

EFEITO DE EXTRATOS EPICUTICULARES DE FRUTOS DE DUAS  
CULTIVARES DE GOIABEIRA (*Psidium guajava*) SOBRE A  
GERMINAÇÃO DE UREDINIOSPOROS DE *Puccinia psidii*

**KALEANDRA SENA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO - 2008

EFEITO DE EXTRATOS EPICUTICULARES DE FRUTOS DE DUAS  
CULTIVARES DE GOIABEIRA (*Psidium guajava*) SOBRE A  
GERMINAÇÃO DE UREDINIOSPOROS DE *Puccinia psidii*

**KALEANDRA SENA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO – 2008

EFEITO DE EXTRATOS EPICUTICULARES DE FRUTOS DE DUAS CULTIVARES DE GOIABEIRA (*Psidium guajava*) SOBRE A GERMINAÇÃO DE UREDINIOSPOROS DE *Puccinia psidii*

**KALEANDRA SENA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 19 de junho de 2008

Comissão Examinadora:

---

Dr. Juan Manuel Anda Rocabado (D.Sc., Produção Vegetal) – UFV

---

Prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Acelino Couto Alfenas (Ph. D., Fitopatologia) – UFV

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Fitopatologia) – UENF  
(Orientador)

**“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”**

**Albert Einstein**

Ao meu grande mestre:  
Boanerges Nunes Sena, meu pai.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, ao Cristo Jesus e a virgem mãe, pela força e por me guiar permitindo mais uma realização na minha vida.

À Universidade Estadual Norte Fluminense “Darcy Ribeiro” (UENF) e ao Centro de Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas e concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Dr. Silvaldo Felipe da Silveira, pela orientação, paciência e respeito durante a realização deste curso.

Ao Dr. Juan Manuel Rocabado pela amizade, apóio e incentivo durante todo o curso.

À Dra Karina Gramacho, por me iniciar e sempre incentivar na pesquisa, pelo exemplo, por sempre ter acreditado em mim e pela grande amizade.

Ao prof. Ian Schrifsema, pela atenção e contribuição nas análises de RNM.

Ao Sr. Roberto pela paciência , grande atenção e colaboração nas análises de RNM.

À Cláudio Moisés, meu marido, pelo apoio, amor, lealdade e companheirismo na realização de mais um objetivo na minha caminhada.

Aos meus pais e irmãos por sempre terem me dado a mão e me erguido nos momentos necessários.

A minha madrinha Lavínia Sena, pelo incentivo e apóio de sempre.

À minha tia Maria, pelas orações e orientações.

À minha amada “irmã” Tarcilly, pela cumplicidade, amizade e apóio, sempre.

À amiga Vanessa, pelas orações e palavras de conforto.

À Lana e Adelino por terem me acolhido tão bem e hoje serem minha segunda família.

Aos funcionários Daniel, Vilarinho e Ritinha por toda atenção e contribuição.

Aos meus amigos, os quais conquistei nessa estada em Campos e que levarei sempre comigo, por tudo que bebemos, compartilhamos e aprendemos juntos: Lucileia (“Lú” minha irmanzinha), Robinho (“Toody”), Ana Raquel (minha “bichana” preferida), Glauco (grande amigo), Kelly Lana (“anta verde”), Marcelia, Rozaninha (uma alegria quando chega), Vicente (“Vincent”), Hérica (“Herikinha”), Jonicélia (“Branquela”), Helaine (“Helen”), Alexandre (“Xandrinho”), Ginnie (“Style”), Paty Gopi (“Peit”), Janice (“Jany”) , Rosivany (“Piguinha”), Pedro (“Predinho”), Nelma (“Pavão”) e Marcos (“Chocolate”).

Ao super “P”, pela atenção amiga e sorrisos das terças.

Ao pessoal do churrasquinho pelas várias “brejas” geladas.

Ao Nino, que foi enviado por papai do céu, pela sua doçura e companhia nos momentos solitários.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. O hospedeiro.....	5
2.1.1. Característica das cultivares.....	6
2.1.1.1. Rica.....	7
2.1.1.2. Paluma.....	7
2.2. Ferrugem da Goiaba.....	8
2.3. Interações superficiais na infecção de plantas por ferrugens.....	9
2.4. Barreiras estruturais pré-formadas de plantas à patógenos.....	13
2.5. Epiderme e Cutícula.....	15
2.5.1 Cutina.....	17
2.5.2. Cera.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Obtenção e manutenção do inóculo.....	20
3.2. Obtenção de extratos de ceras epicuticulares....	20
3.3. Caracterização química dos extratos obtidos.....	22
3.4. Efeito de diferentes suportes sobre germinação de uredíniosporos de <i>Puccinia psidii</i> .....	23
3.5. Efeito dos extratos epicuticulares sobre germinação de uredíniosporos de <i>Puccinia psidii</i> .....	23

3.6. Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Extratos de ceras epicuticulares.....	25
4.2. Caracterização química dos extratos obtidos.....	27
4.3. Efeito de diferentes suportes sobre germinação de uredíniosporos de <i>P. psidii</i> .....	32
4.4. Efeito de extratos epicuticulares de frutos de goiaba, em diferentes solventes, na germinação in vitro de uredíniosporos de <i>P. psidii</i> .....	33
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## RESUMO

SENA, KALEANDRA, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, junho de 2008; Efeito de extratos epicuticulares de frutos de duas cultivares de goiabeira (*Psidium guajava*) sobre a germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii*. Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira. Conselheiros: Juan Manuel Rocabado, Rosana Rodrigues, Acelino Couto Alfenas.

Entre as doenças de importância econômica causadas por Uredinales, encontra-se a ferrugem das mirtáceas, que tem como agente causal o fungo *Puccinia psidii* Winter. A importância dessa ferrugem tem aumentado com o cultivo de espécies de mirtáceas frutíferas, hoje economicamente importantes, como a goiaba (*Psidium guajava* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha*, Cambess), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] Berg), o araçá-boi (*Eugenia stipitata* MC Vaugh) dentre outras. Estas fruteiras são cultivadas para indústria na produção de polpa congelada para sucos, além de doces, geléias e bebidas destiladas (vinhos) e licores. Na região Norte Fluminense, a goiaba se destaca pelo seu grande potencial de produção e de processamento industrial, além das crescentes oportunidades de exportação. Os frutos da goiabeira são fortemente atacados pela ferrugem, causando perdas de até 90% de produção. Partindo da hipótese de que ceras epicuticulares podem constituir fatores de resistência pré-formada à infecção por *P. psidii* em frutos de goiaba, propõe-se caracterizar e relacionar a composição de ceras epicuticulares de frutos da variedade Rica (resistente) e Paluma (suscetível) e avaliar o efeito de extratos de ceras sobre a germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii*. Os experimentos foram

realizados em condições de laboratório, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As ceras foram extraídas de frutos de dois e quatro centímetros de diâmetro, de ambas as variedades, por lavagem, nos respectivos extratores testados, seguida de evaporação em ambiente de laboratório. Os extratores testados foram acetona, diclorometano, metanol, etanol e clorofórmio, na quantidade de 10ml para frutos com 2 cm de diâmetro e 20 ml para frutos com 4 cm de diâmetro. Para estudar os efeitos dos extratos na germinação de *P. psidii*, foram utilizados suportes constituídos de filme de papel celofane sobre meio de agar-água, em placas de Petri. Sobre este, adicionaram 12µl de uma suspensão em óleo mineral de  $10^4$  uredíniosporos.ml<sup>-1</sup> mais 12 µl dos extratos a serem testados. Como controle, utilizou-se a mesma metodologia, mas foram adicionados aos esporos apenas óleo mineral sem extratos. As placas foram mantidas em câmara úmida, no escuro, por 24 h para germinação dos esporos e posterior observação ao microscópio de luz sob aumento de 200x. A caracterização dos compostos químicos dos extratos foi efetuada por Ressonância Magnética Nuclear. Os resultados indicam que para todos os extratos testados houve inibição na germinação de uredíniosporos de *P. psidii* em relação ao controle. Os extratos epicuticulares de frutos da cv. Rica (resistente) apresentaram maior efeito inibitório do que os da cv. Paluma (suscetível). Entre os solventes testados, o metanol resultou em menor percentual de germinação, enquanto que o etanol possibilitou obter maiores diferenças quantitativas na germinação de *P. psidii* entre as variedades testadas. Os perfis químicos dos extratos testados de frutos das cultivares Rica e Paluma mostraram similaridade qualitativa nos grupos de compostos químicos, os quais compreendem compostos alifáticos, alcanos, alcenos e aromáticos. As possíveis ações inibitórias dos extratos epicuticulares de frutos de goiaba sobre a germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii* são discutidas.

## ABSTRACT

SENA, KALEANDRA, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, June 2008; Effect of epicuticular extracts of guava fruits (*Psidium guajava* L.) of two cultivars on the germination of urediniospore of *Puccinia psidii* Winter. Advisor: Silvaldo Felipe da Silveira. Committee members: Juan Manuel Roçagado, Rosana Rodrigues, Acelino Couto Alfenas.

One of the economically important Uredinales is Myrtaceae rust, with the causal fungus *Puccinia psidii* Winter. The economical importance of this rust has increased greatly with the commercial cultivation of American Myrtaceae fruits species such as guava (*Psidium guajava* L.) and others, ex. *Eugenia uvalha* Cambess, *Eugenia uniflora* L., *Myrciaria cauliflora* [Mart.] Berg, *Eugenia stipitata* MC Vaugh etc, which are grown mainly for the industrial production of juices, jellies and drinks (“wines”). In the northern fluminense region (State of Rio de Janeiro, Brazil) the guava rust is endemic and can cause losses up 90% of productivity. Based on the hypothesis that epicuticular waxes can be factors of preformed resistance to infection by *P. psidii* on guava fruits, it is proposed to characterize and relate the composition of epicuticular waxes in fruits of the varieties Rica (rust resistant) and Paluma (rust susceptible) and to evaluate the effect of wax extracts on *in vitro* germination of *P. psidii* urediniospores. The experiments were conducted in laboratory conditions, in a randomized design with three replications. The wax was extracted from fruit with a diameter of two and four centimeters of both varieties, by washing in the extractors tested, followed by evaporation in a laboratory environment. The acetone, dichloromethane,

methanol, ethanol, and chloroform extractors were tested (fruits with a diameter of 2 cm in 10ml and fruits with a diameter of 4 cm in 20 ml of extractant). To study the extract effects on *P. psidii* spores germination, a cellophane film on 2% agar medium in Petri dishes were used as physical support. To this, 12µl of urediniospore suspension ( $10^4$  spores.ml<sup>-1</sup>) of *P. psidii* was added to 12 µl of the test extracts sonicated and dissolved on mineral oil. The same methodology was used for the control, but the spores were added only to the pure mineral oil without extracts. The dishes were kept in the dark in a moist chamber for 24 h, for spore germination and subsequent observation under 200x light microscope. The chemical extract compounds were characterized by Nuclear Magnetic Resonance. Results indicate that all extracts tested inhibited *P. psidii* spores germination, compared with the control. The inhibitory effect of epicuticular extracts of fruit of cv. Rica (resistant) was stronger than of cv. Paluma (susceptible). Of the solvents, methanol extract reduced the germination rate, while *P. psidii* germination with ethanol extract was quantitatively different for the varieties tested. Cv. Rica ethanolic extract had more inhibitory effect to spores germination than cv. Paluma ethanolic extract. The chemical profiles of the fruit acetone extracts of cultivars Rica and Paluma were qualitatively similar in the groups of chemical compounds, which comprised aliphatic compounds, alkanes, alkenes and aromatics. The possible inhibitory actions of epicuticular extracts of guava fruits on *in vitro* germination of *P. psidii* urediniospores are discussed.

