

10983

EMBRAPA-CPAA

Biblioteca

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DO INSTITUTO DE BOTÂNICA  
DA UNIVERSIDADE DE HAMBURG-ALEMANHA OCIDENTAL

LUADIR GASPAROTTO

Relatorio de estagio do ...  
1990 RT-FOL4818



CPAA-10983-1

Maio a Julho/1990

FOL  
4818



## 1 - INTRODUÇÃO

Desde 1980, a equipe do prof. Dr. Reinhard Lieberei (até o primeiro semestre de 1989 trabalhando no Instituto de Botânica da Universidade de Braunschweig e atualmente na da Universidade de Hamburg) em conjunto com a área de Fitopatologia do antigo CNPSD, hoje CPAA, vêm estudando, principalmente, a função do cianeto e cianogênese na interação seringueira - *Microcyclus ulei*. Dentro deste programa tem-se identificado e estudado os precursores cianogênicos, os enzimas e os processos envolvidos na liberação e na inibição de liberação do HCN e a presença de substâncias fungitóxicas nas folhas de seringueira. O objetivo principal deste programa é obter um método que, através do teor de HCN, possibilite uma seleção rápida de plantas de seringueira resistentes ao mal-das-folhas, como suporte ao programa de melhoramento genético da *Hevea*.

Os resultados dos trabalhos de resistência desenvolvidos no CPAA e os estudos fisiológicos da interação seringueira - *M. ulei* efetuados na Alemanha sempre enfrentam o problema da falta de dados concretos sobre a origem genética de muitos clones, principalmente os clones nativos e primários. Considerando-se esse problema, planejou-se este estágio com o objetivo de tentar, através da análise de isoenzimas com auxílio da eletroforese, esclarecer pelo menos a relação genética entre as espécies, clones diplóides e poliplóides, híbridos inter e intra-específicos, clones nativos e primários de origem desconhecida e plantas obtidas através de polinização controlada do cruzamento IAN 6158 x Fx 985. Entretanto, como o tempo disponível era insuficiente para desenvolver a metodologia a ser usada para cada isoenzima; para preparar as 204 amostras de folhas liofilizadas dos 61 clones e espécies coletados em Manaus e fazer a eletroforese para os diferentes isoenzimas, optou-se por realizar um treinamento nesta técnica e deixar parte dos trabalhos anteriormente citados para serem executados pela laboratorista Sabine Uhlenhant e a estudante de biologia Katja Koch. Assim, modificou-se o objetivo da viagem, fazendo-se um treinamento nas seguintes áreas: eletroforese, micorriza, extração e quantificação de fitoalexinas e de HCN. Além disso, efetuaram-se discussões do programa em andamento e prepararam-se novos programas a serem submetidos

aos órgãos financiadores.



## 2 - ELETROFORESE

### 2.1 - Soluções para preparo do gel

#### 2.1.1 - Soluções do gel separador

- a) Tampão: 18,15g TRIS  
0,115ml TMED  
+ ~ 11ml HCl 1N para ajustar o pH  
8,9  
Completar o volume de 50ml com  
água destilada.
- c) 14g acrimilada + 0,368g BIS - completar o  
volume de 50ml com água destilada.
- h) 0,14g de peroxidissulfato de amônio +  
100ml de água destilada.

#### 2.1.2 - Soluções do gel coletor

- b) Tampão: 2,99g TRIS  
0,23ml TMED  
~ 24ml HCl 1N para ajustar o pH  
6,7  
Completar o volume de 50ml com  
água destilada.
- d) 5g acrimilada + 1,25g BIS - completar o  
volume de 50ml com água destilada.
- e) 4mg de riboflavina + 100ml de água desti-  
lada
- f) 20g de sacarose + 50ml de água destilada

#### Observações:

- Preparar as soluções e e h na hora de usá-las e as demais podem ser mantidas até 14 dias a 4°C.
- Usar luvas durante o preparo das soluções e dos géis.



### 2.1.3 - Preparo dos géis

No preparo dos géis as soluções são misturadas na temperatura ambiente.

|  | Gel separador<br>pH 8,9                                | Gel coletor<br>pH 6,7                        |
|--|--|--|
|  | ml      solução  | ml      solução                              |
| Eletroforese de disco ou de placa pequena. | 2..... a<br>4..... c<br>2..... água dest.<br>8..... h  | 1..... b<br>2..... d<br>1..... e<br>4..... f |
| Eletroforese de placa grande               | 4..... a<br>8..... c<br>4..... água dest.<br>16..... h | 2..... b<br>4..... d<br>2..... e<br>8..... f |
| Polimerização                              | 30 minutos   | 45 min. sob UV                               |

### 2.1.4 - Solução tampão para corrida

**Solução estoque:** 14,4g de glicine  
3,0g de TRIS  
500ml de água destilada  
pH 8,0

**Solução a ser usada:** 1 parte da solução estoque + 9 partes de água destilada.

## 2.2 - Eletroforese de disco

### 2.2.1 - Preparo do gel

- Marcar os tubos na altura de 5,3 e 5,5cm, vedar o fundo com parafilme e colocá-los sobre a borracha e no suporte;

- Após a mistura das soluções do gel separador, colocá-los num kitasato, conectado a uma corrente de água. Manter na corrente de água durante 2 minutos, sob agitação constante;

- Colocar nos tubos a solução do gel separador até atingir a primeira marca (usar pipeta de bico bem fino - tipo conta-gotas);



- Colocar sobre a solução do gel separador uma solução de iso-propanol 10% (tornar a linha de polimerização reta). Não misturar o isopropanol com a solução do gel;

- Após a polimerização, eliminar o isopropanol e colocar a solução do gel coletor até atingir a segunda marca (no preparo da solução do gel coletor, esta também deverá ser submetida a corrente de água);

- Colocar novamente a solução de iso-propanol 10%;

- Colocar o resto da solução do gel coletor e o suporte com os tubos em frente a luz UV.;

- Após a polimerização, eliminar o isopropanol.

#### 2.2.2 - Corrida das amostras

- Colocar os tubos contendo o gel no suporte, identificando-os;

- Colocar a solução tampão (item 2.1.4) na parte superior e inferior do suporte, de tal forma que as extremidades dos géis fiquem submersas;

- Colocar em cada tubo 50 $\mu$ l da amostra (deve-se testar qual a quantidade que dá melhor visualização das bandas);

- Corrida: **Primeiros 15 min.:** 16 mA - 260V

Depois : 32 mA - 260V

A eletroforese é conduzida até a zona frontal (azul-de-bromofenol), indicadora do movimento das moléculas, atingir a extremidade final do gel;

- Após a corrida, com auxílio de uma seringa retirar os géis, colocá-los em tubos de ensaio e submetê-los aos testes específicos dos isoenzimas em estudo.



## 2.3 - Eletroforese de placa pequena

### 2.3.1 - Preparo do gel

- Vedar o fundo da placa com agar-água 2%;
- Misturar as soluções do gel separador (submetê-lo à corrente de água);
- Colocar a solução entre as placas até a altura que atinge a extremidade do pente e, imediatamente, o iso-propanol 10%;
- Após a polimerização, retirar o iso-propanol com auxílio de um papel e colocar a solução do gel coletor até a altura dos orifícios da placa;
- Preparar o gel em frente da luz;
- Colocar o pente (eliminar as bolhas nas extremidades dos dentes do pente) e aguardar a polimerização.

### 2.3.2 - Corrida das amostras

- Colocar a placa com o gel no suporte (cuba);
- Encher o fundo do suporte com o tampão (item 2.1.4);
- Após eliminar o ágar do fundo da placa, encher este com tampão e verter rapidamente (não pode haver presença de bolhas de ar);
- Encher a parte superior do suporte com tampão;
- Remover o pente, apenas quando ambas extremidades do gel estiverem submersas;
- Colocar em cada orifício 10  $\mu$ l da amostra a ser testada;
- Corrida: Primeiros 15 minutos: 5 mA - 200V  
Depois : 10 mA - 200V  
Esperar até a linha frontal (azul-de-bromefenol) atingir a extremidade final do gel;
- Após a corrida, remover o gel, colocá-lo em placa e submetê-lo aos testes específicos das isoenzimas em estudo



## 2.4 - Material selecionado para eletroforese

### 2.4.1 - Espécies

*Hevea viridis*

*H. guianensis*

*H. guianensis* var. *marginata*

*H. camaragoana*

*H. camporum*

*H. spruceana*

CNSAM 7623 - clone nativo e primário

*H. rigidifolia*

*H. pauciflora*

P10 - clone nativo e primário

PA31 - clone nativo e primário

*H. benthamiana*

F4542 - clone nativo e primário

F4512 - clone nativo e primário

*H. brasiliensis*

GT1 - clone primário

PB86 - clone primário

PFB5 - clone primário

RRIM600 - PB86 x Tjir1

Fx25 - F351 x AVROS49

Fx4098 - PB86 x FB74

Fx3864 - PB86 x FB38

Fx3844 - AVROS183 x FB45

Fx2261 - F1619 x AVROS183

LCB510 - GA55 x PR107

IAN710 - PB86 x F409

2.4.2 - Clones diplóides e respectivos poliplóides

IAN873 - PB86 x F1717

IAN222

IAN6158 - Fx43-665/Fx213 (F4542 x AVROS183)x  
AVROS183/x PB86

IAN6158P

Fx3925 - F4542 x AVROS363

Fx3925p

IAN6323 - Tjir1 x Fx3810

IAN6323P

Fx985 - F315 x AVROS183

Fx985P

MDF180 - clone nativo e primário (H.  
*brasilensis*)

MDF180P

CNSAM7704 - clone nativo e primário

CNSAM7704P

CNSAM7665 - clone nativo e primário

CNSAM7665P

2.4.3 - Híbridos inter-específicos

IAN717 - PB86 x F4542

Fx3899 - F4542 x AVROS363

Fx2804 - F4542 x Tjir1

IAN2909 - Fx516 x PB86

IAN3193 - Fx516 x PB86

IAN2880 - Fx516 (F4542 x AVROS363) x PB86

Fx3810 - F4542 x AVROS363

IAN2878 - Fx516 x PB86

Fx3703 - F4542 x Tjir1

IAN3087 - Fx516 (F4542 x AVROS363) x PB86

IAN7002 - Fx625 x Tj1

Fx516 - F4542 x AVROS363

Fx567 - F4542 x AVROS368

IAN7388 - LL49 x P316 I14

IAN3044 - Fx516 x PB86



#### 2.4.4 - Clones nativos e primários

CNSAM7718

CNSAM7907

CNSAM7745

#### 2.4.5 - Plantas do cruzamento IAN6158 x Fx985

PL22

PL24

PL39

PL32

PL51

PL57

PL72

PI 82

PL 84

PI 92

PL 98

PL 101

#### **2.5 - Extração de proteínas da amostra**

- Amostras liofilizadas;

