257, 2000.

MORICCA, S. *Cronartium flaccidum* in axenic culture: new insights and perspectives. Abstracts - **Phytopathology Mediterranea**, v. 49, p. 421-34, 2010.

NAHRSTEDT, A. Strukturelle Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Sekundärstoffe, **Planta Medica**, v. 44, p. 2-14, 1982.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 247-256, nov., 2000.

NUTTER, F.W., TENG, P.S., SHOKES, F.M. Disease assessment terms and concepts. **Plant Disease**, v. 75, p.1187-8, 1991.

PAINEL FLORESTAL. Eucalipto: Emprego e Renda. Notícias Disponível em: <<http://painelflorestal.com.br/noticias/eucalipto/10091/eucalipto-emprego-e-renda>>. Mato Grosso do Sul. Acesso em: 25 nov. 2010.

PEI, M.H., GIBBS, J.N. Axenic culture of *Peridermium pini* from single aeciospores. **Plant Pathology**, v. 41, p. 91-4, 1992.

PEI, M. H., PAWSEY, R. G. Axenic culture of *Peridermium pini*. **Mycological Research** 95, 108-115. 1990.

PETERSEN, R.H. The rust fungus life cycle. **Botanical Review**, n.40, p.453-513, 1974.

RAHBAR BHATTI, M. H., SHATTOCK, R. C. Axenic culture of *Phragmidium mucronatum*. **Trans. Br. mycol. Soc.** 74 (3) 595-600. 1980.

REIS, E.M. & RICHTER, R.L. Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos e comprimento de tubos germinativos de *Puccinia triticina*. **Fitopatologia Brasileira** 32:075-078. 2007.

RODRÍGUEZ, E. HEALEY, P. L., MEHTA, I. (eds.), **Biology and Chemistry of Plant Trichomes**, Plenum Press, New York, 1984.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. **Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana**. In: Biocontrole de Doenças de Plantas: Usos e Perspectivas. Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. Jaguariuna, Embrapa Meio Ambiente, Cap. 6, p. 85–100, 2009.

RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C. Absorção e translocação de fungicidas sistêmicos em *Eucalyptus grandis* para o controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 47-9, 1989.

RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., BARBOSA, M.M. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 73-81, (1989a).

RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., VALE, F.X.R. do. 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, (1989b).

SAVILE, D.B.O. Evolution of the fungi (Uredinales) as reflected by their ecological problems. **Evolutionary Biology**, n.9, p.137-207, 1976.

SCHENK, R. U., HILDEBRANDT, A. C. Medium and technique for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany** 50, 199-204, 1972.

SEIGLER, D. S. **Monoterpenes**, In. Plant Secondary Metabolism, Klumer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, p. 759, 1998.

SILVEIRA, V.D. Elementos de Fitopatologia: *Puccini psidii*, ferrugem das Mirtáceas. **Agronomia**, v.10, p. 218-24, 1951.

SOUZA, S.M.C. de. Doenças de Plantas – Goiaba. **Informe Agropecuário.**, v.11, p.26, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2.ed., 792p., 1998.

TAIZ, I.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 722 p. In: TAIZ, I.; ZEIGER, E. **Metabólicos secundários e defesa vegetal**. p.309–332, 2004.

TAKAHASHI, S.S., FURTADO, E.L., CAMARGO, F.R.A., RAMIRO, G.A. Teste de modelo para estimativa da incidência e evolução da ferrugem do eucalipto, *Puccinia psidii* Winter, em duas regiões de plantio no Estado de São Paulo. In: **Forest: Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas**, 5, Curitiba, 1999. (CD-ROM).

TAKAHASHI, S.S. **Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo**. Botucatu, 2002, 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2002.

TUREL, F. L. M. Saprophytic development of the flax rust *Melampsora lini*, race n°3.

**Canadian Journal of Botany**, 47(5): 821-823, 10.1139/b69-118. 1969.

WALKER, P.T. Crop losses: the need to quantify the effects of pests, diseases and weeds on agricultural production. **Agriculture, Ecosystems and environment**, v. 9, p. 119-58, 1983.

WALLA, J.A. Axenic culture of *Peridermium harknessii*, *Cronartium quercuum* f.sp. *banksianae* and *Cronartium comandrae*. **Forest Research**, (Suppl.):33-43, 2003.

WILLIAMS, P.G., SCOTT, K.J., KUHL, J.L. Vegetative growth of *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici in vitro*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1418-9, 1966.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: SCHELL, J.; VASIL, I. K. (Eds.). **Cell culture and somatic cell: genetics of plants**. New York: Academic Press, 1988. p. 17-42.

YAMAOKA, Y., KATSUYA, K. Axenic culture of four *Melampsora* species parasitic on willows. **Transactions Mycological Society of Japan**, v. 25, p. 85-92, 1984a.