## 1. INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava*) é originária da América Tropical e possui grande importância no comércio internacional e na economia interna de mais de 50 países tropicais e subtropicais (Silva, 1994). Essa fruta apresenta um dos maiores teores de vitamina C, com valores superiores em até seis vezes aos do fruto cítrico, que é uma fonte tradicional dessa vitamina. É uma das principais matérias-primas utilizadas pela indústria brasileira de conservas e, atualmente, existe uma alta demanda por polpa congelada de goiaba no país, tanto para indústria de sucos como para a produção de sorvetes, doces e geléias (Pio *et al.*, 2007).

As exportações brasileiras de goiaba são insignificantes, devendo-se isso a diversos fatores, entre os quais: o pouco conhecimento do produtor por parte dos consumidores nos mercados externos, a fragilidade do produto na fase pós-colheita, falta de tradição do Brasil como exportador de frutas e o fato de o preço final de venda no mercado externo ser elevado (Pio *et al.*, 2007).

A espécie é produzida em praticamente todo o território brasileiro, desenvolvendo-se satisfatoriamente em vários tipos de clima e solo. Para uma melhoria qualitativa e quantitativa da produção de goiaba no país é necessário que haja maior incremento do nível técnico dos cultivos, desde o plantio de cultivares selecionadas até os cuidados com a apresentação dos frutos destinados ao mercado (Pio *et al.*, 2007).

No município de Campos de Goytacazes, na região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, devido ao declínio da cultura canavieira, foi proposta a criação de um pólo agroindustrial voltado para a fruticultura. Entre as frutas, destaca-se a goiaba, pelo seu grande potencial de produção e de processamento industrial, além das crescentes oportunidades de exportação (Silva, 1994).

Apesar do incentivo estadual dado a produção de fruteiras, por meio do programa de financiamento denominado Frutificar, o Estado do Rio de Janeiro não alcançou a produção esperada, de modo que até o ano de 2006 a produção de goiaba no Estado foi de 10.412 t, das quais apenas 2.887 t corresponderam ao Norte Fluminense (IBGE, 2007). Pouca quantidade da goiaba produzida na região destina-se ao consumo de mesa, ficando a maior parte da produção como matéria-prima de pequenas fábricas artesanais de doces situadas no Norte e Noroeste do Estado (Silva, 1994).

Outros fatores também vêm contribuindo para a baixa produção e competitividade no desenvolvimento comercial da goiaba na região norte fluminense, como a desorganização na cadeia produtiva, a qual abrange a produção técnica (como questões fitossanitárias), o gerenciamento de custos e a comercialização (Ponciano *et al.*, 2006).

A ferrugem causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter é uma das principais doenças da goiabeira na região de Campos dos Goytacazes-RJ (Silveira *et al.*, 1997) e no Brasil (Campacci, 1983; Manica *et al.*, 2000, citado em Martins, 2003), constituindo um fator limitante da cultura devido ao prejuízo que ocasiona a produção. Os frutos podem ser inutilizados não só para consumo in natura, como também para a industrialização (Figueredo *et al.*, 1984).

Frutos com lesões necróticas de ferrugem têm seu valor depreciado para consumo “in natura” (Castilho *et al.*, 1982). Além dos danos diretos nas flores e nos frutos, a doença reduz o vigor de mudas ao incidir nos terminais de ramos.

No Norte Fluminense a ferrugem já causou perdas de próximas de 100% de frutos em épocas favoráveis à infecção e na ausência de controle químico, em pomar da cultivar Paluma (Rocabado, 1998).

Para o controle recomendam-se podas de produção em épocas escape, desfavoráveis a doença. As podas também permitem maior aeração no interior da copa. A medida de controle principal é o controle químico. Martins (2003) indica aplicações preventivas de oxicloreto de cobre e aplicações curativas de

triadimenol, tebuconazole ou azoxystrobin, no início da floração e frutificação, tão logo se detecte a doença incidindo sobre os botões. Porém, é pertinente salientar que aplicações de oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso causam sintomas de fitotoxicidade em níveis severos em frutos de diâmetro entre 2,5 e 3,5 cm (Goes *et al.*, 2004).

Não existe cultivares comerciais de goiaba com botões e frutos resistentes a ferrugem (Piccinin e Pascholati, 1997), embora seja o meio mais eficaz e econômico para o controle da doença. Na fase de muda, todas as cultivares testadas apresentam-se com folhas suscetíveis à ferrugem (Vasconcelos, 1998). São raros trabalhos envolvendo a seleção de cultivares resistentes à ferrugem em fase adulta e na fase de floração. Ribeiro e Pommer (2000) observaram variabilidade quanto à resistência à ferrugem na fase de mudas. No entanto, não se avaliou a resistência a ferrugem em plantas adultas e nos botões e frutos, o principal alvo biológico. É no fruto onde a resistência tem que ser expressa, para que se possa atingir nível satisfatório de controle da doença.

Estudos epidemiológicos e de patogênese entre as cultivares Paluma e Rica, realizados por Rocabado (2003), mostraram que a cv. Rica é mais resistente à ferrugem que a cv. Paluma. Ao estudar os eventos de pré-penetração da *P. psidii* em frutos de Rica e Paluma, o autor constatou diferenças na germinação e formação de apressório de uredíniosporos de *P. psidii* entre estes dois cultivares. A percentagem de uredíniosporos germinados na cv. Paluma foi maior bem como a freqüência na formação de apressório. A cv. Rica apresentou menor percentual de uredíniosporos germinados e baixa freqüência de formação de apressórios, a qual foi observada somente em frutos mais novos.

A acentuada redução da germinação e formação de apressórios em frutos da cv. Rica pode estar relacionada à maior quantidade de ceras epicuticulares e a maior espessura de cutícula dos frutos da cv. Rica. Estas estruturas são barreiras físicas e químicas a penetração por ferrugens e podem estar atuando de alguma forma na resistência a *P. psidii* (Rocabado, 2003). Observações análogas também foram feitas por Xavier (1997). Segundo a autora, a redução na formação de estruturas de infecção e a redução do número de soros de uredíniosporos de *P. psidii* podem estar associados ao aumento na cerosidade superficial das folhas maduras de *Eucalyptus grandis*.

A constituição química de ceras epicuticulares em Myrtaceae e o efeito dos seus componentes químicos nos mecanismos de resistência pré-formada a agentes nocivos ou à infecção de fitopatógenos foram pouco estudados. Trabalhando com frações purificadas de extratos de folha de jambo (*Syzygium jambus* L.), Tessmann e Dianese (2002) identificaram o hidrocarboneto hentriacontano, o qual apresentou efeito estimulante na germinação de *P. psidii*. Segundo os autores, o composto pode reverter provável ação auto-inibitória de substâncias produzidas pelos uredíniosporos, como verificado para outras espécies de ferrugens.

Tanto os mecanismos de defesa das plantas como a habilidade dos agentes fitopatogênicos em causar doença estão sob controle genético (Camargo, 2008). A co-evolução patógeno-hospedeiro resulta em uma pressão de seleção recíproca, onde, de um lado são selecionados biótipos do patógeno com novos mecanismos de ataque e do outro, o do hospedeiro, são selecionados genótipos com diferentes mecanismos de resistência. Saber como essa interação ocorre, quais substâncias são responsáveis e qual seu papel nos processos bioquímicos e quais genes de resistência estão envolvidos é de fundamental importância para a ciência e a ação do homem na busca de plantas resistentes a doenças.

No atual trabalho, propõe-se verificar a associação da composição de ceras extraídas de frutos de goiaba à resistência pré-formada a ferrugem; avaliar extratos de ceras obtidos da superfície de frutos de goiaba sobre a germinação de uredíniosporos *in vitro* e caracterizar quimicamente os extratos por meio de ressonância magnética nuclear (RMN).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1. O hospedeiro

No Brasil, o cultivo comercial da goiabeira (*Psidium guajava* L.) abrange os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Paraíba, Goiás, região centro-oeste, Rio Grande do Sul e Paraná, totalizando 18.000 ha (Pereira, 1995). No Norte Fluminense são 250 ha plantados com a cultivar Paluma como alternativa de investimento na agricultura familiar (Ponciano *et al.*, 2007), que embora bastante produtiva e de fácil manejo é suscetível à várias doenças e pragas.

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é pertence à família Myrtaceae da ordem Myrtifloral (Myrtales), a qual é composta por mais de 70 gêneros e 2.800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente América e Austrália. As diferentes espécies dessa família apresentam porte variável, desde grandes árvores até arbustos e trepadeiras. São cultivadas como plantas ornamentais e para a produção de madeiras, óleos, resinas, goma, especiarias e frutos.

*Psidium* é um gênero que apresenta cerca de 150 espécies, das quais se destacam *Psidium guajava* L. (goiaba), *Psidium catleyanum* Sabine (araçá-doce, araçá de praia ou de coroa) e *Psidium guineense* Swatz ou *Psidium roddah* (araçá verdadeiro ou araçá azedo) (Pereira, 1995).

De acordo com Gonzaga Neto *et al.* (1990), *P. guajava* é a única espécie com interesse comercial. As outras espécies se constituem num importante banco de germoplasma nativo para programas de melhoramento genético (Gonzaga Neto e Soares, 1994).

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é classificada como arbusto ou pequena árvore esgalhada, com altura variável de 3 a 7m, podendo atingir portes maiores em condições especiais (Medina *et al.*, 1978, citado por Pereira e Nachtigal, 2002).

Seu crescimento lateral, característico da espécie, é reduzido através de podas, permitindo o estabelecimento de pomares comerciais em espaçamento menor, além da aeração no interior da copa contribuindo no manejo de doenças.

A brotação da goiabeira não é uniforme, com floração ocorrendo durante o período de setembro a novembro. A maturação dos frutos se dá normalmente no período de janeiro a março, de modo que, devido a sua possibilidade de florescer em ramos do ano e apresentar significativa resposta a supressão parcial da copa, a produção comercial de frutos durante todo o ano é conseguida através de poda drástica associada à irrigação.

Suas flores são hermafroditas, heteroclamídeas, actinomorfas e epígenas, com floração ocorrente apenas em ramos do ano. A depender da cultivar, podem ocorrer em botões isolados ou em grupos de dois ou três, sempre na axila das folhas (Gonzaga Neto e Soares, 1994). As inflorescências são do tipo dicásio, de modo a formar duas brácteas opostas, na base do botão, formando um total de três flores (Pereira, 1995).

### **2.1.1. Característica das cultivares**

Os trabalhos de melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L.) no Brasil tiveram início com Soubihe Sobrinho na ESALQ, com publicação em 1951. A partir desse, vários outros trabalhos estão sendo desenvolvidos nessa cultura (Gonzaga Neto, 1994).

De acordo com Pereira (1995), a implantação da cultura através de mudas de pés-franco (sementes) ocorreu não só na maior parte dos pomares comerciais

no Brasil, como também na maioria dos países produtores, originando pomares com alta heterogeneidade de frutos e de plantas.

