

PAULO MAZZAFERA

ESTUDOS SOBRE A RESISTÊNCIA INDUZIDA
NO COMPLEXO *Coffea arabica* L.-*Hemileia*
vastatrix BERK. et BR.
(CAFÉ-FERRUGEM)

Tese apresentada ao
Instituto de Biolo-
gia da Universidade
Estadual de Campi-
nas, para obtenção
do Título de Mestre
em Ciências Bioló-
gicas na área de
Biologia Vegetal.

*Este exemplar correspon-
de à redação final da tese
defendida pelo candidato
Paulo Mazzafera e aprovada
pela comissão julgadora*

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO

CELSO NOVAES DE MAGALHÃES

Assinatura

CAMPINAS

Estado de São Paulo-Brasil

-1 9 8 7-

M458e

3187/BC

UNICAMP
BIB. TECA CENTRAL

À Arlete e Luiz

DEDICO

Ao Dr. Alcides Carvalho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Celso N. de Magalhães, pela orientação, amizade e apoio
- Ao Dr. Alcides Carvalho por minha introdução a pesquisa
- Aos pesquisadores Masako Toma Braghini e Jaap G. G. Hoogstraten pelo estímulo e apoio
- Às pesquisadoras Vera Maximiluc Nacacche, Sonia M. C. Dietrich e Sielke Sievers pelas sugestões
- Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelos esclarecimentos técnicos e ao pesquisador João Paulo F. Teixeira, da Seção de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, pela disponibilidade de seu laboratório
- Aos amigos Sérgio Jachtchenko, pela manutenção elétrica de aparelhos e redação desta tese e Oliveira Guerreiro Filho, pelo auxílio na análise estatística
- à Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, através do pesquisador Luiz Carlos Fazuoli, pelas facilidades oferecidas durante a realização deste trabalho
- Aos professores do Curso de Pós Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos e amizade
- Aos meus pais, Arlete e Luiz, pela compreensão e apoio constante durante este trabalho.

ÍNDICE

I- Introdução.....	01
II- Revisão bibliográfica.....	04
1- <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. et BR.....	05
1.1- Considerações gerais.....	05
1.2- Fatores que afetam a doença.....	06
2- Genética de resistência do cafeeiro à ferrugem.....	09
3- Interações patógeno-hospedeiro.....	12
4- Alterações em cafeeiros infectados por <i>Hemileia vastatrix</i>	17
4.1- Alterações histopatológicas no cafeeiro.....	17
4.2- Alterações metabólicas no cafeeiro.....	19
5- Resistência Induzida.....	35
5.1- Considerações Gerais.....	35
5.2- Alterações metabólicas na resistência induzida..	39
5.3- Resistência induzida como método de controle à doenças em plantas.....	43
III-Material e métodos.....	45
1- Material vegetal.....	45
2- Amostragem de Folhas.....	45
3- Obtenção de esporos de <i>Hemileia vastatrix</i> , teste de germinação, inativação de esporos.....	46
4- Teste de discos de folhas.....	47
5- Extração e determinação de fenóis.....	48
6- Extração e determinação de atividade de peroxidase e polifenoloxidase.....	49

7- Extração e determinação de atividade de fenilalanina amônia-liase.....	50
8- Tratamento de luz na faixa do vermelho extremo e luz fluorescente.....	51
9- Tratamento de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem.....	53
10- Análise cromatográfica dos extratos etanólicos.....	55
IV- Resultados e discussão.....	56
1- Teste de discos.....	56
1.1- Ensaio de exposição à luz fluorescente e vermelho extremo.....	56
1.2- Ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem.....	58
2- Teor de fenóis.....	64
2.1- Ensaio de exposição à luz fluorescente e vermelho extremo.....	65
2.2- Ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem.....	68
3- Atividade de peroxidase e polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.....	72
4- Análise cromatográfica.....	75
V- Conclusões.....	80
VI- Resumo.....	81
VII- Summary.....	83
VII- Abreviaturas.....	85
IX - Literatura citada.....	86

I- Introdução

A ferrugem das folhas do café (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) foi detectada no Brasil, no Estado da Bahia, em 1970 (MEDEIROS, 1970), sendo considerada uma das mais importantes doenças do cafeeiro, por causar a queda precoce das folhas, afetando a produtividade.

Para o seu controle são conhecidas técnicas eficientes de combate químico, com base em aplicações de fungicidas preventivos e curativos. No entanto, segundo levantamentos realizados no ano agrícola de 1980/81, em diversas regiões do Estado de São Paulo, apenas 5% dos cafeeiros recebiam tratamento fitossanitário adequado, 24% recebiam esporadicamente e o restante, 70%, não eram tratados (TOMAZIELO, 1984).

De acordo com MONACO (1977), as perdas ocasionadas pelo ataque da ferrugem no Brasil podem chegar a 30% da produção. O controle químico, nas condições do Estado de São Paulo, pode gerar aumentos da ordem de 33% a 111% (TOMAZIELO, 1984) sendo que, o custo do tratamento de mil covas de café é inferior ao valor de uma saca de 60Kg de café beneficiado (GARCAFÉ, 1985).

Em face a estes dados, o melhoramento genético do cafeeiro, visando resistência ao agente causal da ferrugem, adquire acentuada importância. Pesquisas com esta finalidade há muito vêm sendo desenvolvidas no Brasil (MONACO, 1975), o que

permitiu o acúmulo de boa quantidade de informações sobre as bases genéticas da resistência à esta doença do cafeeiro.

Por outro lado, muito pouco se conhece sobre os processos bioquímicos da resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. São escassos os trabalhos que se propuseram a analisar com maior profundidade as alterações bioquímicas na interação entre patógeno e hospedeiro, seja esta compatível (suscetibilidade) ou incompatível (resistência).

Um dos principais objetivos neste campo de pesquisa tem sido a elucidação de como ocorre o reconhecimento entre a planta e o patógeno, de forma que ocorra a reação de resistência. Alguns modelos explicativos foram propostos e vários métodos foram usados nestes estudos. Entretanto, o assunto mostrou-se muito complexo, pois, conseguiu-se em muitos sistemas a indução de resistência à patógenos, com indutores que vão desde sais inorgânicos até microorganismos não patogênicos, ou mesmo patogênicos, porém, inativos.

Entre os vários indutores de resistência descobertos, os microorganismos não patogênicos e patogênicos inativos têm merecido maior atenção por representarem, de certa forma, um processo corrente na natureza e também porque, através da sua compreensão, sob o contexto bioquímico, podem levar a um maior esclarecimento de como ocorre o controle genético da resistência. Isto talvez possibilitaria melhores estratégias no melhoramento de plantas visando a resistência à doenças.

Em função do que foi comentado previamente, o presente trabalho teve como objetivo a indução de resistência em cafeeiro

suscetível ao agente causal da ferrugem. Utilizou-se para tal fim, a prévia inoculação de discos de folhas com esporos inativos de ferrugem e exposição a luz na faixa do vermelho-extremo. Analisaram-se os compostos fenólicos quantitativa e qualitativamente, pelo fato destes compostos serem considerados como substâncias antifúngicas e que, para alguns sistemas patógeno hospedeiro, provou-se estarem intimamente relacionados com a resistência à doenças. Foram dosadas as atividades das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, as quais, segundo a bibliografia, estão envolvidas no metabolismo dos fenóis.

II- Revisão bibliográfica

Devido aos poucos estudos realizados no campo da bioquímica da resistência no complexo *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*, esta revisão bibliográfica procurou abranger, também, trabalhos que citam a influência de diversos fatores sobre o desenvolvimento da ferrugem do cafeeiro. Julgou-se adequado que tais referências, associadas a uma revisão geral sobre a bioquímica da resistência em outros complexos patógeno hospedeiro possam gerar novas idéias a serem pesquisadas em café. No entanto, procurou-se evitar um aprofundamento maior no assunto, devido à diversidade e quantidade de informações disponíveis.

O capítulo 1 e 2 apresentam uma revisão sobre o fungo e sobre as bases genéticas da resistência no sistema *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*, respectivamente. O capítulo 3 abrange a interação entre o fungo causador da ferrugem eo cafeeiro e também de outros sistemas, dando maior enfoque aos processos de reconhecimento entre patógeno e hospedeiro. O quarto capítulo faz, principalmente, um levantamento das alterações histopatológicas e metabólicas em café infectado por *Hemileia vastatrix*, com referência a outros sistemas, abordando inclusive alguns aspectos sobre resistência induzida. O quinto capítulo é referente ao fenômeno da resistência induzida, abrangendo estudos em café e outras culturas.

1- *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.

1.1- Considerações gerais

A moléstia conhecida como ferrugem alaranjada das folhas do cafeeiro foi detectado pela primeira vez na África, próximo ao lago Vitória, em 1861 (SCHIEBER, 1975). Porém, considera-se como descoberta oficial a sua presença no Ceilão, atual Sri-Lanka, em 1868 (SACCAS e CHARPENTIER , 1971).

A doença é causada por um basidiomiceto da subclasse Hemibasidio mycetidae, ordem Uredinales e família Pucciniaceae. Difere dos outros fungos desta família por duas características: hábito de esporulação exclusivamente através dos estômatos e possuir uredosporos reniformes, equinulados dorsalmente e lisos ventralmente (BERKELEY, 1869; apud CHAVES, 1970). A ferrugem do café é um parasita obrigatório, formando pústulas amarelas na face inferior das folhas e ocasionando a sua queda precoce (CHINAPPA e SREENIVASAN, 1969).

Sua disseminação dentro de uma cultura de café se dá principalmente pelos respingos das gotas de chuva e pelo vento. O ser humano e o vento são indicados como responsáveis diretos pela passagem do fungo de um país para outro (SCHIEBER e ZENTMYER, 1984).

A germinação dos esporos da ferrugem ocorre apenas em

presença de água no estado líquido (NUTMAN e ROBERTS, 1963), e tem início por emissão do tubo germinativo que, atingindo a célula guarda do estomato, forma uma estrutura denominada apressório, da qual saem as hifas primárias, e destas, as secundárias ou hifas de infecção. Após a ramificação das hifas pelos espaços intercelulares forma-se, na face de contato entre o micélio do fungo e célula do hospedeiro a célula mãe do haustório, que dá origem ao haustório. Estruturas especializadas que se desenvolvem a seguir, os "pegs de infecção", efetuam a penetração (WARD, 1882 e RIJO e SARGENT, 1974).

1.2- Fatores diversos que afetam a doença

Estudos sobre a nutrição do cafeeiro e o seu efeito sobre o desenvolvimento da ferrugem demonstraram que a ausência de nitrogênio em plantas cultivadas em vasos, permite maior número de folhas infectadas e de pústulas (FIGUEIREDO et al, 1974).

Moraes (1974) notou que a deficiência de ferro tornava o desenvolvimento da doença mais lento e 50% das lesões iniciais não chegavam a esporular.

Cafeeiros com alta produção se mostram mais atacadas pela ferrugem (MARIOTTO et al, 1974). ESKES e SOUZA (1981) observaram, através de inoculações artificiais em laboratório em folhas de ramos com e sem frutos de café, que este maior ataque se deve em parte à maior suscetibilidade das folhas.

Esques et al (1978) estudando os cultivares Catuai e Icatu de *C. arabica* e o cultivar Kouillou de *C. canephora* observaram que, em Catuai, as folhas mais velhas e expostas a pleno sol, eram mais atacadas por ferrugem do que as folhas novas expostas ou não ao sol. Em Kouillou e Icatu a resistência revelou-se maior nas folhas mais velhas (ESKES e TOMA BRAGHINI, 1982). Esta maior resistência expressou-se pelo menor tipo de reação e densidade de lesão, e maior período de latência.

As primeiras especulações sobre a influência do déficit hídrico no desenvolvimento do fungo da ferrugem foram feitas por TASCHDJAN (1934) apud DIAS, (1957). Hoogstraten (1982) manteve os cultivares Mundo Novo e Ibaaré de *C. arabica*, inoculados com ferrugem, plantados em vasos com três níveis de umidade de solo, sendo uma com base em lâmina de água, outra com rega normal (uma a duas vezes por dia), e uma terceira onde as plantas recebiam água quando apresentavam sintomas visíveis de murcha. O tratamento com excesso de umidade teve três a cinco vezes mais lesões do que o de menor umidade.

ORTOLANI et al (1974) relataram que o ciclo epidemiológico da ferrugem em plantas suscetíveis, em São Paulo, é mais intenso na face sul, na qual, durante o período em que realizou-se o estudo, praticamente não incidia radiação solar direta. Ressaltam ainda que a diferença entre a face sul e a norte indica um relacionamento com o balanço de energia que, por sua vez, condicionaria a duração do período de molhamento das folhas, situação propícia ao desenvolvimento do fungo da ferrugem.

ESKES (1977) coletou folhas de Mundo Novo expostas ou

não a pleno sol , colocando-as , sob condições de laboratório , sob maior ou menor intensidade luminosa. Seguindo-se à inoculação com esporos de ferrugem, a observação do desenvolvimento do fungo mostrou que o número de lesões foi oito vezes maior no material proveniente do sol, e que a esporulação foi maior com maior intensidade de luz no laboratório. Também ESKES (1982b) observou que plantas de café aclimatadas por seis semanas em ambiente com alta intensidade luminosa, quando inoculadas com esporos de ferrugem, apresentaram um aumento significativo na densidade de lesões. Isto, porém, não foi observado quando o período de aclimação , em alta intensidade luminosa, se dava somente poucas horas antes da inoculação. A alta luminosidade após a inoculação, ou menores intensidades antes da inoculação, mostraram efeito semelhante.

COOK (1901) relata que, na Índia, cafeeiros plantados em floresta raleada apresentavam poucos danos pela ferrugem. Aquele autor levantou a hipótese de as árvores da floresta funcionarem como uma barreira física. RODRIGUES JR. (1984) também fez observações que plantas de café bastante sombreadas foram atacadas com menor severidade por ferrugem.

O efeito da luminosidade pode estar relacionado com a temperatura. GOMEZ e JARAMILLO (1974) mostraram que folhas de café a pleno sol podem apresentar temperaturas de 3 a 5 °C, podendo chegar a 10 °C, acima da temperatura ambiente. MONACO et al (1973) demonstraram que o crescimento de lesões de ferrugem foi completamente inibido quando plantas de café permaneceram a 40 ° C durante quatro horas por dia durante cinco dias

consecutivos. A permanência a 40°C por dezesseis horas seguidas inibiu a formação de pústulas (RIBEIRO et al, 1978).

Combinações compatíveis e incompatíveis entre racas de ferrugem e diferentes genótipos de café causaram aumento da suscetibilidade, quando permaneceram a 45°C por uma hora e meia. Na planta suscetível houve o aparecimento precoce de sintomas e melhor esporulação e, na planta resistente, observou-se melhor desenvolvimento do micélio no espaço intercelular (MARIA et al, 1985).

2- Genética da resistência do cafeeiro à ferrugem

Considera-se uma planta resistente aquela que, exposta a inóculo suficiente e condições ambientais adequadas, evita e restringe a infecção e, posteriormente, a atividade do patógeno (PARLEVLIET, 1981).

Um dos grandes problemas na obtenção de plantas resistentes à moléstias é a possibilidade da eventual perda da resistência devido à adaptação do patógeno. Este tipo de resistência, conhecida como vertical, segue a teoria gene por gene de FLOR (1956). Para o sistema ferrugem cafeeiro, NORONHA-WAGNER e BETTENCOURT (1967) citam que a resistência vertical segue a teoria de FLOR.

Em *Coffea* são, até agora, relatados a ocorrência desete genes dominantes de resistência à *Hemileia vastatrix*, que podem ocorrer isoladamente ou em combinações. Dessa forma, deduziu-se

a existência de sete genes de virulência do patógeno, que lhe permitem ultrapassar as barreiras de defesa da planta (SCALI et al, 1973).

Ao contrário da vertical, a resistência horizontal tem por definição básica a ausência de interação entre o patógeno e o hospedeiro, sendo, no geral, poligênica e possibilitando o aparecimento de genótipos com diferentes graus de resistência (VANDERPLANK, 1963).

Segundo SIMONS (1972), a resistência horizontal não é completa e tem bases em mecanismos que dificultam parcialmente o desenvolvimento de um patógeno no hospedeiro. Por envolver vários genes, tem alta variabilidade, podendo conferir a imunidade semelhantemente à resistência vertical.

A definição do termo resistência horizontal é conflitante, recebendo também outras denominações, tais como não específica, parcial, poligênica, de genes menores e quantitativa (ESKES, 1980). VANDERPLANK (1978) considera o termo horizontal mais adequado por ser mais abstrato e de ampla utilidade. No entanto, NELSON (1978) discorda disto e afirma que esta definição deve ser usada apenas no sentido epidemiológico, onde representaria a diminuição da taxa de crescimento da epidemia. Isto pode não ser correto pois existem genes de resistência vertical com proteção incompleta. Em *C. arabica*, dois genes condicionadores de resistência vertical (SH3 e SH4) podem conferir proteção incompleta para raças de ferrugem normalmente incompatíveis, o que epidemiologicamente tem efeito semelhante à resistência horizontal (ESKES, 1983a).

O termo estável se distingue de duradoura, pois, a resistência horizontal pode ser influenciada pelo ambiente (ESKES, 1980a).

A resistência vertical, determinada por um ou mais genes que conferem resistência completa, mostra-se não muito eficiente para o controle de doenças, pois, o aparecimento de novas raças do patógeno pode anular totalmente este tipo de resistência. Isto é válido, principalmente, para culturas perenes como o café, onde a rotação de cultivares é lenta; ao contrário do que ocorre com culturas anuais, onde é frequente o lançamento de novos cultivares.

Os parâmetros mais usados para avaliar resistência parcial ou horizontal são taxa de infecção, taxa de crescimento da lesão, período de latência e taxa de esporulação, que indicam os danos causados por um patógeno (UMAERUS e DIHNELL, 1976 e VANDERPLANK, 1978).

Para o sistema ferrugem-café a avaliação da resistência horizontal tem sido feita principalmente pelo período de latência, tipo de reação, densidade de lesões e número de lesões esporulando (ESKES e TOMA BRAGHINI, 1979 e ESKES et al, 1979).

Muitos patógenos mostram grande variabilidade para patogenicidade, especialmente os biotróficos, tal como são os fungos. A ferrugem do café tem apresentado variação de patogenicidade, sendo conhecidas por volta de 30 raças (RODRIGUES JR et al, 1975a e FERNANDEZ, 1981).

As raças I e II da ferrugem são as mais encontradas no mundo, sendo que a raça II, portadora de apenas um gene de virulência (v5), infecta a maioria dos cultivares e variedades de *C. arabica* portadoras do gene SH5 (CARVALHO, 1982). A mesma

raça é predominante nas condições de São Paulo (RIBEIRO et al. 1975).

Dos cinco genes de resistência vertical presentes em *C. arabica*, os esforços no melhoramento genético vêm se concentrando em SH3 (CARVALHO, 1982). A raça patogênica da ferrugem que quebra a resistência do gene SH3 mostrou ser pouco virulenta em condições de campo, sugerindo que a resistência conferida por este fator possa ser relativamente duradoura (ESKES, 1980b).

3- Interações patógeno hospedeiro

De acordo com SHAW (1967), define-se um parasita obrigatório aquele que, na natureza, consegue completar seu ciclo somente nos tecidos vivos de um hospedeiro. O mesmo autor propõe um esquema, o qual é representado na figura 1 , que sumariza as interações básicas que podem ocorrer entre patógeno e hospedeiro.

Os efeitos físicos podem incluir desde o contato do patógeno com a superfície foliar do hospedeiro, até a interface formada entre a parede celular das células do mesófilo e o micélio do fungo. O ambiente influencia o parasita e o hospedeiro, principalmente as condições de umidade e temperatura, podendo causar alterações na resposta da resistência. A interação no sentido contrário refere-se ao microclima formado pelo fungo na planta.

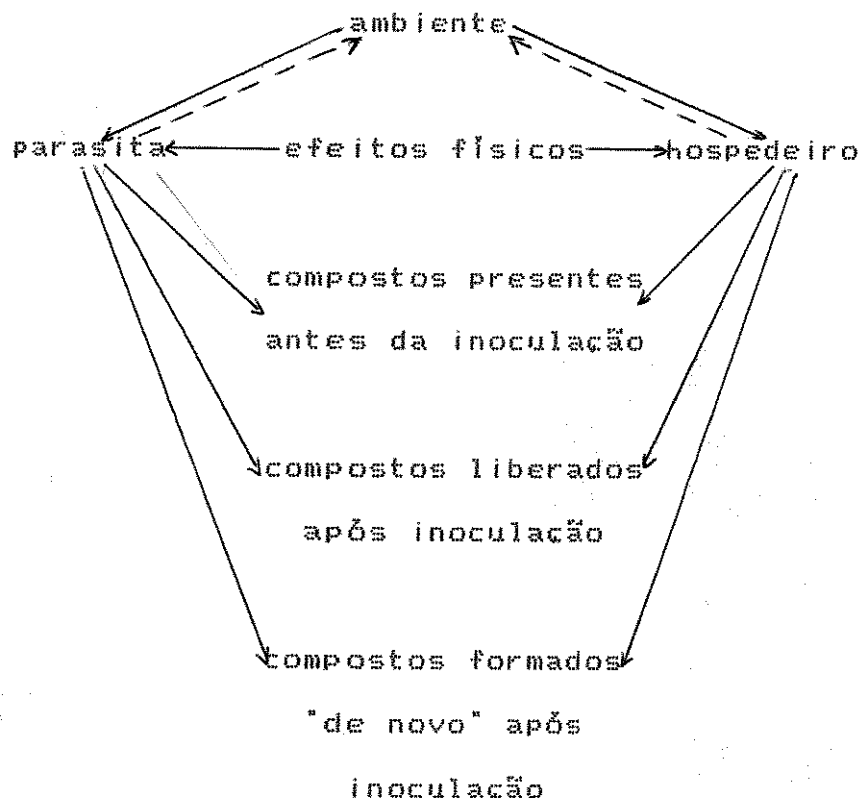


Fig. 1 - Interações patógeno hospedeiro (SHAW, 1967)

As interações bioquímicas são provavelmente as mais complexas e podem se dar por parte de ambos os implicados em uma relação patógeno-hospedeiro. Desta forma, segundo o esquema de SHAW, pode-se agrupar três categorias de substâncias na resposta bioquímica da resistência; a) as já presentes nos organismos; b) as liberadas após a inoculação e que para isso precisam de precursores; c) as sintetizadas a partir da inoculação ou penetração do patógeno.

De maneira semelhante a SHAW (1967), RODRIGUES JR (1980) classifica os mecanismos de defesa de plantas a patógenos em duas categorias amplas. A primeira delas, barreiras estruturais ou físicas, podem ser constitutivas (estruturas já

presentes) ou induzidas (formação após infecção). As barreiras químicas, ou seriam constitutivas ou semiconstitutivas, ou ainda induzidas. As constitutivas e induzidas recebem conotação semelhante ao citado anteriormente para barreiras físicas, com a diferença de que se relacionam com compostos químicos, e as semiconstitutivas incluem as substâncias que estão presentes na planta e que aumentam em quantidade na presença de um patógeno.

O aspecto bioquímico torna-se mais complexo quando o parasita apresenta o fenômeno conhecido como especialização fisiológica. Isto, segundo BRIAN (1976), é mais frequente quando agentes patogênicos são restritos a uma única espécie ou espécies intimamente relacionadas, os quais, sob a forma de diferentes raças, se restringiriam à alguns genótipos da espécie hospedeira. Tal tipo de especificidade encontra bases genéticas na relação gene por gene , através da complementariedade genética entre parasita e hospedeiro.

Do ponto de vista de que a resistência em plantas é um processo essencialmente dinâmico, as barreiras passivas, isto é, as barreiras constitutivas, geram objeções quanto a sua eficácia na defesa das plantas à patógenos. Isto baseia-se, fundamentalmente, no conhecimento de que raças fisiológicas de patógenos atacam genótipos iguais ou diferentes, os quais não apresentam diferenças morfológicas evidentes, e que as alterações no metabolismo do hospedeiro, induzidas pelo patógeno, podem gerar a formação de barreiras ativas do tipo morfológico, ou a produção de compostos antifúngicos (RODRIGUES

JR, 1980).

Segundo KUC (1985) a resistência poderia ter explicação em duas hipóteses. Na primeira, a presença de uma certa informação genética codificaria para um mecanismo, ou mecanismos, inibidores do desenvolvimento de uma determinada moléstia. Para a outra hipótese haveria a presença de informação genética para mecanismos de resistência para todos os microorganismos e em todas as plantas. Na primeira alternativa a resistência existe ou não, e na segunda a resistência seria dependente da rapidez e magnitude pela qual a informação genética fosse transmitida e o seu produto formado. De outra forma poderia ser dito que, a primeira proposição pode explicar a resistência de plantas à fungos específicos, mas sendo mais difícil, através dela, explicar a resistência que as plantas oferecem aos vários microorganismos não patogênicos. Assim, a hipótese de que a resistência é condicionada pela maneira como se expressa uma determinada sequência de nucleotídeos, rapidez e magnitude de resposta, torna-se mais consistente e explicativa(KUC, 1982 e 1985).

Respostas semelhantes às de resistência causadas por microorganismos podem ser induzidas em plantas por uma série fatores físicos, químicos, bióticos e mesmo por moléculas envolvidas na transferência de informações genéticas. Entre os indutores físicos se encontram a temperatura baixa, déficit hídrico e radiação ultravioleta (EDREVA, 1977). O cobre e o mercúrio são citados como indutores químicos de natureza inorgânica (HARGREAVES, 1979), e aminas, antibióticos, fungicidas, inibidores de respiração, RNA, DNA e proteínas

básicas, de natureza orgânica (HESS e HADWIGER, 1971 e HOPPER et al, 1975).