- Determinar o peso seco

- Triturar os folíolos no almofariz. Antes de triturar adicionar 0,05g de PVP/ml do tampão. PVP - polivinilpirolidone, K30 para absorver os fenóis da amostra;

- Na câmara fria (5°C) colocar o tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,4 (Volume = 4 vezes o peso fresco da amostra), triturar no homogeneizador (3 vezes - 10s cada) e filtrar;

- Atenção: manter as amostras sempre no gelo;

- Centrifugar a 30.000g durante 30 minutos (temperatura de 4°C);

- O sobrenadante será utilizado para quantificar o teor de proteínas, concentrar as proteínas na amostra e uma parte manter na temperatura de -18°C;

- Para concentrar as proteínas, centrifugar 0,6ml da amostra na microcentrífuga a 13.000rpm durante 5 minutos (temperatura de 4°C). Descartar o sobrenadante e completar o volume para

0,6ml com o sobrenadante da amostra (essa operação é repetida 3 a 4 vezes);

- Após centrifugar, juntar em um único frasco e completar o volume para 0,6ml

## 2.6 - Preparo da amostra para eletroforese

Aos 0,6ml da amostra adicionar 0,2ml de tampão (solução b - descrita nas soluções do gel coletor - item 2.1.2), 200mg de sacarose e 2 gotas de amido preto.

## 2.7 - Teste para estimar a concentração de proteínas

Permite estimar concentrações de 1 a 10mg de proteínas.

É necessário uma solução padrão de albumina de boi.

Preparo da solução de albumina:

- Pesar 100mg de albumina e depois colocar em 33ml de água destilada (solução estoque);

- Fazer diluições da solução estoque para obter concentrações de albumina de 10mg; 5mg; 2,5mg e 1mg;

- Preparo da amostra: 1ml da amostra + 2,3ml de água destilada;

- Adicionar em todas as amostras 0,6ml da NaOH (200g/l) e mantê-las durante 3 minutos na temperatura de 80°C;

- Esfriar as amostras em uma corrente de água;

- Adicionar 0,1ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (250g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l de água destilada). Colocar no agitador;

- Manter em repouso durante 30 minutos ou até 5 horas;

- Centrifugar a 3.000rpm durante 10 minutos (solubilização do  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ );

- Preparar a amostra branca: 1ml da amostra + 2,3ml de água destilada. Não colocar a solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e não centrifugar;

- Manter em repouso durante 30 minutos;

- Fazer a leitura da absorbância no espectrofotômetro.



| Concentração de Albumina<br>(mg/3,3ml) | Absorbância |
|--|-------------|
| 10                                     | 0,740       |
| 5                                      | 0,639       |
| 2,5                                    | 0,206       |
| 1                                      | 0,054       |
| amostra                                | 0,640       |
| branco                                 | 0,234       |

Valor da absorbância a ser usada para cálculo da concentração de proteínas na amostra: (amostra - branco):

$$0,640 - 0,240 = 0,406$$

Determinar a curva-padrão para estimar a concentração de proteínas nos extratos das amostras.

## 2.8 - Coloração com coomassie

- a) Solução estoque: 1,25g de coomassie  
454ml de metanol  
46ml de ácido acético glacial  
100%
- b) Solução corante: 1 parte da solução estoque  
9 partes de ácido acético glacial 7,5%
- c) Coloração do gel: Colocar o gel na solução corante e após 1 hora lavá-lo com ácido acético glacial 7,5%

## 2.9 - Análise das isoenzimas

### 2.9.1 - Esterase - EST

a) Químicos: Tampão - Tris - HCl pH 7,2 -  
0,2mol

Substrato -  $\alpha$ -naphthyacetato  
acetona

Corante - Fast Blue RR

- b) Solução do Substrato: 30mg de  $\alpha$ -naphthy acetato + 10ml de acetona
- c) Solução para reação: Solução do substrato + 40ml do tampão tris - HCl pH 7,2 - 0,2mol.
- d) Solução corante: 50mg de Fast Blue RR + 50ml de água destilada
- e) Marcha para detectar a esterase no gel:
- I - Colocar o gel durante 10 minutos na solução de 15ml do tampão Tris- HCl pH 7,2 - 0,2mol + 35ml de água destilada.
  - II - Incubação na solução para reação - Colocar o gel durante 20 minutos nesta solução, mantendo-a na temperatura de 40°C.
  - III - Lavagem do gel - lavá-lo duas vezes (sendo 10 minutos cada) com o tampão Tris-HCl pH 7,2 - 0,2mol
  - IV - Coloração - Após a lavagem, colocar o gel na solução corante.

#### 2.9.2 - Malato desidrogenase - MDH

- a) Químicos: Tampão - Tris-HCl pH 5,5 - 0,5mol;
- Substrato - DL-Malato de sódio  
pH 7,0 - 1mol;
- Coenzima - NAD<sup>+</sup>
- Corantes - NBT (nitrotetrazólio)  
PMS (Phenazim metassulfato)



b) Solução do Substrato: DL-malato de sódio  
pH 7,0 — 1mol

| Substrato             | Peso<br>Molecular | Peso (g/ml de água dest.) |      |      |      |      |      |
|-----------------------|-------------------|---------------------------|------|------|------|------|------|
|                       |                   | 100                       | 50   | 25   | 20   | 10   | 5    |
| DL-malato de<br>sódio | 156,1             | 15,61                     | 7,80 | 3,90 | 3,12 | 1,56 | 0,78 |

pH = ajustá-lo para 7,0 com NaOH 10mol

c) Solução do coenzima: 10mg de  $\text{NAD}^+$  + 1ml  
de água destilada

d) Solução do corante: 10mg de NBT + 1ml de  
água destilada.  
1mg de PMS + 1ml de  
água destilada.

Prepará-los na hora de usá-los e manter  
no escuro.

e) Marcha para detectar a MDH no gel:

Misturar: 10 ml do tampão Tris-HCl pH  
8,5 — 0,5 mol

5 ml de DL-malato de sódio pH  
7,0 — 1,0 mol

1 ml da solução de  $\text{NDA}^+$

1 ml da solução de NBT

1 ml da solução de PMS

Completar o volume para 500 ml com água  
destilada, manter essa mistura a 40°C  
no escuro e colocar o gel durante 10 mi  
nutos.

Aparecem bandas de cor azul.

### 2.9.3 - Fosfatase ácida

a) Químicos: Tampão - Acetato de sódio pH  
5,0 — 0,5 mol

Catalizador -  $MgCl_2$  — 0,4 mol

Substrato: 1 - Naphthylfosfato  
de sódio

Corante: Fast Garnet GBC

b) Solução do Catalizador:  $MgCl_2$  — 0,4 mol  
em água destilada.

| Substrato            | Peso<br>Molecular | Peso (g/ml de água) |       |       |       |      |      |
|----------------------|-------------------|---------------------|-------|-------|-------|------|------|
|                      |                   | 1000                | 500   | 250   | 200   | 100  | 50   |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 203,31            | 81,32               | 40,66 | 20,33 | 16,26 | 8,13 | 4,07 |

c) Solução para reação: **Misturar** - 150mg de  
1 - naphthylfosfato de  
sódio ( $\alpha$ - naphthyl-  
fosfato ácido)  
15ml do tampão ace-  
tato de sódio pH 5  
0,5 mol  
1ml da solução de  
 $MgCl_2$  — 0,4 mol  
35ml de água desti-  
lada

d) Corante: 50mg de Fast Garnet GBC

e) Marcha para detectar a fosfatase ácida  
no gel:

I - Pré-incubação: Colocar o gel durante  
10 minutos na seguinte mistura -  
15ml do tampão de acetato de sódio -  
pH 5,0 — 0,5 mol  
1 ml da solução  $MgCl_2$  — 0,4 mol  
35ml de água destilada



II - Incubação na solução para reação - Colocar o gel durante 45 minutos nesta solução, mantendo no escuro na temperatura ambiente;

III - Coloração - Colocar os 50mg do corante Fast Garnet GBC no bequer que contém o resto da solução usada em II. Verter o que está na placa com o gel na solução que contém o corante. Misturar e colocar na placa que contém o gel. Deixar pelo menos 1 hora ou passar a noite

#### 2.9.4 - Polifenoloxidase - PPO

a) Químicos: Tampão - Fosfato pH 6,4 —  
0,1 mol

Substrato - L-DOPA = L-3,4-  
- dihidroxifenilalanina  
( $C_9H_{11}NO_4$ )

b) Solução do Substrato - L-DOPA 5m Mol  
(0,005 mol) em  
tampão fosfato pH  
6,4 — 0,1 mol.

| Substrato | Peso Molecular | Peso (g/ml do tampão) |       |       |       |       |       |
|-----------|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           |                | 1000                  | 500   | 250   | 200   | 100   | 50    |
| L-DOPA    | 197,6          | 0,986                 | 0,493 | 0,247 | 0,197 | 0,099 | 0,049 |

c) Solução para reação - Preparar a solução do substrato na temperatura ambiente . Colocar para agitar durante 10 minutos

d) Marcha para detectar a PPO no gel - Colocar o gel na solução, Aparecem bandas de cor cinza-escura

### 2.9.5 - Peroxidase - PO

- a) Químicos:  $H_2O_2$  (Solução 30%)  
 Guajakol ( $C_7H_8O_2$ )
- b) Solução de  $H_2O_2$  a 3%