Por meio de métodos de seleção, hibridação e propagação assexuada, o melhoramento da goiabeira objetiva a obtenção de frutos com melhor qualidade, plantas com maior produtividade e resistentes às pragas e doenças (Kavati, 1997).

O fato da goiabeira ser uma planta alógama, facilita os trabalhos de melhoramento promovendo indivíduos com maior variabilidade genética. Outra característica a favor do melhoramento é que dentro do gênero *Psidium* não há incompatibilidade entre as espécies bem como a propagação assexual, pelo enraizamento de estacas herbáceas, o que facilita a seleção e rápida multiplicação clonal de híbridos intra e inter-específicos na geração F1.

#### **2.1.1.1. Cultivar Rica**

Origina-se do programa de melhoramento genético da UNESP/FCAV de Jaboticabal, São Paulo, pelo método de polinização aberta da variedade Supreme. Caracteriza-se por ter boa produtividade (50t/ha) e vigor, sendo recomendada para industrialização, especialmente na elaboração de goiabadas e sucos (Kavati, 1997).

Seus frutos são ovalados e levemente piriformes, com pescoço curto e tamanho médio (100 a 250 g). A coloração da casca é verde-amarelada, com textura levemente rugosa. Polpa vermelha, espessa e firme. Possui sabor agradável com elevado teor de açúcares (11° Brix) e baixa acidez. Suas sementes são poucas e pequenas (Pereira, 1995; Kavati, 1997).

#### **2.1.1.2. Cultivar Paluma**

Originou-se através da polinização aberta da variedade Rubi-Supreme, pelo programa de melhoramento genético da UNESP/FCAV de Jaboticabal, São Paulo.

É uma variedade de boa produtividade (acima de 50 t /ha), vigorosa, de crescimento lateral e com boa tolerância à ferrugem. É utilizada in natura e na industrialização de sucos, compotas e marmelada.

Possui fruto grande, acima de 200 g, piriforme com pescoço curto. Os frutos maduros possuem poucas sementes, casca lisa e amarelada, polpa vermelha intensa, firme e espessa. Seu Brix é de aproximadamente 10° e acidez equilibrada, é a mais cultivada no país, sendo distribuída por todas as regiões de cultivo (Pereira, 1995; Kavati, 1997).

## 2. 2. Ferrugem da Goiabeira

As ferrugens (Urediniomicetes, Basidiomycota) incluem mais de 100 gêneros fúngicos e cerca de 7000 espécies. *Puccinia* é gênero com maior número de espécies conhecidas, com aproximadamente 4000 espécies (Voagele, 2005).

A espécie *Puccinia psidii* Winter, agente etiológico da ferrugem da goiabeira (*Psidium pomiferum* L. = *Psidium guajava* L.) é originária da América do Sul, sendo encontrada até o sul dos Estados Unidos. A importância dessa ferrugem tem aumentado muito com o cultivo de espécies de mirtáceas frutíferas, hoje economicamente importantes, como a goiaba (*Psidium guajava* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha*, Cambess), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] Berg), o araçá-boi (*Eugenia stipitata* MC Vaugh) dentre outras, as quais são cultivadas e utilizadas pela indústria na produção de sucos, doces, geléias e bebidas destiladas (vinhos) e licores.

A ferrugem das mirtáceas foi descrita pela primeira vez por George Winter, em material coletado por Ernest H. G. Ule, no Estado de Santa Catarina, Brasil. Sabe-se que seus hospedeiros classificam-se predominantemente na família botânica Myrtaceae, de onde provém o nome de ferrugem das mirtáceas (Figueredo, 2001).

Em decorrência de pertencer a um grupo de organismos biotróficos é do hábito de muitos micólogos de designar espécies novas com base no hospedeiro, *P. psidii* tem pelo menos 11 sinônimos telemorfos e nove anamorfos, dos gêneros *Caeoma*, *Uredo* e *Aecidium*, sendo que *Caeoma eujeniarium* Link seria o nome anamórfico mais antigo.

*P. psidii* é considerada uma ferrugem de ciclo incompleto, pois não se conhece o estágio de picnio, mas somente são conhecidos os estágios de écio (I II), urédia (II), télia (III) e basídio (IV) (Mac Lachlam, 1938, citado em Rocabado; 1998; Ferreira, 1983; Ferreira, 1989; Figueiredo *et al.*, 1984). Teleosporos já foram encontrados em alguns hospedeiros, dentre os quais jambeiro (*Syzygium jambos*), jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e eucalipto (Ferreira, 1989).

Segundo Ruiz *et al.* (1989), as infecções de *P. psidii* em folha de eucalipto sob condições controladas é favorecida por temperaturas amenas (entre 20 e 25° C), com molhamento foliar ótimo de 24 h, sob escuro contínuo. No entanto, a inibição da esporulação e a redução da germinação do patógeno ocorrem em temperaturas iguais ou menores que 15° C e iguais ou maiores que 30° C.

Em relação à produção de uredíniosporos em condições de viveiro, mudas de jambeiro apresentaram produção a partir de 5 até 15 dias após inoculação com temperaturas mínimas médias de 22° C (Coutinho e Figueredo, 1984). Em mudas de eucalipto a produção de soros urediniais é favorecida a temperaturas em torno de 20° C (Ruiz *et al.*, 1989) e a maior intensidade da doença foi registrada nos períodos de 8 h diárias consecutivas com umidade relativa superior a 90% e temperaturas médias entre 15 e 25 ° C. Na ausência destas condições não se observou incidência da doença (Carvalho *et al.*, 1994 e Ruiz *et al.*, 1989).

Em algumas plantas as partes mais afetadas são as folhas jovens e em outras os sintomas foliares são insignificantes, sendo apenas os botões e frutos intensamente afetados, como é o caso da goiabeira.

Na goiabeira, a ferrugem caracteriza-se por incidir em órgãos novos em desenvolvimento, tais como folhas, botões florais, frutos e ramos, com importância preponderante em botões e frutos novos nas plantas adultas no campo. Perdas diretas de 70 a 90% da produção de frutos por abortamento foram observada em em pomares adultos na ausência de controle químico no Norte Fluminense (Silveira *et al.*, 1997; Rocabado, 1998; Junqueira e Costa, 2002).

### **2.3. Interações superficiais na infecção de plantas por ferrugens**

O processo infectivo na maioria das ferrugens ocorre com o desenvolvimento de estruturas especializadas dos esporos até que se estabeleça

a relação parasítica com o hospedeiro. Essa relação divide-se em: fase de reconhecimento, fase de sinalização e fase parasítica (Voegelé, 2005).

A fase de reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro compreende os eventos de pré-penetração, que incluem a adesão e germinação dos esporos, o alongamento do tubo germinativo, a formação de apressório e “peg” de penetração.

A adesão (attachment) é considerada pré-requisito essencial durante a patogênese de fungos (Nicholson e Epstein, 1991), podendo ocorrer através da liberação de materiais adesivos produzidos pelo patógeno de forma passiva ou ativa. Uredinioporos devem ser depositados sobre a superfície do hospedeiro e ficarem aderidos a esta, como requisito prévio ao reconhecimento entre planta e patógeno, possibilitando o desencadeamento dos eventos sucessivos durante a pré-penetração.

A germinação do esporo é um evento importante no ciclo de vida da maioria dos fungos, como também no controle de doenças. Na germinação de urediniosporos em ferrugens, as características topográficas da superfície do hospedeiro como textura, dureza e carga elétrica possuem grande influência por funcionarem como sinais ativadores aos eventos de diferenciação das estruturas de infecção (Allen *et al.*, 1991).

Em *Puccinia hordei* Otth, o tubo germinativo cresce orientado longitudinalmente pelas células epidérmicas, até que ao encontrar um estômato, cessa seu crescimento e desenvolve o apressório diretamente sobre a abertura estomatal, o que demonstra a influência das características topográficas da superfície do hospedeiro no processo inicial de penetração (Littlefield e Heath, 1979; Hoch *et al.*, 1987).

Estudando estímulos topográficos em esporos, Patto e Nicks (2001) e Caver *et al.* (1990) mostraram que a espessura da camada de cera epicuticular na superfície foliar de espécies de *Lolium spp.* pode influenciar na germinação de *Blumeria graminis*. Da mesma forma, Rubiales *et al.* (2001) mostram que camadas espessas de cera sob os estômatos das folhas em espécies de *Hordeum vulgare* fizeram com que esporos de ferrugem não germinassem na direção desses estômatos e os tubos germinativos que encontravam os estômatos não formassem apressório.

Para a diferenciação do apressório, assim como nas etapas anteriores, é necessário o reconhecimento da superfície hospedeira pelo patógeno. Esse evento dependerá do arranjo de ceras na superfície do hospedeiro (Wynn e Staples, 1981) e da habilidade do patógeno em degradar cera epicuticular (Maheshwari *et al.*, 1967). Em estudos da resistência à ferrugem em frutos de goiaba, Rocabado (2003) aventou sobre provável relação entre a quantidade de ceras epicuticulares com a germinação de urediniosporos de *P. psidii*. Segundo o autor, a cv. Rica (resistente) é caracterizada por possuir uma maior quantidade e diversidade micromorfológica de ceras epicuticulares em relação à cv. Paluma (suscetível), o que poderia influenciar o baixo percentual germinativo dos urediniosporos na superfície dos frutos da cultivar resistente.

Outro fator relevante no desencadeamento dos eventos de pré-infecção são as propriedades hidrofóbicas da superfície dos hospedeiros. Essas propriedades funcionam como fator de patogenicidade, uma vez que permitem ao esporo uma maior habilidade em se fixar na superfície do hospedeiro, favorecendo o processo de infecção (Nicholson e Epstein, 1991).

A relação entre os eventos de pré-infecção de patógenos e a hidrofobicidade da superfície do hospedeiro tem sido estudada em várias espécies. Clement *et al.* (1994) afirmam ser a interação hidrofóbica entre a cutícula do feijoeiro e o urediniosporos de *Uromyces viciae-fabae* o fator mais importante na interação deste patossistema, uma vez que durante o estágio inicial de infecção a superfície de contato entre urediniosporos e cutícula é mediada por estruturas semelhantes a pequenos espinhos, que emergem da superfície do esporo. Assim, os urediniosporos maximizam as chances de contato com a superfície foliar (Mendgen, 1996), vencendo a barreira física das protuberâncias da cutícula e cristais de cera. Hamer *et al.* (1988); Howard *et al.*, (1991); Kumar e Sridhar (1987) e Lee e Dean, (1994) afirmam existir correlação entre hidrofobicidade e adesão de conídios de *Magnaporthe grisea*, embora evidências tenham sugerido não haver uma especificidade deste patógeno entre superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas na diferenciação do tubo germinativo e formação de apressório nesse patossistema (Bourett e Howard, 1990; Jelito *et al.*, 1994; Uchiyama *et al.*, 1979 e Xiao *et al.*, 1994). Hegde e Kolattukudy (1997) também observaram indução na germinação do esporo e formação de apressório em conídios de *Magnaporthe grisea* na ausência de superfície hidrofóbica. Burnlage

*et al.* (1991) mostraram que conídios de *Colletotrichum musae* tiveram melhor aderência em substrato hidrofóbico que em substratos hidrófilico.