Apesar de todos estes fatores poderem induzir respostas de resistência semelhantes às causadas pelo ataque de microorganismos em plantas, para um sistema patógeno-hospedeiro, onde existe um alto grau de especificidade, supõe-se que o reconhecimento se dá entre moléculas com especificidade de reconhecimento químico, que conferem as características da reação de incompatibilidade entre patógeno e hospedeiro(KEEN, 1982). Dentro deste conceito acredita-se, de modo geral, que os indutores bióticos podem ser componentes da parede celular do patógeno, fragmentos liberados da parede celular do hospedeiro, por ação de enzimas do parasita, ou ainda as próprias enzimas liberadas pelo mesmo. Pode-se citar então, como possíveis indutores, polissacarídeos (ALBERSHEIM e VALENT, 1978 e YOSHIKAWA, 1981), glicoproteínas (KEEN e LEGRAND, 1980 e De WIT e KODDE, 1981) e enzimas (STEKOL E WEST, 1978).

As lectinas constituem uma classe de compostos, que devido às suas características químicas, têm sido relacionadas com o processo de reconhecimento entre plantas e parasitas. São proteínas com capacidade de se ligarem quimicamente a sacarídeos de glicoproteínas ou glicolipídeos, compostos estes que normalmente são constituintes de parede celular de plantas. Até por volta de 1977 eram conhecidas cerca de 50 lectinas, sendo a maioria de origem vegetal (LIENER, 1976 e SHARON, 1977). Aliado a isto cita-se o fato de que lectinas com capacidade de se ligarem a constituintes de natureza fúngica ou bacteriana são

encontradas na superfície das paredes celulares de células do mesófilo, ou seja, local onde se efetua o contato entre agentes patogênicos, que penetram na planta através dos estômatos, e o hospedeiro (SEQUEIRA, 1978).

4- Alterações em cafeeiros infectados por *Hemileia vastatrix*

4.1- Alterações histopatológicas no cafeeiro

A reação de resistência no complexo *C. arabica*-*H. vastatrix* é denominada "flecks" (pequena mancha clorótica) e é geralmente acompanhada de tumefação (aumento no volume de células do mesófilo) no local de infecção (OLIVEIRA e RODRIGUES JR, 1961).

A progressão do micélio do fungo nas folhas de café parece estar intimamente relacionada com o grau de suscetibilidade da planta. Assim, ROGER (1951) notou que, em plantas do cultivar Robusta de *C. canephora* resistentes à ferrugem, o micélio se limitava a algumas camadas de células do parênquima lacunoso, enquanto que em plantas altamente suscetíveis, o micélio poderia, em alguns casos, chegar até células da epiderme superior das folhas.

Em interações incompatíveis de café e ferrugem, após a formação do haustório, cerca de quatro dias depois da penetração da ferrugem, o micélio apresentava-se senescente. As células do

mesófilo aumentavam de volume (tumefação), as paredes tornavam-se espessadas e o espaço intercelular ficava reduzido (RIJO, 1972 e RIJO e RODRIGUES JR, 1978). Nesta reação há, também, o aumento do núcleo e nucléolo, sendo que RIJO (1972) afirmou que a presença de auxina produzida pela planta ou pelo fungo, poderia estar envolvida neste processo, atuando como um ativador de RNAm o qual, por sua vez, induziria a síntese de enzimas específicas que atuariam nas paredes celulares.

Outro tipo mais raro de reação de resistência é designado por "imunidade" e é invisível a olho nu. Nestes casos há apenas o espessamento da parede celular das células da zona estomática e das células adjacentes (RIJO et al, 1982).

RIJO e VASCONCELOS (1983) detectaram deposição de calose somente nos primeiros cinco dias, e de lignina a partir do quinto dia após a inoculação de folhas de café com raças avirulentas de ferrugem. A calose foi encontrada nos pontos de contato entre o micélio do fungo e células do hospedeiro e a lignina nas paredes das células grandes do parênquima lacunoso, sendo que decorridos 15 dias da inoculação toda área da tumefação tornou-se lignificada.

RODRIGUES JR et al (1983) fracionaram polissacarídeos da parede celular de esporos de *H. vastatrix* e os aplicaram em folhas de café, observando que uma das frações induzia espessamento das paredes celulares das áreas estomáticas. A aplicação de quitina comercial, ou extraída de esporos, causaram alterações semelhantes à fração citada anteriormente.

4.2- Alterações metabólicas do hospedeiro

O tecido foliar de café infectado por ferrugem apresenta taxa respiratória maior que tecidos sadios adjacentes ou não à lesão (ANN. REP. COFFEE BOARD, 1965/66). Também, o padrão de aminoácidos se altera havendo um razoável acúmulo de hidroxiprolina, glutamina e asparagina, estando o triptofano ausente (ANN. REP. COFFEE BOARD, 1965/66).

GUEDES e NUNES (1978) mediram as trocas gasosas, no claro e no escuro, em folhas de café atacadas por ferrugem, em vários estádios de infecção. Observaram que, no escuro, as trocas eram maiores no tecido atacado desde o começo da infecção, e que o ponto de compensação para CO₂ era maior nos últimos estádios da infecção. O quociente respiratório era semelhante entre plantas inoculadas e as testemunhas não inoculadas, mostrando que CO₂ e O₂ se alteravam na mesma extensão. Havia, também, aumento na liberação de etileno.

CARVALHO e RIBEIRO (1975) analisaram o teor de açúcares totais, redutores e sacarose em combinações compatíveis e incompatíveis de ferrugem e café. O teor de sacarose nas interações incompatíveis aumentou a um determinado nível, mantendo-se constante em seguida, enquanto que, nas interações compatíveis, este aumento foi maior, porém declinando acentuadamente no oitavo dia de infecção. Açúcares redutores não apresentaram variações enquanto que açúcares totais variaram devido a sacarose. Os autores analisaram os resultados obtidos em sacarose para a combinação incompatível, ou como sendo um

desvio para formação de substâncias fungitóxicas, ou translocação com semelhança à senescência, ou uma elevação da respiração do tecido doente com aumento no consumo de energia.

CARVALHO (1972) além de notar variações em sacarose semelhantes a CARVALHO e RIBEIRO (1975) observou que, nas combinações incompatíveis havia o aparecimento de uma invertase ácida pH 4 , a qual relacionou com a queda no teor de sacarose. Contraditoriamente, esta conclusão não é coerente com o trabalho de CARVALHO e RIBEIRO (1975) pois, neste trabalho observou-se queda no teor de sacarose no oitavo dia após a infecção, porém, não houve menor teor do açúcar em relação a testemunha não inoculada.

DIAS et al (1977) demonstraram a presença de maior quantidade de carboidratos em folhas expostas a pleno sol do que à sombra. Isto pode explicar a maior suscetibilidade deste tipo de folhas como mencionado anteriormente (ESKES, 1982b).

Em combinações compatíveis e incompatíveis entre raças de ferrugem e cafeeiros ocorre um decréscimo de carboidratos nas paredes celulares do tecido foliar, indicando uma possível relação com ação enzimática do fungo (NACACCHE, 1983). No mesmo trabalho, observou-se um maior e mais rápido aumento na concentração de fenóis totais e ácido clorogênico nas plantas resistentes, sendo que as atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase mostraram o mesmo comportamento.

NACACCHE (1983), aponta, também, a existência de um indutor produzido pela ferrugem, que seria o responsável, pelo menos em parte, pelo processo de reconhecimento entre as raças de ferrugem e os cafeeiros usados no estudo. Tal indutor

apresentava composição glicoprotéica, era estável a uma série de pHs e temperaturas e tinha sua atividade afetada por pronase. Uma análise mais profunda do indutor mostrou ser um composto essencialmente formado por uma fração protéica associada a glicose e manose.

A importância do estudo dos fenóis se deve as evidências do envolvimento destes compostos na resistência de plantas à patógenos. Há indicações de que, em plantas suscetíveis o acúmulo ocorre quando o tecido já foi invadido pelo patógeno, enquanto que, em plantas resistentes o aumento também ocorre, porém, mais rápido o suficiente para bloquear o desenvolvimento do organismo invasor (TOUZÉ e ESQUERRÉ-TUGAYÉ, 1982).

Numerosos têm sido os trabalhos que investigam o papel dos compostos fenólicos no mecanismo de resistência de plantas a doenças. De maneira geral, estes estudos relatam o acúmulo destes compostos em tecidos vegetais em resposta a infecções (PRIDHAM, 1965; KUČ, 1966; ROHRINGER e SAMBORSKI, 1967 e KOSUGE, 1969).

Segundo GROSS (1981) o termo "ácido fenólico" é aplicável a uma variedade de compostos orgânicos apresentando pelo menos um radical hidroxila e um radical carboxila; no entanto é comum o uso deste termo para um grupo limitado de compostos, denominados ácidos cinâmicos e ácidos benzóicos.

A maioria dos estudos sobre a síntese de fenóis revela que a principal via de síntese é a do ácido shiquímico, onde há condensação de eritrose-4-fosfato com fosfoenolpiruvato para produzir 3-desoxi D-heptolosanato 7-fosfato, o qual é rapidamente convertido em ácido 5-dehidroquínico, 5-

dehidroshiquimato e ácido shiquímico (CONN, 1964 e NEISH, 1964). No entanto, existem evidências de que unidades de acetato poderiam estar envolvidas na síntese de fenóis (NEISH, 1964 e HADWIGER, 1966).

Devido à natureza fitotóxica dos compostos fenólicos, acredita-se que eles são encontrados armazenados no vacúolo (PRIDHAM, 1965) e a glicosilação dos mesmos parece afetar tanto sua característica tóxica (BARUAH e SWAIN, 1959; ROBERTS, 1960 e PRIDHAM, 1965), como também a solubilidade, influenciando a sua translocação pela planta (KENNEDY e MITTLER, 1953; HATWAY, 1959 e HILLIS e HASEGAWA, 1963).

Os ácidos cafêico e clorogênico são referidos, em alguns casos de interação patógeno-hospedeiro, como compostos que se acumulam em tecidos vegetais infectados (KUČ, 1956; CLARK et al. 1959; ZUCKER et al. 1967 e KUČ, 1972). Em café, o ácido clorogênico está quimicamente associado com a cafeína, formando um complexo de clorogenato de potássio e cafeína (HAMIDI e WANNER, 1964 e HORMAN e VIANI, 1973).

CHALFOUN et al (1978) estudaram o teor de ácido clorogênico em cafeeiros portadores de diferentes fatores de resistência à ferrugem e constataram que apenas as plantas com o alelo SH2 tinham maior quantidade do composto, em relação a plantas suscetíveis, que não continham este fator.

CARELLI et al (1974) analisaram o conteúdo de ácido clorogênico em sementes de espécies do gênero *Coffea*, como também em seleções de *C. arabica*, portadores de diferentes genes de resistência à ferrugem. Observaram que a quantidade deste

fenol variou entre e dentro da mesma espécie. Uma planta do cultivar Robusta de *C. cansebor*, resistente à todas as raças, apresentou maior quantidade daquele composto. No entanto, os autores não conseguiram traçar uma relação entre resistência à ferrugem e teor de ácido clorogênico em sementes de plantas estudadas.

Também é conhecido em café que folhas jovens apresentam maior quantidade de determinados fenóis e que estes variam de acordo com o genótipo estudado (ANN. REP. COFFEE BOARD, 1965/66 e 1969/70 e AMORIM et al, 1978).

O conhecimento dos tipos de fenóis presentes em plantas resistentes ou suscetíveis não permite afirmar a existência de uma relação com resistência. Assim, LOPES e MONACO (1977) encontraram quarenta e sete tipos de fenóis em variedades e cultivares de café, sendo que apenas treze eram comuns, mas não conseguiram traçar uma relação com a resistência à ferrugem.

O conceito de fitoalexinas foi criado por MULLER e BORGER (1940, apud RODRIGUES JR et al, 1975b) para designar substâncias produzidas em combinações incompatíveis entre patógenos e hospedeiro e julgaram serem responsáveis pela inibição do crescimento do fungo e pela resistência do hospedeiro.

Atualmente, em face dos novos conhecimentos sobre estes compostos, define-se fitoalexinas como substâncias antimicrobióticas de baixo peso molecular, que são sintetizadas ou acumuladas em tecidos de plantas após a exposição a microorganismos (PAXTON, 1981).

A natureza bioquímica destes compostos é variada; assim,

em Solanaceae, as fitoalexinas são reconhecidas como sendo fenóis e terpenóides; em Compositae, acetilenos; em Malvaceae, naftaldeídos; e em Convolvulaceae, furano-sesquiterpenóides (RODRIGUES Jr, 1980 e KUČ, 1985). As vias metabólicas acetato-mevalonato, acetato-malonato e do ácido shiquímico são consideradas os caminhos básicos para a produção de fitoalexinas e estas, podendo surgir de precursores resultantes de uma, duas, ou três das vias citadas (KUČ, 1985).

Mesmo havendo fortes evidências, as quais serão citadas posteriormente, do envolvimento das fitoalexinas no processo de resistência de vegetais a microorganismos, tais compostos não são considerados notáveis agentes antibióticos, pois, a quantidade requerida para interromper o avanço de uma infecção é considerada bastante alta ($LD_{50}=1$ a 5×10^{-4} M) (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984 e KUČ, 1985). A eficácia destes compostos no processo de resistência estaria no acúmulo nos locais de infecção (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984). Assim, um número apreciável de estudos mostra que as fitoalexinas, não somente se acumulam nos locais de infecção após a penetração do tecido pelo patógeno, como também o fazem rapidamente e em concentrações suficientemente altas, para poder inibir o crescimento do parasita (SATO et al, 1971; BARLEY, 1974 e ROSSAL et al, 1980).

No entanto, há a ocorrência de patógenos que conseguem ultrapassar todos os mecanismos de defesa em determinadas espécies vegetais, inclusive o acúmulo de substâncias do tipo fitoalexinas. MATTHEWS e VAN ETEN (1983) demonstraram, em

ervilha, que *Nectria haematococca* conseguia destoxificar a fitoalexina pisatina, através de oxigenases do citocromo P-450 do fungo.

DENNY e VAN ETEN (1983a e 1983b) relatam outro exemplo onde, no mesmo sistema patógeno-hospedeiro citado acima, o fungo tornou-se tolerante à pisatina, através de alterações na composição e morfologia da membrana celular, impedindo que esta sofresse disfunções, o que ocorreria em condições que não estas.

Alguns patógenos parecem ser também capazes de secretar moléculas que inibem a síntese de fitoalexinas em seus hospedeiros (OKU et al, 1975 e 1980).

Assim como os estudos envolvendo os compostos fenólicos durante o processo de infecção de *H. vastatrix* em cafeeiro, pouco tem sido realizado sobre fitoalexinas.

GUEDES (1983) afirma ter detectado três fitoalexinas do tipo sesquiterpenóides em combinações incompatíveis de ferrugem e café, seis a dez dias após a inoculação sendo um deles identificado como capsidiol. Os três compostos não foram identificados em combinações compatíveis através de técnicas cromatográficas. Estas substâncias inibiram o crescimento de *Cladoseporium cucumerinum*, mas não de *Pseudomonas secalis*.

Dois interessantes trabalhos sobre fitoalexinas em café foram desenvolvidos por MEDEIROS e RODRIGUES JR (1978) e RODRIGUES JR et al (1975). No primeiro deles, folhas de cafeeiros foram inoculadas com os fungos não patogênicos *Uromyces vignae*, *U. trifolii*, *U. betae*, *Puccinia graminis* e *P. transversalis*. Após a inoculação com estas ferrugens e quarenta e oito horas de incubação, a página inferior das folhas foi

posta em íntimo contato com uma lâmina de água e, vinte e quatro horas depois, foi retirada uma alíquota de cada exsudato. Cada alíquota obtida foi colocada em presença de uredosporos de ferrugem recém germinados, e que tinham tido seus tubos germinativos previamente medidos. Notou-se que houve redução do crescimento dos tubos, quando comparados com a testemunha (água), ou com exsudato de folhas de café inoculadas com raças compatíveis de ferrugem. No segundo trabalho as inoculações foram feitas em genótipos diferentes (SH1SH1SH5SH5 e SH2SH2SH5SH5), com raças compatíveis e incompatíveis de *Hemileia vastatrix* (v1v1v5v5 e v2v2v5v5). O método de coleta do exsudato foi o mesmo que o citado anteriormente. A avaliação do efeito fungitóxico foi feita tanto em esporos recém germinados, que tiveram seus tubos germinativos previamente medidos, como também em esporos postos a germinar. Os exsudatos das interações incompatíveis inibiram a germinação e o crescimento do tubo germinativo de ambas as raças, o mesmo não ocorrendo nos exsudatos provenientes das combinações compatíveis.

Nos dois trabalhos os autores levantaram aspectos importantes. Um deles seria sobre a capacidade de uma raça virulenta isto é, que infecta o cafeeiro, de destoxificar os produtos liberados pelas folhas, quando em íntimo contato com água. De acordo com o que foi realizado no segundo experimento, os exsudatos coletados foram tóxicos para as duas raças de ferrugem testadas, ou melhor, aquele proveniente de uma interação incompatível envolvendo uma determinada raça, foi

tóxico para a mesma, indicando a destoxificação como um processo improvável de ter ocorrido. Outro ponto levantado é que a resistência do hospedeiro, supostamente expressa pelos genes SH, não implicaria diretamente na produção de compostos fungitóxicos, e sim que, os produtos codificados por estes fatores seriam responsáveis pelo reconhecimento da raça do patógeno pela planta de café. Haveria, posteriormente, a produção ou aumento na quantidade de substâncias tóxicas, resultado da atuação de outros genes.

Tanto MEDEIROS E RODRIGUES JR (1978), como RODRIGUES JR et al (1975b) sugeriram que os compostos liberados se difundem do meio celular para o intercelular, fato este que recebe suporte de estudos histopatológicos, os quais mostram que o micélio de *H. vastatrix* pode interromper seu crescimento e entrar em senescência praticamente sem penetrar as células de plantas resistentes (RIJO e SARGENT, 1974).

Em contraposição ao que foi discutido acima, NACACCHE (1983) empregou técnica semelhante de coleta de exsudatos e não conseguiu resultados similares, utilizando combinações entre cafeeiros portadores dos genes SH1SH5, SH2SH5 e SH5 e a raça II de ferrugem (v5).

Normalmente, em plantas atacadas por parasitas, o aumento do conteúdo de fenóis é acompanhado por uma maior atividade de enzimas oxidativas. A análise das enzimas polifenoloxidase e ascorbato oxidase em cafeeiro suscetível (*C. arabica* cv. Bourbon) e resistente (*C. arabica* cv. Híbrido de Timor) indicou que o cultivar Bourbon, quando infectado, apresentou maior atividade das duas enzimas, do que quando não infectado.

As atividades comparadas entre os dois tipos de café sadios, não demonstraram diferenças consistentes entre as duas enzimas (ANN. REP. COFFEE BOARD, 1965/66).

A polifenoloxidase (PFO), também referida como fenolase, catecol oxidase, tirosinase, catecolase ou cresolase (MAYER e HAREL, 1979), é uma enzima que tem o cobre como cofator, e cataliza duas reações distintas. Na Primeira delas atua como hidroxilase, transformando um monofenol para um o-difenol (atividade de cresolase), e na segunda, atuando como oxidase, cataliza a passagem do o-difenol para o-quinona correspondente (atividade de catecolase).

O papel da PFO na resistência de vegetais a doenças é controvertido. Muitos são os trabalhos que citam o aumento da atividade em presença de patógenos (MATTA e ABBATTISTA, 1970; BALASUBRAMANI et al, 1971; BRUESKE e DRAPKIN, 1973 e PITT, 1975), e existem aqueles que indicam o contrário (WEAVER et al, 1970; POLLOCK e DRYSDALE, 1976 e ROEBER, 1976).

KOSUGE (1969) conclui que, na maioria dos casos estudados, as evidências não são suficientes para se afirmar uma associação significativa da enzima no mecanismo de resistência. Nas ocasiões em que evidências são estabelecidas, provavelmente a PFO atuaria sobre enzimas hidrolíticas do patógeno. Este modo de atuação, segundo CORY et al (1962) e CORY (1967), se daria pela oxidação direta de grupamentos tirosina das proteínas ou, indiretamente, pela produção de quinonas, que são tóxicas à enzimas extracelulares (KOSUGE, 1969). Quanto à última hipótese, deve ser citado que a PFO é rapidamente inativada por

quinonas, sendo outro aspecto importante a atuação destas sobre proteínas extracelulares, com a formação de complexos poliméricos relativamente insolúveis (GOLDSTEIN e SWAIN, 1965 e PIERPOINT, 1969). No entanto, a redução das mesmas causa aumento da infectividade (MOUSTAFA e WHITTENBURY, 1970) e a inibição da PFO induz diminuição da resistência (MUKHERJEE e GOSH, 1975).

GUEDES e RODRIGUES JR (1974) empregaram eletroforese em gel de poliacrilamida para estudar a PFO em folhas sadias de cultivares e seleções de *C. arabica* que apresentavam diferentes respostas à ferrugem. Apesar dos resultados não terem permitido estabelecer uma relação com a resistência, foi observado que os padrões eletroforéticos variavam de genótipo para genótipo.

SIEVERS (1980) e SIEVERS et al (1980) dosaram PFO também em folhas sadias de cafeeiros, com diferentes comportamentos quanto à ferrugem, e não encontraram diferenças significativas.

No entanto, NACACCHE (1983) observou que cafeeiros resistentes, inoculados com raça II de ferrugem, mostraram aumento mais rápido da atividade da PFO do que plantas suscetíveis inoculadas com a mesma raça, isto ocorrendo já no primeiro dia após a inoculação. O máximo de atividade foi atingido no quinto dia, quando então começou a decrescer.

BRUGES e CONTREIRAS (1968) constataram que, em folhas de café resistentes às raças I e II de ferrugem, o pico de atividade de PFO se dava vinte horas após a inoculação, caindo para o nível inicial após vinte e sete horas. Este aumento era desprezível quando comparado com plantas resistentes não

inoculadas. Aqueles autores notaram também que, apesar das plantas suscetíveis mostrarem aumento de atividade até o décimo sexto dia, esta atividade era menor tanto em relação às plantas resistentes infectadas como às não infectadas.

A peroxidase (PO), outra enzima investigada no mecanismo de resistência de plantas às doenças atua, na presença de H₂O₂, na oxidação de uma variedade de compostos, incluindo aminas alifáticas e aromáticas e fenóis (KOSUGE, (1969). Assim como alguns autores relacionam aumento da atividade da enzima com resistência (KEDAR, 1959; UMAERUS, 1959 e FHERMANN e DIMOND, 1967), outros consideram que esta associação não acontece, sendo mais uma consequência do que uma causa (RAUTELA E PAYNE, 1970; SEEVERS e DALY, 1976; JOHNSON e LEE, 1978 e YAMAMOTO et al, 1978).

Uma forte evidência para envolvimento da PO na resistência a doenças é sua atuação sobre compostos fenólicos, formando como produto a lignina. Este polímero parece atuar como barreira mecânica, aumentando a resistência das paredes celulares do hospedeiro à ação hidrolítica de enzimas fúngicas (STAFFORD, 1964; BROWN, 1966; FRIEND E THORNTON, 1974; VANCE et al, 1976 e VANCE e SHERWOOD, 1977).

Em café, a formação de calose e lignina tem sido observada, através de microscopia eletrônica, em combinações incompatíveis com ferrugem (RIJO, 1972 e RIJO e VASCONCELOS, 1983).

Discos de folhas de cafeeiros, portadores dos genes SH1SH5, SH4SH5 e SH5, inoculados com raça II de *H. vastatrix* (

v5), mostraram aumento em PO (NACACCHE, 1983). As plantas resistentes mostraram este aumento mais rapidamente quando comparadas com a suscetível, sendo que a atividade máxima foi observada no décimo quarto dia após a inoculação. Na combinação compatível o pico de atividade deu-se no vigésimo oitavo dia, porém, com valores inferiores aos atingidos nos genótipos resistentes.

Como foi citado anteriormente, RIJO e VASCONCELOS (1983) verificaram a formação de lignina, a partir do quinto dia da inoculação, em combinações resistentes de café e ferrugem. No décimo quinto dia a área de tumefação estava toda lignificada. Aliando estes dados aos obtidos por NACACCHE (1983), poder-se-ia supor que a atividade da PO esteja associada ao processo de síntese localizada de lignina, em resposta à infecção por ferrugem.

Porém, em contradição aos resultados de NACACCHE (1983), SIEVERS et al (1980) não detectaram aumento de PO passadas trinta e oito horas após a infecção de café (SH2) por esporos incompatíveis de ferrugem. Apenas houve aumento de atividade, em plantas suscetíveis, depois de várias semanas seguidas à inoculação. Também SIEVERS et al (1980), comparando a atividade de PO em folhas sadias de diferentes espécies de café, encontraram que esta foi mais elevada em *C. canephora* e em Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), do que em *C. arabica*. Dentre as espécies analisadas, as duas primeiras eram resistentes a todas as raças de ferrugem.

Uma técnica de lavagem do líquido intercelular, com uso de centrífuga, foi utilizada por SIEVERS (1983) para estudar a

composição do mesmo em cafeeiros das espécies *C. arabica*, *C. liberica*, *C. canephora* e *Coffea racemosa*, que variavam quanto à resistência a *H. vastatrix*. Atividade de fosfatase ácida foi observada em todas as espécies, mas sem acusar diferenças significativas. PD, a enzima com maior atividade dentre todas as estudadas, mostrou-se mais ativa em *C. canephora* (resistente), quando comparada com *C. arabica* e *C. racemosa*.

A fenilalanina amônia-liase (PAL), considerada enzima chave no metabolismo de fenóis, situa-se logo no início da via biosintética destes compostos e tem sido muito estudada, tanto quanto a sua cinética (HAVIR e HANSON, 1968; CAMM e TOWERS, 1980 e HANSON e HAVIR, 1981), como no seu envolvimento na resistência de plantas a doenças (MINAMIKAWA e URITANI, 1965; BIEHN et al. 1968 e BURREL e AP REES, 1974).