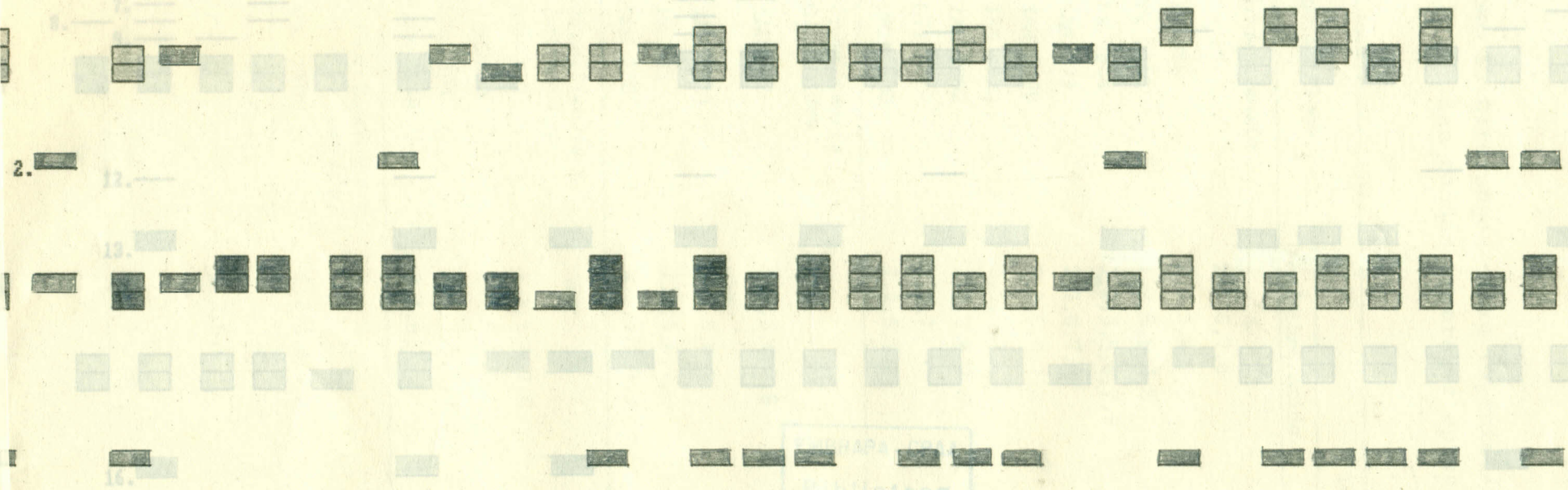
|                      |    |    |    |     |
|----------------------|----|----|----|-----|
| $H_2O_2$ 30%<br>(ml) | 3  | 6  | 9  | 10  |
| Água (ml)            | 27 | 54 | 81 | 90  |
| Total<br>(ml)        | 30 | 60 | 90 | 100 |

- c) Solução para reação: O guajakol é líquido - 1g de guajakol (pesar o líquido) e completar o volume para 100ml com a solução de  $H_2O_2$  a 3%.
- d) Marcha para detectar a PO no gel - Colocar o gel na solução para reação. Aparecem bandas de cor vermelha a castanho escuro.

### 2.10. Resultados parciais da análise das isoenzimas fosfatase ácida e esterase em algumas espécies/clones.

Os padrões isoenzimáticos para fosfatase ácida e esterase de algumas espécies/clones de seringueira estão apresentados nas Figuras 1 e 2 e no Quadro 1. Não justifica discutir esses resultados, pois são incompletos e há necessidade de repetir os testes com estas isoenzimas e testar outras.





Biblioteca

|      |     |             |            |           |       |          |    |      |    |                   |       |      |      |      |                    |     |      |      |                    |      |                   |         |    |     |      |      |      |    |
|------|-----|-------------|------------|-----------|-------|----------|----|------|----|-------------------|-------|------|------|------|--------------------|-----|------|------|--------------------|------|-------------------|---------|----|-----|------|------|------|----|
| IAN  | IAN | H.          | H.         | H.        | CNSAM | H.m.     | PB | IAN  | GT | MDF               | CNSAM | IAN  | IAN  | FX   | IAN                | IAN | RRIM | IAN  | CNSAM              | FX   | FX                | H.      | FX | FX  | MDF  | FX   | IAN  | PA |
| 7398 | 873 | rigidifolia | camargoana | guianense | 7623  | arginata | 86 | 6323 | 1  | 180 <sup>p1</sup> | 7665  | 3087 | 2880 | 2261 | 6323 <sup>p1</sup> | 717 | 600  | 7002 | 7704 <sup>p1</sup> | 3099 | 983 <sup>p2</sup> | viridis | 25 | 985 | 180P | 3844 | 6158 | 31 |

FIGURA 1. Padrões isoenzimáticos para fosfatase ácida (PAS)

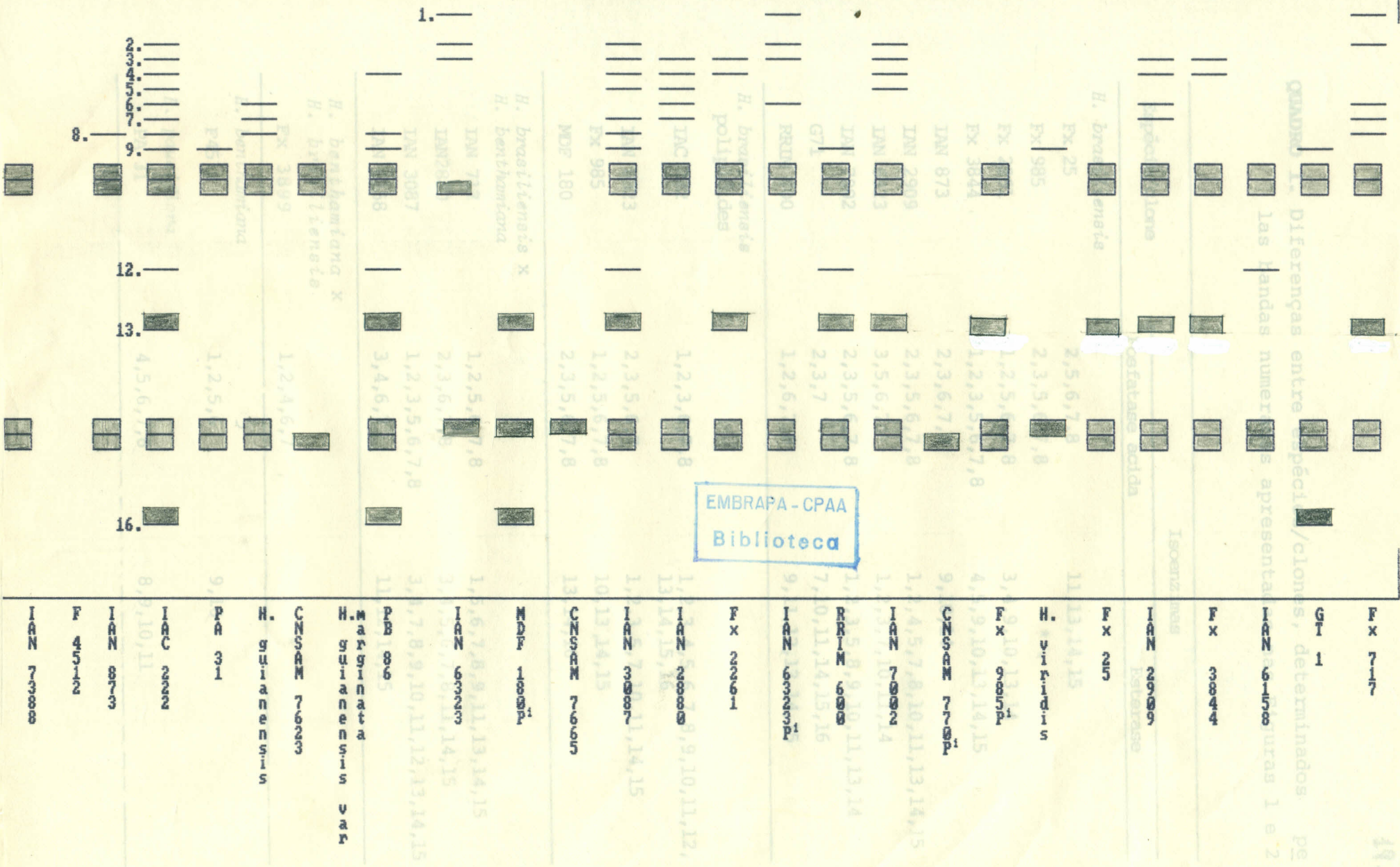


FIGURA 2. Padrões isoenzimáticos para Esterase (EST).



**QUADRO 1.** Diferenças entre espécies/clones, determinados pelas bandas numeradas apresentadas nas Figuras 1 e 2

| Espécie/clone                                     | Isoenzimas      |  |
|---|-----------------|--|
|   | Fosfatase ácida | Esterase                                   |
| <i>H. brasiliensis</i>                            |                 |  |
| Fx 25   | 2,5,6,7,8       | 11,13,14,15                                |
| Fx 985  | 2,3,5,6,7,8     | *  |
| Fx 2261   | 1,2,5,6,7,8     | 3,4,9,10,13,14                             |
| Fx 3844   | 1,2,3,5,6,7,8   | 4,5,9,10,13,14,15                          |
| IAN 873   | 2,3,6,7,8       | 9,10,14                                    |
| IAN 2909  | 2,3,5,6,7,8     | 1,2,4,5,7,8,10,11,13,14,15                 |
| IAN 6323  | 3,5,6,7         | 1,2,3,7,10,11,14                           |
| IAN 7002  | 2,3,5,6,7,8     | 1,2,3,5,8,9,10,11,13,14                    |
| G71   | 2,3,7           | 7,10,11,14,15,16                           |
| RRIM 600  | 1,2,6,7,8       | 9,11,12,13,14,15                           |
| <i>H. brasiliensis</i><br>poliplóides             |                 |  |
| IAC 222   | 1,2,3,6,7,8     | 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,<br>13,14,15,16 |
| IAN 6323  | 2,3,5,6,7       | 1,2,3,5,7,10,11,14,15                      |
| Fx 985  | 1,2,5,6,7,8     | 10,13,14,15                                |
| MDF 180   | 2,3,5,6,7,8     | 13,14,16                                   |
| <i>H. brasiliensis</i> x<br><i>H. benthamiana</i> |                 |  |
| IAN 717   | 1,2,5,6,7,8     | 1,5,6,7,8,9,11,13,14,15                    |
| IAN2880   | 2,3,6,7,8       | 3,4,5,6,7,8,11,14,15                       |
| IAN 3087  | 1,2,3,5,6,7,8   | 3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15                |
| IAN 6158  | 3,4,6,7         | 11,12,14,15                                |
| <i>H. benthamiana</i> x<br><i>H. brasiliensis</i> |                 |  |
| Fx 3899   | 1,2,4,6,7       | *  |
| <i>H. benthamiana</i>                             |                 |  |
| F4512   | 1,2,5,6         | 9,10                                       |
| <i>H. pauciflora</i>                              |                 |  |
| PA 31   | 4,5,6,7,8       | 8,9,10,11                                  |