De acordo com Robert *et al.* (1993), conídios de *Botrytis cinera* tiveram uma adesão eficiente tanto em cutícula de tomate como em substratos artificiais hidratados. Neste caso, a adesão foi inibida na presença de detergentes iônicos e não iônicos, de forma que a variação de hidrofobicidade dos substratos teve uma relação direta entre o ângulo de contato da água na superfície e a porcentagem de adesão.

Xavier (1997) sugeriu que propriedades físicas da superfície das folhas de plantas de *Eucalyptus* de diferentes idades, como sua hidrofobicidade e constituição química (derivados químicos cuticulares e celulósicos) poderim influenciar a germinação de *P. psidi*.

No patossistema *P. psidii* x *P. guajava*, a adesão dos esporos na superfície de frutos inoculados pode estar relacionada a hidrofobicidade da superfície dos frutos, embora outros fatores como característica morfológica do esporo (apêndices espiculados) e a forma de inoculação também tenham sido citados como fatores influenciáveis à adesão (Rocabado, 2003).

Oh *et al.* (1999) mostram que a infecção específica em frutos de pimenta verde por *C. gloesporioides*, comparados com os de frutos vermelhos, pode estar relacionada com as ceras epicuticulares da superfície desses frutos.

As formas de penetração de alguns patógenos, incluindo fungos, são variadas. Alguns usam meios mecânicos, geralmente acompanhados por secreções enzimáticas para romper as camadas protetoras (cutina e parede celular). Por exemplo, *Nectria haematococca* causador da podridão em raiz de ervilha é um patógeno que possui o gene da cutinase para degradação da cutina no processo de penetração (Stahl e Schafer, 1992).

Estudos sobre anticorpos e inibidores químicos, sugerem que a cutinase é essencial para patogenicidade de fungos. Esporos de fungo colocados em caule de ervilha na presença de um anti-corpo de cutinase ou inibidores de hidrolase de serina, como disopropil de fluoril fosfato, inibiram o processo de infecção (Chasan, 1992).

Outros patógenos são capazes de penetrar somente através de aberturas já existentes na planta (como feridas, onde as barreiras já tenham sido quebradas). Neste caso, podemos citar *Phakospora pachyrhizii* Syd em soja

(Marchetti, 1975, citado em Rocabado, 2003) e *Ravenelia humphreyana* P. Henn. em *Cesalpinia pulcherrima* (Littlefield e Heath, 1979, citado em Rocabado, 2003), *Puccinia striiformis* f. sp. tritici em trigo ( Mares and Cousen, 1977; Vallavieille-Pope *et al.*, 1995, em Feng *et al.*, 2008)

#### **2.4. Barreiras estruturais pré-formadas de plantas à patógenos**

Didaticamente, os mecanismos de defesa das plantas, bioquímicos e estruturais, são divididos em pré-formados e pós-formados.

Os mecanismos pré-formados ou estruturais ocorrem independentes da presença do patógeno e são transmitidos por herança, agindo na planta como defesas físicas que evitam ou restringem o desenvolvimento de tais patógenos (Pascholati e Leite, 1995). Como exemplos, podem ser citados a cutícula, os tricomas, os estômatos e fibras nos feixes condutores.

Alguns patógenos, durante o processo de infecção, penetram no tecido do hospedeiro pelos estômatos, como ocorre com a maioria das ferrugens. Assim, a morfologia estomática, o período de abertura e quantidade dos estômatos podem contribuir para a suscetibilidade ou resistência do hospedeiro a doenças do tipo ferrugens (Agris, 2005).

Os estômatos são circundados por células epidérmicas, as quais podem funcionar como sinais topográficos para respostas aos eventos de pré-penetração. Tal afirmação é apoiada por Wynn (1976), ao mostrar que o crescimento direcionado do tubo germinativo da ferrugem de feijão, em *Phaseolus*, só ocorre na junção das células epidérmicas, no rumo da parede anticlinal.

A presença das células epidérmicas ao redor dos estômatos, também influenciam a entrada de água na câmara sub-estomática e a formação do filme de água na superfície do hospedeiro, favorecendo a adesão do patógeno (Pascholati e Leite , 1995).

Os patógenos, ao encontrarem o estômato, normalmente param de crescer e penetram diretamente pelo poro estomatal ou desenvolvem apressório penetrando na folha (o que ocorre na maioria das ferrugens) (Niks e Rubiales, 2002). Em geral, quanto menor eficiência o patógeno apresentar em encontrar o

estômato, menor a possibilidade de penetrar no hospedeiro, uma vez que o patógeno estará efetuando maior gasto energético no alongamento do tubo germinativo, diminuindo as chances de colonizá-lo (Niks,1990). Essa afirmação corrobora com os estudos feitos por Sillero e Rubiales (2002), mostrando a ineficiência de *Uromyces-fabae* em encontrar o estômato e efetivar a penetração. Eles afirmam que, geralmente, 50% dos tubos germinativos encontram um estômato e que esta baixa taxa é explicada, em parte, pelo fato de 20% dos esporos germinarem e formarem apressório distante dos estômatos.

Na maioria das dicotiledôneas, os estômatos são espalhados sobre a superfície das folhas aleatoriamente na base adaxial como abaxial da folha (Appezato e Guerreiro, 2003). A localização e a densidade dos estômatos influenciam a eficiência da infecção. Esta relação foi confirmada em *Phaseolus* por Wynn (1976), ao relacionar a baixa formação de apressório de *Uromyces appendiculatus* na face abaxial das folhas, a qual apresentava menor densidade de estômatos em relação à face adaxial.

Outro exemplo de fatores estruturais de resistência são os tricomas. Tricomas são apêndices de origem epidérmica presentes em qualquer órgão vegetal, de forma permanente ou efêmera (Appezato e Guerreiro, 2003).

Os tricomas mais comuns envolvidos na resistência a patógenos são os pêlos, em função do seu número por área de tecido, os quais podem interferir na molhabilidade da superfície do hospedeiro e, conseqüentemente, na germinação dos esporos (Pascholati e Leite, 1995). Outro efeito dos tricomas é a possibilidade de manterem os esporos fora do alcance da superfície das folhas, reduzindo as chances de o tubo germinativo encontrar o sítio de penetração (Niks e Rubiales, 2002), como mostrado na cv. de soja Bragg. O tubo germinativo da ferrugem da soja não entrou em contato com a superfície das folhas devido aos tricomas alongados, característicos da cultivar (Wynn,1976).

Dentre os mecanismos citados como pré-formados estruturais ou constitutivos estruturais, o interesse deste trabalho compreende mais precisamente a cutícula e os componentes químicos epicuticulares contido na mesma.

## 2.5. Epiderme e cutícula

A epiderme é uma (ou mais) camada de células parenquimatosas, originada da protoderme, que reveste externamente das plantas. Suas células variam em forma e tamanho, contudo estão sempre formando uma camada compacta, desprovida de espaços intercelulares, e, geralmente, aclorofiladas (Cutter, 1987).

A principal função da epiderme é de revestimento. A disposição compacta das células, assim como a espessura e rigidez da parede externa das células epidérmicas pode dificultar ou mesmo impedir a penetração direta dos patógenos e a ação de choques mecânicos, além de restringir a perda de água (Apezato e Guerreiro, 2003).

Plantas com estas características são resistentes, embora, se o patógeno for introduzido no interior da planta através de ferimentos poderá ser facilmente colonizada (Agris, 2005).

Nas partes aéreas das plantas, as células epidérmicas apresentam uma cutícula, formada por incrustação da cutina em sua parede periclinal externa. Essa cutícula é uma das principais aquisições evolutivas das plantas terrestres, pois lhes possibilitou a redução na perda de água para a atmosfera (Mauseth, 1988).

Para que um patógeno tenha sucesso na infecção do hospedeiro, esse tem que atravessar primeiro sua camada de cutícula externa e a sua parede celular.

A cutícula age como a primeira barreira protetora revestindo toda epiderme, os pêlos, escamas e estômatos. A primeira função fisiológica da cutícula da planta é de prevenir o ressecamento do tecido pela atmosfera minimizando a perda de água pelo estômato (Rieder e Schreiber, 1995; Kerstiens, 1996).

A cutícula foi descrita e denominada pela primeira vez por Brogniart (1830), sendo essa uma matriz de poliéster com ácidos graxos de cadeia longa (C16 e C18) (Kunst *et al.*, 2003), de cor creme, resistente aos ácidos minerais fortes, mas rapidamente atacável por solução alcoólica de álcali. Na sua superfície, ou no seu interior, pode haver depósitos de sais em forma de cristais, borracha, resina e óleos. O uso moderno da palavra “cutícula”, que significa: “filme superficial formado pelas camadas externas cutinizadas das paredes superficiais das células

epidérmicas” da planta (sensu A.P. de Candolle, 1827, citado por Rieder, 2006), designa uma membrana extracelular contínua e não uma camada celular.

Ao seu processo de formação denomina-se de cuticularização. Em muitas plantas, a cutícula propriamente dita está separada da parede celulósica por uma camada de pectina, que provavelmente corresponde à lamela média da parede periclinal externa das células (Appuzzato e Guerreiro, 2003).

Como principais funções fisiológicas atribuídas a cutícula das plantas, pode-se citar: i – controle da transpiração, ii – controle da perda de água e aquisição de solutos polares, iii – controle da troca de vapores e gases, iv – transporte de substâncias lipofílicas, v – repulsão de água e partículas (hidrofobicidade), vi – atenuação de radiação fotossintética ativa e UV, vii – interfase para interações bióticas (Rieder, 2006). Esta superfície também possui importância ecológica e fitopatológica, sendo a primeira barreira oferecida à infecção por organismos.

A espessura da cutícula nem sempre apresenta correlação positiva com altos níveis de resistência. Os patógenos produzem enzimas cutinases e hidrolases da parede celular, tais como pectinases, celulases, xilanases e poligalacturonases (PGs), capazes de atacar os diversos polímeros da parede celular e da cutícula. Por outra parte, a partir da ação destas enzimas são produzidos fragmentos da parede celular, particularmente oligômeros do ácido galacturônico, que podem atuar como elicitores secundários dos mecanismos de defesa ou amplificando as reações de defesa originais da planta contra patógenos (Balardini, 2005).

Como a cutícula possui componentes hidrófobos (cera), semi-hidrófobos (cutina) e hidrófilos (pectinas e celulose), a penetração de substâncias predominantemente polares ocorre através das pectinas e das não-polares ou predominantemente não-polares, através das ceras e da cutina (Devine *et al.*, 1993). Contudo, como já mencionado, diversos patógenos possuem ou são capazes de usar diversas enzimas durante a penetração direta de cutículas vegetais.

Todavia, a distribuição de constituintes químicos na cutícula mostra que a mesma não é uma camada homogênea e que a sua superfície externa é altamente lipofílica, tornando-se mais hidrofílica interiormente (Devine *et al.*, 1993).

### 2.5.1. Cutina

A cutina é o componente polimérico estrutural da cutícula de todas as partes aéreas da planta, exceto a periderme (Espelie *et al.*, 1980, citado em Kolattukudy,1981), com aparência amorfa ou em alguns casos lamelar (Olesen 1979, citado em Kolattukudy,1981).