A PAL cataliza a reação envolvendo a transformação de L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico e amônia. Apresenta como características ser uma globulina, localizar-se em peroxissomas, glioxissomas e cloroplastos e ter sua atividade dependente do genótipo da planta, idade e desenvolvimento dos órgãos e tecidos (HANSON e HAVIR, 1972; CAMM e TOWERS, 1977 e BELL, 1981). Outros fatores, não inerentes a planta, podem afetar a atividade da PAL, podendo ser citado ferimentos (MINAMIKAWA e URITANI, 1965; CREASY, 1976 e LAMB e RUBERY, 1976), etileno (IMASEKI et al. 1968; RIOV et al. 1969; HYODO e YANG, 1971 e RHODES e WOOLVERTON, 1971), infecção por patógenos (MINAMIKAWA e URITANI, 1965; BIEHN et al. 1968 e BURREL e AP REES, 1974), carboidratos (CREASY, 1968 e CREASY e ZUCKER, 1974), luz

branca, vermelha-vermelho extremo, azul e ultravioleta (ATTRIDGE e SMITH, 1967, BELLINI e VAN POUCKE, 1970; HADWIGER e SCHWOCHAN, 1971; ZUCKER, 1971; SCHOPFER e MOHR, 1972; ENGELSMA, 1974; MCCLURE, 1974; SAUNDERS e MCCLURE, 1975; BLUME e MCCLURE, 1978; JOHNSON e SMITH, 1978 e TONG e SCHAUPFER, 1978), temperatura (ENGELSMA, 1968b e 1970 e ATTRIDGE e SMITH, 1973) e ions inorgânicos (IREDALE e SMITH, 1973).

Via de regra o etileno aumenta a atividade da PAL, porém existem exemplos onde não se observa esta correlação (ENGELSMA e VAN BRUGGEN, 1971 e HYODO e YANG, 1974). Parece haver também uma provável ligação entre o efeito de ferimentos e etileno, já que o mesmo é liberado quando o tecido é danificado (CAMM e TOWERS, 1980). Semelhantemente, é possível existir uma ligação entre infecção por patógenos, produção de etileno e aumento da PAL (BIEHN et al, 1968; PEGG e SEQUEIRA, 1968 e BURREL e AP REES, 1974).

Devido a diversidade de respostas aos vários tipos de luz, torna-se difícil a interpretação de um mecanismo geral de modulação da PAL para este fator. Com relação ao efeito da luz branca, em tecidos estiolados, o mecanismo parece ser semelhante para alguns vegetais (AMRHEIN e ZENK, 1970; HAHLBROCK e WELLMAN, 1970 e ZUCKER, 1970 e 1971), apesar de serem conhecidas exceções em outros vegetais (WALTON e SONDHEIMER, 1968; RIOV et al, 1969 e RHODES e WOOLTON, 1971).

Para as qualidades de luz vermelho e vermelho extremo existem controvérsias sobre suas influências sobre a atividade da PAL. Assim, tecidos destacados de plantas respondem a curtas exposições a vermelho, seguido de escuro, com o aumento da

atividade da enzima. Este efeito é revertido se em seguida houver uma curta exposição a vermelho-extremo (WEIDNER et al, 1965 e MEYER e AGERMAN, 1973, apud CAMM e TOWERS, 1977). Por outro lado, a exposição contínua a vermelho-extremo aumenta a atividade da PAL em tecidos estiolados (ATTRIDGE e SMITH, 1967 e BELLINI e VAN POUNCKE, 1970). Segundo DURST e MOHR (1966) a constante iluminação com vermelho-extremo estaria relacionada com fitocromo, o qual permaneceria, preferencialmente, na sua forma estável, e que a baixa porcentagem na forma instável seria responsável pelas mudanças de atividade da PAL.

Em algumas plantas o aumento da PAL se dá tanto em resposta a luz azul e a vermelha, sugerindo a possibilidade de dois pigmentos fotorreceptores envolvidos (ENGELSMA, 1967 e 1968a e MCCLURE, 1974).

MARTINEZ e RESTREPO (1981 apud CARRIZOSA e ESPITIA, 1982) e CARRIZOSA e ESPITIA (1982) foram os únicos autores levantados nesta revisão que trabalharam com a PAL em café, porém, sob aspectos metodológicos. No primeiro trabalho foi feita a extração da enzima com tampão contendo ácido ascórbico, sem contudo conseguirem chegar à determinação da atividade. No segundo trabalho utilizou-se o 2-mercaptoetanol para a extração, o que possibilitou a dosagem da atividade da PAL. Concluiu-se que o 2-mercaptoetanol tornou a enzima ativa, a partir de um estado inativo, por eliminação de um possível inibidor de atividade. Existem evidências de que, em alguns casos, a enzima parece ser sintetizada " de novo " mediante um estímulo (WELLMAN e SCHOPFER, 1975 e BORNER e GRISEBACH, 1982), e que

também pode constituir um " pool " inativo na célula, passando à forma ativa por supressão de um inibidor (ATTRIDGE e SMITH, 1973 e ATTRIDGE et al, 1974), servindo como apoio às conclusões de CARRIZOSA e ESPITIA (1982) em café.

A metodologia estudada por CARRIZOSA e ESPITIA (1982) foi desenvolvida em cafeeiros resistentes a todas as raças de ferrugem (Híbrido de Timor e Catimor) e suscetíveis (Caturra e Catimor) a maioria das raças. Foram observados maiores valores da atividade da PAL em folhas sadias das plantas resistentes, tendo o Catimor resistente maior atividade e o Catimor suscetível menor. Isto poderia sugerir uma relação entre a PAL e a resistência à ferrugem em café, porém, os autores não propiciaram maior embasamento para esta hipótese pois, não foi dosada atividade da enzima em folhas infectadas pela ferrugem.

5- Resistência induzida

5.1- Considerações gerais

O termo resistência induzida ou adquirida, é normalmente empregado nos casos em que plantas, recebendo um determinado tratamento antes da inoculação com o patógeno, aumentam sua resistência, diminuindo os danos provocados pela doença (BELL, 1981 e SEQUEIRA, 1983). Estes tratamentos incluem a pré exposição do vegetal a organismos não patogênicos, patogênicos

inativos ou avirulentos, constituintes estruturais ou celulares do patógeno, ferimentos, luz, fito-hormônios, substâncias químicas diversas, etc. Os estudos mais comuns nesta área de pesquisa são realizados com organismos não patogênicos ativos ou inativos e substâncias químicas exógenas ou não ao parasita.

Esse tipo de resistência é comumente expressa pela redução do número e tamanho das lesões. Os mecanismos envolvidos na resistência induzida podem ou não ser semelhantes aos discutidos no capítulo anterior.

JOHNSON (1978) discutiu os seguintes pontos, os quais devem ser considerados no estudo da resistência induzida: a) se a resistência é local ou sistêmica, b) o tempo em que é eficiente após a indução, c) no caso de resistência induzida por patógenos, a especificidade sobre outras linhagens do patógeno ou de outros patógenos e d) se o inverso, suscetibilidade induzida, poderia contrariar os efeitos da resistência induzida. Para o primeiro ponto define-se resistência sistêmica como sendo aquela que é capaz de se manifestar longe do local ou órgão onde se deu a indução. Vários são os trabalhos que mostram este tipo de resistência em plantas (KUĆ et al, 1975; MORAES et al, 1976; BERETTA et al, 1977; CARUSO e KUĆ, 1977 e KUĆ e RICHMOND, 1977). Em relação ao segundo ponto, o tempo que a resistência leva para se manifestar e o período que é atuante, variam em função do sistema estudado (LITTLEFIELD, 1969; AYERS et al, 1976a; MORAES et al, 1976 e TUZUM e KUĆ, 1983) e também da concentração do indutor (AYERS et al, 1976a e 1976b; EBEL et al, 1976; MORAES et al, 1976; CARUSO e KUĆ, 1977; PASCHOLATI,

1980 e KUĆ, 1982)

MORAES et al (1976) e BERETTA et al (1977) utilizaram esporos da raça II de *H. vastatrix* inativados termicamente, para induzir resistência a posterior inoculação com esporos viáveis da mesma raça de ferrugem. Além de detectarem que a resistência era sistêmica, estes autores observaram que o nível da mesma era dependente da concentração do indutor. Semelhantes resultados foram obtidos com extratos aquosos de esporos, concluindo-se que a presença física dos esporos era desnecessária. O composto responsável pela indução da resistência era termoestável, já que os esporos foram inativados a 120°C. A análise da natureza química do indutor revelou ser um polissacarídeo de alto peso molecular (MORAES et al, 1981).

Quanto ao terceiro ponto levantado por JOHNSON (1978), sobre a especificidade de indução de resistência pelo patógeno, observa-se que, de modo geral, parece não haver especificidade no processo. Isto é, raças avirulentas de um patógeno, e também outros microorganismos não patogênicos, conseguem induzir resistência a uma raça virulenta do mesmo patógeno (GOODMAN et al, 1967; KUĆ e RICHMOND, 1977 e KUĆ, 1982). Interessante no entanto, é o trabalho de KUĆ e RICHMOND (1977), onde a inoculação de um dos cotilédones de pepino com uma determinada raça de *Colletotrichum lagenarium* levou a diferentes respostas de infecção a de outra raça inoculada no cotilédone oposto. A inoculação da raça 1 induziu resistência à raça 3 e a ela mesma, mas a raça 3 só foi eficiente contra ela mesma.

A maneira como ocorre o reconhecimento entre planta e patógeno é destituído de maiores informações, devido a falta de

um maior número de trabalhos e ainda, pela difícil interpretação dos resultados, pois, dentre os fatores indutores agrupam-se desde ions inorgânicos até o RNAm do patógeno (SEQUEIRA, 1983 e KUČ, 1985).

Para os casos onde no processo de indução se utiliza um agente não patogênico ou certos constituintes celulares, o processo de reconhecimento é mais estudado e se baseia na provável interação entre um produto gênico do hospedeiro e um do patógeno (PERSON e MAYO, 1974).

As membranas celulares de hospedeiros contêm proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos de funções desconhecidas, que apresentam a propriedade de se ligarem a carboidratos e poderiam, portanto, se ligarem a parede de patógenos (KAUS e BOWLES, 1976 e SEQUEIRA, 1978).

AYERS et al (1976b) isolaram quatro frações da parede celular de *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. A fração 1 foi a mais ativa na produção de gliceolina em soja, fitoalexina responsável pela resistência). A análise das frações revelou que o indutor não era proteína e que a fração 1 era primariamente composta de um glucano ramificado e que o resíduo manose, 1% do polissacarídeo, ocupava o sítio ativo da molécula. AYERS et al (1976c) alegam que no sistema acima citado, a alta sensibilidade das células de soja ao indutor do fungo sugere que tenham moléculas receptoras nas paredes e que se ligam ao indutor, representando uma função biológica específica. Apoio a isto, é o fato de que protoplastos de plantas são aglutinados por glucanos constituintes da parede celular de fungos (PETERS

et al, 1978)

A análise da parede de esporos de *H. vastatrix* raça II revelou que a fração lipídica representava 50% e carboidratos, menos que 20% (NACACCHE e DIETRICH, 1981). Dentre os carboidratos a manose era o mais abundante e a ressonância magnética de protons mostrou que os resíduos deste açúcar tinham ligações B1,3 e B1,4. Os autores não discutem a importância dos resultados obtidos, porém, poderia-se inferir alguma hipótese sobre a maior quantidade de manose, baseado nos resultados de AYERS et al (1976c).

5.2- Alterações metabólicas na resistência induzida

CRAMER et al (1985) colocaram culturas de células de feijão em presença de um indutor extraído de *Colletotrichum lindemuthianum* e observaram síntese "de novo" de RNAm codificador da PAL, chalcona-sintetase e chalcona-isomerase, enzimas do metabolismo dos fenóis. PARTRIDGE e KEEN (1977) inocularam cultivares de soja resistentes a *Phytophthora megasperma* e verificaram aumento da PAL, chalcona isomerase e peroxidase, mas não averiguaram se tais enzimas eram sintetizadas "de novo".

Por outro lado, KUČ (1982) induziu resistência a *Colletotrichum lagenarium* em Cucurbitáceas (pepino, melancia e melão), com *C. lagenarium*, *C. cucumerinum* e *Pseudomonas lachrymans* ou ainda com o vírus da necrose do fumo (TNV), e

não detectou aumento da atividade da PAL, mas sim da PO. Foi observada lignificação de tecido vegetal e discutiu-se a relação entre este evento e o aumento da atividade de PO.

O pré tratamento de cenoura, em meio de cultura ou cortada em fatias, com esporos de *Botrytis cinerea* inativados pelo calor, induziu resistência à posterior inoculação com esporos vivos, e também aumento de PO e síntese de lignina (HEALE e SHARMAN, 1977).

Um indutor de resistência extraído de *P. megasperma* var. *sojae* induziu aumento da PAL em culturas de células de soja, coincidindo o pico de máxima atividade com a fase de extinção do nitrato do meio de cultura (EBEL et al, 1976).

BORNER e GRISEBACH (1982) quando inoculavam hipocótilos de plântulas de soja com raças compatível e incompatível de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, observaram aumento da PAL nas duas combinações, e que a enzima foi sintetizada "de novo", utilizando L-(35S)metionina e imunoprecipitação. O aumento foi igual nas duas combinações até por volta das doze horas após a inoculação, sendo que a partir daí, houve declínio com a raça incompatível, sendo que com a compatível a atividade da enzima somente diminuiu após dezesseis horas.

DIXON e FULLER (1976) conseguiram induzir a síntese da fitoalexina faseolina e o aumento da PAL em cultura de células de feijão, com adição de ácido naftalenoacético. A medida que se diminuía a concentração do hormônio, havia redução da PAL.

A atividade da PAL não aumentou em tecido de feijão, distante do local de infecção por *Colletotrichum* spp , ou do

local de aplicação de um indutor (ELLISTON et al, 1977), levando à hipótese de que a enzima seria mais importante na resistência induzida localizada do que na sistêmica (SEQUEIRA, 1983).

Nacacche (1983) usou a técnica de ANDERSON-PROUTY e ALBERSHEIM (1975) para extração de indutor de esporos da raça II de ferrugem de café. Após a inoculação do indutor em discos de folhas de cafeeiros, com diferentes respostas à ferrugem (SH1SH5, SH4SH5 e SH5), foram determinados o teor de fenóis totais e as atividades da PO e PFO. Para PO ocorreu um aumento de 50% nas plantas resistentes, quando comparadas com as suscetíveis, após vinte e quatro horas da inoculação. A planta suscetível não apresentou diferenças de PO em relação à planta controle, que recebeu inoculação com água. Com PFO houve aumento de atividade após doze horas, vindo a decrescer em vinte e quatro horas. A presença do indutor levou ao aumento no teor de fenóis, contudo, nas plantas suscetíveis a resposta ao tratamento foi mais lenta do que nas resistentes. Ácido clorogênico, também analisado, teve o mesmo comportamento.

NACACCHE (1983) também observou, no mesmo trabalho, que a variação na concentração do indutor, até um determinado nível, influenciou o teor de fenóis. A análise do indutor extraído de esporos de ferrugem (NACACCHE, 1983) demonstrou ser um polissacarídeo constituído por manose, glicose. Outros polissacarídeos contendo estes açúcares foram usados para a tentativa de indução do aumento de fenóis de café, sendo que com exceção à laminarina, que ocasionou aumento inferior ao indutor, nenhum outro composto levou a um aumento de fenóis (NACACCHE,

1983).

As fitoalexinas normalmente são relacionadas com resistência a doenças em plantas e o seu acúmulo deve representar um entre os vários mecanismos de defesa (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984). A produção de fitoalexinas perante um indutor biótico ou abiótico, tem sido bastante constatada em vários estudos com plantas (CRUICKSHANK e PERRIN, 1968; AYERS et al., 1976a; ALBERSHEIM e VALENT, 1978; CLINE e ALBERSHEIM, 1978; HARGREAVES, 1979; GRISEBACH, 1980 e 1981; HAHN et al., 1981; KEEN et al., 1983; TIETJEN e MATERN, 1983a e TIETJEN et al., 1983b).

Em café alguns trabalhos realizados indicaram que substâncias tipo fitoalexinas poderiam estar envolvidas na resistência à *H. vastatrix* (RODRIGUES JR et al., 1975b e MEDEIROS e RODRIGUES JR, 1978), porém nada foi feito para a identificação da natureza química de tais compostos.

GUEDES (1983) detectou fitoalexinas do tipo sesquiterpenóides, extraídas de folhas de cafeeiros infectados com raça avirulenta de ferrugem, o que não ocorreu em tecido não infectado.

Apesar de se encontrar muitas situações onde o aparecimento de fitoalexinas está associado com a paralização do crescimento ou morte do patógeno, tais compostos parecem ter atuação limitada. Como citado no capítulo anterior, determinados agentes infecciosos têm a capacidade de destoxificar fitoalexinas (MATTHEWS e VAN ETEN, 1983), secretar fitotoxinas que causam injúria ou matam as células hospedeiras

adjacentes ao local de penetração, impedindo ou retardando a produção de fitoalexinas (STROBEL, 1982), secretar moléculas que inibem a síntese de fitoalexinas (OKU et al, 1980) ou ainda, penetrar eficientemente o hospedeiro, antes que se dê a produção de tais substâncias em quantidade inibitória (ALBERSHEIM e VALENT, 1978).

Apesar disto, acredita-se que o sucesso, ou não, de um patógeno infectar uma planta, depende da rapidez com que a planta responde a um sinal emitido pelo patógeno, já que plantas suscetíveis podem ser induzidas à resistência, apresentando então, um potencial de defesa (KUČ, 1982; DARVILL e ALBERSHEIM, 1984 e KUČ, 1985).

5.3- Resistência induzida como método de controle de doenças em plantas

De modo geral a resistência induzida tem sido provocada em experimentos de laboratório, sendo poucos os de campo (JOHNSON, 1978 e SEQUEIRA, 1983).

SEQUEIRA (1983) fez um abrangente comentário sobre fatores que poderiam impedir a utilização da resistência induzida em condições de campo. Foram discutidos aspectos sobre demanda de energia pela indução da resistência como fator limitante de produção, acúmulo de substâncias antimicrobiais indesejáveis tornando o produto impróprio para consumo, disponibilidade ou dificuldade na obtenção em quantidade de

indutores adequados e o tempo em que a proteção é efetiva.

Segundo SEQUEIRA (1983), talvez o papel mais importante da resistência induzida seria no melhoramento de plantas resistentes à doenças, pois, poderia gerar informações para a compreensão do controle genético de mecanismos de reconhecimento entre plantas e agentes não patogênicos e patogênicos.

III- Material e métodos

1- Material Vegetal

As plantas usadas no presente estudo encontravam-se instaladas em experimentos de produção da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas. Pertencem à espécie *Collea arabica* e diferem entre si, quanto à resistência à ferrugem, em apenas um gene de resistência vertical. A planta de identificação C1122-18 é homozigota dominante para os fatores SH2 e SH5, conferindo resistência para mais de dez raças de ferrugem (CARVALHO et al, 1977). A outra planta, H2077-2-5-81, pertence ao cultivar Catuaí de *C. arabica*. Possui apenas o fator SH5 em homozigose dominante, o que a torna suscetível às principais raças de ferrugem conhecidas.

No período em que se efetuaram os experimentos descritos, isto é, no ano agrícola de 1985/86, as plantas apresentavam-se praticamente sem produção.

2- Amostragem de folhas

As amostragens foram feitas sempre às doze horas e somente em dias de pleno sol. Folhas saudáveis foram colhidas da face norte e na altura mediana do cafeeiro, pertencentes ao segundo ou

terceiro nó, a partir do ápice do ramo plagiotrópico, e acondicionadas em sacos plásticos umidecidos internamente, os quais foram levados diretamente para o laboratório.

3- Obtenção de esporos de *Hemileia vastatrix*, teste de germinação, inativação de esporos

A identificação de uma raça de ferrugem se faz através da inoculação de esporos em plantas de constituição genética conhecida, denominadas diferenciais, e observa-se o sucesso ou não do desenvolvimento da doença. Os esporos, coletados de lesões esporulando em plantas suscetíveis, são acondicionados em cápsulas plásticas, que são armazenadas a 4°C e 50% de umidade.

Testou-se a germinação dos esporos por dispersão de pequena quantidade em água destilada sobre lâmina de vidro, seguida de incubação no escuro, com umidade e à temperatura ambiente. Após vinte e quatro horas foi quantificada a germinação em microscópio óptico (FUMIKO et al, 1977). Em todos os experimentos a germinação manteve-se de 20 a 30%.

A inativação dos esporos de ferrugem foi feita em banho-maria a 70°C, por duas horas. Confirmou-se a eficiência do tratamento através do teste de germinação citado anteriormente.

4- Teste de discos de folhas

Segundo ESKEs (1982a) o teste foi padronizado e considerado adequado para analisar a resistência do cafeeiro à ferrugem. Com furador de rolhas ($r=0,8\text{cm}$) foram retirados entre oito a dez discos por folha de café, os quais foram colocados em caixas plásticas contendo no fundo espuma umidecida com água. A inoculação foi feita colocando-se uma gota de água ($0,025\text{ml}$) contendo esporos em suspensão sobre cada disco e incubando-os por vinte e quatro horas no escuro a 22°C . Em seguida, os discos foram secos por exposição ao ambiente e, as caixas, fechadas com vidro transparente, permaneceram sob luz fluorescente (500 a 1000 lux) com fotoperíodo de doze horas.

Entre o décimo quinto e vigésimo dia após a inoculação o aparecimento das lesões tinha início. Os parâmetros usados na avaliação do ataque do fungo foram, período de latência (tempo decorrido entre a inoculação e quando 50% dos discos com lesões esporulam), densidade de lesão (escala de 0 a 9 onde o menor valor indica ausência de lesões e o maior bastante lesionado), porcentagem de discos lesionados e tipo de reação (escala de 0 a 9 onde 0 indica ausência de sintomas, de 1 a 3 variação dentro de reações de resistência sem esporulação, de 4 a 7 reações heterogêneas com aumento na intensidade de esporulação e porcentagem de lesões esporulando e de 8 a 9 lesões bem desenvolvidas e com intensa esporulação) (ESKEs e TOMA

BRAGHINI, 1981).

5- Extração e determinação de fenóis

A extração dos compostos fenólicos nas folhas de café foi feita com etanol 70% (1g tecido verde/20ml) por noventa minutos sob refluxo. Em experimento prévio testou-se, como extrator, etanol 70, 80 e 99,5%, sendo que a primeira concentração mostrou-se mais eficiente na extração de fenóis. A remoção da clorofila do tecido foliar indicava boa extração no tempo empregado (HARBORNE, 1974).

Depois de resfriados a temperatura ambiente, os extratos foram completados ao volume inicial e os fenóis foram determinados pelo método de SWAIN e HILLIS (1959). Misturou-se uma alíquota de 0,25ml de extrato etanólico a 3,25ml de H₂O destilada e após agitação, adicionaram-se 0,25ml do reagente de Folin e Ciocalteu (BDH Chemicals) (MORAES, 1984, comunicação pessoal). A mistura foi submetida à agitação, juntando-se 3 minutos depois, 0,5ml de solução aquosa saturada de Na₂CO₃ (A.O.A.C., 1955). O volume foi completado a 5,0 ml com H₂O destilada, e após uma hora de repouso foi feita a leitura da absorbância em 725nm (Espectrofotômetro Baush Lomb).

Também foram realizadas leituras do extrato etanólico em 645 e 663nm para estimativa do teor de clorofila (ARNON, 1949) e para avaliar sua possível interferência na dosagem de fenóis,

já que não houve redução de volume do extrato bruto em evaporador rotatório, o que elimina parcialmente a clorofila.

6- Extração e determinação da atividade de peroxidase e polifenoloxidase

A extração para ambas enzimas obedeceu o mesmo método (Nacacche, 1983). Discos de folhas (350mg) foram macerados, a frio, com 2ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH7,0, contendo KCl 0,8M e ácido ascórbico 0,05M. O volume foi completado para 5ml, seguindo-se centrifugação a 10000rpm por dez minutos a 4 C. O precipitado era ressuspenso em 4ml do mesmo tampão e novamente centrifugado. Aos sobrenadantes reunidos foram adicionados 0,5g Polivinilpolipirrolidona (Sigma Chem. Comp.). Após filtração o extrato passou por coluna de Sephadex G-25 (Pharmacia F. Chem. 50-100) e, em seguida, foi armazenado em freezer a -25°C.

Para a dosagem da atividade de peroxidase (PO) (E.C.1.11.1.7) foi utilizado o método de KAR e MISHRA (1976). A mistura de reação foi composta por 1,6ml de tampão fosfato de sódio 0,125M, pH6,8, 1ml de pirogalol 0,2M, 1ml de H₂O₂ 0,25% e 0,4ml de extrato enzimático. Como controle substituiu-se peróxido por tampão. A incubação foi a 25°C por trinta minutos, a qual foi interrompida adicionando-se 0,5ml de H₂SO₄ 5%. As leituras de absorbância foram feitas a 420nm.

A atividade de Polifenoloxidase (PPO) (E.C.1.10.3.1) também seguiu o método de KAR e MISHRA (1976). A mistura de

reação incluiu 2ml de tampão fosfato de sódio 0,125M pH6,8, 1ml de pirogalol 0,2M e 0,4ml de extrato enzimático. O tampão fosfato também continha piruvato de sódio na concentração de 0,1M, pois, segundo SIEVERS et al (1980) impede a formação de H₂O₂, que poderia estimular a atividade de peroxidase interferindo nos resultados. Como controle substituiu-se o extrato por tampão. A incubação foi feita a 37°C (SIEVERS et al, 1980) por trinta minutos, interrompendo-se a reação por adição de 0,5ml de H₂SO₄ a 5%. As leituras de absorbância foram feitas a 420nm.

Para ambas as enzimas os resultados da dosagem de atividade foram expressos em unidades de enzima, ou seja, a quantidade de proteína que causa uma variação de uma unidade de absorbância por minuto (DRAETTA e LIMA, 1976).

7- Extração e determinação da atividade de fenilalanina amônia liase

Para a extração da fenilalanina amônia liase (PAL) (E.C.1.10.31) foi previamente preparado pó cetônico de discos de folhas de café. O tecido foi macerado com acetona contendo 1% de 2-Mercaptoetanol (2-ME) (v/v), a -25°C, na proporção de 1g de tecido verde/20ml. O homogenado foi filtrado sob vácuo, efetuando-se lavagem com acetona 1% 2-ME, a -25°C, na proporção 1g inicial de tecido verde/80ml. Nova lavagem se seguiu utilizando-se porém, acetona a -25°C, guardando a mesma

proporção da maceração inicial (CARRIZOSA e ESPITIA, 1982). O pó obtido foi estocado em freezer a -25°C até uso posterior.