## Cont. QUADRO 1.

|   |               |                                 |
|---|---------------|---------------------------------|
| <i>H. guianensis</i><br>var. <i>marginata</i> | 4,5,6,7       | **                              |
| <i>H. guianensis</i>                          | 6             | 7,8,9,11,14,15                  |
| <i>H. rigidifolia</i>                         | 2,6           | *                               |
| <i>H. camargoana</i>                          | 6             | *                               |
| <i>H. spruceana</i><br>CNSAM 7632             | 6,7           | 1,2,3,7,10,11,14                |
| <i>H. viridis</i>                             | 6,7           | 10,14                           |
| <i>H. brasiliensis</i><br>Fx 3844             | 1,2,3,5,6,7,8 | 4,5,9,10,13,14,15               |
| IAN 2909                                      | *             | 1,2,4,5,7,8,10,11, 13,<br>14,15 |
| <hr/>   |               |                                 |
| Poliplóides de clone<br>primário              |               |                                 |
| CNSAM 7704                                    | 2,6           | 14                              |
| <hr/>   |               |                                 |
| Clone primário                                |               |                                 |
| PB 86   | 2,6,7         | 3,4,9,10,11,12,13,14,15,16      |
| CNSAM 7665                                    | 2,7           | 14                              |
| <hr/>   |               |                                 |
| IAN 7388 ***                                  | 4,6           | 10,14,15                        |

\* Não efetuado análise

\*\* Não houve formação de bandas

\*\*\* Clone com problema na identificação



### 3 - EXTRAÇÃO DA $\beta$ GLUCOSIDADE

- Pode-se utilizar folhas de qualquer idade. As folhas jovens até o estágio B contêm maior teor de  $\beta$  glucosidade e além disso são menos fibrosas. Pode-se utilizar material fresco ou liofilizado.

- Triturar o material no liquidificador. O volume do tampão corresponde a 5 vezes o peso do material fresco. **Tampão:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 10mM/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM + ácido ascórbico 2mM (evitar oxidação das proteínas), pH 6,5-6,8.

- Filtrar e centrifugar a 30.000g durante uma hora.

- Medir a atividade da  $\beta$ - glucosidade

. Fração da enzima ( $\beta$ -glucosidade)

. Tampão: ácido cítrico - 0,1M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,2M

pH 5,6

. Solução substrato: 2mg de 4-nitrofenil- $\beta$ -D- glucopiranoside/ml do tampão

. Método de avaliação:

A) Método novo

| Amostras                         |   | Referências                      |                                |
|----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|
| 1                                | 2 | A                                | B                              |
| 50 $\mu$ l da fração de enzima.  |   | 50 $\mu$ l do tampão             | 50 $\mu$ g da fração de enzima |
| 100 $\mu$ l da solução substrato |   | 100 $\mu$ l da solução substrato | 100 $\mu$ g do tampão          |

O ensaio começa quando se adiciona a solução substrato. O período de incubação de cada amostra e das referências devem ser exatamente o mesmo.

O tempo de incubação deve ser 2 a 5 minutos, dependendo da atividade da fração enzima.

Paralizar as reações (incubação) adicionando-se 2,5ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 0,2mM.

Manter em repouso durante 10 minutos ou até 2 horas (escuro e frio).

Medir o coeficiente de extinção no comprimento de onda de 400nm.

**B) Método antigo**

| Amostras                   |   | Referências                |                        |
|----------------------------|---|----------------------------|------------------------|
| 1                          | 2 | A                          | B                      |
| 0,1ml da fração enzima     |   | 4,0ml do tampão            | 0,1ml da fração enzima |
| 3,9ml do tampão            |   | 1,0ml da solução substrato | 4,9ml do tampão        |
| 1,0ml da solução substrato |   |                            |                        |

Tempo de incubação: 10min. ou 5 minutos

Após esse período, retirar uma alíquota de 0,5ml de cada amostra e cada referência e adicioná-la 1,0ml da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,2mM). Depois da reação adicionar mais 3,5ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

**- Cálculo da atividade da  $\beta$ -glucosidade:**

50 $\mu$ l da solução do enzima retirada de 92ml da fração enzima foram obtidas de 25g de folhas frescas.

Tempo de incubação: 3 minutos

Coeficiente de extinção: 2,7

$E = \epsilon \cdot c \cdot d$ .

$E =$  Coeficiente de extinção

$\epsilon = 18.650 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$c =$  Concentração

$d =$  Largura da cubeta 1cm



$$E = \epsilon \cdot c \cdot d.$$

$$2.7 = 18650 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{1cm} \cdot c$$

$$c = 1,447 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} = 144,7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

O E = 2,7 originou de 2,65ml do ensaio, portanto:

$$1000\text{ml} \text{ --- } 144,7 \mu\text{mol}$$

$$26,5\text{ml} \text{ --- } x$$

$x = 383\text{nmol}$  produzido durante 3 minutos por  $50 \mu\text{l}$  da fração enzima.

Assim:

$$\frac{383\text{nmol}}{3 \text{ min}} = 127\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ por } 50 \mu\text{l} \text{ da fração enzima.}$$

$$\begin{array}{l} 50 \mu\text{l} \text{ --- } 127\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \quad *92\text{ml obtido de 25g de folha} \\ *92000 \mu\text{l} \text{ --- } y \end{array}$$

$$y = 233680 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$25\text{g de folha} \text{ --- } 233688\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$1\text{g} \text{ --- } z$$

$$z = 9,34 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de folha fresca}$$

- Após a centrifugação, retirar cerca de  $100 \mu\text{l}$  e testar a atividade da  $\beta$ -glucosidade. Coletar o sobrenadante e descartar o precipitado.

- Precipitação. Colocar 561g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HSO}_4$  por litro de sobrenadante. Colocar em pequenas quantidades após a outra parte já ter sido diluída. Isto demora cerca de 1 hora. Sempre verificar o pH. Nunca deve ser inferior a 6. Se necessário adicionar NaOH 0,1N. Após esse período deixar agitando mais uma hora. A agitação deve ser extremamente lenta para não desnaturar as proteínas. Deixar em repouso durante uma noite.

- Centrifugar a 20000g durante 45 minutos. Descartar o sobrenadante.

- Resuspender o precipitado em 2ml do tampão usado na trituração das folhas. Adicionar o tampão em pequenas quantidades ( $250 \mu\text{l}$ ) até colocar os 2ml.

- Colocar o enzima resuspendida no dialysis-cellophane .

Na diálise colocar um volume de tampão no mínimo de 200 vezes maior que o volume da enzima resuspendida. Fazer a diálise durante 8 horas/2 vezes.

- Centrifugar a 20.000g durante 25 minutos.
- Testar a atividade da  $\beta$ -glucosidade
- Filtrar
- Preservar no freezer.



## 4 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HCN POTENCIAL

a) Químicos: Kit da Merck com os seguintes reagentes:

CN 1A -  $\text{Cl}_2$  complexado

CN 2A - Ácido dimetil barbitú  
rico

CN 3A - Piridina

Solução - NaOH 0,2M

HCl 0,2M

Tampão - Fosfato pH 5,8 —  
0,2 mol/l

$\beta$ -glucosidase

b) Preparo do extrato - Utilizar 1g de folha fresca;  
Adicionar 4ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> — 0,1M;  
Triturar o tecido com auxílio do almofariz;  
Filtrar ou centrifugar a 4000rpm, durante 5 minutos -  
Manter o material no gelo.

c) Quantificação do teor de HCN<sub>p</sub> - Na parte inferior do tubo de Thunberg, colocar 0,1ml do extrato; 0,4ml do tampão fosfato pH 5,8 — 0,2M e 0,1 ml da solução de  $\beta$ -glucosidase e na superior 0,6ml de NaOH — 0,2M;

- A amostra branca pode ser extrato de folha de planta não cianogênica ou colocar apenas a  $\beta$ -glucosidase e o tampão fosfato sem o extrato.

- Manter os tubos, durante 20 minutos, a 30°C. A amostra branca é mantida aberta;

- Após esse período verter os tubos para misturar as substâncias. Em contato com o NaOH a atividade da  $\beta$ -glucosidase é interrompida e o aglicon (= hidroxinitril = cianohidrina) é desdobrado em carbonil e HCN. O HCN reage com o NaOH formando  $\text{NaNO}_3$  e HCN ácido;
- Adicionar no tubo: 3,2ml de água destilada e 0,6ml de HCl;
- Adicionar uma colherinha de CN 1A e agitar;
- Adicionar uma colherinha de CN 2A e agitar;
- Adicionar 3 gotas de piridina (CN 3A); agitar e esperar uns 3 a 5 minutos;
- Medir a absorvância no espectrofotômetro a 585nm;
- Cálculo do teor de HCN na folha:  
 $E = \epsilon \cdot c \cdot d$   
 $E = \text{absorvância}$   
 $\epsilon = 131600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$   
 $c = \text{concentração}$   
 $d = \text{largura da cubeta (normalmente é 1)}$

Utilizou-se extrato de folha de seringueira, cuja absorvância foi: Amostra 1=0,305  
 Amostra 2=0,257

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$C = \frac{0,281}{131600 \times 1} = 2,1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$$

Calcular a quantidade de HCN por grama de folha fresca.

$$\begin{array}{r} 1000\text{ml} - 2,1 \times 10^{-6} \text{ mol/l} \\ 5 \text{ ml} - x \end{array}$$

$$x = 10,5 \text{ nmol/0,1ml do extrato}$$



Esses 5ml correspondem: 0,1ml do extrato + 0,4ml do tam<sub>po</sub>ã fosfato + 0,1ml da solução de  $\beta$ -glucosidase (colocados na parte inferior do tubo de Thunberg) + 0,6ml de NaOH 0,2M (colocado na parte superior do tubo) + 3,2ml de água destilada + 0,6ml de HCl (adicionados ao tubo após a reação).