A cutina é composta principalmente de ácidos alifáticos saturados, hidroxilados saturados, geralmente uma mistura de homólogos de C16 a C18 (Stark e Tian, 2006). O componente predominante é o ácido 10, 16 - dihidroxipalmitico e/ou seu isômero posicional do grupo hidroxil C-9, C-8 ou C-7 (Kolattukudy,1981).

A cutina é insolúvel em solventes orgânicos. Quimicamente, é constituída por ácidos graxos hidroxilados, unidos entre si por ligações de éteres. Os ácidos graxos hidroxilados também denominados "ácidos da cutina" formam 80 % do complexo cutínico. Sua estrutura química ainda não está perfeitamente definida, mas seus produtos de decomposição e hidrólise geralmente apresentam dois ou mais grupos reagentes, capazes de esterificar ou eterificar (ácidos dicarboxílicos e hidroxicarboxílicos) (Mauseth,1988).

Quimicamente, a cutina é definida como um composto de lipídios (poliésteres insolúveis) de alto peso molecular, resultante da polimerização de certos ácidos graxos produzidos, aparentemente, no retículo endoplasmático do protoplasma das células epidérmicas (Mauseth,1988).

A estrutura molecular da cutina é uma rede formada por hidroxi-ácidos graxos e ácidos dicarboxilícos, ligados entre si por pontes de éster, éter e peróxidos.

### 2.5.2. Ceras

A terminologia que descreve a cera em superfície de plantas foi definida pela primeira vez em um trabalho de Martin e Juniper em 1970 (Baker, 1982), em que a camada de cera foi chamada de " membrana cuticular " e caracterizada como uma mistura complexa de lipídios não-polares.

As ceras vegetais compreendem duas camadas separadas dentro da cutícula. Uma porção interna, caracterizada por cera intracuticular associada com uma matriz de poliéster de cutina. E outra, uma camada contínua localizada na superfície, sendo esta última denominada de cera epicuticular (Jeffree, 1996). Sua estrutura é formada por cristais de cera que revestem a camada amorfa da superfície de várias plantas, dando-as um aspecto cinzento (Post-Beittenmiller, 1996).

Essas estruturas são formadas por um filme relativamente fino de material epicuticular sobre a superfície da cutícula. Tais cristais epicuticulares exibem uma gama extensiva de formas, como plaquetas, tiras, rosetas, varetas, entre outros (Bartholott *et al.*, 1998).

De acordo com Post-Beittenmiller (1996), a cera cuticular é uma mistura de vários compostos, como os ácidos graxos de cadeias longas, aldeídos graxos, álcoois primários e secundários, cetonas e ésteres.

Através da extração de tecidos contendo ceras epicuticulares, Silva Fernandes *et al.* (1964); Baker & Procopiou (1975), citados por Terhune e Hoch (1993), obtiveram compostos alifáticos de cadeias longas, várias porções de triterpenóides, esteróis ou fenóis.

Motta (2000) sugeriu que os ésteres e álcoois de cadeia longa são constituintes proeminentes das ceras, podendo esses, serem resultantes da combinação dos ácidos graxos livres com o álcool primário formado pela redução do acil ou pela descarboxilação de ácidos graxos longos, com produção de aldeídos, álcoois secundários, alcanos e cetonas.

A proporção destes compostos difere entre as espécies de plantas, entre os diferentes tecidos de uma única planta, sua fenologia como também entre as condições climáticas (Poste-Beittenmiller, 1996).

A constituição química das ceras epicuticulares possui uma relação com a sua morfologia e ultraestrutura (Baker, 1982). Desse modo, a variação desses compostos químicos contribuirá na formação de estruturas morfológicas distintas do tipo cristalina e amorfa como: hidrocarbonetos e álcoois primários que se cristalizam em forma de placas; álcoois secundários, cetonas e betadicetonas em túbulos. Já os triterpenóides e ésteres originam estruturas amorfas (Reina, 1982). Apoiando a afirmação, Holloway *et al.* (1977) mostram cristais epicuticulares na superfície de folhas de ervilha (*Pisum sativum*) em forma de placas contendo

álcoois primários, possibilitando a caracterização qualitativa de compostos individuais na superfície epicuticular das plantas.

A interação entre ceras epicuticulares e resistência a doenças tem sido mostrado em vários patossistemas. Ceras epicuticulares são as primeiras barreiras encontradas pelos fungos fitopatogênicos nos processos iniciais de infecção (Stockwell e Hanchey, 1985).

De acordo com Prusky *et al.* (1991) e Bailey *et al.* (1992), essa interação está relacionada a respostas aos sinais químicos nos processos iniciais de infecção. Esses pesquisadores relataram que ceras da superfície de frutos de abacate promoveram o processo de germinação e diferenciação em conídios de *Colletotrichum gloesporioides*.

Sabe-se que substâncias químicas presentes nos esporos com ação auto-inibidoras da germinação podem sofrer reversão na sua atividade em presença de compostos químicos epicuticulares. Este efeito estimulatório foi atribuído ao hidrocarboneto hentrocontano, extraído de compostos epicuticulares de folhas de jambo (*Syzygium jambos*), sobre a germinação de *P. psidii*. (Tessmann e Dianese, 2002).

Os compostos que estimulam germinação de uredíniosporos incluem álcoois gordurosos, aldeídos, cetonas, hidrocarboneto lineares saturados e não saturados, derivado de isopropanos, compostos cíclicos, ésteres voláteis, sulfetos, tiocianetos, nitritos, amins e amidos, derivados de não voláteis como 1,9 - nanonedial solúvel em água, octil de sódio (French e Gallimore, 1971; Charudattan *et al.*, 1981; French, 1992), assim como octadecanol e outros componentes encontrados em ceras epicuticulares (Jellitto *et al.*, 1994).

Rocabado (2003) sugeriu que a presença de ceras epicuticulares na superfície de frutos de goiaba pode estar relacionada com fator de resistência ao observar diferenças quantitativas na germinação e formação de apressório de *P. psidii* entre frutos de cultivar suscetível (Paluma) e resistente (Rica). No mesmo estudo, o autor evidenciou diferenças na quantidade de ceras epicuticulares da superfície de frutos das mesmas cultivares, mostrando que na cultivar resistente a quantidade de ceras epicuticulares é maior que na cv. suscetível.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção e manutenção do inóculo**

Uredíniosporos de *P. psidii* foram coletados em pomares comerciais de goiabeira no município de São Francisco de Itabapoana – RJ. Foram armazenados em frascos de penicilina embutidos em um recipiente de vidro ou plástico hermeticamente fechado, contendo sílica granular (câmara seca), a 8º C, por no máximo 60 dias.

#### **3.2. Obtenção de extratos de ceras epicuticulares**

Os extratos epicuticulares foram obtidos, a partir de frutos de 2 e 4 cm de goiabeira das cultivares Rica e Paluma (resistente e suscetível à ferrugem respectivamente).

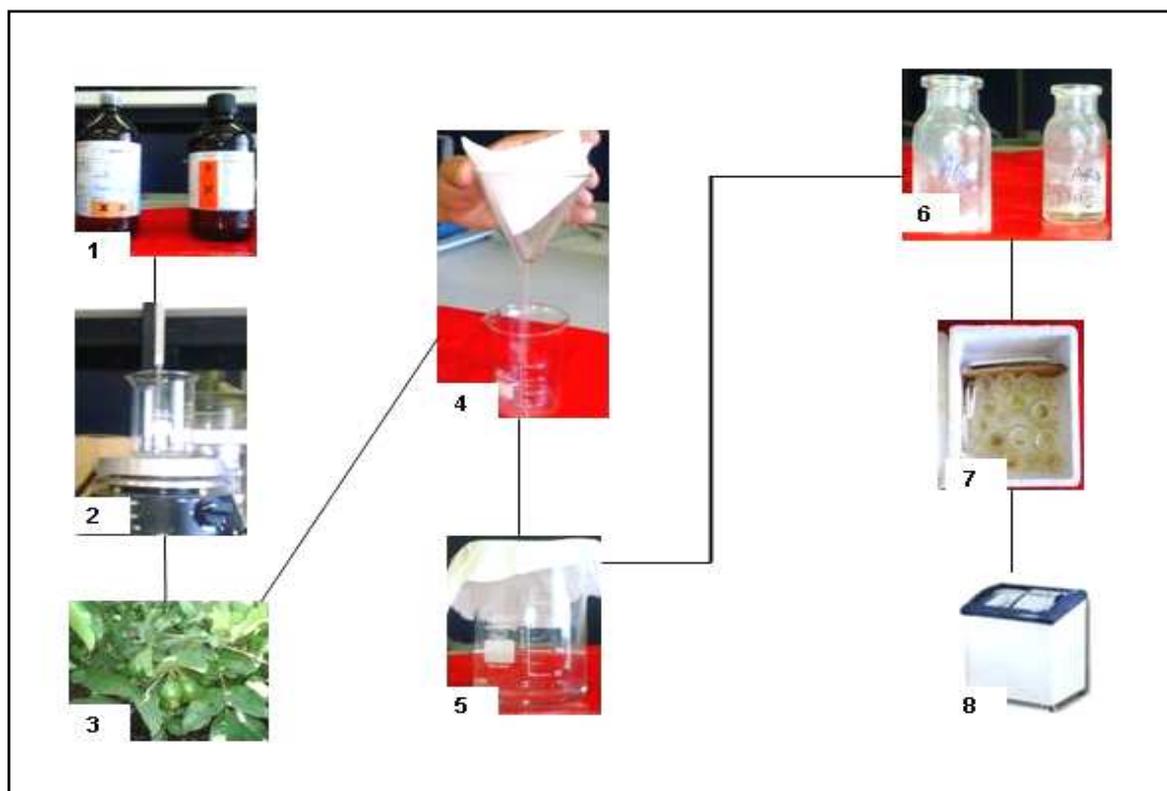
Os frutos foram coletados em cinco árvores de cada cultivar tendo em média seis frutos para cada tamanho e por cada árvore, totalizando duzentos e quarenta frutos por coleta e cultivar. Ao total foram feitas seis coletas. Tais frutos foram lavados em água corrente, secados em temperatura ambiente, pesados em balança de precisão e medidos com paquímetro.

No intuito de se obter diferentes compostos epicuticulares e para se estudar seus efeitos na germinação dos uredíniosporos, foram testados cinco

solventes orgânicos de diferentes polaridades: clorofórmio (média polaridade), acetona (polaridade média), diclorometano (baixa polaridade), metanol (polaridade média).

A análise da relação quantidade de extrato por unidade de fruto foi feita em três repetições para cada extrator. Para a extração dos compostos epicuticulares, os frutos foram lavados, um por vez com cada extrator, por 30 a 60s a temperatura de 50°C. Após a extração, a solução (extrato+solvente) foi filtrada com papel-filtro autoclavado e deixada à temperatura ambiente até que o extrator evaporasse por completo (Figura1).

Ao final da evaporação, retirou -se o resíduo sólido do recipiente, o qual foi pesado em balança de precisão e armazenado em vidros de penicilina hermeticamente fechados em caixa de isopor, a temperatura de 8°C (Figura1).