Na extração da PAL o pó cetônico foi suspenso em tampão borato 0,1M, pH8,8, na proporção de 1/100 (p/v), com agitação por sessenta minutos em banho de gelo. O extrato foi centrifugado por trinta minutos a 20.000rpm, a 4°C , e o sobrenadante filtrado guardado em freezer a -25°C (CARRIZOSA e ESPITIA, 1982), para ser usado dois dias depois.

O meio de reação para medida de atividade da enzima continha 0,5ml de extrato enzimático, 1ml de L-fenilalanina 12mM e 1,5ml de tampão borato 0,1M, pH8,8. Como branco substituiu-se o substrato por tampão. A incubação foi efetuada a 40°C por noventa minutos, e a leitura de absorbância feita a 290nm (CARRIZOSA e ESPITIA, 1982).

Os resultados da dosagem de atividade da PAL foram expressos em unidades de absorbância.

8- Tratamento de luz na faixa do vermelho extremo

As folhas, coletadas conforme citado anteriormente, tiveram o pecíolo envolto em algodão e foram colocadas em caixas plásticas, tendo ao fundo espuma embebida em água. As caixas, tampadas com vidros transparentes, ficaram expostas à luz fluorescente contínua (500 a 1000 lux) por três dias seguidos, após os quais metade delas foi colocada sob tratamento com

vermelho extremo (VE). A qualidade de luz foi obtida com a combinação de duas folhas de papel celofane azul, duas vermelhas e novamente uma azul (FELIPPE et al, 1983). Com o conjunto de folhas foram confeccionados sacos para acondicionamento das caixas plásticas, submetidas a iluminação com três lâmpadas incandescentes de 40 watts, a uma distância de 0,5m. A eficiência dos filtros foi avaliada através de testes de germinação com *Lactuca sativa* variedade Grand Rapids e a qualidade de luz com uso de um espectroscópio (Carl Zeiss).

O acompanhamento da temperatura no interior dos "sacos filtros" mostrou um aumento de 1°C acima da temperatura do laboratório (22°C + 2°C).

Em um primeiro experimento, na coleta de folhas (col.), antes da exposição das folhas ao VE (0 hora) e com 2, 5, 8, 11, 14, 17 e 21 horas após o início do tratamento, procedeu-se à extração e dosagem de fenóis. O mesmo foi feito para as folhas que permaneceram continuamente sob luz fluorescente. Paralelamente, fez-se a inoculação com esporos viáveis de ferrugem raça II, na concentração de 0,5 mg.ml⁻¹ H₂O destilada, em discos retirados de folhas que estavam expostas ao VE e luz fluorescente.

Dependendo dos resultados obtidos no experimento descrito anteriormente, fez-se ou não a extração de PER, PPO e PAL.

Na análise de fenóis totais, para cada tipo de luz e em cada tempo de tratamento, foram feitas três determinações, sendo que para cada determinação utilizaram-se de oito a dez discos retirados da mesma folha. O mesmo delineamento foi adotado para as inoculações com esporos de ferrugem, sendo os discos

ordenados nas caixas de forma a representar uma folha. Desta forma o modelo estatístico adotado foi um fatorial em blocos de 2×7 .

9- Tratamento de pré inoculação de discos com esporos inativos de ferrugem

De cada folha coletada no campo, ao todo 189, foram retirados de oito a dez discos, e estes ordenados em caixas plásticas de maneira a permanecerem agrupados, representando a folha de origem.

Os discos foram retirados no mesmo dia da coleta (dia 0) e divididos em sete grupos iguais e, cada um destes, subdivididos em três subgrupos (figura 2). Ainda no dia 0 um subgrupo de cada grupo foi tratado com uma gota de $0,025 \text{ ml}$ de suspensão aquosa de esporos inativos na concentração $2 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$, um outro subgrupo, também de cada grupo, com 1 mg.ml^{-1} , permanecendo o terceiro como controle, no qual o tratamento foi feito apenas com água destilada. Dentro de cada grupo fez-se nova subdivisão tripla dos subgrupos pré inoculados e inoculou-se esporos viáveis nas concentrações de 1, 0,5, e $0,25 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$, correspondentes a cada novo grupo subdividido. Porém, estas inoculações foram feitas em diferentes dias após o pré tratamento com esporos inativos, sendo estes dias 0, 1, 3, 5, 7, 10, 13. Assim a cada dia correspondia um grupo de discos de café, que tinha recebido pré inoculações de 0, 1 e $2 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$

de esporos inativos e dentro de cada uma destas concentrações ocorreram inoculações com esporos viáveis em 0,25, 0,5 e 1 mg.ml⁻¹ H₂O.

No segundo dia após o dia 0 (col.), praticamente todos os discos apresentaram-se, dentro das caixas plásticas, com as gotas de suspensão de esporos inativos secas. Portanto, somente no dia 1 fez-se a secagem por exposição ao ambiente, antes da inoculação com esporos viáveis.

A extração de fenóis foi feita nos dias das inoculações com esporos vivos. Dependendo dos resultados obtidos determinou-se a realização de experimento semelhante para extração e dosagem de PD, PPD e PAL.

Segundo o descrito anteriormente, o delineamento estatístico adotado foi um fatorial 3x3x7.

esporos inativos
(mg.ml⁻¹ H₂O)

esporos viáveis
(mg.ml⁻¹ H₂O)

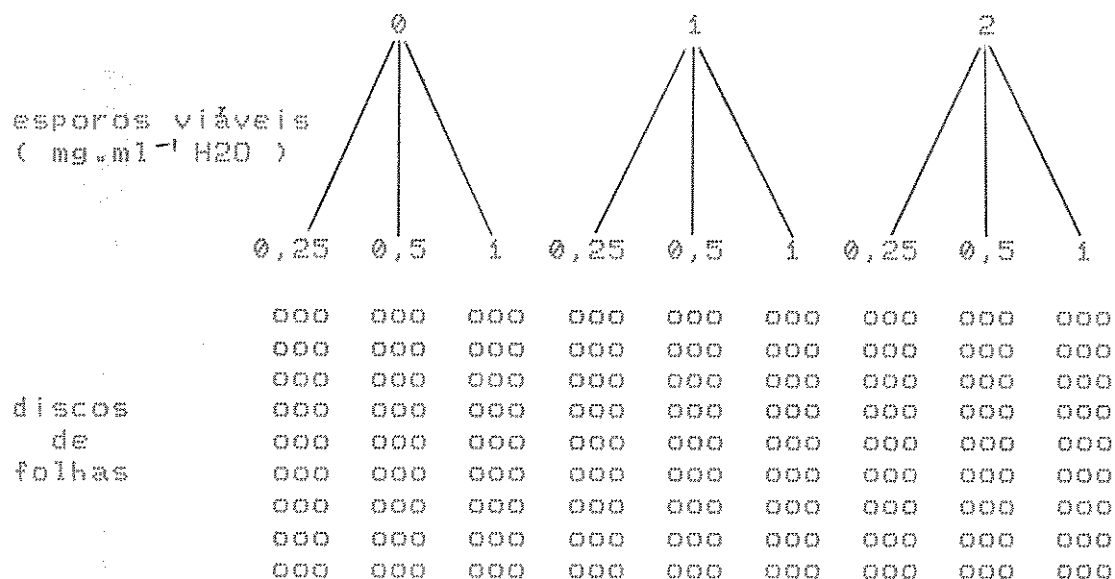


Figura 2 : Esquema de inoculação de um grupo, ou de um dia.

10- Análise cromatográfica dos extratos alcoólicos

Os extratos etanólicos obtidos a partir de folhas de café para dosagem de fenóis, foram conservados em freezer a 20 C.

Como em todos experimentos foram feitas três repetições para cada tratamento, reuniu-se os extratos em proporções iguais, somando 9ml e, a amostra composta, foi seca em evaporador rotatório e ressuspensa em 1,5ml de metanol 80%.

Cada amostra foi aplicada (0,05ml) em placa de camada delgada de celulose (0,3mm) e submetida à corrida bidimensional. Na primeira direção empregou-se butanol:ácido acético:água (6:2:1) e na segunda ácido acético 2% (SEIKEL, 1962 e EGGER, 1969).

As placas foram observadas em luz ultravioleta com e sem vapores de amônia, e reveladas com solução aquosa de FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ para fenóis em geral (BARTON et al, 1952), solução alcoólica 95% de AlCl_3 seguida de observação em ultravioleta para todas as classes de flavonóides (SIEKEL, 1962 e RIBEREAU-GAYON, 1972), e com solução 10% de vanilina em HCL para flavonóides com núcleo floroglucinol (ROUX e MAIHS, 1960 e RIBEREAU-GAYON, 1972).

IV- Resultados e Discussão

1- Testes de Discos

Conforme citado em Material e Métodos, este primeiro experimento foi planejado para se constatar a resistência induzida no cultivar Catuai e, dependendo do tratamento utilizado para tal, definir o melhor tempo de incidência de VE ou em que combinação de concentrações de esporos inativos e viáveis a resistência melhor se expressaria.

Mesmo sabendo que o cafeeiro C1122-18 é resistente à raça II de ferrugem, inoculações com esporos viáveis após os tratamentos de indução, também foram efetuados. Não se obteve, como esperado, esporulação em discos de folhas deste cafeeiro, portanto os resultados narrados neste ítem referem-se exclusivamente ao Catuai.

1.1- Ensaio de exposição à luz fluorescente e vermelho extremo

Os resultados para período de latência (PL), tipo de reação (TR), densidade de lesão (DL) e porcentagem de discos lesionados (PDL) são apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A análise dos resultados contidos nas tabelas mostram que em nenhum dos parâmetros avaliados houve influência

Tabela 1 - Período de latência (dias) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de exposição de folhas de café à luz fluorescente (FL) e vermelho extremo (VE).

Tipo de luz	coleta	Tempo de exposição (horas)							
		0	3	6	9	12	15	18	\bar{x}
<hr/>									
	*								
FL	28,1	30,0	29,8	28,5	28,5	28,2	28,3	29,5	28,9
VE	29,7	28,1	28,8	30,0	28,1	29,7	29,8	28,2	29,1
\bar{x}	28,9	29,1	29,3	29,3	28,3	29,0	29,1	28,9	29,0

CV% 3,79

* - médias de seis repetições

Tabela 2 - Tipo de reação (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de exposição de folhas de café à luz fluorescente (FL) vermelho extremo (VE).

Tipo de luz	coleta	Tempo de exposição (horas)							\bar{x}
		0	3	6	9	12	15	18	
FL	[*] 8,3	9,0	8,0	8,7	8,7	8,0	8,7	8,3	8,5
VE	8,3	9,0	8,3	8,3	8,0	8,3	9,0	8,7	8,5
\bar{x}	8,3	9,0	8,2	8,5	8,4	8,2	8,9	8,5	8,5
CV%	6,99								

* - médias de seis repetições

Tabela 3 - Densidade de lesões (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de exposição de folhas de café à luz fluorescente (FL) e vermelho extremo (VE).

Tipo de luz	coleta	Tempo de exposição (horas)							
		0	3	6	9	12	15	18	\bar{x}
		* **							
FL	7,3	6,7	7,0	6,5	6,7	7,3	7,0	7,7	7,0
VE	7,3	6,7	6,7	6,3	7,0	7,0	6,7	7,3	6,9
\bar{x}	7,3ab	6,7ab	6,9ab	6,4b	6,9ab	7,2ab	6,9ab	7,5a	7,0
CV%	20,55								

* - médias de seis repetições

** - letras diferentes indicam significância por Tukey 5%

Tabela 4 - Porcentagem de discos lesionados em discos de folhas de Catuai inoculadas com raça II de ferrugem - ensaio de exposição de folhas de café à luz fluorescente (FL) e vermelho extremo (VE).

Tipo de luz	Tempo de exposição (horas)								
	coleta	0	3	6	9	12	15	18	\bar{x}

	*								
FL	71,1	74,7	70,7	71,3	69,0	70,3	69,6	76,0	71,7
VE	71,1	74,7	71,5	73,0	69,7	69,7	69,4	70,7	71,2
\bar{x}	71,1	74,7	71,1	72,2	69,4	70,0	69,3	73,4	71,4

CV%	28,24								

* - médias de seis repetições

da qualidade de luz e do tempo de exposição.

Para DL (tab. 3) ocorreram diferenças significativas para horas de exposição, o que traz pouca informação pois, estas representam a média dos dois tipos de luz. Nota-se no entanto que, os menores e os maiores valores coincidem em ambas as qualidades luminosas, levando a supor que nos tempos de exposição de seis e dezoito horas, outros motivos, que não as alterações metabólicas pretendidas, tenham sido os responsáveis pelos resultados.

Apesar dos resultados aqui obtidos, ainda assim não podemos concluir que o VE não induz resistência. Observações visuais indicam que cafeeiros bastante sombreados têm suas folhas menos atacadas por ferrugem e com menor severidade (RODRIGUES JR, 1984). O autor não especifica em que tipo de sombra isto ocorre.

Segundo SMITH (1975, apud FELLIPE, 1979) e KENDRICK e FRANKLAND (1976) o espectro de luz desloca-se bastante para a faixa do vermelho-vermelho extremo, quando tomado sob vegetação de floresta, indicando filtração dos raios solares pelas folhas dos vegetais.

ESKES et al (1978) observaram que folhas retiradas do interior de plantas de café apresentaram menor número de lesões do que as provenientes da parte externa da planta, quando inoculadas com ferrugem.

A aclimação de plantas de café em baixa luminosidade, seguida por inoculação com ferrugem, propiciou menor número de lesões do que em alta luminosidade (ESKES, 1982b). A questão

se torna mais contundente sabendo-se que mudas de café em viveiro (50% de luminosidade) são mais suscetíveis do que mudas mantidas em estufa (luminosidade inferior a 50% (ESKES, 1982b).

Outro ponto a ser considerado é que o tempo de exposição de VE, nesses experimentos, possa não ter sido suficiente para induzir resistência.

Conclui-se que é recomendável a realização de ensaios semelhantes para VE e outras qualidades de luz (vermelho e azul) com maior tempo de exposição, em folhas de plantas que estivessem sob cobertura vegetal ou baixa luminosidade (% conhecida) onde o espectro de luz seja conhecido.

1.2- Ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem

Na tabela 5 são apresentados os resultados para período de latência (PL). Observa-se que, na média geral dos experimentos, em relação às concentrações de esporos inativos, não ocorreram diferenças significativas. Por outro lado, na média geral de dias após a pré inoculação, o dia 1 difere dos restantes, sendo que nele a média da concentração $2 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ de esporos inativos foi significativamente superior às outras concentrações. Em outras palavras, a esporulação foi mais lenta.

Dentro de $2 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ocorre um "cruzamento de significâncias", ou seja, na concentração $0,5 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ de esporos viáveis o dia 1 diferiu dos outros e, neste mesmo dia,

Tabela 5 - Período de latência (dias) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - Ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml	H2O	0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
Ina- tivo	Viã- vel	* **							
	0,25	28,6	34,4	26,2	36,9	30,0	37,0	30,8	32,0
0	0,50	29,7	28,0	28,7	32,0	28,2	32,0	30,3	29,8
	1,00	29,8	28,0	26,5	31,6	32,0	29,3	33,2	30,1
\bar{x}		29,4	30,1▲	27,1	33,5	30,1	32,8	31,4	30,6
	0,25	33,6	31,0	29,2	31,0	28,0	33,8	28,9	30,8
1	0,50	29,3	29,1	27,9	32,8	30,3	28,9	27,9	29,5
	1,00	34,5	29,0	32,8	32,0	28,6	31,9	32,1	31,6
\bar{x}		32,5	29,7▲	29,9	31,9	29,0	31,5	29,6	30,6
	0,25	35,4	36,2▲	31,1	33,3	31,5	30,3	32,3	32,9
2	0,50	29,7b	61,5a□	34,5b	36,5b	28,0b	31,5b	39,0b	36,0
	1,00	30,4	38,3▲	28,6	33,3	30,8	31,5	30,3	32,4
\bar{x}		31,8b	45,3a■	31,4b	34,3b	30,1b	31,1b	32,2b	33,7
\bar{x}		31,2	35,1	29,5	33,3	29,7	31,8	31,1	31,7
CV%		9,49							

* - médias de três repetições

** - letras diferentes indicam significância por Tukey 5% dentro de tratamentos e símbolos, entre tratamentos

esta concentração diferiu das outras. Os dados permitem inferir que, para PL, a melhor combinação de esporos viáveis e inativos foi 0,5 mg.ml e 2 mg.ml, respectivamente, e o melhor dia foi o 1. Ao ser mencionado melhor concentração ou dia, isto é referente aos maiores valores de PL que, possivelmente, traduzem a manifestação da resistência induzida.

Outra informação oriunda dos dados contidos na tabela 5 é que a combinação 2 mg.ml / 0,5 mg.ml teve PL significativamente maior que a combinação 1 mg.ml / 0,5 mg.ml e 0 mg.ml / 0,5 mg.ml, confirmando o que foi dito acima.

A tabela 6 apresenta os dados para tipo de reação (TR). Sómente são observadas variações estatísticas significativas entre a média dos dias 1 e 3 das concentrações de esporos inativos. Assim, para o dia 1, destaca-se a concentração 2 mg.ml H₂O, inferior a 0 e 1 mg.ml⁻¹ H₂O. No dia 3, 2 mg.ml é inferior a 0 e 1 mg.ml é semelhante à ambas.

Ainda que o valor encontrado no dia 1 na interação 2 mg.ml / 0,5 mg.ml seja baixo, não se constatou nível de significância pelo teste de variância. Isto, possivelmente, se deve ao fato deste teste utilizar médias, mascarando tal dado. Contudo, a média de dias da maior concentração de esporos inativos acusa os dias 1 e 3 como diferentes dos demais.

A partir dos resultados de TR não se pode, como anteriormente se fez para PL, definir dia e concentrações de esporos que melhor representam a resistência induzida. Pode-se, no entanto, afirmar que 2 mg.ml⁻¹ H₂O de esporos inativos produziram menores valores de TR no dia 1, seguido, não tão

Tabela 6 - Tipo de reação (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O		0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
Ina- Viã- tivo vel	*								
0,25	**	8,3	8,7	9,0	8,5	8,7	8,0	8,7	8,6
0		8,0	9,0	8,7	8,0	8,7	8,0	8,7	8,4
1,00		8,0	9,0	8,7	8,7	7,0	8,7	8,0	8,3
\bar{x}		8,1	8,9▲	8,8▲	8,4	8,1	8,2	8,5	8,4
0,25		7,0	8,0	8,3	9,0	8,5	7,7	9,0	8,2
1		8,0	8,7	8,3	8,0	8,3	8,7	8,7	8,4
1,00		6,0	8,7	7,3	7,0	8,3	8,5	8,5	7,8
\bar{x}		7,0	8,5▲	8,0▲■	8,0	8,4	8,3	8,7	8,1
0,25		6,0	6,0	8,0	7,9	8,0	8,0	8,0	7,4
2		7,0	3,0	5,7	6,0	8,0	7,5	7,3	6,4
1,00		7,7	6,0	8,0	7,9	8,3	8,0	8,0	7,7
\bar{x}		6,9a	5,0b■	7,2a■	7,3a	8,1a	7,8a	7,8a	7,2
\bar{x}		7,3	7,5	8,0	7,9	8,2	8,1	8,3	7,9
CV%		10,59							

* - médias de três repetições

** - letras diferentes indicam significância por Tukey 5% dentro de tratamentos e símbolos, entre tratamentos

nitidamente, pelo dia 3 .

Em densidade de lesão (DL) (tab. 7) ocorreram diferenças tanto para a média geral de concentrações de esporos inativos, como para dias após a pré inoculação. No primeiro caso, 2 mg.ml⁻¹ H₂O diferiu de 1 mg.ml , que por sua vez diferiu de 0 mg.ml , que apresentou o maior valor. Quanto à média geral de dias , o dia 0 difere de todos os outros com exceção do dia 3 , que é estatisticamente igual aos restantes.

Entre médias de dias das concentrações de esporos inativos, 2 mg.ml⁻¹ H₂O teve os dias 1, 3, 5, 7 e 13 diferindo de 0 mg.ml porém, não ocorrendo o mesmo com 1 mg.ml , onde foram iguais nos dias 1 e 3. Dentro das médias da concentração 1 mg.ml , o dia 1 foi inferiormente significativo aos demais. Para 2 mg.ml este dia apenas diferiu claramente dos dias 0 e 3, tendo, este último, valores semelhantes aos demais que o seguiram.

Novamente em DL a concentração 2 mg.ml⁻¹ H₂O da pré inoculação se destaca como o tratamento mais indicativo da resistência induzida. Em relação ao dia 1, nota-se que destaca-se em 1 mg.ml⁻¹ H₂O de esporos inativos, não acontecendo o mesmo para a concentração superior e para a média geral de dias. Acreditamos que isto não ocorreu devido aos baixos valores de 2 mg.ml , que são constantes em todos os dias e nas três concentrações de esporos viáveis.

Para porcentagem de discos lesionados (PDL) (tab. 8) as médias de dias de 1 e 2 mg.ml⁻¹ H₂O de esporos inativos são inferiores e diferem de 0 mg.ml . Observa-se que, para o dia 1, 1 e 2 mg.ml são bem menores que 0 mg.ml , e que os valores

Tabela 7 - Densidade de lesões (0 a 9 pontos) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O		0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
Ina- viã- tivo vel		*							
		**							
0,25		7,0	5,7	6,7	3,5	7,0	4,0	3,3	5,3
0,50		6,3	8,0	5,7	5,8	6,7	3,3	5,0	5,8
1,00		7,0	6,7	6,7	6,0	3,7	5,3	3,7	5,6
\bar{x}		6,8	6,8 Δ	6,4 Δ	5,1 Δ	5,8 Δ	4,2	4,0 Δ	5,6 Δ
0,25		5,3	2,7	4,0	4,0	3,5	2,7	4,5	3,8
1,00		6,0	3,3	4,3	4,5	4,7	6,3	4,7	4,8
1,00		5,7	3,0	4,3	3,0	4,0	3,5	4,5	4,0
\bar{x}		5,7a	3,0 \square	4,2 \square	3,8 Δ	4,1 Δ	4,2a	4,6 Δ	4,2 \blacksquare
0,25		5,0	1,0	4,0	3,6	3,8	3,0	1,5	3,1
0,50		6,3	1,0	2,7	2,0	3,0	2,0	2,0	2,7
1,00		5,0	1,5	5,7	3,6	3,8	3,0	1,5	3,4
\bar{x}		5,4	1,2 \square	4,1 \square	3,1 \square	3,5 \square	2,7	1,7 \square	3,1 \bullet
		a	c	ab	abc	abc	bc	bc	
\bar{x}		6,0a	3,7b	4,9ab	3,9b	4,5b	3,7b	3,4b	4,3b
CV%		31,37							

* - médias de três repetições

** - letras diferentes indicam significância por Tukey 5% dentro de tratamentos e símbolos, entre tratamentos

Tabela 8 - Porcentagem de discos lesionados (%) em discos de folhas de Catuai inoculados com raça II de ferrugem - ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

E esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O		0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
Ina- Viã- tivo vel		*							
		**							
0,25		80,4	71,1	76,3	66,3	84,1	50,9	35,2	66,3
0	0,50	83,3	100,0	66,3	70,5	71,5	46,6	55,4	70,5
	1,00	95,8	73,3	80,6	66,7	70,0	69,3	42,5	71,2
\bar{x}		86,5	81,5 Δ	74,4 Δ	67,8 Δ	75,2 Δ	55,6	44,4	69,3 Δ
	0,25	64,0	27,0	44,9	37,5	34,0	40,0	62,5	44,3
1	0,50	81,9	36,1	50,5	40,0	45,7	68,2	48,9	53,0
	1,00	70,4	33,6	48,5	51,3	60,1	50,0	45,0	51,3
\bar{x}		72,1	32,2 \square	48,0 \square	42,9 \square	46,6 \square	52,7	52,1	49,5 \blacksquare
	0,25	57,6	13,7	58,9	62,5	60,9	54,4	48,3	50,9
2	0,50	80,4	11,1	31,0	55,5	61,0	54,3	48,2	48,8
	1,00	62,5	16,3	74,1	70,0	60,9	54,3	47,9	55,1
\bar{x}		66,8	13,7 \square	54,7 $\square\Delta$	62,7 $\square\Delta$	60,9 $\square\Delta$	54,3	48,1	51,6 \blacksquare
\bar{x}		75,1	42,5	59,0	57,8	60,9	54,2	48,2	56,8
CV%		30,91							

* - médias de três repetições

** - letras diferentes indicam significância por Tukey 5% dentro de tratamentos e símbolos, entre tratamentos

dos dias 3, 5 e 7, em 1 mg.ml , são iguais a 2 mg.ml , porém não o são a 0 mg.ml .

Como descrito na Revisão Bibliográfica, fatores adversos ao fungo *H. vastatrix* normalmente causam menor número de lesões, com menor TR e maior PL. Nos únicos trabalhos encontrados sobre resistência induzida em café, MORAES et al (1976) e BERETTA et al (1977) avaliaram somente o número de lesões, não dando indicações sobre velocidade e/ou intensidade de esporulação.

Encontraram-se no presente trabalho alterações nos quatro parâmetros avaliados, faltando, entretanto, maior evidência estatística em alguns deles. Atribuímos isto ao fato do teste de variância utilizar médias e também ao rigor do teste de Tukey.

De modo geral conclui-se que, na combinação 2mg/0,5mg/dia 1 foram encontradas as melhores indicações da manifestação da resistência induzida. PL foi o parâmetro que mais evidenciou esta interação.

Tanto PL como TR foram parâmetros pouco eficientes para a avaliação de resistência induzida. Justifica-se esta conclusão devido à especificidade de PL e TR em relação ao dia 1, não se manifestando, mesmo aparentemente, nos outros dias. Assim, para cada raça e genótipo estudado, seriam necessários novos experimentos, se considerada válida a proposição de que a resistência é função da velocidade que se processa o reconhecimento entre patógeno e hospedeiro e, conseqüentemente, as reações de resistência.