Como utilizou-se 4ml de  $H_3PO_4$  0,1M, então:

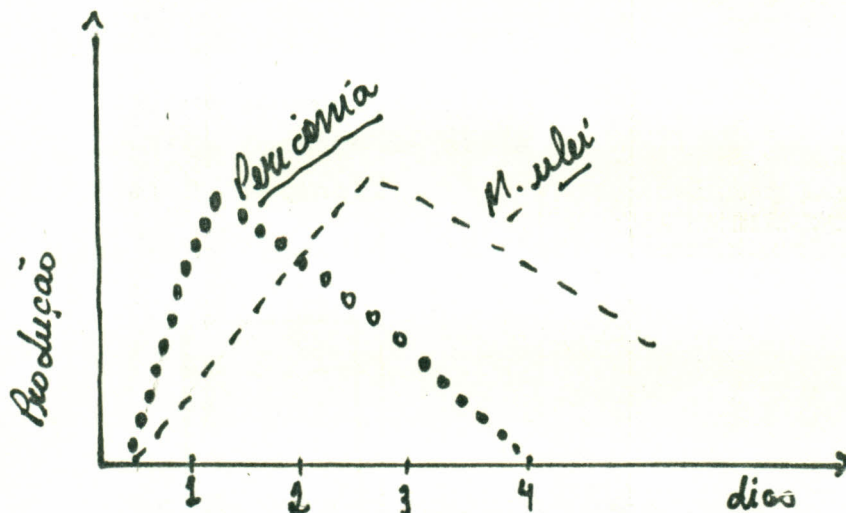
0,1ml do extrato - 10,5nmol

4ml do extrato - y

y = 420nmol/g de folha fresca.

## 5 - ESCOPOLINA E ESCOPOLETINA

A escopolina e escopoletina são produzidas em folhas de seringueira. Atuam como fator de resistência. Podem ser induzidas por patógenos, tampão (pH 8 é mais efetivo), radiação 340nm e metais pesados ( $HgCl_2$ ,  $AgNO_3$ ). Com relação a patógenos depende do isolado. A produção é alta com isolados incompatíveis e extremamente baixa com os compatíveis.



A extração pode ser feita de material fresco ou liofilizado. Coletar, determinar o peso fresco e colocar as folhas imediatamente no congelador.

Preparo das amostras e extração de escopoletina e escopolina por meio de cromatografia de camada fina:

- Triturar as folhas no almofariz;
- Colocar metanol frio;
- Manter o material no gelo;
- Centrifugar a 4000g durante 10 minutos;
- Secar no secador a vácuo ou utilizar compressor (colocar o sobrenadante em tubo de ensaio e com o fluxo de ar faz-se a secagem);
- Depois de seco, colocar 0,1ml de metanol frio/0,1g de folha fresca para dissolver a fitoalexina. Este extrato é usado para extração de fitoalexina (escopoletina e escopolina) em cromatografia de camada fina;
- Utilizar cromatofolhas Al de silicagel 60 (sem indicador fluorescente) para cromatografia em camada fina. São pro



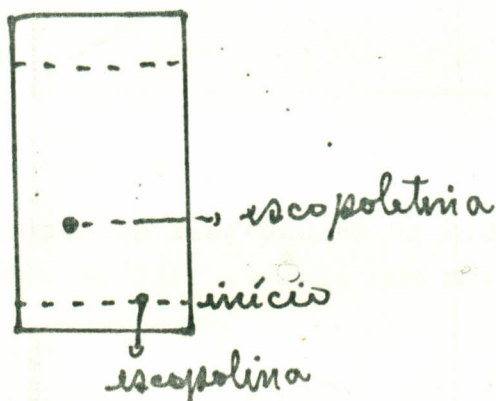
duzidas pela MERCK e vendidas em caixas com 25 folhas (cada uma 20x20cm com uma camada de 0,2mm de espessura). Em inglês: TLC aluminium sheets silica gel 60 (Without fluorescent indicator) pre-coated 25 sheets 20x20cm - layer thickness 0,2mm.

- Soluções usadas para separação das fitoalexinas na cromatofolha (Tese Giesemann, 1986. p.22). As soluções devem ser preparadas no momento de ser usadas.

1ª) Solução de Eilert 1983:

70ml de tolueno  
20ml de formato de etila  
10ml de metanol.

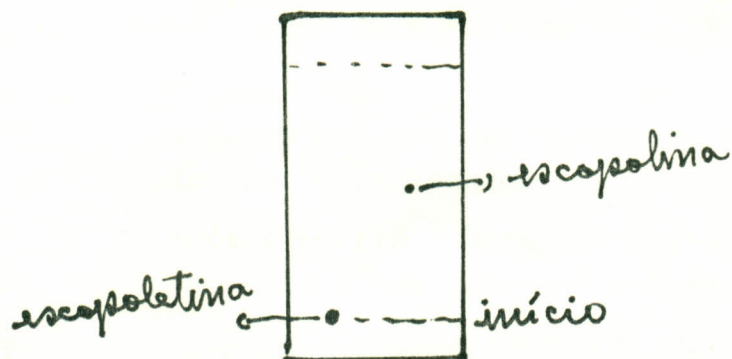
Usada para comarinas (apolar) - escopoletina



2ª) Solução de Tan & Low, 1975:

100ml de acetato de etila  
16,5ml de metanol frio  
13,5ml de água destilada.

Usada para fenóis (polares) - escopolina



Para quantificar os teores das fitoalexinas necessita-se de espectrofotômetro fluorescente.

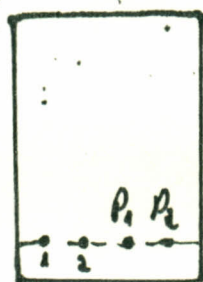
A 280 nm é possível quantificar no espectrofotômetro simples. Construir a curva com substância padrão. A escopoletina ou escopolina é colocada em metanol. Calibrar a curva com 5µg/ml; 1µg/ml; 0,5µg/ml e 0,1µg/ml.

Para extrair a escopoletina ou escopolina da placa de cromatografia usar 3ml de tampão fosfato pH 7,0. Misturar no agitador. Centrifugar a 1000g durante 10 minutos. Com a solução limpa, fazer a leitura no espectrofotômetro.



Corrida do extrato na placa de cromatografia:

Para colocar as substâncias na placa utilizar um capilar com graduações de 5µl; lavá-lo com metanol.



placa

1 - escopoletina

2 - escopolina

P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> soluções em estudo.

Escopolina e escopoletina - colocar 5µl da solução (5mg / 50ml)

Substâncias P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> - colocar 10 a 20µl.

- Colocar para correr com uma das soluções. Depende de qual a fitoalexina a ser estudada. As amostras não podem ficar imersas no solvente;
- Após a corrida, para visualizar a fitoalexina a placa seca tem que ser colocada sob luz ultra-violeta;



- Marcar a distância de corrida do solvente e a da fitoale\_xina em estudo;
- Calcular o  $r_f = D(\text{substância}) / D(\text{solvente})$ .

## 6 - MICORRIZA

Discutiram-se e executaram-se os métodos de extração de esporos, isolamento de fungo micorrízico do campo (a ser identificado), produção de esporos, preservação dos isolados, inoculação, avaliação de infecção, preparo de lâminas e identificação de gênero e espécie.

### 6.1. - Extração de esporos

Retirar uma alíquota de 100ml da amostra de solo a ser analisada.

Colocar num bequer e adicionar cerca de 500 a 600 ml de água. Agitar e esperar cerca de 5 a 10s para decantação das partículas mais densas. Passar o sobrenadante em peneiras de 425 mesh e 45 mesh (a de 425 sobre a de 45). No material decantado que ficou no bequer, colocar mais água, agitar, esperar a decantação e passar o sobrenadante nas peneiras.

Coletar o material retido na peneira de 45 mesh e centrifugá-lo a 2500 rpm/5min.

Descartar o sobrenadante.

Coletar o sedimento, suspendê-lo em sacarose a 40% e centrifugá-lo a 2500 rpm/1min.

Passar imediatamente o sobrenadante na peneira de 45 mesh e lavar com água de torneira. A operação desde a suspensão do sedimento em sacarose até a lavagem tem que ser rápida para evitar que os esporos sejam afetados, devido a diferença de potencial osmótico entre o conteúdo celular dos esporos e a solução de sacarose.

No microscópio estereoscópio com o auxílio de um estilete separar os esporos das impurezas, agrupá-los e coletá-los com uma micropipeta.

## 6.2 - Isolamento de fungo micorrízico do campo

Escolher planta anual de crescimento lento para aumentar a probabilidade de encontrar os esporos. Em recipiente próprio ao crescimento da planta, colocar no fundo uma camada de areia, a seguir uma camada do substrato que contém fungo micorrízico a ser isolado e sobre esta uma outra camada de areia (cada camada deve ser de 1/3 da altura do recipiente).

Quando a planta atingir um crescimento satisfatório, removê-la do substrato. Lavar as raízes e transferir a planta para um substrato esterelizado. Deixar crescer durante 6 meses.

Após esse período, cortar a parte aérea da planta para secar o sistema radicular. Nesta situação fica durante 6 semanas para o fungo esporular.

Extrair os esporos e inocular 1 em cada planta, em substrato esterelizado, para conseguir esporos puros de um único isolado.

## 6.3 - Produção de esporos

A produção de esporos deve ser feita com plantas que apresentam crescimento rápido e bom sistema radicular. Plantas mais utilizadas: milho, sorgo e *Poncetia*. *Glomus etunicatus* infecta várias espécies.

## 6.4 - Preservação de isolados

Os esporos podem ser armazenados a 8°C. Sistema radicular mantido em solo seco. Nestas condições os esporos mantêm a mesma infectividade durante 1 ano e após 3 anos cai para 30%.

Os isolados também podem ser mantidos em plantas (*Poncetia*, milho, mamão e mandioca). Fazer manejo da umidade e não utilizar muito fósforo.

Ficha de controle dos isolados.





### 6.5 - Inoculação

No caso de usar argila expandida, coloca-se 10% desta no volume de solo a ser utilizado. Misturar o substrato com a argila e, posteriormente, fazer o plantio. Na argila contém cerca de 30 esporos/g. Quanto utilizar outra fonte de inóculo (esporos misturados com areia, solo, etc...), deve-se homogeneizar e quantificar a população de esporos. Colocar uma população de esporos semelhante à usada com a argila.

### 6.6 - Avaliação de infecção

Retirar as raízes da parte do centro do vaso. Evitar as raízes da parte lateral dos vasos.

Na avaliação do grau de infecção (% de raízes infectadas), corta-se ao acaso 100 pedaços de 1cm de comprimento, colore e a seguir com auxílio do microscópio estereoscópio conta-se as raízes infectadas.