**Figura 1.** Diagrama da metodologia para obtenção de extratos de ceras epicuticulares de frutos de goiaba. (1) Solventes utilizados na extração. (2) Placa para aquecimento do solvente a temperatura de 560 C. (3) Frutos a serem banhados pelo solvente aquecido por 30 e 60 min. (4) Solução (solvente + cera) da extração sendo filtrada em papel filtro. (5) Solução (solvente + cera) em temperatura ambiente para evaporação do solvente. (6) Extrato sólido de cera epicuticular de fruto de goiaba armazenado em frasco de penicilina após evaporação do solvente. (7 e 8) Frascos de penicilina contendo extratos sólidos de ceras epicuticulares de frutos e goiaba em caixa de isopor para armazenamento em geladeira, a 8 °C.

### 3.3. Caracterização química dos extratos obtidos

Para a identificação dos compostos químicos contidos nos extratos epicuticulares, as amostras foram dissolvidas na proporção de 0,4 mg de cada extrato em acetona-d<sub>6</sub> (deuterado) e caracterizadas por espectroscopia unidimensional (1D) a partir de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de <sup>1</sup>H (Ressonância de prótons) e analisadas no software Delta Eclipse+ 400, no Laboratório de Ciências Químicas – CCT – UENF. Foram analisadas as amostras

de extrato feito com clorofórmio e acetona devido à baixa quantidade de cera epicuticular extraída pelos outros solventes.

### **3.4. Efeito de diferentes suportes sobre germinação de urediniosporos de *P. psidii***

Uma vez que urediniosporos de *P. psidii* apresentam limitações de germinação in vitro, foram testados, como substrato de germinação, dois diferentes filmes de papel, celofane e paleofane, de diferentes texturas. Depois de esterilizados, os filmes foram postos sobre meio de agar-água 2% em placas de Petri, para que se mantivessem úmidos. Foram postos três filmes (de cada suporte testado) por placa, com três repetições ou placas.

Os filmes foram semeados com suspensão de  $10^4$ /ml de urediniosporos em óleo mineral e em água destilada. As placas foram postas em câmara úmida no escuro, durante 24h, com temperatura de 22°C. Decorridas 24h, as placas foram levadas ao microscópio para observação do percentual de germinação (Figura 4). Para a contagem de germinação sob aumento de 200 x, os filmes foram divididos em cinco campos visuais, nas quais foram contados trinta urediniosporos, tendo um total de 150 urediniosporos observados/filme. Para o cálculo da percentagem de germinação utilizou-se a fórmula: % germinação = (nº de urediniosporos germinados/total do nº de urediniosporos) x 100. Consideraram-se esporos germinados aqueles com tubo germinativo maior que seu comprimento.

### **3.5. Efeito dos extratos epicuticulares sobre germinação de urediniosporos de *P. psidii* in vitro.**

Os extratos de cera foram ressuspensos em óleo mineral (Vetec, 99,9%; 1mg de extrato em 2 ml de óleo) e homogeneizados por 10 min em sonicador Branson Sonifier, modelo 450. Após homogeneizados, obtiveram-se frações de extrato bruto de cera e também efetuou-se a diluição do extrato em nove partes de óleo (Vetec, 99,9%; diluição  $10^{-1}$ ).

Em placas de Petri com agar-água 2%, foram colocados três fragmentos (3 repetições) do suporte que apresentou melhor percentual de germinação (item 3.4). Cada fragmento foi coberto no mesmo instante, com: 1) 12µl de suspensão de urediniosporos em óleo a  $10^4$  esporos/ml e mais 12µl do extrato de cera bruto; 2) 12 µl de suspensão de esporos e 12 µl do extrato de cera diluído dez vezes em óleo mineral (diluição  $10^{-1}$ ). Como testemunha foi utilizada uma placa de petri com três fragmentos do mesmo suporte com 12µl de óleo mineral mais 12 µl da suspensão de urediniosporos em óleo mineral a  $10^4$ /ml. As placas permaneceram em câmara úmida, no escuro, durante 24h. Efetuou-se a contagem de esporos germinados ao microscópio óptico sob aumento de 200 x. O critério de contagem foi o mesmo usado na análise da germinação sob o efeito dos diferentes suportes.

### **3.6. Análises estatísticas**

Os resultados de germinação *in vitro* foram submetidos à análise de variância e comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ), utilizando-se o programa Saeg - Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (Euclides, 1983).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extratos de ceras epicuticulares

Diferenças quantitativas foram evidenciadas no peso seco dos extratos epicuticulares dos frutos de goiaba com 4 cm das cvs. Rica e Paluma. Tais diferenças foram influenciadas pelas variáveis independentes: solventes, cultivares e tempos de extração (Quadro 1).

Frutos das cvs. Rica e Paluma, ao serem banhados durante 60s pelos diferentes solventes testados, apresentaram maior peso seco dos extratos epicuticulares em relação aos frutos banhados durante 30s. Resultado semelhante foi citado por Silva *et al.* (2005) na extração de extratos de pimenta rosa em diferentes tempos, observando que o rendimento dos extratos foi diretamente proporcional ao tempo extração. De acordo Shaidi e Naczki (1995), o tempo de extração afeta consideravelmente a recuperação dos compostos bioativos, aumentando a possibilidade de sua oxidação. Todavia, a extração durante tempos não maiores a 60s visou garantir que a mesma ocorresse a nível epicuticular. A extração entre 30 e 60s não mostrou diferenças quantitativas significativas, demonstrando que a metodologia utilizada garantiu a extração de somente frações de ceras epicuticulares em frutos de goiaba.

**Quadro 1.** Peso seco do extrato de ceras por unidade de fruto de goiaba das cvs. Rica e Paluma. Os extratos foram obtidos com diferentes solventes e tempo de extração de frutos com 4 cm de diâmetro na proporção de 20 mL de solvente por fruto. Os solventes apresentam-se na tabela em ordem decrescente de polaridade.

Cvs.	Extrator	Polaridade (graus)	Tempo extração (seg.)	Peso seco do extrato / fruto (gr)
	Metanol	6,6°	30´	1,40
			60´	2,30
	Acetona	5,4°	30´	2,83
			60´	4,77
Paluma	Etanol	5,2°	30´	0,83
			60´	1,73
	Diclorometano	3,4°	30´	0,83
			60´	1,63
	Clorofórmio	1,7°	30´	0,1
			60´	0,23
	Metanol	6,6°	30´	1,70
			60´	4,00
	Acetona	5,4°	30´	2,77
			60´	6,03
Rica	Etanol	5,2°	30´	1,07
			60´	3,90
	Diclorometano	3,4°	30´	0,60
			60´	1,00
	Clorofórmio	1,7°	30´	0,47
			60´	1,77

Relacionando os diferentes solventes testados, a acetona extraiu maior quantidade de ceras, seguida do metanol, etanol, diclorometano e clorofórmio. De acordo com Tiito (1995) e Marinova e Yanishlieva (1997), citados em Ceppa (2006), diferenças nos potenciais oxidativos e na polaridade dos compostos extratores alteram a capacidade de extração de diferentes compostos, sendo que no caso de ceras, quanto mais apolar for o extrator maior quantidade de ceras podem ser extraídas. Os resultados se aproximam da relação direta entre polaridade do solvente e rendimento do extrato. Contudo, neste estudo, mesmo não sendo a acetona o solvente mais apolar, foi o que resultou em maior

rendimento na extração de ceras. É sugerido que essa inversão esteja relacionada com a coleta e armazenamento dos frutos e a metodologia de extração. Frutos desprotegidos dos raios solares após a coleta podem ter sofrido alguma alteração na composição química da cera epicuticular, como também seu armazenamento por um período acima de 24hs, favorecendo processos oxidativos na composição da cera. Há também a possibilidade da acetona ter maior penetração nas camadas cuticulares da superfície dos frutos de goiaba, promovendo a extração de ceras epi e intra-cuticulares, bem como de outros compostos.

Outra inferência a esse resultado é o maior rendimento no peso seco dos extratos de frutos da cv. Rica comparado ao rendimento no peso seco dos extratos da cv. Paluma, nos diferentes solventes e tempos testados, o que vem apoiar os estudos de Rocabado (2003). Este último autor afirmou haver diferenças quantitativas de ceras epicuticulares entre as cvs. Rica e Paluma, sendo que a cv. Rica apresenta maior quantidade de ceras epicuticulares na superfície dos frutos quando comparada com a Paluma. Xavier (1997), em estudos histológicos na superfície de folhas de eucalipto de diferentes idades, observou a presença de projeções de cera epicuticulares relacionadas com o aumento na idade da folha.

#### **4.2. Caracterização química dos extratos obtidos**

Pela análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em  $^1\text{H}$  (Ressonância de prótons), observou-se similaridade entre os perfis característicos da classe de compostos químicos dos extratos epicuticulares dos frutos adultos (4cm de diâmetro) da cv. Rica e da cv. Paluma, sendo estes: compostos alifáticos, alcenos, alcoóis ligados à hidroxila e compostos aromáticos. Apesar da similaridade entre os grupos, é possível perceber que nos frutos adultos da cv. Rica os grupos alifáticos e aromáticos apresentam-se em maior proporção que os frutos adultos da cv. Paluma. Da mesma forma, ocorreu na análise dos perfis dos extratos epicuticulares de clorofórmio de frutos adultos (4cm de diâmetro) da cv. Rica e cv. Paluma. Neste caso, entretanto, não se observou a classe de compostos aromáticos, para ambos os cultivares.

Entre os perfis de extratos epicuticulares de acetona de frutos novos e adultos da cv. Rica, foi observada diferença nas classes de compostos químicos, assim como na sua proporção. Nos extratos dos frutos novos não houve a presença da classe de compostos aromáticos, apenas a classe dos compostos alifáticos, alcenos e alcoóis ligados à hidroxila. Já, os extratos de acetona de frutos adultos apresentam a classe dos aromáticos e os demais compostos acima citados. A proporção dos compostos entre os extratos de frutos novos e adultos também se diferenciam, de modo que os frutos adultos apresentam proporções maiores que os frutos novos de mesma cultivar.