O contrário parece se dar em DL e PDL, onde a manifestação da resistência ocorre durante um maior período nos

dias após a pré inoculação e nas concentrações de esporos inativos. Analisando as tabelas 7 e 8, destaca-se a combinação 2mg/0,5mg/dia 1, sendo que no dia 1 de 2 mg.ml⁻¹H₂O de esporos inativos, a concentração 1 mg.ml⁻¹H₂O de esporos viáveis tem os maiores valores, seguida de 0,25 e 0,5 mg.ml⁻¹. Seria de se esperar, no entanto, que, fixando-se uma concentração de esporos inativos, o aumento gradual da quantidade de esporos viáveis causaria crescentes valores de DL e PDL. Isto não ocorreu nos ensaios realizados, onde 0,5 mg.ml⁻¹H₂O teve sempre valores inferiores a 0,25 mg.ml⁻¹. Poder-se-iam considerar, então, as hipóteses de um auto-inibidor da germinação de esporos (MUSUMECI et al, 1973), obstrução física na penetração do fungo pelos estomatos e a presença de *Verticillium hemileiae*, parasita de esporos da ferrugem do cafeeiro (BALDACCII et al, 1971).

A primeira hipótese é descartada de início, considerando-se que a interação 2 mg.ml⁻¹ / 1 mg.ml⁻¹ apresenta maior quantidade de esporos e não apresentou o fenômeno de resistência induzida, o que ocorreu com a combinação 2 mg.ml⁻¹H₂O. Quanto à obstrução física, a hipótese é pouco provável porém, para confirmação foram feitas impressões foliares de discos inoculados na maior quantidade de esporos, excluindo totalmente esta suspeita (MAZZAFERA et al, 1984).

É conhecido que o fungo *V. hemileiae* parasita a ferrugem do café, rompendo a parede dos esporos (BALDACCII et al, 1971). Este fungo recebeu a denominação *hemileiae* por ter sido encontrado em café. Contudo, em uma reclassificação da espécie, foi admitido ser o mesmo que *V. lecanii* (ESKES, comunicação pessoal). MAGAN e LACEY (1984), estudando as interações e

alterações de temperatura, pH e tempo, observaram que esporos de *V. lecanii* não germinavam em pH 4,5 e 6,0, em temperaturas superiores a 30°C, mesmo após 40 dias de incubação. Isto vem auxiliar na exclusão de *Verticillium*, alterando os resultados aqui obtidos pois, a inativação dos esporos de ferrugem se deu em banho-maria a 60°C por duas horas. A percepção visual deste fungo é fácil, caracterizando-se por um esbranqueamento no centro das lesões de ferrugem, o que não foi observado durante a condução dos experimentos.

Outra hipótese que poderia ser levantada em relação aos resultados obtidos para DL e PDL, na combinação 2 mg.ml/0,5 mg.ml, seria a interferência de outros microorganismos, que não *Verticillium hemileiae*, durante o tempo em que as gotas de solução de esporos de ferrugem da pré inoculação e inoculação se mantiveram no estado líquido. Como citado anteriormente, na inoculação com esporos viáveis no dia 1 as gotas da pré inoculação foram secas por exposição dos discos de folhas ao ambiente e, no dia 3, as mesmas apresentavam-se praticamente secas em todos os discos. Desta forma, há uma certa continuidade de quarenta e oito horas de água no estado líquido sobre os discos, entre o dia da pré inoculação e o dia 1 da inoculação com esporos inativos. Poderia-se supor, então, que a solução de esporos se tornasse um ambiente propício para a proliferação de microorganismos, que interfeririam na germinação dos esporos.

Com a finalidade de excluir esta hipótese, repetiu-se os mesmos procedimentos da pré inoculação e inoculação para a combinação 2 mg.ml/0,5 mg.ml nos dias 1 e 3 e retirou-se a

impressão foliar dos discos, segundo MAZZAFERA et al (1984). Como os esporos de ferrugem permaneciam aderidos à película de esmalte aplicada sobre os discos, determinou-se, em microscópio óptico a porcentagem de germinação dos esporos para a combinação 2 mg.ml/ $0,5$ mg.ml e para a testemunha 0 mg.ml/ $0,5$ mg.ml. Para a contagem em cada tratamento, foram utilizados pelo menos sete discos e no máximo dez e, um número total de dois mil e cem a três mil e quinhentos esporos foram contados. Para a comparação entre os tratamentos, o número total de esporos na contagem do primeiro tratamento foi dividido por cinco, antes do cálculo da porcentagem de germinação.

Constatou-se que no dia 1, 2 mg.ml/ $0,5$ mg.ml apresentou 14,7% de germinação e a testemunha 12,4%, e no dia 3, 12,2% e 16,1%, respectivamente. Com estes resultados excluiu-se a possibilidade da interferência de microorganismos, principalmente bactérias, que poderiam afetar a germinação dos esporos.

BERETTA et al (1977) induziram resistência à ferrugem em café por pré inoculação com esporos do mesmo fungo, que tinham sido autoclavados a 120°C por trinta minutos. A pré inoculação variou em concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg.ml⁻¹H₂O, e a inoculação propriamente dita, com esporos viáveis, foi com 2 mg.ml⁻¹ H₂O. Os autores observaram que a melhor concentração indutora foi 2 mg.ml , e a proteção estendeu-se em níveis constantes até o sétimo dia, caindo para valores menores de número de lesões no décimo quarto dia após a inoculação. Para os resultados aqui obtidos isto ocorreu em DL até o dia 13 e para PDL até o dia 3, na interação 2 mg.ml/ $0,5$ mg.ml.

Cabe então ressaltar que BERETTA et al (1977) permitiram um intervalo de noventa e seis horas (quatro dias) entre a pré inoculação e a inoculação em si. Ainda, na inoculação as plantas permaneceram por setenta e duas horas (três dias) sob incubação em ambiente úmido. Considerando-se que o indutor presente nos esporos de ferrugem localiza-se na face externa da parede e se libera facilmente em água (BERETTA et al, 1977; ALBA et al, 1983; NACACCHE, 1983; MORAES, 1984 e MORAES et al 1981), BERETTA et al (1977) deram condições muito melhores para que isto ocorresse pois, o período de molhamento foi de pelo menos três dias e no máximo de sete, já que os autores não citam em que condições permaneceram as plantas após a pré inoculação.

Neste trabalho, o período de molhamento foi no máximo dois dias, ou melhor, no dia 1 após a pré inoculação, quando as gotas sobre os discos apresentavam-se praticamente secas, e no dia da inoculação, quando foram incubados por vinte e quatro horas. Talvez isto explique a diferença entre os dois trabalhos, quanto à longevidade da proteção.

Caso seja realmente correto afirmar que o tempo de molhamento afeta diretamente o tempo de proteção na resistência induzida, o seu uso não se justificaria a nível de campo, onde a umidade relativa e a temperatura seriam fatores agravantes.

2- Teor de fenóis

Na extração e dosagem de fenóis, a redução do volume do extrato é citada na literatura como uma maneira de concentrar os compostos (HARBORNE, 1959 e 1974).

HARBORNE (1959) alerta para o fato de que a presença de clorofila poderia interferir no desenvolvimento de flavonóides do grupo das flavonas sobre cromatogramas. Entretanto, o uso de éter na lavagem do extrato pode acarretar a perda de alguns compostos de interesse (SWAIN, 1965).

Sabendo-se que a clorofila absorve muito pouco no comprimento de onda da leitura da reação de coloração de fenóis (725nm) (SWAIN e HILLIS, 1959), esta etapa foi omitida do processo de extração e dosagem de fenóis. Porém, para a certificação da não interferência da clorofila sobre as leituras ao espectrofotômetro, foram feitas leituras em 663 e 645nm nos extratos etanólicos de cada amostra e estimado o teor de clorofila pela fórmula proposta por ARNON (1949). As correlações calculadas entre clorofila e fenóis foram baixas em todos os casos e não significativas pelo teste t. A planta C1122-18 apresentou maior quantidade de clorofila do que Catuai.

2.1- Ensaio de exposição à luz fluorescente e vermelho extremo

Assim como os dados referentes à avaliação da resistência induzida, o teor de fenóis não apresentou variações significativas em resposta ao tempo de exposição à VE ou luz

fluorescente, nos dois cultivares de café estudados (tab. 9). Catuai mostrou menor conteúdo de fenóis do que C1122-18. Os dados referentes à PL, TR, DL e PDL não indicaram, no tratamento com VE, indução de resistência e, se a quantidade de fenóis estiver realmente ligada à resistência, os resultados são concordantes. Ficam válidos, portanto, os mesmos comentários realizados para o teste de discos.

Apesar de se ter proposto testes a fim de melhor compreender a ocorrência do aumento de fenóis em café, em resposta à VE, existem controvérsias sobre o assunto. Sabe-se que a PAL situa-se no início da via metabólica dos compostos fenólicos, logo seria esperado que um aumento em sua atividade levasse à maior síntese destas substâncias.

Tem-se constatado que a PAL aumenta a atividade em resposta à VE e que esta enzima, juntamente com lipoxigenase e pirofosfatase inorgânica, são as únicas que oferecem respostas rápidas ao estímulo por luz (ZUCKER, 1972). DURST e MOHR (1966) não observaram o mesmo em tecidos estiolados expostos a longos períodos de VE.

O tempo máximo de exposição à VE nos experimentos realizados foi de 18 horas, sem ser notada alteração significativa em fenóis. Porém, em ensaios prévios cujos resultados não estão aqui apresentados, e onde procurou-se a adoção de uma metodologia apropriada, conseguiu-se o aumento de fenóis. Nestes ensaios, mudas de Catuai e de Híbrido de Timor (resistente a todas as raças de ferrugem), foram aclimatados em luz fluorescente, em laboratório, por uma semana, e a seguir,

Tabela 9 - Teor de fenóis em Catuai e C1122-18 (mgg tecido verde) - ensaio de exposição de folhas de café à luz fluorescente (FL) e vermelho extremo (VE).

Tipo de luz	coleta	Tempo de exposição (horas)							\bar{x}
		0	3	6	9	12	15	18	
Catuai									
	*								
FL	13,7	14,4	13,9	13,3	15,0	12,9	14,8	14,6	14,1
VE	13,7	14,4	15,1	14,2	14,1	14,2	12,4	15,0	14,1
\bar{x}	13,7	14,4	14,5	13,8	14,5	13,6	13,6	14,8	14,1▲
CV%	8,77								
C1122-18									
FL	16,6	16,6	14,0	15,9	15,4	15,6	16,1	14,8	15,6
VE	16,6	16,6	15,5	15,1	15,2	16,4	15,7	16,5	15,9
\bar{x}	16,6	16,6	14,7	15,5	15,3	16,0	15,9	15,7	15,8■
CV%	8,79								
\bar{x}	15,1	15,5	14,6	14,6	14,9	14,8	14,7	15,2	14,9

* - médias de seis repetições

Tabela 10 - Teor de fenóis totais em Catuai e C1122-18 (mgg tecido verde) - ensaio de pré inoculação de discos de folhas de café com esporos inativos de ferrugem raça II.

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O		0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
Catuai									
	*								
0		13,4	16,0	14,2	12,9	14,5	15,4	12,8	14,2
1		13,4	12,0	13,5	15,2	11,7	12,3	11,4	12,8
2		13,4	12,6	13,4	11,2	15,1	13,4	11,6	12,9
\bar{x}		13,4	13,5	13,7	13,1	13,8	13,7	11,9	13,3▲
CV%		11,03							
C1122-18									
0		16,0	15,1	15,2	15,2	12,9	15,1	14,8	14,9
1		16,0	13,7	12,8	14,9	12,7	13,9	15,4	14,2
2		16,0	15,4	13,8	15,8	13,5	15,3	14,2	14,9
\bar{x}		16,0	14,7	13,9	15,3	13,1	14,8	14,8	14,6■
CV%		11,87							
\bar{x}		14,7	14,1	13,8	14,2	13,4	14,2	13,4	14,0

* - médias de três repetições

folhas padronizadas foram destacadas e colocadas sob tratamento de VE. A análise dos fenóis foi feita por ocasião da retirada das mudas do viveiro (50% de luz), após período de aclimação, inicialmente a cada duas horas por vinte e quatro horas e, a partir de então, a cada doze horas até setenta e duas horas.

Notou-se em ambas as plantas uma redução da concentração dos fenóis no período decorrido entre a saída do viveiro e a aclimação à luz fluorescente. Em VE houve aumento em ambas as plantas, com maior concentração em oito horas de tratamento, decrescendo, em seguida, para níveis iguais à amostragem (aclimação) após vinte e quatro horas. Híbrido de Timor teve maior aumento. A inoculação de discos de folhas providas de VE, com raça II de ferrugem (0,5 mg.ml H₂O com 60% de germinação) não indicou resistência induzida através de PL, TR, DL e PDL.

Desta forma, em uma avaliação imediata, talvez o cafeeiro seja realmente sensível à VE, via PAL. Tem-se, porém, que diferenciar as condutas metodológicas adotadas entre o teste citado anteriormente e o conduzido no presente trabalho. Um ponto a considerar seria a aclimação e a amostragem de folhas. Em um dos experimentos as folhas foram coletadas de cafeeiros no campo e aclimatadas por três dias em luz fluorescente, tendo o pecíolo envolto em algodão umedecido e acondicionadas em câmaras úmidas. No outro caso, as folhas foram coletadas das mudas, imediatamente antes de entrarem em VE, após terem sido aclimatadas por uma semana em luz fluorescente.

A diferença nos dois tipos de conduta refere-se ao estresse de hidratação a que eram submetidas as folhas de café.

Sob este aspecto as folhas retiradas de mudas, logo antes da entrada em VE, sofreriam o estresse da quebra da coluna líquida dos vasos do xilema durante o tratamento de luz, enquanto para o caso de folhas coletadas no campo, elas entrariam em VE sob uma possível condição de equilíbrio.

É conhecido que a PAL tem seu comportamento afetado por déficit hídrico (TODD, 1972), o que possivelmente explicaria em parte o que foi dito anteriormente.

Baseando-se na bibliografia consultada e no que foi discutido, acredita-se que a luz exerça um efeito sobre o desenvolvimento da ferrugem, porém não se pode afirmar que seja o VE a principal faixa do espectro de radiação responsável por isto. Trabalhos feitos em condições de campo com referência ao comportamento da ferrugem são indicativos dos efeitos da luz, guardando, no entanto, uma série de fatores e em diferentes intensidades, que podem ser atuantes. Isto justifica o estudo de outros comprimentos de onda de luz, como também as alterações do espectro luminoso sob diferentes tipos de coberturas.

2.2- Ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem

Para os teores de fenóis, em Catuai o teste de variância acusou significância a 1% para a interação concentração de esporos inativos e dias após a pré inoculação. A decomposição desta interação mostrou diferenças significativas a 5% entre as

concentrações de esporos inativos no dia 1, e a 1% entre dias em cada concentração de esporos inativos. Apesar disso, tais diferenças não foram detectadas pelo teste de Tukey a 5% na análise global dos dados.

Contudo, a observação da tabela 10 mostra que para Catuai, a interação dita acima significativa, concentrações no dia 1, 2 mg.ml⁻¹ H₂O de esporos inativos não atingiu o maior valor, sendo inferior a 0 mg.ml H₂O. O mesmo foi válido para as outras interações, entre dias em cada concentração, onde 0 mg.ml alcançou maiores teores de fenóis totais. Estes resultados não são coerentes com aqueles obtidos para PL, TR, DL e PDL, caso tentemos relacionar fenóis com resistência induzida.

Em Ci122-18 o teor de fenóis totais mostrou-se maior que em Catuai, e também ocorreram diferenças na média dos dias, mas sem apresentar uma sequência lógica de variação.

A análise conjunta do ensaio de discos de ambas as plantas indica que os fenóis provavelmente não foram os responsáveis pela resistência induzida, pelo menos em relação ao caráter quantitativo. Não deve ser descartada a possibilidade da produção, ou aumento em quantidade, de algum composto, mas sem afetar de forma mensurável o conteúdo de fenóis totais.

NACACCHE (1983) observou que havia aumento de fenóis em interações compatíveis e incompatíveis de café e *H. vastatrix*. O aumento foi mais rápido e pronunciado nas interações resistentes. Notou-se, também, semelhante resultado quando inoculou-se discos de folhas de café com solução aquosa contendo indutor extraído de esporos de ferrugem.

Por outro lado, BRUGUES e CONTREIRAS (1968) não observaram aumento em fenóis e quinonas em interações incompatíveis de café e ferrugem, e concluíram que não é possível atribuir a resistência observada à ação fúngica ou fungistática que poderia ocorrer devido a um relativo acúmulo endocelular de fenóis e quinonas. Alegam ainda, que a resistência estaria associada a diferenças qualitativas nos compostos fenólicos, que poderiam estar presentes antes ou após a infecção

A resistência condicionada por um composto específico presente antes da infecção é difícil de ser analisada, em função da grande variação encontrada entre os fenóis de cafeeiros portadores de genes de resistência diferentes ou não. Assim LOPES e MONACO (1977) e AMORIM et al (1978) detectaram grande variação no tipo de fenóis em diferentes espécies e variedades de café.

É conhecido que os compostos fenólicos são armazenados principalmente nos vacúolos, na forma de glicosídeos, e que a glicosilação seria uma maneira de manter a baixa reatividade destas substâncias em oxidações enzimáticas (BARUAH e SWAIN, 1959), maior solubilidade e consequente facilidade de translocação pela planta (KENNEDY e MITTLER, 1953 e ROBERTS, 1960) e evitar que permaneçam livres pela célula (PRIDHAM, 1965). Fenóis glicosilados, gliconas, podem ser liberados do vacúolo para o meio celular, por ação de enzimas do patógeno e tornando as condições desfavoráveis para o mesmo, inibindo o crescimento (DAVIS et al, 1953 e FLOOD e KIRKHAM, 1960).

Evidências para uma possível translocação de fenóis é o fato de que protoplastos de determinados vegetais se tornam eletricamente densos após o início da infecção por patógenos não virulentos (BROTZMAN et al, 1975; LAZAROVITS e HIGGINS, 1976; POLITIS, 1976; HARDER et al, 1979 e MARES, 1979), e a sequência de eventos associadas a este fato é a mesma à da liberação de dihidro-fenóis do vacúolo para o citoplasma (MUELLER e GREENWOOD, 1978).

Seguindo esta linha de raciocínio, a quantidade de fenóis poderia aumentar não como consequência de uma primeira reação de resistência da planta e sim devido ao desenvolvimento do micélio do fungo entre os espaços intercelulares das primeiras camadas de células do mesófilo, como observado na ferrugem do cafeeiro (RIJO e SARGENT, 1974). Porém, isto não explica as diferenças encontradas entre os trabalhos de BRUGUES e CONTREIRAS, (1968), NACACCHE (1983) e os dados apresentados neste trabalho.

No capítulo Material e Métodos foi citada a realização de um ensaio prévio para definição do uso de etanol 70, 80 ou 95% como extrator, optando-se por 70%.

Sabe-se que muitos flavonóides, a maior classe de compostos dentro de fenóis, são preferencialmente extraídos em solventes polares aquosos (GYPTA e SESHADRI, 1954; MABRY et al, 1970 e HARBORNE, 1973). SWAIN (1965) afirma que a maioria dos flavonóides no vacúolo são solúveis em água. Aliando isto ao fato de que tais compostos são armazenados como gliconas, o que afeta a solubilidade, existe a possibilidade de se extrair mais ou menos fenóis, dependendo do solvente empregado. BRUGUES e CONTREIRAS (1968) utilizaram etanol 80% e NACACCHE (1983),

etanol absoluto.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e na bibliografia consultada, conclui-se que a quantidade de fenóis possivelmente não determina a resistência em si, ou mesmo a induzida e, caso estejam os fenóis realmente envolvidos na resistência, o caráter qualitativo deve ser o responsável pelo fenômeno, permanecendo a possibilidade de que o composto, ou compostos, correlacionados estejam presentes ou não antes da infecção.

3- Atividade de peroxidase polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase

Em função de não se ter obtido resistência induzida no tratamento com VE, as atividades destas enzimas não foram determinadas neste tipo de ensaio.

A grande maioria de pesquisas sobre indução da PAL com luz são feitas em tecidos estiolados, que mostram o controle da enzima a nível de interconversões do fitocromo (ZUCKER, 1972). Existem, porém, casos onde a PAL não demonstra modulação pela luz (MARSH e HAVIR, 1968 e WALTON e SONDHEIMER, 1968), ou possui sensibilidade à luz azul em reações de alta energia (ENGELSMA, 1967). Tubérculos de *Helianthus tuberosus* parecem ser o único material vegetal não estiolado que apresenta a modulação da PAL através do fitocromo (DURST e DURANTON, 1970,

agud ZUCKER, 1972 e CAMM e TOWERS, 1977), sendo que a atividade da enzima em tecidos vegetais verdes parece ser controladas por reações fotossintéticas, desempenhando os açúcares importante papel (ENGELSMA, 1967; CREASY, 1968a e 1968b e ZUCKER, 1969).

Portanto, se realmente a PAL é importante no controle de fenóis em plantas, e que este controle é dependente da fotossíntese e de seus produtos, poder-se-ia supor que o tempo empregado no tratamento de VE possa ter sido insuficiente para alterações no nível de carboidratos, ou ainda, que em folhas de café não existe a modulação da enzima por esta qualidade de luz, não afetando o conteúdo de fenóis.

As tabelas 11, 12 e 13 trazem, respectivamente, os dados referentes às dosagens de atividade de PO, PPO e PAL no ensaio de pré inoculação. Não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhum dos casos, com exceção à PO que mostrou variações significativas para dias após a pré inoculação em C1122-18, enquanto que para PPO ocorreu o mesmo em Catuai. Os dados não mostram uma variação coerente de atividades e também não assumem importância pois, não ocorrem dentro de uma concentração definida de esporos mortos.

Grande número de investigações sobre PO e PPO envolvem inoculações de microorganismos vivos em plantas suscetíveis e/ou resistentes. A extração de um indutor do patógeno e sua presença em tecido vegetal pode fazer com que as reações decorrentes sejam mais específicas, ou melhor, sem a presença física do patógeno muitas alterações celulares poderiam deixar de ocorrer. Esta consideração, é importante por levar em conta a omissão de um contato íntimo entre células do hospedeiro e a parede do

Tabela 11 - Atividade de peroxidase em Catuai e C1122-18 - ensaio de pré inoculação de discos de café com esporos inativos de ferrugem raça II (0 e 2mg/ml H₂O).*

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O		0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
<hr/>									
Catuaí		**							

0		15,18	16,49	19,21	21,36	20,95	20,80	17,03	18,72
2		16,50	14,89	21,29	26,98	22,28	14,04	18,58	19,22
\bar{x}		15,84	15,69	20,25	24,17	21,62	17,42	17,81	18,97
CV%		24,49							
<hr/>									
C1122-18									
0		19,72	11,72	18,56	27,10	27,22	22,83	10,99	19,73
2		21,93	11,14	16,75	27,11	23,35	21,95	19,07	20,19
\bar{x}		20,83	11,43	17,65	27,11	25,28	22,39	15,03	19,96
		abc	c	abc	a	ab	abc	bc	
CV%		23,35							
<hr/>									
\bar{x}		18,34	13,56	18,95	25,64	23,45	19,91	16,42	19,47

* - uma unidade da enzima representa a quantidade de proteína que causa a variação de uma unidade de absorbância por minuto

** - médias de três repetições

***- letras diferentes indicam significância por Turkey dentro de genótipo

Tabela 12 - Atividade de polifenoloxidase em Catuai e C1122-18 - ensaio de pré inoculação de discos de café com esporos inativos de ferrugem raça II(0 e 2mg/ml H2O).*

Esporos mg/ml H2O	Dias após a pré inoculação							
	0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}
<hr/>								
Catuai	**							

0	2,77	3,84	6,19	6,14	3,81	5,38	5,87	4,86
2	3,40	3,89	6,28	5,89	6,19	5,69	5,86	5,31
\bar{x}	3,09 b	3,87 ab	6,24 a	6,02 a	5,00 ab	5,54 ab	5,87 a	5,09
CV%	21,41							
<hr/>								
C1122-18								
0	3,72	3,48	5,24	7,86	5,17	7,32	4,60	5,34
2	5,80	3,95	4,25	6,19	5,21	7,07	5,93	5,49
\bar{x}	4,76	3,71	4,74	7,02	5,19	7,20	5,27	5,41
CV%	22,95							
<hr/>								
\bar{x}	3,92 b	3,79 b	5,49 ab	6,52 a	5,10 ab	6,36 a	5,57 ab	5,25
<hr/>								

- * - uma unidade da enzima representa a quantidade de proteína que causa a variação de uma unidade de absorbância por minuto
 ** - médias de três repetições
 ***- letras diferentes indicam significância por Tukey 5% entre genótipos

Tabela 13 - Atividade de fenilalanina amonia liase em Catuai e C1122-18 - ensaio de pré inoculação de discos de café com esporos inativos de ferrugem raça II (0 e 2mg/ml H2O).*

Esporos		Dias após a pré inoculação							
mg/ml H2O	0	1	3	5	7	10	13	\bar{x}	
Catuai									
	**								
0	35,33	53,67	66,00	40,00	49,67	49,33	46,67	48,67	
2	35,33	99,00	46,00	22,33	47,67	67,00	27,67	49,29	
\bar{x}	35,33	76,34	56,00	31,17	48,67	58,17	37,17	48,98	
CV%	58,06								
C1122-18									
0	86,67	50,00	55,67	51,00	49,00	67,00	36,67	56,57	
2	86,67	122,33	75,67	60,00	60,00	45,33	38,00	69,71	
\bar{x}	86,67	86,17	65,67	55,50	54,50	56,17	37,34	63,14	
CV%	50,12								
\bar{x}	55,83	81,25	60,83	43,33	51,58	57,17	37,25	56,06	

* - uma unidade da enzima representa a quantidade de proteína que causa a variação de uma unidade de absorbância por minuto

** - médias de três repetições

patógeno. Um exemplo disto poderia ser a liberação de enzimas hidrolíticas do parasita (JONES et al, 1972; COOPER e WOOD, 1975 e COOPER et al, 1981), que podem constituir prováveis indutores de resistência a doenças em plantas (BELL, 1981).