#### Coloração das raízes:

- Lavá-las
- Cortar os pedacos
- Colocar em solução de KOH 10% para clarificar. Manter a 90°C durante 10 minutos (milho). Para outras plantas testar o tempo necessário. Quanto tem problemas para clarear usa-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Lavar com água para remover o KOH.
- Colocar em HCl 0,1N pouco tempo. Raízes finas não é necessário.
- Para colorir, colocar em solução de Trypan azul 0,05% na temperatura de 90°C.

#### Solução de trypan azul:

- 40 ml de glicerol
- 40 ml de ácido lático (85%)
- 20 ml de água destilada
- 0,05 g de Trypan azul



Outro parâmetro usado é a intensidade de colonização, avaliando-se apenas as raízes colonizadas. Verificar a porcentagem da área superficial das raízes que está colonizada. Sendo dados os valores 1, 2, 3, onde: 1 pouco colonizada, 3 muito colonizada e 2 intermediária. É uma avaliação subjetiva.

O mais importante é o desenvolvimento das plantas. Algumas vezes plantas com 10% de infecção crescem melhor do que com 30% de infecção. Então, quantificar o teor de nutrientes nas folhas e peso fresco e seco da parte aérea e, se possível, do sistema radicular.

#### 6.7. Preparo de lâminas

O preparo de uma boa lâmina semi-permanente é fundamental para determinar uma espécie de um espécime de fungo micorrízico vesicular-arbuscular. Uma boa lâmina permite a observação de caracteres críticos de um espécime. Deve-se evitar bolhas de ar sob a lamínula e os bordos da lamínula devem ser untados cuidadosamente com esmalte claro. A etiqueta sobre a lâmina deve incluir a identidade e a fonte de origem do esporo, a data, quem preparou a lâmina, o líquido de montagem usado e outras informações que o espaço permitir.

Os líquidos de montagem semi-permanentes, tais como PVL (álcool polivinil + lactofenol) ou PVLG (álcool polivinil + ácido láctico + glicerol) permitem que as lâminas permaneçam boas por vários anos. Entretanto, fique sabendo que certas características dos esporos, tais como características da parede e cor dos esporos serão afetadas pelo líquido de montagem. O PVL e PVLG não solidificam completamente. Desta forma, as lâminas com estes líquidos de montagem devem ser guardadas sobre uma superfície plana.

Os passos para preparar uma lâmina são os seguintes:

- a) Separe esporos típicos e limpos com uma pipeta ou outro instrumento com a mínima quantidade de água. Coloque-os em um vidro de relógio com água destilada ou deionizada.



- b) Coloque uma gota do líquido de montagem no lado direito e esquerdo de uma lâmina de microscópio seca e limpa; deixando o espaço em uma extremidade para colocar uma etiqueta. (um lado será para esporos inteiros, pelo menos 10-25 esporos; o outro será para mesma quantidade de esporos que serão quebrados).
- c) Coloque de 10 a 30 esporos (depende do tamanho) por gota do líquido de montagem com a mínima quantidade de água.
- d) Misture os esporos com o líquido de montagem com auxílio de uma agulha, estilete ou outro objeto para dispersar os esporos.
- e) Deixe o líquido de montagem endurecer por alguns minutos para tornar mais viscoso antes de colocar a lamínula. Neste intervalo de tempo com um microscópio estereoscópio os esporos devem ser posicionados no centro da gota e orientados de tal modo que as características interessantes sejam visíveis.
- f) Coloque uma lamínula seca e limpa num ângulo de  $45^{\circ}$  com pequeno contato com a gota do líquido de montagem + esporos. Deixe o líquido espalhar ao longo da superfície da lamínula.
- g) Cuidadosamente solte a lamínula sobre a gota. Este processo minimiza a formação de bolhas de ar.
- h) Repita as operações f e g na outra gota.
- i) Cuidadosamente quebre as paredes dos esporos de uma lamínula, apenas fazendo pequena pressão sobre a lamínula com uma borracha ou com o dedo polegar (usar papel de lente para não sujar a superfície da lamínula).
- j) Deixe o líquido de montagem com os esporos secar por várias horas ou passar a noite numa posição plana. A quebra dos esporos em apenas um lado da lâmina é muito crítico. Se por acaso as paredes dos esporos não estejam quebrados, pode-se quebrá-los neste estágio aplicando ligeiramente mais pressão sobre a lamínula usando um lápis ou borracha sobre os esporos individuais, enquanto observa-os sob um microscópio estereoscópio, até que os esporos quebrem

abrindo uma fenda ligeiramente separadas. Continue este processo até que todos os esporos de uma lado da lâmina fiquem quebrados. Se os esporos ficarem esmagados, deverá ser preparada outra lâmina na qual os esporos quebrados ou fendilhados deverão ser predominantes.

- k. Limpe qualquer excesso do líquido de montagem com um algodão umedecido com etanol.
- l. Sele os lados da lamínula com esmalte claro. Deixe o esmalte secar.
- m. Faça as observações listadas no INVAM WORKSHEET e registre-as. Se há problemas com esta lâmina, prepare outras. INVAM WORKSHEET (Livro de N.C. Schenk e Y. Perez).

Estas observações serão utilizadas para identificação do gênero e espécie do fungo micorrízico.

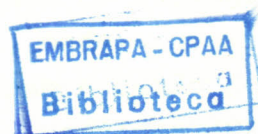
#### 6.8. Identificação do gênero e espécie

Utilizou-se o manual for the identification of VA mycorrhizal fungi de N.C. Schenk and Yvone Pérez - Capítulos 3, 4 e 5.

Existem apenas 6 gêneros de fungos que contêm espécies que produzem micorriza vesicular-arbuscular em plantas. Os gêneros *Glomus* e *Sclerocystis* produzem clamidosporos. Os demais, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* e *Entrophospora* foram esporos do tipo azygosporos. Distinguem-se os gêneros através das características de seus esporos e a relação do esporo com a inserção da hifa.

Para identificação do espécie considera-se: a cor e tamanho do esporo, número e largura das paredes e características da parte exterior da parede.

Depois de olhar o manual (chave de classificação), estudar a descrição das espécies em dúvida.





## 7 - REUNIÕES

- Com o prof. Lieberei, Dr. Falko Feldmann, Elke Icdzak e Ingo Müller. O Ingo é estudante da Universidade de Giessen e pretende desenvolver a tese de doutorado, trabalhando com micorriza em pupunha, seringueira, mandioca, mamão, maracujá e guaraná. O trabalho será desenvolvido em Manaus. Ficou estabelecido que ele preparará o projeto e junto com o prof. Lieberei, como orientador, enviarão o projeto para a DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst). O projeto deverá ser iniciado em março de 1991.

- Com o prof. Lieberei e Dr. Falko Feldmann para discutir o trabalho de tese de habilitação que o Falko deverá apresentar ao Instituto de Botânica da Universidade de Hamburg. O projeto constará de um consórcio de seringueira, cupuaçu, pupunha e mamão. Pretende-se quantificar a receita líquida, estudar a população microbiana do solo e o sistema radicular das plantas e avaliar o efeito das micorrizas. Outros trabalhos básicos deverão ser desenvolvidos, como avaliar o efeito do exsudato radicular das plantas, matéria orgânica, clima etc... O projeto deverá ser enviado ao DFG/GTZ (Deutsche Forschungsgemeinschaft/Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit).

- Com o prof. Lieberei para discutir o projeto de tese de doutorado do pesquisador Antonio Nascim Kalil Filho. Pelo fato do projeto "Development of cytological and biochemical criteria for selection of rubber plants (*Hevea brasiliensis*) resistant to fungal leaf disease", estar sendo concluído não havia mais verba para aquisição das drogas, solicitados pelo Kalil. A alternativa seria o pesquisador inscrever-se no consulado geral da Alemanha em São Paulo para obtenção de uma bolsa. Ele seria estudante da Escola de Medicina de Ribeirão Preto e iria para a Alemanha em abril/91. Aprenderia, durante 6 meses, alemão e desenvolveria, durante 1 ano, o trabalho de tese no Instituto de Botânica da Universidade de Hamburg. A proposta inicialmente foi aceita pelo pesquisador que depois desistiu.

- Com estudantes da faculdade de Biologia da Universidade Eduardo Mondlanô de Moçambique, onde o prof. Lieberei fez uma exposição dos trabalhos que foram e estão sendo desenvolvidos com seringueira (CPAA/EMBRAPA), mandioca (UFV-Viçosa) e cacau



(CEPLAC).

- Com o prof. Lieberei e a Dr<sup>a</sup> Ursula Schlüter para explicar o que se pretende desenvolver no trabalho da tese de habilitação do Dr. Falko Feldmann, com o intuito de conseguir uma bolsa para a pesquisadora colaborar na execução dos trabalhos em Manaus.

- Visita a Universidade de Braunschweig onde houve uma reunião entre Prof. Lieberei, prof. B. Biehl, Dr. Dirk Selmar e o estudante de doutorado Manfred Müller, pesquisador da CEPLAC, onde discutiram o assunto do trabalho de tese do pesquisador.

- Com o prof. Lieberei e o estudante de doutorado Reinhard Körner para expor os resultados obtidos em seu trabalho de tese e o que ainda pretende desenvolver.

## 8 - SITUAÇÃO DO CONVÊNIO

Os trabalhos desenvolvidos pelo pesquisadores envolvidos no projeto já originaram as seguintes publicações:

### 8.1 - Teses

- FELDMANN, F. Die Mykorrhiza des Kaustschukbaumes *Hevea spec.* Muell. Arg.; Vorkommen am Naturstandort und in Plantagen, Wirkung auf das Resistenzverhalten, Nutzung in Plantagenbau (Micorriza da seringueira *Hevea spp.* Muell. Arg.: ocorrência no habitat natural e nas plantações, efeito na resistência e uso nos plantios). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1990. 220p. Tese de doutorado.
- FELDMANN, F. Morphologische und physiologische Veränderungen in *Hevea* - Wurzeln im Zuge der Besiedelung durch bodenbürtige Pilze (Mudanças morfológicas e fisiológicas em raízes de *Hevea* durante a colonização por fungos do solo). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1987. 137p. Tese de mestrado.
- GIESEMAN, A. Resistenzbedingende Faktoren in der Wirt-Pathogen Beziehung *Hevea spec./Microcyclus ulei* P. Henn.v. Arx (Fatores da resistência nas interações entre hospedeiros e patógenos da *Hevea spp./Microcyclus ulei* P. Henn.v.Arx). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1987. 137p. Tese de doutorado.
- KÖRNER, R. Fungitoxische Substanzen in Blättern des Kautschukbaumes *Hevea Species* (Substâncias fungitóxicas em folhas de seringueira *Hevea spp.*). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1988. 102p. Tese de mestrado.