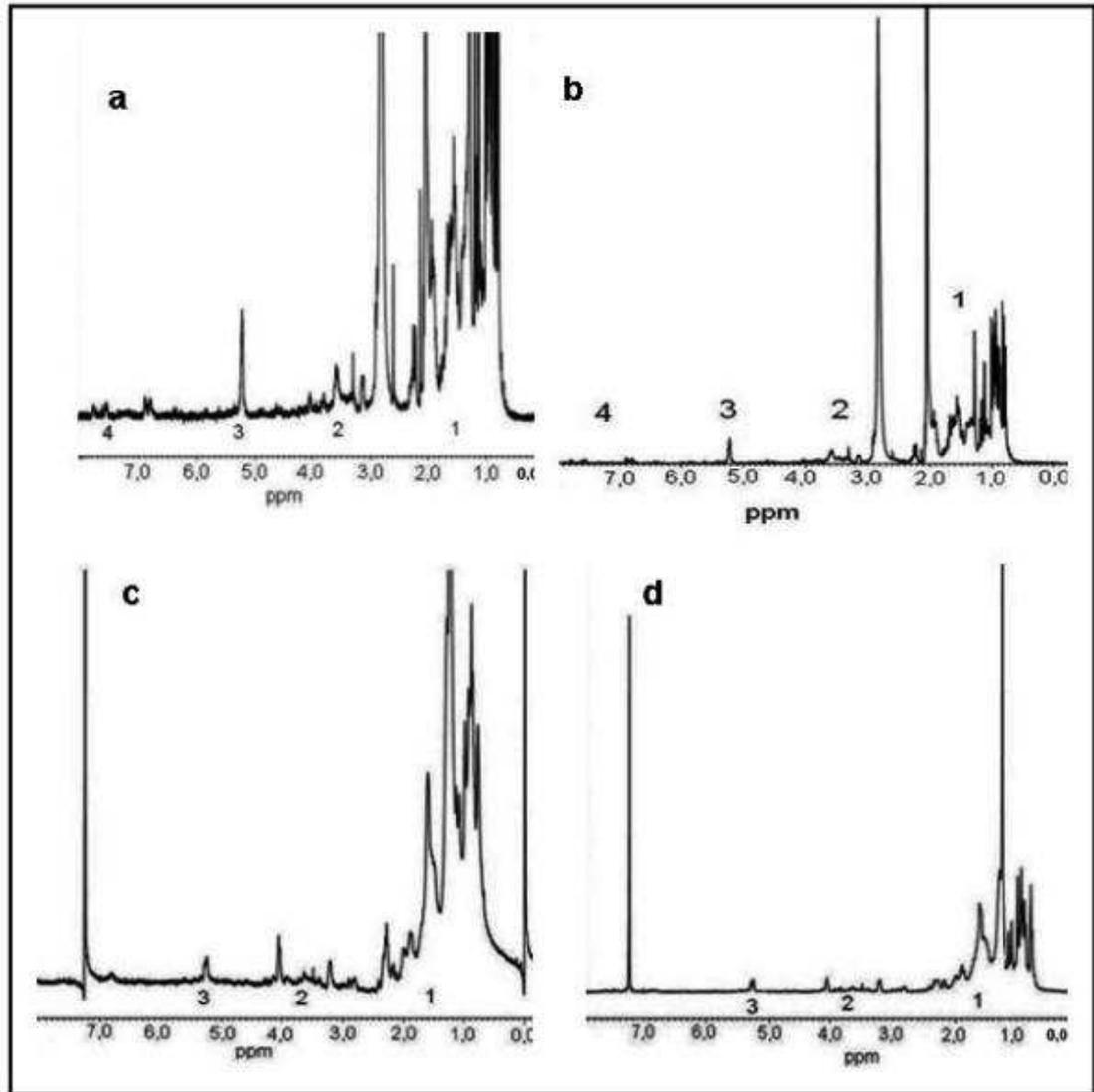
As classes dos compostos alifáticos, alcenos e alcoóis ligados à hidroxila estão presentes tanto nos perfis dos extratos de clorofórmio de frutos novos como no de frutos adultos da cv. Rica. Mas como observado nos extratos de acetona, os compostos de frutos adultos estão em maior quantidade que nos extratos dos frutos novos.

A superfície de cada planta possui como característica uma mistura complexa de muitos componentes hidrofóbicos, contendo compostos alifáticos de cadeias longas, os quais formam as ceras epicuticulares (Kalattukudy *et al.*, 1987). Esta afirmação vem apoiar os resultados obtidos na caracterização por RMN, indicando a presença de compostos alifáticos nos perfis dos extratos analisados, além da presença de alcenos, alcoóis ligados à hidroxila e compostos aromáticos. Chacalis *et al.* (2001) afirmam haver variações qualitativa na composição de ceras epicuticulares entre distintos grupos filogenéticos, espécies e cultivares, bem como em indivíduos com diferentes estádios de crescimento. Essa afirmação contradiz os resultados observados no atual trabalho ao mostrar similaridade qualitativa nos perfis dos extratos epicuticulares de frutos de 2 e 4 cm das cvs. Rica e Paluma. O que se observa é a influencia do tipo de solvente usado na extração dos compostos epicuticulares sobre a diferença qualitativa entre os perfis. É possível que essa similaridade esteja relacionada com o método de extração, com a reação de oxidação de alguns compostos contidos no extrato ou a fatores ambientais (Mc Wroter *et al.*, 1990, citado em Belding *et al.*, 2000).

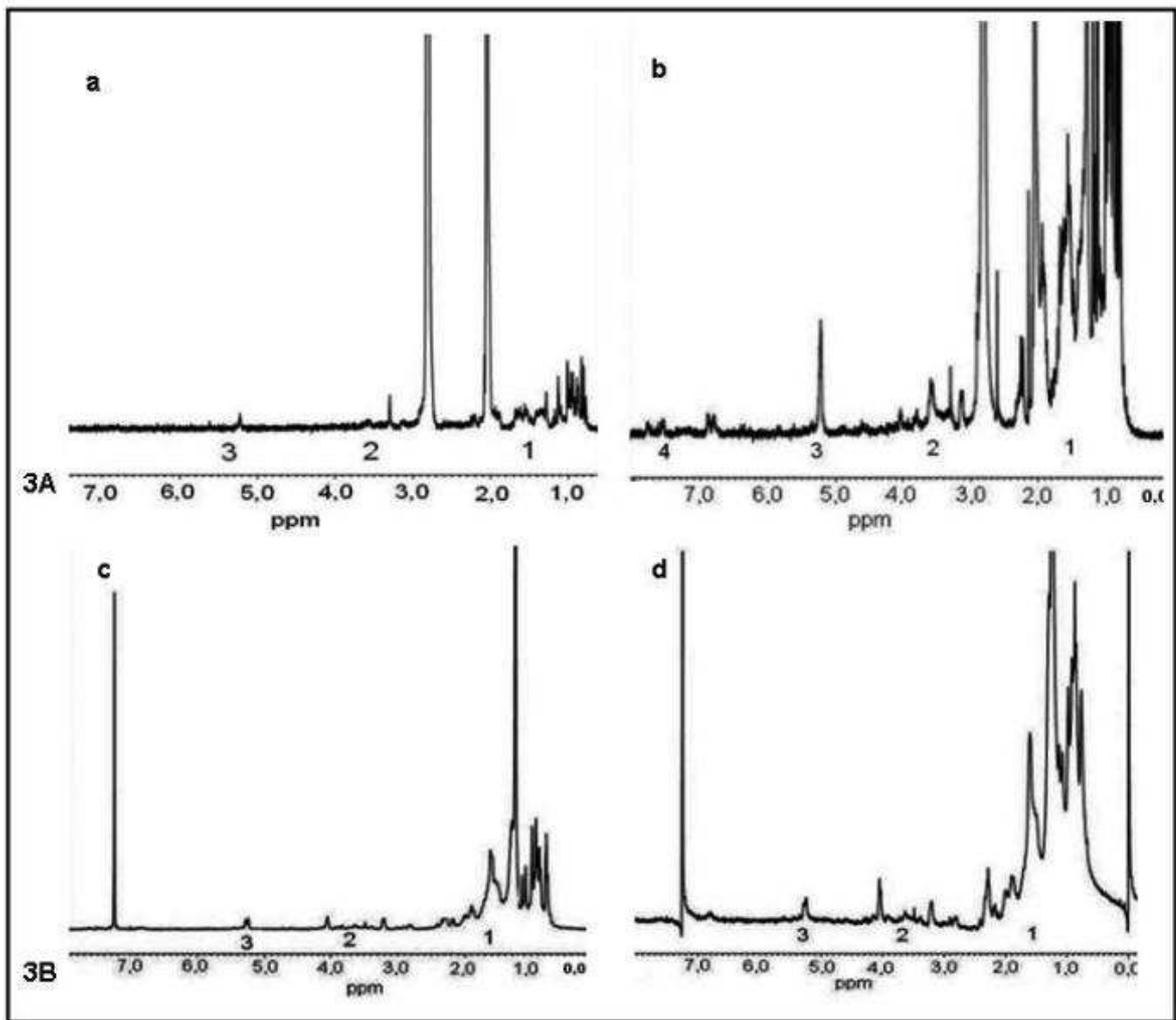
Os resultados observados apoiam mais uma vez o trabalho de Rocabado (2003) e confirmam os resultados das outras análises do atual trabalho relacionando a cv. Rica resistente à ferrugem, uma vez que as classes dos

compostos químicos encontrados nos perfis dos seus extratos estão relacionadas à atividade antimicrobiana conhecidos como compostos metabólicos secundários pré-formados, os quais ocorrem constitutivamente nas plantas funcionando como barreiras químicas contra a infecção de patógenos (Dixon, 2001). Na classe dos alifáticos podemos citar os ácidos graxos, triterpenóides, substâncias lipídicas, derivadas do isopreno com 30 C. Na classe dos aromáticos podemos encontrar os alcalóides e fenóis (Morrissey *et al.*, 1999).

Os outros extratos obtidos com os solventes diclorometano, metanol e etanol não foram caracterizados por RMN devido à quantidade de cera epicuticular ter sido insuficiente para o processamento das amostras. Os extratos epicuticulares com acetona de frutos de goiaba cv. Rica e Paluma com 4 cm de diâmetro mostraram-se constituídos por compostos alifáticos, alcenos e compostos aromáticos (Figura 2). Com base nos resultados de caracterização química (Figuras 2 e 3), pode se questionar seu papel como fatores de resistência diferencial a *P. psidii* na fase de pré-penetração, como observado previamente por Rocabado (2003) e se a resistência da cultivar Rica não seria somente decorrente da constituição química das ceras epicuticulares. Outros mecanismos de resistência ou fatores estariam interferindo na taxa de germinação e na formação de apressórios de *P. psidii* em frutos das cultivares Rica e Paluma e entre frutos de diferentes tamanhos. Entre algumas das características da superfície de plantas que podem estar envolvidas no insucesso de patógenos durante os eventos iniciais de infecção, como a adesão, germinação e formação de apressórios, além do fator ceras epicuticulares, encontram-se as



**Figura 2..** Comparação entre os perfis de  $^1\text{H-NMR}$  dos extratos epicuticulares com acetona e clorofórmio de frutos adultos de goiaba cvs. Rica e Paluma mostrando: Similaridade entre os grupos químicos dos extratos epicuticulares com mesmo extrator, ausência de compostos aromáticos e maior quantidade de compostos alifáticos nos extratos epicuticulares com ambos extratores de frutos com 4 cm de diâmetro nas cultivares resistente (Cv. Rica). (a) Perfil dos extratos epicuticulares com acetona de frutos com 4cm da cv. Rica. (b) Perfil dos extratos epicuticulares com acetona de frutos com 4cm da cv. Paluma. (c) Perfil dos extratos epicuticulares com clorofórmio de frutos com 4cm da cv. Rica. (d) Perfil dos extratos epicuticulares com clorofórmio de frutos com 4 cm da cv. Rica. Legenda: (1) compostos alifáticos, (2) álcoois ligados ao radical hidroxila, (3) alcenos, (4) aromáticos.



**Figura 3.** Comparação entre os perfis de  $^1\text{H-NMR}$  dos extratos epicuticulares com acetona e clorofórmio de frutos novos e adultos de goiaba cvs. Rica e Paluma mostrando: 3A) Diferença dos grupos químicos em extratos epicuticulares com acetona de frutos novos e adultos de goiaba da cv. resistente (Rica) a ferrugem. 3B) Similaridade dos grupos em extratos epicuticulares com clorofórmio de frutos novos e adultos de goiaba da cv. suscetível (Paluma) a ferrugem. 3A e 3B. Maior quantidade de compostos alifáticos nos perfis dos extratos epicuticulares de frutos adultos da cv. resistente (Rica) a ferrugem. (a) Perfil dos extratos epicuticulares com acetona de frutos com 2 cm da cv. Rica. (b) Perfis de extratos epicuticulares com acetona de frutos com 4cm da cv. Rica. (C) Perfil do extrato epicuticulares com clorofórmio de frutos com 2cm da cv Rica. (D) Perfil dos extratos epicuticulares com clorofórmio de frutos com 4cm da cv Rica. Legenda: (1) compostos alifáticos, (2) álcoois ligados ao radical hidroxila, (3) alcenos, (4) aromáticos.