NACACCHE (1983) detectou aumento de PO e PPO em discos de cafeeiros na presença de indutor extraído de ferrugem raça II. A planta controle, suscetível, não teve alterações significativas nestas enzimas, o que em parte é concordante com os dados aqui apresentados, já que o indutor é facilmente liberado em água (MORAES, 1984 e MORAES et al, 1984). SIEVERS et al (1980) detectaram aumento em PO, em interações compatíveis de cafeeiro (SH2) e ferrugem, somente após várias semanas da inoculação com esporos vivos.

Segundo MORAES (1984), o estudo de PO e PPO em café é bastante incomum, apresentando dificuldade na repetibilidade de dados devido à grande variação em diferentes dosagens de atividade em ensaios semelhantes ou não.

O efeito conhecido como hipersensibilidade é comumente definido e referido como sendo a necrose localizada de células do hospedeiro, no ponto de infecção pelo patógeno (BELL, 1981), ficando o tecido escurecido. Segundo BELL (1981), a hipersensibilidade é um ponto contraditório em relação à paralização do crescimento do parasita, citando casos onde isto ocorre antes, durante e depois da morte das células do hospedeiro, levando à suposição do processo ser um efeito, e também uma causa da necrose.

GOODMAN et al (1967) estabelecem um ponto de ligação

entre PFO e a hipersensibilidade, quando dizem que as quinonas produzidas pela atividade de catecolase da enzima, além de causar a oxidação do tecido, podem originar compostos do tipo melanina, que dão coloração marrom. Em café, observa-se a ocorrência ocasional de morte de células da câmara subestomática na presença do micélio de ferrugem, mas sem ser observada a formação áreas necróticas (RIJO, 1972 e MARTINS et al, 1983).

Os resultados aqui obtidos para PD e PFO, apesar de não serem conclusivos, vêm mostrar a complexidade do assunto, principalmente sabendo-se que dentre os poucos trabalhos em café (BRUGUES e CONTREIRAS, 1968; SIEVERS et al, 1980 e NACACCHE, 1983) existem pontos de controvérsias.

A dosagem de atividade da PAL (tab. 13) indicou que não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos e entre plantas, entretanto, C1122-18 mostrou uma tendência a maiores valores que Catuai. Tais resultados são concordantes com os obtidos para fenóis, considerando que a enzima tem a capacidade de afetar o conteúdo destes compostos na célula.

Nota-se que os valores de absorbância da tabela 13 são baixos e cre-se que isto se deva principalmente à maneira como o material vegetal foi triturado (graal), dando maior granulometria do que se fosse feito em homogeneizador, conforme CARRIZOSA e ESPITIA (1982). Este fato talvez tenha afetado a velocidade de extração da enzima, quando resuspenso o pó cetônico em tampão por sessenta minutos, conforme descrito na literatura (CARRIZOSA e ESPITIA, 1982). Observa-se também, altos valores dos coeficientes de variação em ambos os cafeeiros, sem, no entanto, se encontrar explicação para isto.

já que, apesar da maior granulometria do pó cetônico, esta era semelhante para todos os tecidos homogeneizados.

4- Análise cromatográfica

Foram corridas cromatografias dos extratos do experimento de pré inoculação, onde se conseguiu resistências induzida. As figuras 3 e 4 trazem os cromatogramas condensados de Catuai e C1122-18, respectivamente, representando os vários dias após a pré inoculação com esporos inativos.

Ao todo foram identificadas 49 manchas, sendo 42 comuns aos dois genótipos de café. O quadro 1 apresenta as identificações quanto a fenol, flavonóides e flavonóides com núcleo floroglucinol.

Em Catuai (fig. 3) identificaram-se 45 manchas e as de número 4 e 44 não foram encontradas em C1122-18. A mancha 31 apareceu muito pouco visível nos dias 0 e 1 de concentração 0 mg.ml⁻¹ H₂O, sendo a sua presença mais forte e definida nos dias 1, 3 e 5 da concentração 2 mg.ml⁻¹ H₂O. A mancha 44 apenas foi detectada nos dias 3 e 5 de 2 mg.ml.

Em C1122-18 (fig. 4) identificaram-se 47 manchas, não sendo comuns a Catuai as de número 46, 47, 48 e 49. Também, nesta planta a mancha 31 apareceu pouco nítida no dia 0 e com

Quadro 1 - Identificação e Rfs, em butanol:ác. acético:H₂O (6:2:1) e ác. acético 2%, das manchas visualizadas em cromatogramas de extratos de folhas de Catuai e 1122-18 - ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem.

Número mancha	Rf		Provável identificação
	EtAc:1A	Ac2%	
1	0,08	0,00	flavonóide
2	0,13	0,01	flavonóide
3	0,10	0,09	flavonóide
4	0,13	0,13	flavonóide
5	0,25	0,00	fenol
6	0,22	0,03	fenol
7	0,34	0,01	flavonóide
8	0,39	0,11	flavonóide n. f.*
9	0,45	0,01	flavonóide
10	0,45	0,03	flavonóide
11	0,54	0,00	flavonóide
12	0,56	0,04	flavonóide
13	0,51	0,07	flavonóide
14	0,67	0,01	flavonóide
15	0,67	0,07	flavonóide
16	0,70	0,13	flavonóide
17	0,62	0,16	flavonóide
18	0,26	0,32	flavonóide
19	0,35	0,21	flavonóide n. f.
20	0,36	0,30	flavonóide n. f.
21	0,42	0,25	flavonóide
22	0,40	0,34	fenol
23	0,49	0,24	flavonóide n. f.
24	0,46	0,34	flavonóide
25	0,57	0,29	flavonóide n. f.
26	0,74	0,39	flavonóide n. f.
27	0,38	0,51	flavonóide
28	0,50	0,46	flavonóide n. f.
29	0,64	0,55	flavonóide
30	0,55	0,55	fenol
31	0,57	0,55	flavonóide
32	0,46	0,60	flavonóide
33	0,38	0,59	flavonóide
34	0,41	0,60	flavonóide n. f.
35	0,33	0,59	fenol
36	0,33	0,68	flavonóide
37	0,51	0,81	flavonóide
38	0,57	0,76	fenol
39	0,62	0,79	fenol
40	0,59	0,82	fenol
41	0,84	0,85	flavonóide
42	0,87	0,89	flavonóide
43	0,26	0,97	flavonóide
44	0,59	0,63	flavonóide
45	0,30	0,04	flavonóide
46	0,68	0,19	flavonóide
47	0,52	0,27	flavonóide
48	0,18	0,41	flavonóide
49	0,17	0,00	flavonóide

* Flavonóide com núcleo floroglucinol

boa definição nos dias 3 e 5 de 2 mg.ml^{-1} H₂O de esporos inativos. A mancha de número 47 foi identificada em 2 mg.ml^{-1} nos dias 3, 5, 7 e 10 após a pré inoculação.

A mancha 31 tem comportamento semelhante em ambos os cultivares, parecendo ser um composto que teve um aumento em quantidade, a partir da pré inoculação. É interessante, apesar de gerar dúvidas, constatar que tal composto foi detectado de forma pouco nítida nos dias 0 e 1 de 0 mg.ml^{-1} H₂O, podendo indicar uma relação com o dano causado pelo furador de rolhas, quando da retirada dos discos. Por outro lado, esta mancha se manteve presente e bem definida até o dia 5 de 2 mg.ml^{-1} H₂O, o que permite especular sobre uma relação com a presença de esporos inativos de ferrugem induzindo resistência.

Em Catuai, a mancha 44 somente foi identificada em cromatogramas de extratos de discos que receberam 2 mg.ml^{-1} H₂O de esporos inativados e nos dias 3 e 5. O mesmo ocorreu em Cii22-18 com a mancha 47, dos dias 3 ao 10 após a pré inoculação. Acredita-se que estes compostos estejam relacionados com a indução de resistência, mas não se pode afirmar com certeza que tenham sido produzidos especificamente em resposta à resistência induzida. Diz-se isto, pelo fato de existir a possibilidade de que estivessem presentes antes do tratamento indutor, porém sem serem detectados através das técnicas utilizadas. A aplicação de maior quantidade de extrato nas placas cromatográficas (0.05 ml) não permitia melhor visualização destas manchas pelo fato de que outros compostos, em grande quantidade no tecido foliar de café, mascaram o seu aparecimento.

Através das colorações observadas das manchas em UV e na série de reveladores usados (SIEKEL, 1962 e RIBEREAU-GAYON, 1972), pode-se inferir as manchas 31, 44 e 47 como provavelmente sendo flavonol, flavonol e isoflavona, respectivamente.

Com exceção às manchas 44 e 47, as de numeração 4, 46, 48 e 49, presentes em todos os dias e nas duas concentrações estudadas, não são comuns a Catuai e C1122-18, o que poderia, ou não, diferenciar a resposta de resistência destas plantas quando inoculadas apenas com esporos viáveis de ferrugem. Tal insinuação é no entanto, meramente especulativa, já que LOPES E MONACO (1977) analisando espécies e variedades de café não conseguiram traçar uma correlação entre compostos fenólicos identificados e resistência à ferrugem.

NACACCHE (1983) não conseguiu identificar substâncias do tipo fitoalexinas em extratos alcoólicos obtidos a partir de folhas de cafeeiros inoculados com raça avirulenta de ferrugem ou com indutor extraído da mesma.

Conclui-se que, apesar de não se poder afirmar com convicção de que as manchas 44 em Catuai e 47 em C1122-18 foram produzidas especificamente em função da indução de resistência, ou melhor, fitoalexinas, muito provavelmente estão relacionadas com o processo.

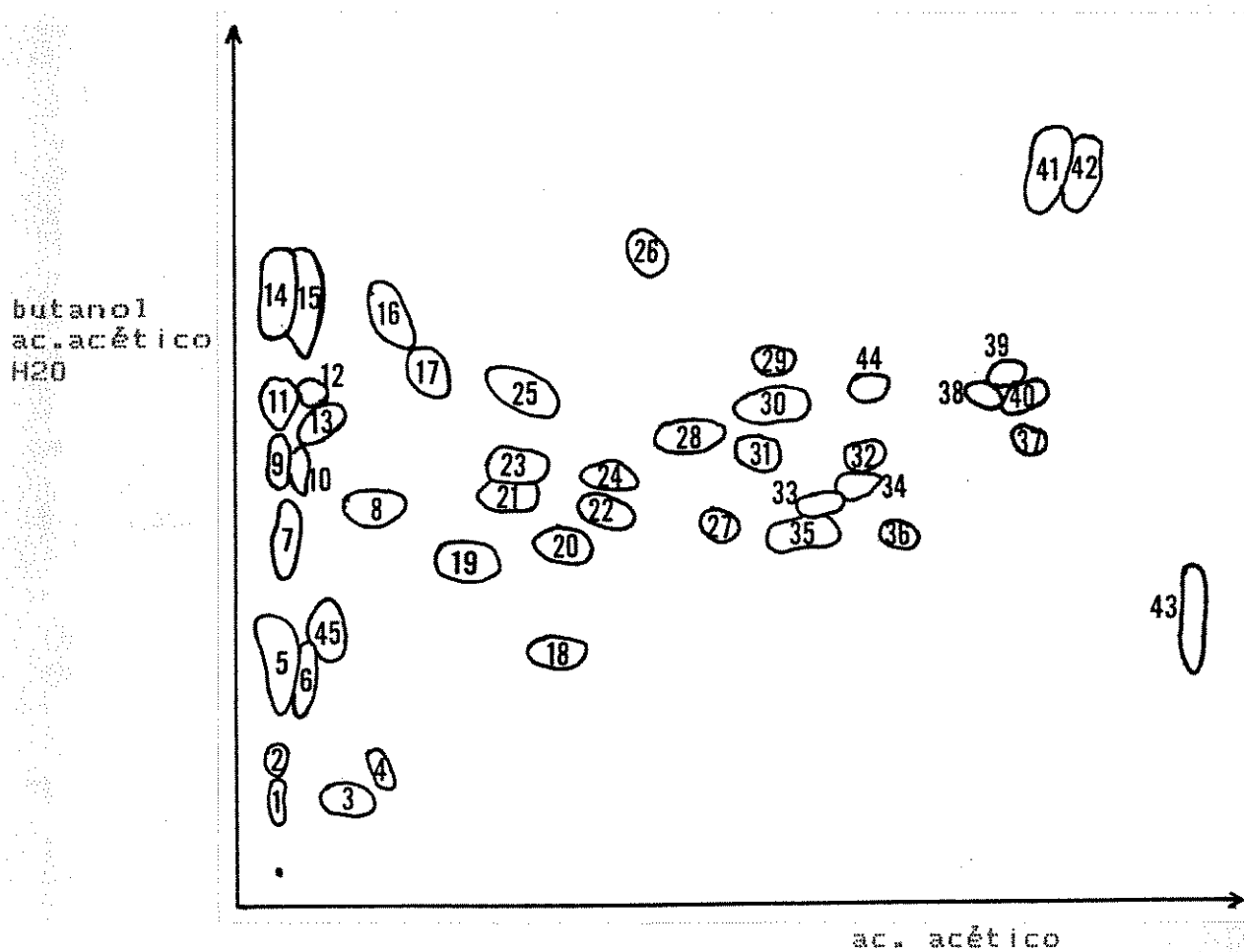


Figura 3 - Representação dos cromatogramas dos extratos de Catuai, no ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II

butanol
ac. acético
H₂O

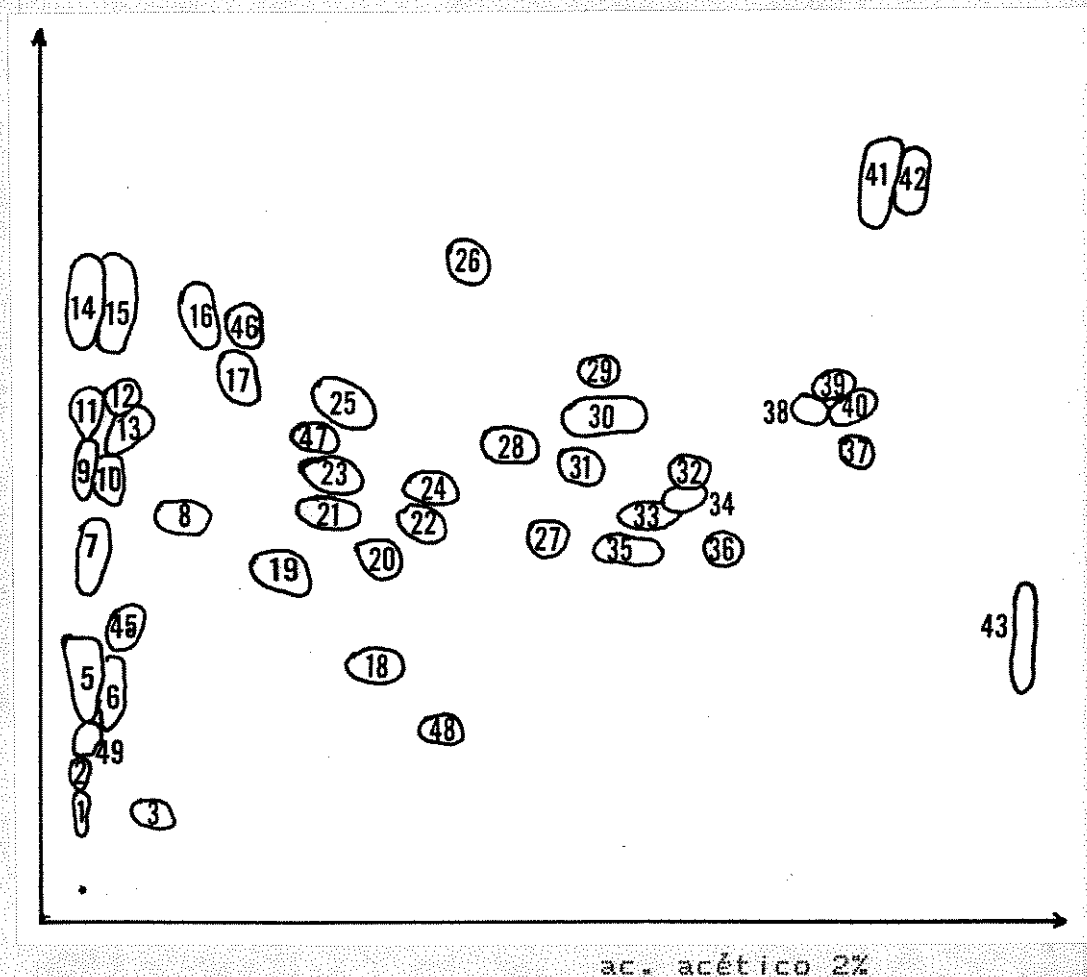


Figura 4 - Representação dos cromatogramas dos extratos de C1122-18, no ensaio de pré inoculação com esporos inativos de ferrugem raça II.

V- Conclusões

Os dados obtidos nos experimentos nos permitem tirar as seguintes conclusões:

A luz na faixa do VE não induz o aumento de fenóis totais e a resistência de cafeeiros à ferrugem, pelo menos no tempo considerado de tratamento (18 horas),

O fenômeno de resistência induzida nos cafeeiro Catuai ocorre com a pré inoculação de esporos inativos da raça II de ferrugem, e é dependente da concentração empregada. Os melhores parâmetros de avaliação, dentre os estudados, são a densidade de lesão (DL) e a porcentagem de discos lesionados (PDL),

A indução de resistência por pré inoculação de esporos inativos não ocasionou aumento de fenóis totais, eliminando o aspecto quantitativo como sua causa,

A resistência induzida observada não levou ao aumento de atividade das enzimas peroxidase (PO), polifenoloxidase (PFO) e fenilalanina amonia-liase (PAL),

Foram identificados dois flavonóides que, possivelmente, se relacionam com a resistência induzida, ressaltando o caráter qualitativo do processo e indicando o envolvimento de outras possíveis enzimas, que não as analisadas, na síntese ou aumento de concentração destes compostos.

VI- Resumo

Para o complexo patógeno-hospedeiro *Coffea arabica* L.-
Hemileia vastatrix Berk. et Br. foram testados dois métodos de
indução de resistência. Em um deles, folhas de dois cultivares
de café, Catuai (SH5) e C1122-18 (SH2SH5), foram expostas a
diferentes períodos de irradiação com luz na qualidade vermelho
extremo, para em seguida serem retirados discos de folhas e
estes inoculados com esporos de ferrugem, raça II (v5). No
segundo método, discos de folhas dos mesmos cultivares de café
foram inoculados com esporos de ferrugem inativados
termicamente, em três concentrações (0, 1 e 2 mg.ml⁻¹ H₂O). Em
seguida, em diferentes dias após esta prévia inoculação, os
discos foram inoculados com esporos viáveis da mesma raça de
ferrugem, nas concentrações 0,25, 0,5 e 1 mg.ml⁻¹ H₂O. Observou-
se indução de resistência na planta suscetível apenas no segundo
método. Tal fato foi melhor evidenciado na combinação 2 mg.ml⁻¹
H₂O/0,5 mg.ml⁻¹ H₂O no primeiro dia após a inoculação com esporos
inativos de ferrugem.

Também determinou-se o teor de fenóis totais e dosou-se a
atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase,
polifenoloxidase e peroxidase. Não foram encontradas variações
estatisticamente significativas em nenhum dos casos.

Análises cromatográficas dos extratos etanólicos de
fenóis revelaram o aparecimento de uma nova substância fenólica
em Catuai, e uma outra em C1122-18, sendo identificadas como
flavonol e isoflavona, respectivamente. Estes compostos não

estavam presentes em cromatogramas dos tratamentos testemunha. Em Catuai, o flavonol foi detectado nos dias onde a resistência induzida tornou-se mais evidente, sugerindo uma possível relação com este tipo de resistência.

VII- Summary

Two methods were tried to induce resistance in the host-pathogen system *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*. In the first method, leaf discs of two cultivars (Catuai, SH5 and Cii22-18, SH2SH5) were inoculated with uredospores of race II (v5) after the leaves were exposed to far red irradiation with different durations. In the second method, discs of leaves of the same cultivars were inoculated with thermically inactivated uredospores of race II at 0, 1, and 2 mg.ml⁻¹ H₂O concentrations. The discs were inoculated with viable uredospores of race II at 0,25, 0,5 and 1 mg.ml⁻¹ H₂O concentrations and on different days after the pre-treatment with inactivated uredospores.

Induced resistance was obtained in the susceptible plant (Catuai) only by the second method. Most evidence of induced resistance was obtained in the combination of 2 mg.ml⁻¹ H₂O of dead uredospores with 0,5 mg.ml⁻¹ H₂O of viable uredospores, applied one day after pre-treatment.

Total phenol content, peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities were also assayed. However no significant differences were observed among treatments.

Phenolic extracts were analysed by cellulose thin-layer chromatography and two new spots were detected, identified as a flavonol in the susceptible cultivar Catuai and an isoflavone in the resistant cultivar Cii22-18. Flavonol might be associated with the induced resistance in leaf discs of Catuai by the pre-

treatment with inactivated uredospores, as suggested by its appearance on the days that induced resistance was most evident.

VIII- Abreviaturas

C - graus centígrados

etc- et cetera

FL - luz fluorescente

g - gramos

M - molar

mg - miligramas

ml - mililitros

PAL- Fenilalanina Amonia-Liase

PFO- Polifenoloxidase

PO - Peroxidase

rpm- rotações por minuto

VE - luz na faixa do vermelho-extremo

IX- Literatura consultada

ALBA, A.P.C., GUZZO, S.D., MAHLOW, M.P.F. e MORAES, W.B.C.,
1983. Common Antigens in Extracts of *Hemileia vastatrix* Berk
et Br. Urediospores and *Coffea arabica* Leaves and Roots.
Fitopatol. Bras. 8:473-483.

ALBERSHEIN, P. e VALENT, B.S., 1978a. Host-Pathogen Interaction
in Plants. J. Cell Biol. 78:627-643.

AMORIM, H.V., ALVARES, M.L.M., LOPES, C.R., CARVALHO, A. e
MONACO, L.C., 1978. Análise de Compostos Fenólicos em Folhas
de Cafeeiros Resistentes e Suscetíveis à *Hemileia vastatrix*.
Turrialba 28(1):57-60.

AMRHEIN, N. e ZENK, M., 1970. Cocomitant Induction of
Phenylalanine Ammonia Lyase and Cinnamic Acid 4-Hydroxylase
During Illumination of Excised Buckwheat Hypocotyls.
Naturwissenschaften 57:312.

ANDERSON-PROUTY, A.J. e ALBERSHEIM, P., 1975. Host -Pathogen
Interactions. VIII. Isolation of a Pathogen-Synthesized
Fraction Rich in Glucan that Elicits a Defense Response in
the Pathogenesis Host. Plant Physiol. 56:286-304.

ANNUAL TECHNICAL REPORT of COFFEE BOARD RESEARCH DEPARTMENT,
INDIA, 1965/66 79p e 1969/70 93p.

A.O.A.C.- Ass. Off. Agric. Chem., 1975. Official and Tentatives
Methods of Analysis. 8th Ed., Washington 144p.

ARNON, D.I., 1949. Cooper Enzymes in Isolated Chloroplasts:
Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Pathol. 24:1.

ATTRIDGE, T.H. e SMITH, H., 1967. A Phytochrome Mediated
Increased in the Level of Phenylalanine Ammonia Lyase
Activity in the Terminal Buds of *Pisum sativum*. Biochem.
Biophys. Acta 148:805-807.

ATTRIDGE, T.H. e SMITH, H., 1973. Evidence for a Pool of
Inactive Phenylalanine Ammonia Lyase in *Cucumis sativus*.
Phytochemistry 12:1569-1574.

ATTRIDGE, T.H., JOHNSON, C.B. e SMITH, H., 1974. Density
Labelling Evidence for the Phytochrome Mediated Activation
of Phenylalanine Ammonia Lyase in Mustard Cotyledons.
Biochem. Biophys. Acta 343:440-451.

AYERS, A.R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. e ALBERSHEIN, P.,
1976a. Host-Pathogen Interaction IX. Quantitative Assays of
Elicitor Activity and Characterization of the Elicitor
Present in the Extracellular Medium of Cultures of
Phytophthora megasperma var. *sojae*. Plant Physiol. 57:751-
759.

- AYERS, A.R., EBEL, J., VALENT, B. e ALBERSHEIN, P., 1976b. Host-Pathogen Interaction X. Fractionation and Biological Activity of an Elicitor Isolated from the Micelial Walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57:760-765.
- AYERS, A.R., VALENT, B., EBEL, J. e ALBERSHEIN, P., 1976c. Host-Pathogen Interaction XI. Composition and Structure of Wall-Released Elicitors Fractions. *Plant Physiol.* 57:766-774.
- BAILEY, J.A., 1974. The Relationship Between Symptom Expression and Phytoalexin Concentration in Hypocotuls of *Phaseolus vulgaris* Infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.* 4:477-488.
- BALASUBRAMANI, K.A., 1971. Changes in Respiratory Rates, Polyphenol-oxidase and Polygalacturonase Activity in and Around Caused by Botrytis in Leaves of *Vicia faba*. *Physiol. Plant Pathol.* 1:105.
- BALDACCI, E., GLILLINI, C.A. e SCARAMUZZI, G., 1971. Studies by Transmission and Scanning Electron Microscopy on the *Hemileia vastatrix*-*Verticillium hemileiae* association. *Revista di Patol. Veg. série IV vol.VII*:127-145.
- BARTON, G.M., EVANS, R.S. e GARNER, J.A.F., 1952. Paper Chromatography of Phenolic Substances. *Nature (Lond.)* 170:249-250.

- BARUAH, P. e SWAIN, T., 1959. The Action of Potato Phenolase on Flavonoid Compounds. J. Sci. Food Agric. 10:125.
- BELL, A., 1981. Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:21-81.
- BELLINI, E. e VAN POUCKE, M., 1970. Distribution of Phenylalanine Ammonia Lyase in Etiolated and Far-Red Irradiated Radish Seedlings. Planta (Berl.) 93:60.
- BERETTA, M.J.G., MARTINS, E.M.F. e MORAES, W.B.C., 1977. Induced Protection to *Hemileia vastatrix* at a Distance from the Site of Inducing Action in Coffee Plants. Summa Phytopathol. 3(1):66-70.
- BETTENCOURT, A.J., 1973. Considerações Gerais Sobre o Híbrido de Timor. Instituto Agronômico de Campinas, circular 23, 20pp.
- BIEHM, W.L., KUC, J. e WILLIAMS, E.B., 1968. Accumulation of Phenols in Resistant Plant-Fungi Interactions. Phytopathology 58:1255.
- BLUME, D.E. e McCLURE, J.W., 1978. Photocontrol of Phenylalanine Ammonia Lyase in Barley Seedlings Treated with Pyridazinone Inhibitors of Chloroplast Development. Phytochemistry 17:1545-1547.