- LIEBEREI, R. Cyanogenese und Resistenz. Physiologische Studien zur Wirt-Pathogen Beziehung bei cyanogenen Pflanzen, durchgeführt am Wirt-Pathogen System *Hevea brasiliensis*-*Microcyclus ulei* (Cianogênese e resistência. Estudos fisiológicos da interação patógeno-hospedeiro em plantas cianogênicas, mostrado no sistema *Hevea brasiliensis* - *Microcyclus ulei*). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1984. 265p. Tese de habilitação.
- MEVENKAMP, G. Charakterisierung und interzelluläre Lokalisierung der  $\beta$ -Cyanoalaninsynthase in Blättern von *Hevea* spp. (Caracterização e localização intercelular da  $\beta$ -cianoalaninasintetase em folha de *Hevea* spp). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, . Tese de mestrado.
- MEYER, R. Phytoalexine in Blättern von *Hevea* spp. species (Fitoalexinas em folhas de *Hevea* spp.). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1987. 79p. Tese de mestrado.
- SCHRADER, A. Einfluß von Blausäure auf Sporenkeimung und Mycelentwicklung von *Microcyclus ulei*, dem Erreger der Südamerikanischen Blatkrankheit (Influência do cianeto na germinação dos esporos e desenvolvimento micelial de *Microcyclus ulei*, agente causal do mal-das-folhas da seringueira). Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1980. 110p. Tese de mestrado.
- SELMAR, D. Charakterisierung einer gereinigten  $\beta$  - Glucosidase mit Linamarase - Aktivität aus Blättern von *Hevea brasiliensis* (Caracterização de uma  $\beta$ -glucosidase pura com atividade de linamarase nas folhas de *Hevea brasiliensis*) . Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1982. 105p. Tese de mestrado.



SELMAR, D. Cyanogenese in *Hevea* - zwei Wege zur Meta-  
bolisierung cyanogener Glycoside (Cianogênese em *Hevea* -  
duas rotas na metabolização do glicosídeos cianogênico) .  
Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, 1986.  
171p. Tese de doutorado.

UMBACH, H.  $\beta$ -Cyanoalaninsynthase in *Hevea* species (  $\beta$ -  
cianoalaninasintetase em *Hevea* spp). Braunschweig,  
Technische Universität Braunschweig, 1989. 79p. Tese de  
mestrado.

## 8.2 - Trabalhos científicos

CHEE, K.H.; DARMOND, T.W.; KAI-MING, Z. & LIEBEREI, R. Leaf  
development and spore production and germination after  
infection of *Hevea* leaves by *Microcyclus ulei*. **J.Rubb. Res.  
Inst. Malaysia**, 33(3):124-137, 1985.

FELDMANN, F. Änderungen des Gehaltes and cyanogenen Glycosid  
und Scopoletin in Wurzeln von *Hevea brasiliensis* als  
Reaktionen auf die Wechselwirkung mit bodenburtigen Pilzen  
(Mudanças dos teores de glicosídeos cianogênicos e escopoleti  
na nas raízes de *Hevea brasiliensis* como reações das intera  
ções com fungos do solo). **Phytomedizin**, 17(3):27. 1987.

FELDMANN, F.; JUNQUEIRA, N.T.V. & LIEBEREI, R. Utilization of  
vesicular - arbuscular mycorrhiza as a factor of integrated  
plant protection. **Agriculture Ecosystem and Environment**,  
29:131-135. 1989.

GIESEMANN, A.; BIEHL, B. & LIEBEREI, R. Identification of  
scopoletin as a phytoalexin in the rubber tree *Hevea*  
*brasiliensis*. **J. Phytopathology**, 117:373-376. 1986.

LIEBEREI, R. Cyanogenesis of *Hevea brasiliensis* during  
infection with *Microcyclus ulei*. **J. Phytopathology**, 115:  
134-146. 1986.

- LIEBEREI, R. Relationship of cyanogenic capacity ( $\text{HCN}_C$ ) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing South American leaf blight. *J. Phytopathology*, **122**:54-67. 1988.
- LIEBEREI, R. The role of cyanide and cyanogenesis in plant - pathogens interactions. In: EVERED, D. & HARNETT, S., eds. Cyanide compounds in biology, John Wiley, Chichester, 1988. p.171-176.
- LIEBEREI, R.; BIEHL, B.; GIESEMANN, A. & JUNQUEIRA, N.T.V. Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol.*, **90**:33-36. 1989.
- LIEBEREI, R. & FELDMANN, F. Physiological changes in root colonized by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture Ecosystem and Environment*, **29**:251-255. 1989.
- LIEBEREI, R.; NAHRSTEDT, A.; SELMAR, D. & GASPAROTTO, L. The occurrence of lotaustralin in the genus *Hevea* and changes of HCN - potential in developing organs of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **25**:1573-1578. 1986.
- LIEBEREI, R.; SCHRADER, A.; BIEHL, B. & CHEE, K.H. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia*, **31**(3):227-232. 1983.
- LIEBEREI, R.; SELMAR, D. & BIEHL, B. Metabolization of cyanogenic glucosides on *Hevea brasiliensis*. *Plant Systematics and Evolution*, **150**:49-63. 1985.
- LIEBEREI, R. & SELMAR, D. Rhodanase in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, **29**(5):1421-1424. 1990.
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R. & BIEHL, B. Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides. *Plant Physiol.*, **86**:711-716. 1988.



- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B. & CONN, E.E.  $\alpha$ -Hydroxynitrile lyase in *Hevea brasiliensis* and its significance for rapid cyanogenesis. *Physiologia Plantarum*, 75:97-101. 1989.
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B.; NAHRSTEDT, A.; SCHMIDTMANN, V. & WRAY, V. Occurrence of the cyanogen linustatin in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 26:2400-2401. 1987.
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B. & VOIGT, J. *Hevea linamarase* a nonspecific  $\beta$ -glycosidase. *Plant Physiol.*, 83:557-563. 1987.

### 8.3 - Trabalhos apresentados em congressos

- FELDMANN, F.; JUNQUEIRA, N.T.V. & LIEBEREI, R. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhiza as a factor of integrated plant protection. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAE, 2., Praga, 1988. *Resumos*. Praga, Czechoslovakia, s.ed., 1988. p.53.
- FELDMANN, F. & LIEBEREI, R. Physiological changes in roots of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the course of colonization by mycorrhizal fungi. In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 14., Berlim, 1987. *Resumo*. Berlim, s.ed., 1987. p.419.
- LIEBEREI, R. Infection - induced cyanogenesis inhibits active defense reaction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Strasbourg, França, 1986. *Resumos*. Strasbourg, s.ed., 1986. Fl.
- LIEBEREI, R. Resistenzbedingende Faktoren von *Hevea brasiliensis* gegen *Microcyclus ulei*, den Erreger der Südamerikanischen Blattkrankheit des Parakaustschukbaumes (Fatores de resistência da *Hevea brasiliensis* contra *Microcyclus ulei*, o agente causal do mal-das-folhas). In: DEUTSCHE PFLANZENSCHUTZ-TAGUNG, 43., Hamburg, 1981. *Resumos*. Berlim, Kommissionsverlag Paul Parey, 1981. p.203.
- LIEBEREI, R. & FELDMANN, F. Mycorrhiza in cyanogenic plants. *Plant Physiology*, 86 (4):148. 1988. (Suplemento). Trabalho apresentado in the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists at Nevada, July 10-14, 1988.

- LIEBEREI, R. & FELDMANN, F. Physiological changes in root colonized by vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAE, 2., Praga, 1988. **Resumos.** Praga, Czechoslovakia, s.ed., 1988. p.65.
- LIEBEREI, R.; GIESEMANN, A. & BIEHL, B. Hemmung von Resistenzmechanismen durch Blausäure in Cyanogenen Pflanzen (Inibição dos mecanismos de resistência pelo HCN nas plantas cianogênicas). In: BOTANIKER-TAGUNG, Viena, 1984. **Resumos.** Viena, s.ed., 1984. p.165.
- LIEBEREI, R.; GIESEMANN, A.; EILERT, U. & JUNQUEIRA, N.T.V. Surface structure of *Hevea* leaves and its importance for the interaction with fungal plant pathogens and for plant systematics. **Fitopatologia Brasileira**, 13(2): 134. 1988. **Resumo** 228. Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia realizado em Salvador-BA.
- LIEBEREI, R.; GIESEMANN, A.; MEVENKAMP, G. & MEYER, R. Wechselwirkung infektionsbedingter Cyanogenese mit der Phytoalexinbildung beim Kautschukbaum *Hevea brasiliensis* (A interação da cianogênese e a produção de fitoalexina durante a infecção de seringueira por *Microcyclus ulei*). In: DEUTSCHE PFLANZENSCHUTZ-TAGUNG, 45., Kiel, 1986. **Resumos.** Berlin, Kommissionsverlag Paul Parey, 1986. p. 277.
- LIEBEREI, R.; GIESEMANN, A.; SELMAR, D.; BIEHL, B.; MEVENKAMP, G. & JUNQUEIRA, N.T.V. Cyanogenesis and plant resistance to microbial attack. In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS; 14., Berlin, 1987. **Resumos.** Berlin, s.ed., 1987. p.67.
- LIEBEREI, R.; JUNQUEIRA, N.T.V. & FELDMANN, F. Integrated disease control in rubber plantations in South American. In: INTEGRATED PEST MANAGEMENT IN TROPICAL AND SUBTROPICAL CROPPING SYSTEMS. **Proceedings.** Bad Bürkheim, Fed. Rep. of Germany, 1989. Vol.II. p.445-456.
- LIEBEREI, R. & JUNQUEIRA, N.T.V. The importance of the hydrocyanic acid capacity of the rubber tree for biochemical resistance screening to fungal diseases. **Fitopatologia Brasileira**, 13(2): 149. 1988. **Resumo** 317. Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileira de Fitopatologia, realizado em Salvador-BA.