- BORNER, H. e GRISEBACH, H., 1982. Enzyme Induction in Soybean by *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Arch. Biochem. Biophys. 217(1):65-71.
- BROTZMAN, H.C., CALVERT, O.H., WHITE, J.A. e BROWN, M.F., 1975. Southern Leaf Blight: Ultrastructure of Host-Pathogen Association. Physiol. Plant Pathol. 7:209-211.
- BROWN, S.A., 1966. Lignins. Ann. Rev. Plant Physiol. 17:223-244.
- BRUESKE, C.H. e DRAPKINS, V.H., 1973. Free Phenols and Root Necrosis in Tomato Infected with the Root Knot Nematode. Phytopathology 63:229.
- BRUGES, J. e CONTREIRAS, J., 1968. Aspects Biochimiques de la Résistance du Caféier à l'*Hemileia vastatrix*. Portugalia Acta Biol. série A 10:75-88.
- BURREL, M.M. e APREES, J., 1974. Metabolism of Phenylalanine and Tyrosine by Rice Leaves Infected by *Piricularia oryzae*. Physiol. Plant Pathol. 4:497.
- CAMM, E.L. e TOWERS, G.H.N., 1977. Phenylalanine Ammonia Lyase. Progress in Phytochemistry 4:169-188.
- CARELLI, M.L.C., LOPES, C.R. e MONACO, L.C., 1974. Chlorogenic Acid Content in Species of Coffea and Selections of *C. arabica*. Turrialba 24:398-401.

CARRIZOSA, M.T. e ESPITIA, H.Z., 1982. Determinacion de la Fenilalanina Amonio-Liasa en Extractos de Hojas de Quatro Variedades de Cafeto y en Otros Tejidos Vegetales. Tese de Graduação, Bogotá, Colômbia.

CARUSO, F.L. e KUČ, J., 1977. Protection of Watermelon and Muskmelon Against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 67:1285-1289.

CARVALHO, A., 1982. Pesquisas Sobre a Resistência do Cafeeiro à *Hemileia vastatrix* em São Paulo. Garcia de Orta, Sér. Est. Agron. Lisboa 9(1-2):129-136.

CARVALHO, A., MONACO, L.C. e FAZUOLI, L.C., 1977. Transferência de Fatores Genéticos de Resistência à *Hemileia vastatrix* para o Cultivar Mundo Novo. *Bragantia* 36(6):93-102.

CHALFOUN, S.M., CARVALHO, V.D., CARVALHO, J.G. e PAIVA, F.A., 1978. Teores de Ácido Clorogênico, N, P, e K em Folhas de Cafeeiros Suscetíveis e Resistentes a Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) *Fitopatol. Bras.* 3(1):79-80.

CHAVES, G.M., CRUZ FILHO, J. da, CARVALHO, M.G. de, MATSUOKA, K., COELHO, D.T. e SHIMOYA, C., 1970. A Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix*)- Revisão de Literatura com Observações e Comentários Sobre a Enfermidade no Brasil.

Seiva, Ed. Especial.

CHINAPPA, C.C. e SREENIVASAN, M.S., 1969. Some Observations on Leaf Rust Fall in Arabica Coffee. Indian Coffee 33(12):374.

CLARK, K.R.J., KUČ, J., HENZE, E. e QUACKENBUSH, F.W., 1959. The Nature and Fungitoxicity of an Amino Acid Addition Product of Chlorogenic Acid. Phytopathology 49:594-597.

CLINE, K. e ALBERSHEIN, P., 1978. Host-Pathogen Interactions XV. Fungal Glucans wich Elicit the Phytoalexin Accumulation in Soybean also Elicit the Accumulation of Phytoalexins in other Plants. Plant Physiol. 62:918-921.

CONN, E.E., 1964. Enzymology of Phenolic Biosynthesis. In: Biochemistry of Phenolic Compounds J.B. Harborne (ed) Academic Press, New York pp.399-435.

COOK, O.F., 1901. Shade in the Coffee Culture. U.S. Dept. Agric.-Division of Botany. Government Printing Office, Washington. Bulletin 25.

CORY, J.G., 1967. Evidence for a Role of Tyrosyl Residues in Cell Membrane Permeability. J. Biol. Chem. 242:218-221.

CORY, J.G., BIGELOW, C.C. e FRIENDEN, E., 1962. Oxidation of Insulin by Tyrosinase. Biochemistry 1:419-422.

- CRAMER, C.L., RYDER, T.B., BELL, J.N. e LAMB, C.J., 1985. Rapid Switching of Plant Gene Expression Induced by Fungal Elicitor. *Science* 227:1240-1243.
- CREASY, L.L., 1968a. The Increase in Phenylalanine Ammonia Lyase Activity in Strawberry Leaf Disks and its Correlation with Flavonoid Synthesis. *Phytochemistry* 441-446.
- CREASY, L.L., 1968b. The Significance of Carbohydrate Metabolism in Flavonoid Synthesis in Strawberry Leaf Disks. *Phytochemistry* 1743-1749.
- CREASY, L.L., 1976. Phenylalanine Ammonia-Lyase-Inactivating System in Sunflowers Leaves. *Phytochemistry* 15:673-675.
- CREASY, L.L. e ZUCKER, M., 1974. Phenylalanine Ammonia Lyase and Phenolic Metabolism. *Recent Advances Phytochem.* 8:1-19.
- CRUICKSHANK, I.A.M. e PERRIN, D.R., 1968. The Isolation and Partial Characterization of Monilicolin A a Polypeptide with Phaseolin-Inducing Activity from *Monilinia fructicola*. *Life* 7:449-458.
- DALY, J.M., 1976. Some Aspects of Host-Pathogen Interactions. In: *Physiological Plant Pathology* R. Heitefuss e P.H. Williams (eds) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp.26-50.

- DARVILL, A.G. e ALBERSHEIN, P., 1984. Phytoalexins and Their Elicitors. A Defense against Microbial Infection in Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:243-275.
- DAVIS, D., WAGGONER, P.E. e DIMOND, A.E., 1953. Conjugated Phenols in Fusarium Wilt Syndrome. Nature (Lond.) 172:959.
- DENNY, T.P. e VAN ETEN, H.D., 1983a. Tolerance of *Nectria haematococca* MPVI to the phytoalexin Pisatin in the Absence of Detoxification. J. Gen. Microbiol. 129:2893-2901.
- DENNY, T.P. e VAN ETEN, H.D., 1983b. Characterization of an Inducible Nondegradative Tolerance of *Nectria haematococca* MPVI to Phytoalexins. J. Gen. Microbiol. 129:2903-2913.
- DE VAY, J.E. e ADLER, H.E., 1976. Antigens Common to Host and Parasites. Ann. Rev. Microbiol. 30:147-168.
- DIAS, M.A.F.R., 1957. Aspectos Fisiológicos de Imunidade e Susceptibilidade do Cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. A Taxa Respiratória e a Resistência ao Fungo. Rev. Café Portugues 15:52-67.
- DIAS, R.M., AMORIM, H.V., ESKES, A.B. e CARVALHO, A., 1977. Resultados Preliminares sobre o Mecanismo de Resistência do Cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. V Congr. Bras. Pesq. Cafeeiras-Resumos pp.75-76.

- DIXON, R.A. e FULLER, K.W., 1976. Effects of Synthetic Auxin Levels on Phaseolin Production and Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) Activity in Tissue Cultures of *Phaseolus vulgaris* L.. *Physiol. Plant Pathol.* 9:299-312.
- DOUBLY, T.A., FLOR, H.H. e CLAGET, C.O., 1960. Relation of Antigens of *Melampsora lini* and *Linum usitatissimum* to Resistance and Susceptibility. *Science* 131:229.
- DRAETTA, I.S. e LIMA, D.C., 1976. Isolamento e Caracterização das Polifenoloxidasas do Café. *Coletânea Inst. Tecnol. Alimentos.* 7:13-28.
- DURST, F. e MOHR, H., 1966. Phytochrome-Mediated Induction of Enzyme Synthesis in Mustard Seedlings (*Sinapis alba*). *Naturwissenschaften* 53:531-532.
- EBEL, J., AYERS, A.R. e ALBERSHEIN, P., 1976. Host-Pathogen Interaction XII. Response of Suspension-Cultured Soybean Cells to Elicitor Isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, Fungal Pathogen of Soybean. *Plant Physiol.* 57:775-779.
- EDREVA, A., 1977. Comparative Biochemical Studies of an Infections Disease (Blue Mold) and a Physiological Disorder of Tobacco. *Physiol. Plant Pathol.* 11:149-161.

EGGER, K., 1969. Plant Phenol Derivatives. In Thin Layer Chromatography. E.S. Stahl (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp687-706.

ELLISTON, J., KUČ, J. e WILLIAMS, E.D., 1977. A Comparative Study of the Development of Compatible, Incompatible and Induced Incompatible Interactions between *Colletotrichum* spp. and *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology Z.* 87:289-303.

ENGELSMA, G., 1967. Photoinduction of Phenylalanine Deaminase in Gherkin Seedlings I. Effect of Blue Light. *Planta* 75: 207-219.

ENGELSMA, G., 1968a. The Influence of Light on Different Spectral Regions on the Synthesis of Phenolic Compounds in Gherkin Seedlings in Relation to Photomorphogenesis IV. Mechanism of Far-Red Action. *Acta Bot. Neerl.* 17:85-89.

ENGELSMA, G., 1968b. The Influence of Light of Different Spectral Regions on the Synthesis of Phenolic Compounds in Gherkin Seedlings, in Relation to Photomorphogenesis. V. The temperature Dependence. *Acta Bot. Neerl.* 17:499

ENGELSMA, G., 1970. Low Temperature Effects on Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Gherkin Seedlings. *Planta* (Berl.) 91:246.

ENGELSMA, G., 1974. On the Mechanism of the Changes in

Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity Induced by Ultraviolet and Blue Light in Gherkin Hypocotyls. Plant Physiol. 48:94.

ESKES, A.B., 1977. Uso de Discos de Folhas para Avaliar a Resistência do Cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. Efeito da Luminosidade e Concentração de Inóculo. V Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p85.

ESKES, A.B., 1980a. Bases Genéticas da Resistência Horizontal a Patógenos em Plantas. Ciênc. Cult. 32(11):1464-1472.

ESKES, A.B., 1980b. Ocorrência de um Isolado de Raça v3v5 de *Hemileia vastatrix* pouco virulento em condições de laboratório. VIII Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p81-82.

ESKES, A.B., 1982a. The Use of Leaf Discs Inoculations in Assessing Resistance to Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Neth. J. Plant Pathol. 88(4):127-141.

ESKES, A.B., 1982b. The Effect of Light Intensity on Incomplete Resistance of Coffee to *Hemileia vastatrix*. Neth. J. plant Pathol. 88:191-202.

ESKES, A.B., 1983. Qualitative and Quantitative Variation in Pathogenicity of Races of Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Detected in State of São Paulo, Brazil. Neth. J.

Plant Pathol. 89:1-15.

ESKES, A.B. e SOUZA, E.Z., 1981. Ataque de Ferrugem em Ramos Com e Sem Produção de Plantas do Cultivar Catuai. 9 Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p186.

ESKES, A.B. e TOMA-BRAGHINI, M., 1981. Assesment Methods for Resistance to Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). Plant Protection Bull. (F.A.O.)29:56-66.

ESKES, A.B. e TOMA-BRAGHINI, M., 1982. The Effect of Leaf Age on Incomplete Resistance of Coffee to *Hemileia vastatrix*. Neth. J. Plant Pathol. 88:219-230.

ESKES, A.B. , RIVERA, A. e COSTA, W.M. da, 1978. Efeito da Idade da Folha e Luminosidade no Campo sobre a Resistência do Cafeeiro a *Hemileia vastatrix* Medido em Discos de Folhas. 30 Reun. An. Soc. Prog. Ciênc.-resumos, p12.

ESKES, A.B., TOMA-BRAGHINI, M., KRDON, M. e Hoogstraten, J.G.J., 1979. Parâmetros para Medir o Grau de Suscetibilidade a *Hemileia vastatrix* em Cultivares e Populações de *Coffea arabica*. VII Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p70-71.

FEHRMANN, H. e DIMOND, A.E., 1967. Peroxidase Activity and Phytoelectro Resistance in Different Organs of the Potato Plant. Phytopathology 57:69-72.

FELIPPE, G.M., 1979. Fotomorfogênese. In Fisiologia Vegetal Vol. 2. M.G. Ferri (Ed), EPU, Ed. Univ. São Paulo. pp231-280.

FELIPPE, G.M., VALIO, I.F.M., PEREIRA, M.F.A., SHARIF, R.R. e VIEIRA, S.R., 1983. Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal. Ed. Campus, R.J., p66.

FERNANDEZ, A.R., 1981. Evaluation de la Resistencia a la Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) en Variedades del Banco de Germoplasma del Instituto Mexicano del Cafe. Tese de Mestrado, Univ. Chapingo, Mexico.

FIGUEIREDO, P., HIROCE, R. e OLIVEIRA, D.A., 1974. Observações Preliminares sobre a Omissão ou Excesso de Adubo Nitrogenado, Fosfatado e Potássico e Níveis de Infecção de Ferrugem em Cafeeiro Cultivado em Vaso. II Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p121.

FLOOD, A.E. e KIRKHAM, D.S., 1960. The Effect of some Phenolic Compounds on the Growth and Sporulation of Two *Venturia* Species. In J.B. Pridham (Ed) Phenolic in Plants in Health and Disease, Pergamon Press, New York, pp81-85.

FLOR, H.H., 1942. Inheritance of Pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-659.

FLOR, H.H., 1956. The Complementary Genetic System in Flax Rust.

FRIEND, J. e THORNTON, J.D., 1974. Caffeic Acid-O-Methyl Transferase, Phenolase and Peroxidase in Potato Tuber Tissue Inoculated with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 64:81:56-84.

FUMIKO ITO, M., SOAVE, J., PARADELA FILHO, O. e RIBEIRO, I.J.A., 1978. Efeitos do Substrato Água sobre a Germinação de Uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Summa Phytopathologica* 4:83-88.

GARCAFÉ, 1985. Estimativa de Custo de Produção de Lavoura Cafeeira, Safra 1984/85. Cooperativa dos Cafeicultores da Região de Garça. mimeograf. pp6.

GOLDSTEIN, J.L. e SWAIN, T., 1965. The Inhibition of Enzymes by Tannins. *Phytochemistry* 4:185-192.

GOMEZ, L. e JARAMILLO, A., 1974. Temperaturas em Árvores de Café al Sol. *Cenicafé* 25:61-62.

GOODMAN, R.N., 1967. Protection of Apple Stem against *Erwinia amylovora* Infection by Avirulent Strains and Three other Bacterial Species. *Phytopathology* 57:22.

GOODMAN, R.N., KYRALY, Z. e ZAITLIN, M., 1967. Phenol Metabolism. In *The Biochemistry and Physiology of Infectious*

- Plant Disease, D. Van Nostrand Company, Inc. pp187-231.
- GROSS, G.G., 1981. Phenolic Acids. In Biochemistry of Plants vol. 7, E.E. Conn and S. Stumpf (Eds), Academic Press, Inc., pp301-316.
- GUEDES, M.E.M., 1983. Formação de Fitalexinas em Interações Incompatíveis *Coffea arabica*-*Hemileia vastatrix*. In Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Centro de Investigações da Ferrugem do Cafeeiro, Oeiras, Portugal, pp204-216.
- GUEDES, M.E.M. e RODRIGUES JR, C.J., 1974. Disc Electrophoretic Patterns of Phenoloxidase from Leaves of Coffee Cultivars. Port. Acta Biol. Série A, 13(1/2):169-177.
- GYPTA, S.R. e SESHADRI, T.R., 1954. Survey of Anthoxanthins. Part VI. Colouring Matter of *Iamarix troupii*. Constitution of the Aglycone and its Synthesis. J. Chem. Soc. 3063.
- HADWIGER, L.A., 1966. The Biosynthesis of Pisatin. Phytochemistry 5:523-525.
- HADWIGER, L.A. e SCHWOCHAN, M.E., 1971. Ultraviolet Light-Induced Formation of Pisatin and Phenylalanine Ammonia-Lyase. Plant Physiol. 47:588-590.
- HAHN, M.G., DARVILL, A.G. e ALBERSHEIN, P., 1981. Host-Pathogen

Interaction IX. The Endogenous Elicitor, a Fragment of a Plant Cell Wall Polyssacharide that Elicits Phytoalexin Accumulation in Soybeans. *Plant Physiol.* 68:1161-1169.

HALLBROCK, K. e WELLMAN, E., 1970. Light-Induced Flavone Biosynthesis and Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase and UDP-Apiose Synthetase in Cells Suspension Cultures of *Petroselinum hortense*. *Planta* 94:236.

HAMIDI, A. e WANNER, H., 1964. The Distribution Pattern of Chlorogenic Acid and Caffeine in *Coffea arabica*. *Planta* 61:90-96.

HANSON, K. e HAVIR, H., 1972. Mechanism and Properties of Phenylalanine Ammonia-Lyase from Higher Plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 4:45.

HANSON, K.R. e HAVIR, H., 1981. Phenylalanine Ammonia-Lyase. In *The Biochemistry of Plants vol. 7, Secondary Plant Products*. E.E. Conn (Ed). Academic Press, pp627-665.

HARBORNE, J.B., 1959. The Chromatography of the Flavonoid Pigments. *J. Chromatogr.* 2(6):581-604.

HARBORNE, J.B., 1973. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. J.B.Harborne (Ed), Chapman And Hall, London, pp278.

HARDER, D.E., ROHRINGER, R., SAMBORSKI, D.J., RIMMER, D.J., KIM, S.R. e CHONG, W.K., 1979. Electron Microscopy of Susceptible and Resistant near Isogenic (sr6/Sr6) Lines of Wheat Infected by *Puccinia graminis tritici* II. Expression of Incompatibility in Mesophyll and Epidermal Cells and the Effect of Temperature on Host Parasite Interactions in these Cells. *Can. J. Bot.* 57:2617-2625.

HARGREAVES, J.A., 1979. Investigations into Mechanism of Mercuric Chloride Stimulated Phytoalexin Accumulation in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. *Physiol. Plant Path.* 15:279-287.

HATHWAY, D.E., 1959. Experiments on the Origin of Oak-Bark Tannin. *Biochem. J.* 71:533.

HAVIR, E.A. e HANSON, K.R., 1968. L-Phenylalanine Ammonia-Lyase I. Purification and Molecular Size of the Enzyme from Potato Tubers. *Biochemistry* 7(5):1896-1903.

HEALE, J.B. e SHARMAN, S., 1977. Induced Resistance to *Botrytis cinerea* in Root Slices and Tissue Cultures of Carrot (*Daucus carota* L.). *Physiol. Plant Pathol.* 10:51-61.

HEGNAUER, R., 1969. Chemical Evidence for the Classification of some Plant Taxa. In *Perspectives in Phytochemistry*, J.B. Harborne and T. Swain (Eds), Academic Press, London, New

York, pp121-138.

HESS, S.L. e HADWIGER, L.A., 1971. The Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Phaseollin by 9-Aminoacridine and other DNA-Intercalating Compounds. Plant Physiol. 48:197-202.

HILLIS, V.V.E. e HASEGAWA, M., 1963. The Formation of Polyphenols in Trees I. Administration of ¹⁴C Glucose and Subsequent Distribution of Radioactivity. Phytochemistry 2:195-199.

HOLLANDER, H. e AMRHEIN, N., 1981. The estimation of Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Intact Cells of Higher Plants Tissue. Planta (Berlin) 152:374.

HOOGSTRATEN, J.G.J., 1982. Effect of Soil Humidity on Resistance of *Coffea arabica* to Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). In Second Technical Report of International Programme on Horizontal Resistance, F.A.O.-I.A.C., mimeog.pp16.

HOOGSTRATEN, J.G.J., ESKES, A.B. e TOMA-BRAGHINI, T., 1982. Research on Incomplete resistance to Coffee Leaf Rust. X Colloque Assoc. Scient. Intern. du Cafe, pp517-521.

HOPPER, D.G.; VENERE, R.J.; BRINKERHOLF, L.A. e GHOLSON, R.K., 1975. Necrosis Induction in Cotton. Phytopathology 65:206-213.

HORMAN, I. e VIANI, R., 1973. The Caffeine Chlorogenate Complex of Coffee : An NMR Study. V Colloque Assoc. Scient. Intern. du Cafe, pp102-111.

HYODO, H. e YANG, S.F., 1971. Ethylene-Enhanced Synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Pea Seedlings. Plant Physiol. 47:765-770.

HYODO, H. e YANG, S.F., 1974. The Effect of Ethylene on the Development of Phenylalanine Ammonia-lyase in Potato Tubers Disks. Z. Pflanzenphysiol Bd. 71:76-79.

IMASEKI, H., UCHIYAMA, M. e Uritani, I., 1968. Effect of Ethylene on the Inductive Increase in Metabolic Activities in Sliced Sweet Potato Roots. Agric. Biol. Chem. 32:387.

IREDALE, S.E. e SMITH, H., 1973. Density Labelling Studies on the Photocontrol of Phenylalanine Ammonia-Lyase Levels in *Cucumis sativus*. Phytochemistry 12:2145-2154.

JOHNSON, L.B. , 1978. Induced Resistance to Fungal Diseases with Special Reference to Yellow Rust of Wheat. Ann. Appl. Biology 89(1):107-110. JOHNSON, R. e ALLEN, D.J., 1975. Induced Resistance to Rust Diseases and its Possible role in the Resistance of Multiline Varieties. Ann. Appl. Biology 80:359-364.

JOHNSON, L.B. e LEE, R.F., 1978. Peroxidase Changes in Wheat

Isolines with Compatible and Incompatible Leaf Rust Infections. *Physiol. Plant Pathol.* 13:173-181.

JOHNSON, C.B. e SMITH, H., 1978. Phytochrome Control of Aminoacids Synthesis in Cotyledons of *Sinapis alba*. *Phytochemistry* 17:667-670.

KAR, M. e MISHRA, D., 1976. Catalase, Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319.

KAUSS, H. e BOWLES, D.J., 1976. Some Properties of Carbohydrate-Binding Proteins (Lectins) Solubilized from Cell Wall of *Phaseolus vulgaris aureus*. *Planta* 130:169-174.

KEDAR, N., 1979. The Peroxidase Test as a Tool in the Selection of Potato Varieties Resistant to Late Blight. *Ann. Potato J.* 36:215-224.

KEEN, N.T., 1982. Mechanisms Confering Specific Recognition in Gene for Gene Plant Parasite Systems. In *Active Defense Mechanisms in Plants*, R.K.S. Wood (Ed), Plenum Press, New York, London, pp67-84.

KEEN, N.T. e LEGRAND, M., 1980. Surface Glycoproteins: Evidence that They May Function as the Race Specific Phytoalexin Elicitors of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*.

Physiol. Plant Pathol. 17:175-192.

KEEN, N.T., YOSHIKAWA, M. e WANG, M.C., 1983. Phytoalexin Elicitor Activity of Carbohydrates from *Erythrina megasperma* f. sp. *glycinea* and Others Sources. Plant Physiol. 71:466-471.

KENEDY, J.S. e MITTLER, T.E., 1953. A Method to Obtaining Phloem Sap via a Mouth Parts of Aphids. Nature (Lond.) 171:528.

KOSUGE, T., 1969. The Role of Phenolics in Host Response Infection. Ann. Rev. Phytopathol. 7:195-222.

KUC, J., 1966. Resistance of Plants to Infections Agents. Ann. Rev. Microbiol. 20:337-370.

KUC, J., 1972. Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol. 10:207-232.

KUC, J., 1982. Induced Imunity to Plant Disease. Bioscience 32(11):854-860.

KUC, J., 1985. Resistência Sistêmica Induzida para Moléstias de Plantas e Fitointerferons. São Eles Compatíveis? Fitopatol. Bras. 10(1):15-40.

KUC, J., SHOCKLEY, G. e KEARNEY, K., 1976. Protection of Cucumber Against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol. 7:195-199.

KUC, J. e RICHMOND, S., 1977. Aspects of the Protection of Cucumber Against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathol.* 67:533-536.

KUC, J., HENZE, R.E., ULLSTRUP, A.J. e QUACKENBUSH, F.W., 1956. Chlorogenic and Caffeic Acids as Fungistatic Agents Produced by Potatoes in Response to Inoculation with *Helminthosporium carbonum*. *J. Amer. Chem. Soc.* 78:3123-3125.

LAMB, C.J. e RUBERY, P.H., 1976. Photocontrol of Chlorogenic Acid Biosynthesis in Potato Tuber Discs. *Phytochemistry* 15:665-668.

LAZAROVITS, G. e HIGGINS, V.J., 1976. Ultrastructure of Susceptible, Resistant and Immune Reactions of Tomato to Races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.* 54:235-249.

LITTLEFIELD, L.J., 1969. Flax Rust Induced Resistance by Prior Inoculation with a Avirulent Race Of *Melampsora lini*. *Phytopathol.* 59:1323-1328.

LIENER, J.E., 1976. Phytohemagglutinins (Phytolectins). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:291-319.

LONGO, C.R.L., 1972. Estudos dos Pigmentos Flavonóides e sua Contribuição à Filogenia do Gênero *Coffea*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de

Queiroz, Universidade de São Paulo.

LOPES, C.R. e MONACO, L.C., 1977. Estudos de Quimiotaxonomia em Cultivares de *Coffea arabica* L.. Turrialba 27(1):55-61.

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, pp354.

MAGAN, N. e LACEY, J., 1984. Effect of Temperature and pH on Water Relations of Field and Storage Fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 82:1171-1181.

MARES, D.J., 1979. Microscopy Study of the Development of Yellow Rust (*Puccinia striiformis*) in a Wheat Cultivar Showing Adult Plant Resistance. Physiol. Plant Pathol. 15:289-296.