- LIEBEREI, R.; SELMAR, D. & BIEHL, B. HCN-Entgiftung in *Hevea brasiliensis* (Detoxificação do HCN em *Hevea brasiliensis*). In: BOTANIKER-TAGUNG, Viena, 1984. **Resumos**. Viena, s.ed., 1984. Abstract. 813.
- MEVENKAMP, G.; LIEBEREI, R. & SELMAR, D.  $\beta$  - Cyanoalanina synthase in *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology**, 89(4):191. 1989 (Suplemento). Trabalho apresentado in the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists with the Canadian Society of Plant Physiologists at Toronto, July 30-August 3, 1989.
- SCHRADER, A. & LIEBEREI, R. Einfluß von Cyanid auf die in-vitro-Entwicklung von *Microcyclus ulei*, einen Pathogen des cyanogenen Wirtes *Hevea brasiliensis* (Influência do cianeto no desenvolvimento in vitro de *Microcyclus ulei*, um patógeno do hospedeiro cianogênico *Hevea brasiliensis*). In: DEUTSCHE PFLANZENSCHUTZ-TAGUNG, 43., Hamburg, 1981. **Resumos**. Berlim, Kommissionsverlag Paul Parey, 1981. p. 328.
- SELMAR, D. Cyanogenic glycosides - constituents of xylem and phoem sap? **Plant Physiology**, 89(4): 193. 1989 (Suplemento) . Trabalho apresentado in the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists with the Canadian Society of Plant Physiologists at Toronto, July 30-August 3, 1989.
- SELMAR, D. Significance of hidroxynitrile lyase for rapid HCN-liberation. **Plant Physiology**, 86(4): 153. 1988 (Suplemento) . Trabalho apresentado in the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists at Nevada, jully 10-14, 1988.
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R.; BIEHL, B. & COON, E.E. Metabolization of cyanogenic glycosideos. In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 14., Berlim, 1987. **Resumos**. Berlim, s.ed., 1987. p.52.
- SELMAR, D.; LIEBEREI, R. & BIEHL, B. Distribution and variation of cyanogenic capacity in tissues of *Hevea brasiliensis*. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM - MEMBRANES AND COMPARTMENTATION IN REGULATION OF PLANT FUNCTIONS, 1983. **Resumos**. Toulouse, Phytochemical Society of Europe, 1983. Poster 044.

SELMAR, D.; LIEBEREI, R. & BIEHL, B.  $\beta$ Glucosidasen der cyano genen Pflanze *Hevea brasiliensis* ( $\beta$ -Glucosidase da planta cianogênica *Hevea brasiliensis*). In: JUBILÄU-UMSTAGUNG DER DEUTSCHEN BOTANISCHEN GESELLSCHAFT, Freiburg, 1982. Resu mos. Freiburg, s.ed., 1982. Poster 018.

SELMAR, D.; LIEBEREI, R. & BIEHL, B. Transport of cyanogenic glycosides in *Hevea brasiliensis*. In: CONGRESS OF THE FEDE RATION OF EUROPEAN SOCIETIES OF PLANT PHYSIOLOGY, 5., Ham burg, s.ed., 1986. p.27.

#### 8.4 - Trabalhos em andamento

Estão sendo desenvolvidos dois trabalhos de tese de douto rado.

##### a) Tese do estudante KÖRNER, R.

Os resultados indicam que há correlação entre cianogênese e resistência da seringueira ao mal-das-folhas. O HCN inibe as reações de defesa da planta e funciona como um fator de suscetibilidade. O teste de avaliação de resistência da *Hevea* a *M. ulei* poderá ser feito em condições de laboratório, onde plantas com alto teor de  $\text{HCN}_p$  (acima de  $10\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^-/\text{g}$  de folha fresca) são suscetíveis, as com baixo teor (inferior a  $3\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^-/\text{g}$  de folha fresca) são resistentes e as com teores intermediários podem ser suscetíveis ou resistentes. Assim, em um programa de melhoramento genético da *Hevea* todas pro gênies serão submetidas ao teste. As que apresentarem teores de HCN intermediários aos valores pré-estabelecidos deverão ser inoculadas com isolados dos *M. ulei* pertencentes aos dife rentes grupos. A vantagem deste teste é que reduz o período de espera para avaliação da resistência e o número de plantas a serem levadas para o campo e, conseqüentemente, a despesas de mão-de-obra e insumos.

Há correlação da cianogênese com as enzimas  $\beta$ - glucosidade e  $\alpha$ -hidroxinitrileliase que aceleram a liberação do HCN e com a  $\beta$ -cianoalaninasintetase que inibe a liberação. Essas infor mações reforçam a idéia de utilizar o teor de  $\text{HCN}_p$  como parâ metro de seleção de plantas resistentes a *M. ulei*.



Deverã ser feita correlaçãõ entre HCNp e a produçãõ de 15 plantas (algumas resistentes e outras suscetíveis) oriundas do cruzamento IAN 6158 x Fx 985. Além disso, deverão ser identificadas e quantificadas substâncias fungitõxicas nas folhas e a correlaçãõ destes com a resistẽncia. Tem se verificado que a es copoletina e escopolina sãõ induzidas e fazem parte do sistema de resistẽncia.

Trabalhando com cromatografia constatou-se que existem 17 diferentes substâncias fungitõxicas nas folhas de seringueira. Destas, 7 sãõ induzidas e 10 sãõ prẽ-formadas. Entre as induzidas deverão ser feitos estudos com escopoletina e escopolina. Enumerando-se as substâncias prẽ-formadas de 1 a 10 (ainda nãõ foram identificadas) as mais interessantes e que deverão ser estudadas sãõ a 3, 4 e 8. A 3 e a 4 porque sãõ encontradas em folíolos de diferentes idades (inclusive maduro) e a 8 porque ẽ encontrada atẽ 48 horas apõs a infecçãõ. Todas as substâncias prẽ-formadas sãõ encontradas nos folíolos com 6 dias de idade (estãgio B). Quando inocula-se o clone Fx 3899 com *M. ulei*, no momento da inoculaçãõ ẽ possível encontrar as 10 substâncias prẽ-formadas, apõs 24 horas apenas a 3, 4, 5, 8, 9 e 10 e apõs 48 horas sãõ existem a 3, 4 e 8.

b) Tese do estudante MEVENKAMP, G.

Estuda-se os fatores morfolõgicos e bioquímicos envolvidos na resistẽncia da seringueira, utilizando-se como patõgeno o fungo *Periconia* sp.

Quando o fungo ẽ inoculado em folhas "in vivo" o patõgeno causa lesões e nãõ esporula, enquanto que em folhas destacadas o patõgeno destrõi a folha e esporula. Nas primeiras 24 horas ocorrem grande mudançãs no processo infeccioso. Nas folhas pre sas na planta ocorre acúmulo de lignina e depois de 24 horas as lesões praticamente nãõ aumentam de tamanho. Nas folhas destaca das o tamanho das lesões nãõ ẽ limitado e nãõ há presençã de lignina.



Em torno das lesões não há acúmulo de suberina. A calose começa a ser produzida 24 horas após a inoculação. Em 72 horas há calose espalhada por toda folha sendo mais concentrada próxima a lesão. O fungo cresce no interior dos tubos crivados. Em torno de tubos crivados há presença de lignina e no interior dos tubos de calose e a área necrótica é alongada. Em folhas destacada não há produção de calose e lignina, se a folha for destacada da planta 72 horas após a inoculação, a folha torna-se suscetível e dentro de 24 a 48 horas o patógeno volta a crescer, esporula e destrói-a. Desta forma, presume-se que a resistência está correlacionada com o acúmulo de lignina e de calose.

Tem-se verificado que *Periconia* é insensível a escopoletina. Em folhas cortadas quando se adiciona HCN o tamanho das lesões é maior. O HCN afeta o tamanho das lesões mas não é o responsável pela resistência. Estudando-se a influência do total de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) em folhas infectadas presas na planta ou destacadas, colocando-as na luz ou no escuro, não se conseguiu explicar nada.

Com relação a mudança do teor de energia tem-se verificado que quando a folha está presa na planta nas primeiras 24 horas após a inoculação há um decréscimo no teor mas a planta consegue reagir, enquanto que em folhas destacadas estas não reagem.

Quando folhas inoculadas com *Periconia* são reinoculadas com *Microcyclus ulei* ocorre reação induzida. O número e o tamanho das lesões de *M. ulei* são menores. O período de incubação e de geração são maiores e a esporulação é reduzida. Isto só ocorre quando se inocula a mesma folha. Tem-se verificado que aproximadamente 1 lesão de *Periconia/cm*<sup>2</sup> de área foliar é suficiente para induzir resistência. O efeito da reação induzida é mais visível quando se inocula *M. ulei* 24 horas após infecção por *Periconia*.

## 9 - AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos ao prof. Dr. Reinhard Lieberei e família pela hospitalidade durante minha estada na Alemanha, ensinamentos e dedicação.

Ao Deutsche Forschungsgemeinschaft/Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (DFG/GTZ) pela concessão dos recursos



financeiros para este estágio e para os programas de pesquisa.

Ao Chefe do CPAA/EMBRAPA, Dr. Erci de Moraes, por ter autorizado minha licença prêmio (3 meses).

Ao Dr. Falko Feldmann e aos estudantes Elke Icdzak, Georg Mevenkamp, Katja Koch e Reinhard Körner pela amizade, pela cooperação e pelos ensinamentos dos métodos utilizados nos seus trabalhos de pesquisa.

A estudante Christiane Kurzhals pelos ensinamentos transmitidos quando estive no Instituto de Botânica da Universidade de Braunschweig.

Ao Instituto de Botânica da Universidade de Hamburg, na pessoa de seu diretor e funcionários, pela oportunidade de realização deste estágio.

Aos pesquisadores Maria Imaculada Pontes Moreira Lima, Josefino de Freitas Fialho e Alderi Emidio de Araújo e aos funcionários do laboratório de Fitopatologia por terem assumido meus trabalhos durante minha ausência.

Ao Dr. Falko Feldmann (Braunschweig), prof. Dr. Böle Biehl (Braunschweig), Dr. Dirk Selmar (Braunschweig); Sr. Rolf Thieme (Alemanha Oriental), Dr. Hans-Otto Lindner (Bad Harzburg), Georg Mevenkamp (Lüneburg) e ao pastor Johannes Kernich (Maschen) e respectivas famílias pela hospitalidade.