MARIA, A.C., MARTINS, E.M.F., MORAES, W.B.C. e STOCKER, G.G., 1985. Mudanças na Resistência de Folhas Destacadas de Cafeeiro pelo Tratamento com Calor e com Filtrado de Fermento. XII Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, pp38-39.

MARIOTTO, P.R., GERALDO JÚNIOR, C., da SILVEIRA, A.P., de ARRUDA, H.V., FIGUEIREDO, P. e BRAGA, J.B.R., 1974. Efeito da Produção sobre a Incidência da Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). II Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, pp144-145.

MARIOTTO, P.R., FIGUEIREDO, P., da SILVA, A.P., GERALDO JÚNIOR, C., de ARRUDA, H.V., LOPES, H., de OLIVEIRA, E.G., BUENO JÚNIOR, L.F.S. e de OLIVEIRA FILHO, N.L., 1979. Estudos sobre o Controle Químico da Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) e seus Efeitos na Produção, nas Condições do Estado de São Paulo. O Biológico 49(9/10):165-174.

MARSH, H.V., HAVIR, E.A. e HANSON, K.R., 1968. Biochemistry 7:1915-1918.

MARTINS, E.M.F., MORAES, W.B.C. e TIBURZY, R., 1983. Histological Studies of Compatible and Incompatible Interactions of *Coffea arabica* and *Hemileia vastatrix*. Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro-resumos, Oeiras, Portugal, p29.

MATTA, A. e ABBATTISTA, G.I., 1970. Differential Inhibition and Activation of Polyphenoloxidase Activity in *Eusarium*-Infected Tomato Plants. Phytopath. Mediter. 9:168.

MATTHEWS, D.E. e VAN ETEN, H.D., 1983. Detoxification of Phytoalexin Pisatin by a Fungal Cytochrome P-450. Arch. Biochem. Biophys. 224:494-505.

MAXEMIUC, V., 1977. Polissacaridasas de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. (Ferrugem do Café) e suas Interações com Folhas de

Cafeeiros Suscetível e Resistente do Parasito. Tese de Mestrado Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MAXEMIUC, V. e DIETRICH, S.M.C., 1973. Presence of Cellulolytic and Pectinolytic Activities in Spore Extracts from *Hemileia vastatrix* Berk et Br. (Coffee Rust). An. Acad. Bras. Ciênc. 45:315-319.

MAZZAFERA, P., CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C. e LEVY, F.A., 1984. Contagem do Número de Estomatos para Identificação do Efeito da Colchicina em Cafeeiros. XI Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, pp193-194.

MAYER, A.M. e HAREL, E., 1979. Polyphenoloxidases in Plants. Phytochemistry 18:193-215.

McCLURE, J., 1974. Action Spectra for Phenylalanine Ammonia-Lyase in *Hordeum vulgare*. Phytochemistry 13:1071-1073.

MEDEIROS, A.G., 1970. Informe sobre *Hemileia vastatrix* em Café, em Bahia, Brasil. Com. Exec. Pl. Recup. Rural Lav. Cacaueira, Rio de Janeiro.

MEDEIROS, E.F. e RODRIGUES JÚNIOR, C.J., 1978. Produção de Substâncias do Tipo Fitoalexinas em Folhas de *Coffea arabica* L. Inoculadas com Ferrugens não Patogênicas. Garcia de Orta, Série Est. Agron. 5(1/2):15-18.

MERCK INDEX, 1976. 9 Edição p703.

MINIMIKAWA, T. e URITANI, I., 1965. Phenylalanine Ammonia-Lyase in Sliced Sweet Potato Roots. J. Biochem. 57:678-688.

MOESTA, P. e GRISEBACH, H., 1980. Effects of Biotics and Abiotics Elicitors on a Phytoalexin Metabolism in Soybean. Nature (Lond.) 286:710-711.

MOESTA, P. e GRISEBACH, H., 1981. Investigation on the Mechanism of Phytoalexin Accumulation in Soybean Induced by Glucan or Mercuric Chloride. Arch. Biochem. Biophys. 211:39-43.

MONACO, L.C., 1977. Consequences of the Introduction of Coffee Leaf Rust into Brazil. Ann. N. Y. Acad. Sci. 287:57-71.

MONACO, L.C. e CARVALHO, A., 1975. Resistência à Hemileia vastatrix no melhoramento do Cafeeiro. Ciênc. Cult. (São Paulo) 27(10):1070-1081.

MONACO, L.C., RIBEIRO, I.J.A., TISSELI FILHO, O., SUGIMORI, M.H. e SCALI, M.H., 1973. Efeito da Temperatura na Esporulação da Ferrugem. I Congr. Bras. Pragas e Doenças do Cafeeiro-resumos, p36.

MONTOYA, R.H. e CHAVES, G.M., 1974. Influência da Temperatura e da Luz na Germinação, Infectividade e período de Geração de

Hemileia vastatrix. II Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, pp104-105.

MORAES, S.A., 1974. Estudo Preliminar do Desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* sobre Cafeeiros com Sintomas de Deficiência de Ferro. II Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p135.

MORAES, W.B.C., 1981. Relatório de Atividades da SEção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, mimeogr.

MORAES, W.B.C., MARTINS, E.M.F. e BERETTA, J.G., 1981. Studies on Induced Protection on Coffee Plants to *Hemileia vastatrix*. III. Chemical Analysis of the Inducer. Colloque International sur la Protection de Cultures Tropicales, p.58

MORAES, W.B.C., MARTINS, E.M.F., MUSUMECI, M.R. e BERETTA, M.J.G., 1976. Induced Protection to *Hemileia vastatrix* in Coffee Plants. Summa Phytopathol. 2:39-43.

MUSUMECI, M.R., MORAES, W.B.C. e STAPLES, R.C., 1973. Evidência de um Autoinibidor de Germinação nos Uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk et Br.. O Biológico 39(7):171-173.

MUSUMECI, M.R., MORAES, W.B.C. e STAPLES, R.C., 1974. A Self-Inhibitor in Uredospores of Coffee Rust Fungus. Phytopathology 64:71-73.

NACCACHE, V.M., 1983. Alterações Bioquímicas em Folhas de *Coffea arabica* Resistentes e Suscetíveis à Infecção por *Hemileia vastatrix* (Ferrugem do Café). Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, Depto Bioquímica.

NACCACHE, V.M. e DIETRICH, S.M.C., 1981. Cell Wall Composition of Spores of *Hemileia vastatrix* (Coffee Rust). Rev. Microbiol. 12(2):61-64.

NEISH, A.C., 1964. Major Pathways of Biosynthesis of Phenols. In Biochemistry of Phenolic Compounds, J.B. Harborne (Ed), Academic Press, New York, pp295-359.

NELSON, R.R., 1978. Genetics of Horizontal Resistance to Plant Disease. Ann Rev. Phytopathol. 16:359-378.

NORONHA-WAGNER, M. e BETTENCOURT, A.J., 1967. Genetic Study of the Resistance to Leaf Rust I. Identification and Behavior of Four Factors Conditioning Disease Reaction in *Coffea arabica* L. to 12 Physiologic Races of *Hemileia vastatrix* Berk et Br.. Can. J. Bot. 45:2021-2031.

NUTMAN, F.J. e ROBERTS, F.M., 1963. Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46:27-48.

NUTMAN, F.J., ROBERTS, F.M. e BOCK, K.R., 1960. Method of

- Uredospore Dispersal of the Coffee Leaf Rust Fungus *Hemileia vastatrix*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 43(3):509-515.
- OKU, H., SHIRAISHI, T. e OUCHI, S., 1975. The Role of Phytoalexins as the Inhibitor of Infection Establishment in Plant Disease. Naturwissenschaften 10:486.
- OKU, H., SIRAISHI, T., OUCHI, S., ISHIURA, M. e MATSUEDA, R., 1980. A New Determinant of Pathogenicity in Plant Disease. Naturwissenschaften 67:310-311.
- OLIVEIRA, B. de e RODRIGUES JÚNIOR, C.J., 1961. O Problema das Ferrugens do Cafeeiro. Rev. Café Portugues 8(29):5-50.
- ORTOLANI, A.A., ALFONSI, R.R., PINTO, H.S., PEREIRA, A.R. e PARRA, J.R.P., 1974. II Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras- resumos, p132.
- PARTRIDGE, J.E. e KEEN, N.T., 1977. Soybean Phytoalexins: Rates of Synthesis are not Regulated by Activation of Initial Enzymes in Flavonoid Biosynthesis. Phytopathology 67:50-55.
- PARLEVLIET, J.E., 1981. Disease Resistance in Plants and its Consequence for Plant Breeding. In Plant Breeding II, K.J. Fry (Ed), The Iowa State Univ. Press, Ames, pp309-364.
- PASCHOLATI, S.F., 1980. Aspectos Fisiológicos do Fungo *Mycosebaerella melonis* (Pass) Chiu e Walker e Estudos

- sobre a Indução de Resistência em Plantas de Melão (*Cucumis melo* L.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- PAXTON, J.D., 1981. Phytoalexins-A Working Redefinition. *Phytopathol. Z.* 101:106-109.
- PAYNE, R.C. e FAIRBROTHERS, D.E., 1976. Disc Electrophoretic Evidence for Heterozygosity and Phenotypic Plasticity in Selected Lines of *Coffea arabica* L. *Bot. Gaz.* 137(1):1-6.
- PEGG, O.F. e SEQUEIRA, L., 1968. Stimulation of Aromatic Biosynthesis in Tobacco Plants Infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 58:476.
- PERSON, C.O. e MAYO, G.M.E., 1974. Genetic Limitations on Models of Specific Interaction between a Host and its Parasite. *Can. J. Bot.* 52:1339-1347.
- PETER, B.M., CRIBBS, D.H. e STELZIG, D.A., 1978. Agglutination of Plant Protoplasts by Fungal Cell Wall Glucans. *Science* 201:364-365.
- PIERPOINT, W.S., 1969. O-Quinones Formed in Plant Extracts. Their Reactions with Aminoacids and Peptides. *Biochem. J.* 112:609-616.

- PITT, D., 1975. Changes in the Subcellular Location of Catalase and O-diphenoloxidase during Infection of Potato Tubers by *Phytophthora erythroseptica*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 65:91.
- POLITIS, D.J., 1976. Ultrastructure of Penetration by *Colletotrichum graminicola* of Highly Resistant Oat Leaves. Physiol. Plant Pathol. 8:117-122.
- POLLOCK, C. e DRYSDALE, R.B., 1976. The Role of Phenolic Compounds in the Resistance of Tomato Cultivars to *Verticillium albo-atrum*. Phytopathol. Z. 86:56.
- PRIDHAM, J.B., 1965. Low Molecular Weight Phenols in Higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 16:13-36.
- RAUTELA, G.S. e PAYNE, M.G., 1970. The Relationship of Peroxidase and O-diphenoloxidase to Resistance of Sugarbeets to *Cercospora* Leaf Spot. Phytopathology 60:238-245.
- RHODES, M.J.C. e WOOLTORTON, L.S.C., 1971. The Effect of Ethylene on the Respiration and Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Swede and Parsnip Root Tissue. Phytochemistry 10:1989-1997.
- RIBEIRO, I.J.A., SUGIMORI, M.H., MORAES, S.A. e MONACO, L.C., 1975. Raças Fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. no Estado de São Paulo. Summa Phytopathol. 1:19-22.

RIBEIRO, I.J.A., MONACO, L.C., TISSELI FILHO, O. e SUGIMORI, M.H., 1978. Efeito de Alta Temperatura no Desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em Cafeeiro Suscetível. *Bragantia* 37(2):11-16.

RIBEREAU-GAYON, P., 1972. *Plant Phenolics*. Oliver and Boyd, Edinburg, pp254.

RIDE, J.P., 1980. The Effect of Induced Lignification on the Resistance of Wheat Cell Walls to Fungal Degradations. *Physiol. Plant Pathol.* 16:187-196.

RIJO, L., 1972 Histopathology of the Hypersensitive Reaction (Tumefaction) Induced on *Coffea* spp by *Hemileia vastatrix*. *Agronomia Lusitana* 23:427-431.

RIJO, L. e RODRIGUES JÚNIOR, C.J., 1978. Processo de Infecção de *Hemileia vastatrix* Berk et Br. em Cultivares Suscetíveis e Resistentes de *Coffea arabica* L.. *Garcia de Orta, Série Est. Agron.* 5(12)23-24.

RIJO, L. e SARGENT, J.A., 1974. The Fine Structure of the Coffee Leaf Rust *Hemileia vastatrix*. *Can. J. Bot.* 52:1363-1367.

RIJO, L. e VASCONCELOS, M.I., 1983. Formação de Calose e Lignina em Combinações Incompatíveis de *Coffea* spp e *Hemileia vastatrix*. In *Simpósio sobre as Ferrugens do Cafeeiro*,

Oeiras, Portugal, pp269-281.

- RIJO, L., RODRIGUES JÚNIOR, C.J. e VASCONCELOS, M.I., 1982. Immunity of Coffee Orange Rust Association. Histopathological Aspects. Garcia de Orta, Série Est. Agron. 9(1/2):101-103.
- RIOV, J., MONSELISE, S.P. e KAHAN, R.S., 1969. Ethylene Controlled Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Citrus Fruit Cell. Plant Physiol. 44:631-635.
- ROBERTS, E.A.H., 1960. Effect of Glycosilation on the Enzymic Oxidation and Translocation of the Flavonoids. Nature (Lond.) 185:536-537
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., 1980. Mecanismos de Resistência de Plantas aos Agentes Patogênicos. Junta de Investigações Científicas do Ultramar, CIFIC, Oeiras, Portugal, pp67.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., 1984. Coffee Rust Races and Resistance. In Symposium Coffee Rust in the Americas vol.2, Oeiras, Portugal, pp41-58.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., BETTENCOURT, A.J. e RIJO, L., 1975a. Race of Pathogens and Resistance to Coffee Leaf Rust. Ann. Rev. Phytopathol. 13:49-70.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., MEDEIROS, E.F. e LEWIS, B.G., 1975b. Relationship between a Phytoalexin-like Response in Coffee Leaves (*Coffea arabica*) and Compatibility with *Hemileia*

- vastatrix* Berk et Br.. *Physiol. Plant Pathol.* 6:35-41.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., RIJO, L. e MEDEIROS, E.F., 1982.
Induction of Flecks and Tumefactions on Coffee Leaves by Incompatible and Compatible, Viable and non Viable Uredospores of *Hemileia vastatrix* and other Rusts, and by their Leachates. *Garcia de Orta, Série Est. Agron.* 9(1/2):105-110.
- RODRIGUES JÚNIOR, C.J., RIJO, L., LEAL, A. e MEDEIROS, E., 1983.
Lignification of the Stomatic Cells Walls of Coffee Leaves Induced by Comercial Chitin and by Chitin Extracted from *Hemileia vastatrix* Uredospores. In *Symposium CoffeeRust in the Americas vol.2* , Deiras, Portugal, pp285-294.
- ROEBER, K.C., 1976. Role of Phenoloxidasases in Rot Resistance of Potato Tubers to *Pectobacterium caratovorum* var. *atrosepticum* (Van Hall Dowson). *Chem. Abstr.* 85,156656J.
- ROGER, L., 1951. *Phytopathologie des Pays Chauds.* In *Les Cafeiers dans le Globe*, P. Chevalier (Ed) Vol.1 Paris, pp838-855.
- ROHRINGER, R. e SAMBORSKI, D.J., 1967. Aromatic Compounds in the Host Parasite Interaction. *Ann. Rev. Phytopathol.* 5:77-86.
- ROSSAL, S., MANSFIELD, J.W. e HUTSON, R.A., 1980. Death of

- Botrytis cinerea* and *B. fabae* Following Exposure to Wgerone Derivatives in vitro and during Infection Development in Broad Bean Leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 16:135-146.
- ROUX, D.G. e MAIHS, A.E., 1960. Selective Spray Reagent for Identification and Stimation of Flavonoid Compounds Associated with Condensed Tannins. *J. Chromatogr.* 4:65-74.
- ROVERATI, D.S., GUZZO, S.D. e MORAES, W.B.C., 1985. Emprego de Controle Alternativo da Ferrugem do Cafeeiro Através da Indução de Resistência. XII Congr. Bras. Pesquisas Cafeeiras-resumos, p39.
- SACCAS, A.M. e CHARPENTIER, J., 1971. La Rouille des Cafeiers due à *Hemileia vastatrix*. Institut Français du Café et Du Cacao. Bulletin 10.
- SATO, N., KITAZAWA, K. e TOMIYAMA, K., 1971. The Role of Rishitin in Localizing the Invade Hyphae of *Phytophthora infestans* in Infection Sites at the Cut Surfaces of Potato Tubers. *Physiol. Plant Pathol.* 1:289-295.
- SAUNDERS, J.A. e McCCLURE, J.W., 1975. Phytochrome Controlled Phenylalanine Ammonia-Lyase in *Hordeum vulgare* Plastids. *Phytochemistry* 14:1285-1289.
- SCALI, M.H., MONACO, L.C. e CARVALHO, A., 1973. Novo Gene para Resistência Isolado de *Coffea canephora*. I Congr. Bras.

- Pragas e Moléstias do Cafeeiro, pp28.
- SHIEBER, E., 1972. Economic Impact of Coffee Rust in Latin America. *Phytopathology* 10:491-510.
- SCHIEBER, E. e ZENTMYER, G.A., 1984. Distribution and Spread of Coffee Rust in Latin America. In *Symposium Coffee Rust in the Americas* vol.2.
- SCHOPFER, P. e MOHR, H, 1972. Phytochrome Mediated Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Mustard Seedlings. *Plant Physiol.* 49:8-10.
- SEEVERS, P.M. e DALY, J.M., 1970. Studies on Wheat Stem Rust Resistance Controlled at the Sr6 Locus II. Peroxidase Activities. *Phytopathology* 60:1642-1647.
- SEIKEL, M.K., 1962. Chromatography Methods of Separation, Isolation and Identification of Flavonoid Compounds. In *Chemistry of Flavonoid Compounds*, T.A. Geissman (Ed), The MacMillan Company, New York, pp34-69.
- SEQUEIRA, L., 1978. Lectins and their Role in Host Pathogen Specificity. *Ann. Rev. Phytopathol.* 16:453-481.
- SEQUEIRA, L., 1983. Mechanisms of Induced Resistance in Plants. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:51-79.

SHARON, N., 1977. Lectins. Sci. Amer. 236(6):109-119.

SHAW, M., 1967. Cell Biological Aspects of Host-Pathogen Relations of Obligate Fungal Parasites. Can. J. Bot. 45:1205-1219.

SIEVERS, S., 1980. Internal Report LIQC. Project Biochemistry LIQC-GTZ. mimeogr. pp33.

SIEVERS, S., 1983. Obtenção do Lavado do Líquido Intercelular (IWF) de Folhas de Cafeeiro para o Estudo do Mecanismo de Resistência à *Hemileia vastatrix*. In Simpósio sobre as Ferrugens do Cafeeiro-resumos, Oeiras, Portugal, pp217-235.

SIEVERS, S., ABLANQUE, E., BAUTISTA, E., CHAPARRO, F., GUTIERREZ, J., HAVERKAMP, J., MORENO, E., de Peña, M., POSADA, E., ROJAS, M.A.L., SPETTEL, D., ZAMUDIO, V. e QUIJANO-RICO, M., 1980. Relationship between Genetics and Chemistry in the System *Coffea* spp/*Hemileia vastatrix*. IX Colloque Ass. Scient. Int. du Café (ASIC), pp671-680.

SIMONS, M.D., 1972. Polygenic Resistance to Plant Disease and its use in Breeding Resistant Cultivars. J. Environ. Qual. 1:232-239.

STAFFORD, H.A., 1964. Comparison of Liginin-Like Products Found Naturally or Induced in Tissues of *Phleum*, *Elodea* and *Coleus*, and in a Paper Peroxidase System. Plant Physiol.

39:350-360.

STAHMAN, M.A., MUSUMECI, M.R. e MORAES, W.B.C., 1976.
Germination of Coffee Rust and their Inhibition by Cinnamic
Acid Derivatives. *Phytopathology* 66:765-769.

STEKOLL, M. e WEST, C.A., 1978. Purification and Properties of
an Elicitor of Castor Bean Phytoalexin from Culture
Filtrates of the Fungus *Rhizopus stolonii*. *Plant Physiol.*
61:38-45.

STROBEL, G., 1982. Phytotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* 51:309-333.

SWAIN, T., 1965. Analytical Methods for Flavonoids. In
Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. T.W. Goodwin (
Ed), Academic Press, London, New York, pp533-549.

SWAIN, T. e HILLIS, W.E., 1959. The Phenolic Constituents of
Prunus domestica L. The Quantitative Analysis of Phenolic
Constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.

SYLVAIN, P.G., 1955. Some Observations on *Coffea arabica* L. in
Ethiopia. *Turrialba* 5:37-53.

TIETJEN, K.G. e MATERN, U., 1983a. Differential Response of
Cultured Parsley Cells to Elicitors from Two non Pathogenic
Strains of Fungi II. Effects on Enzyme Activities.

- TIETJEN, K.G., HUNKLER, D.H. e MATERN, U., 1983b. Differential Responses of Cultured Parsley Cells to Elicitors from Two non Pathogenic Strains of Fungi I. Identification of Induced Products as Coumarin Derivatives. *Eur. J. Biochem.* 131:401-407.
- TODD, G.W., 1972. Water Deficits and Enzymatic Activity. In *Water Deficits and Plant Growth vol. III.* T.T. Kozlowski (Ed), Academic Press, New York, S. Francisco, Londres, pp177-216.
- TOMASIELLO, R.A., 1984. Simpósio sobre Ferrugem do Cafeeiro. Congr. Pta de Fitopatologia, Botucatu, resumos.
- TONG, W.F. e SCHOPFER, P., 1978. Absence of Pfr Destruction in the Modulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase Synthesis of Mustard Cotyledons. *Plant Physiol.* 61:59-61.
- TOUZE, A. e ESQUERRE-TUGAYE, 1982. Defence Mechanisms of Plants Against Varietal non Specific Pathogens. In *Active Defense Mechanisms in Plants*, R.K.S. Wood (Ed), London, pp103-117.
- UMAERUS, V., 1959. The Relationship between Peroxidase Activity in Potato Leaves and Resistance to *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 36:124-131.
- UMAERUS, V. e DINHELL, D., 1976. A Laboratory Method for Measuring the Degree of Attack by *Phytophthora infestans*.

Potato Res. 19:91-107.

VANCE, C.P. e SHERWOOD, R.T., 1977. Lignified Papilla Formation as a Mechanism for Protection in Reed Canarygrass. *Physiol. Plant Pathol.* 10:247-256.

VANCE, C.P.; ANDERSON, J.O. e SHERWOOD, R.T., 1976. Soluble and Cell Wall Peroxidases in Reed Canarygrass in Relation to Disease Resistance and Localized Lignin Formation. *Plant Physiol.* 57:920-922.

VANDERPLANCK, J.E., 1963. *Plant Diseases Epidemic and Control.* Academic Press Inc., New York, London, pp349.

VANDERPLANCK, J.E., 1968. *Disease Resistance in Plants.* Academic Press Inc., New York, pp206.

VANDERPLANCK, J.E., 1978. *Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp167.

VERLEUR, J.D., 1968. Regulation of Carbohydrate and Respiratory Metabolism in Fungal Diseased Plants. In *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury*, T. Hirai (Ed.), Kyoritsu Printing Co, LTD, Tokyo, pp351.

WALTON, D.C. e SONDEHEIMER, E., 1968. Effects of Abscisin II on

Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Excised Bean Axes.
Plant Physiol. 43:467-469.

WARD, M., 1982. On the Morphology of *Hemileia vastatrix* Berk et
Br.. J. Microsc. Sci. 22:1-11.

WEAVER, M.L., HANTALA, E. e HEEVE, R.M., 1970. Distribution of
Oxidase Enzymes in Potato Tubers Relative to Blackspot
Susceptible. Am. Potato J. 47:479.

WEIDNER, M., RISSLAND, I. e MOHR, H., 1965. Photoinduction of
Phenylalanine Ammonia-Lyase in Mustard Seedlings:
Involvement of Phytochrome. Naturwissenschaften 55:452.

WELLMAN, E. e SCHOPFER, P., 1975. Phytochrome Mediated "de novo"
Synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Cell Suspension
Culture of Parsley. Plant Physiol. 55:822-827.

WIT De, P.J.G.M. e KODDE, E., 1981. Further Characterization and
Cultivar Specificity of Glycoprotein Elicitors from Culture
Filtrates and Cells Walls of *Cladosporium fulvum* (syn.
Fulvea fulva). Physiol. Plant Pathol. 18:297-314.

YAMAMOTO, H., HOKIN, H. e TANI, T., 1978. Peroxidase and
Polyphenoloxidase in Relation to the Crown Rust Resistance
of Oat Leaves. Phytopathol. Z. 91:191-202.

YOSHIKAWA, M., MATAMA. M. e MASAGO, H., 1981. Rwlease of a

Soluble Phytoalexin Elicitor from Micelial Walls of
Phytophthora megasperma var. *sojae* by Soybean Tissues. Plant
Physiol. 67:1032-1035.

ZUCKER, M., 1965. Induction of Phenylalanine Deaminase by Light
and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato
Tuber Tissue. Plant Physiol. 40(5):779-784.

ZUCKER, M., 1969. Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase in
Xanthium Leaf Discs. Photosynthetic Requirement and Effect
of Daylength. Plant Physiol. 44:912-922.

ZUCKER, M., 1970. Rate of Phenylalanine Ammonia-Lyase Synthesis
in Darkness. Biochem. Biophys. Acta 208:331.

ZUCKER, M., 1971. Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase in
Xanthium Leaf Discs. Plant Physiol. 47:442-446.

ZUCKER, M., 1972. Light and Enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol.
23:133.

ZUCKER, M., HANSON, K. e SONDEHEIMER, E., 1967. The Regulation of
Phenolic Biosynthesis and the Metabolic Role of Phenolic
Compounds in Plants. In Phenolic Compounds and Metabolic
Regulation, B. Finkle and V. Runeckles (Eds), Appleton,
New York, pp68-93.