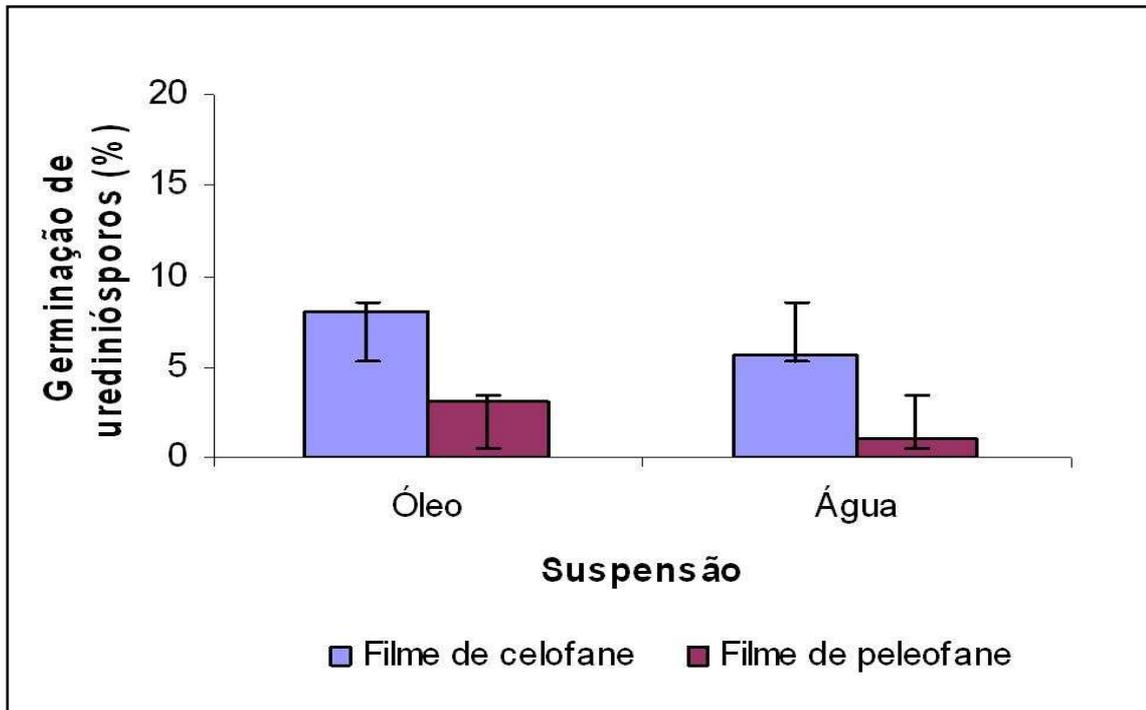
características topográficas da superfície do hospedeiro, molhabilidade, a textura fina e natureza das cutículas, a estrutura das células-guarda e estômatos e os compostos químicos presentes na cutícula (Wynn e Staples, 1981). Deste modo, características da superfície vegetal que não são reconhecidas pelo patógeno, seriam responsáveis por falhas no processo inicial de infecção (pré-penetração). Estas características são consideradas componentes da resistência horizontal, pois as falhas resultantes da interação patógeno-superfície hospedeira resultam na redução da doença. Todavia, novos estudos deverão ser conduzidos para caracterizar melhor os extratos obtidos a partir do solvente etanol, a partir de um maior número de frutos de goiaba, para que se obtenham amostras de ceras em quantidade suficiente para a análise química por RMN.

#### **4.3. Efeito de diferentes suportes sobre germinação de uredíniosporos de *P. psidii*.**

Maior percentual de germinação de uredíniosporos de *P. psidii* ocorreu sobre filme de papel celofane utilizando-se como veículo óleo mineral, quando comparado a filme de paleofane e água como veículo (Figura 4).

O grau de molhabilidade ou hidrofobicidade e sua relação com a adesão e germinação de esporos tem sido o fator mais estudado em vários fungos, incluindo as ferrugens usando-se várias metodologias (Terhune e Hock, 1993). A adesão do esporo à superfície do hospedeiro é uma estratégia essencial do patógeno ao estabelecimento da infecção, uma vez que o fungo e a planta iniciarão uma troca intensa de sinais que promoverá a fase de reconhecimento e, conseqüentemente, à diferenciação das estruturas infectivas.

Sabe-se que não há um mecanismo padrão de adesão de fungos a plantas, embora se considere que o processo ocorra com maior facilidade em superfícies hidrofóbicas tanto artificiais como naturais. Apesar de hidrofóbico, o celofane possui molhabilidade (Kuo e Hoch, 1996, citado em Thines *et al.*, 2004) suficiente para promover a germinação de uredíniosporos de *P. psidii*.



**Figura 4.** Germinação de urediniosporos de *Puccinia psidii* suspensos em óleo mineral e em água destilada, sobre filmes de papel celofane e filme de paleofane.

#### 4.4. Efeito de extratos epicuticulares de frutos de goiaba, em diferentes solventes, na germinação in vitro de urediniosporos de *P. psidii*.

De modo geral, todos os extratos testados inibiram a germinação de *P. psidii* em relação à testemunha, cuja germinação média foi em torno de 80%.

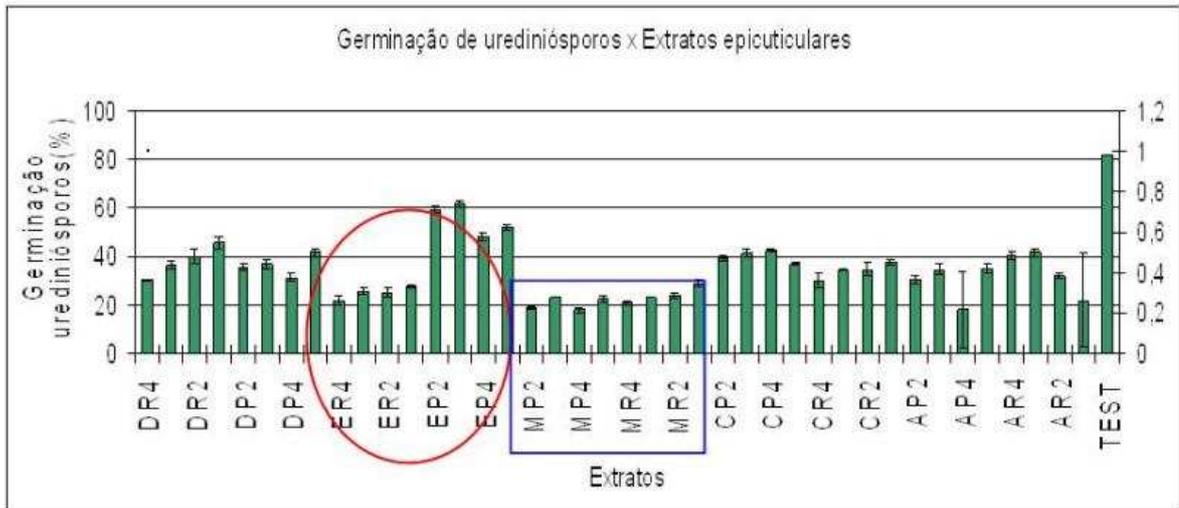
Os resultados da análise de variância mostram que a germinação de *P. psidii* sofreu efeitos significativos para diluição dos extratos, solvente, cultivares e tamanho do fruto (Quadro 2).

**Quadro 2.** Resultados da análise de variância da germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii*, considerando os efeitos de concentração dos extratos (Conc.), tipo de solvente (Solv.), tamanho dos frutos (Tf) e cultivares (Cv.).

FV	GL	SQ	QM	F	Nível Signif.
Conc.	1	3,366,74	3,366,749	12,88	,00052
Solv.	4	4,679,30	1,169,825	44,780	,00000
Tf	1	1,134,67	1,134,675	43,435	,00000
Cv.	1	4,687,50	4,687,500	1,794	,18350
Conc. x Solv.	4	7,203,33	1,800,834	,689	ns
Tf x Solv.	4	4,726,36	1,181,591	45,231	,00000
Cv. x Solv.	4	8,260,00	2,065,001	7,905	,00001
Conc. x Cv.	1	1,875,00	1,875,000	,072	Ns
Cv. x Tf	1	1,220,08	1,220,084	4,670	,03312
Res.	98	2,560,11	2,612,362		

ns – efeito não significativo a 0,05 de probabilidade.

O extrato etanólico foi o que mais diferenciou ou evidenciou o efeito dos cultivares sobre a germinação *in vitro* dos uredíniosporos de *P. psidii*, sendo que a cv. Rica apresentou maior inibição de germinação que a cv. Paluma. O máximo de inibição da germinação dos uredíniosporos foi observado na presença dos extratos de metanol com percentual de 40,5% em frutos de 2 cm e 36% em frutos de 4 cm, embora não se observou diferenças significativas relacionada as cultivares testadas. Do mesmo modo, os demais extratos também não apresentaram diferença significativa no efeito sobre a germinação de *P. psidii* entre as cultivares testadas ( Figura. 5).



**Figura 5.** Efeito dos extratos epicuticulares obtidos com vários solventes puros ou diluídos em óleo mineral (1:10), a partir de frutos de 2 e 4 cm de diâmetro e de duas variedades de goiaba (Rica e Paluma), sobre a germinação de urediniosporos de *P. psidii* (%). As barras indicam média e desvio padrão da % de urediniosporos germinados. Abreviaturas: D – Diclorometano, E – Etanol, M – Metanol, C – Clorofórmio e A – Acetona. Após evaporação dos solventes, os extratos foram ressuspensos em óleo mineral na proporção de 1mg/mL de óleo (extrato bruto) ou diluídos 1:10 em óleo mineral ( $10^{-1}$ ). As linhas sobre as barras indicam o desvio padrão da média de urediniosporos germinados para cada tratamento.

Hipotetiza-se que os resultados obtidos estejam relacionados às diferenças na natureza química dos solventes, método de extração, idade da planta e tempo de coleta, o que pode acarretar uma reação de oxidação ou perda de compostos biologicamente ativos em extratos vegetais (Dey e Harbone, 1989; Waterman e Mole, 1996). Ademais, novos estudos, com maior número de frutos, deverão ser conduzidos visando caracterizar os compostos obtidos com o extrato etanólico, pois este diferenciou as cultivares quanto ao efeito sobre a germinação *in vitro* dos urediniosporos de *P. psidii*.

Suzuki *et al.* (1998) avaliaram o efeito de extratos aquosos totais de folhas de goiaba em meio de ágar 2%, sobre a germinação de urediniosporos coletados de frutos de goiaba veiculados em óleo mineral. Observaram que o extrato de folhas de goiaba foi o único que não reduziu a germinação em relação a testemunha, utilizando-se urediniosporos obtidos de plantas de goiaba. No atual trabalho, os extratos testados são de origem epicuticular sugerindo a presença de

compostos químicos diferentes e específicos como, por exemplo: ácidos graxos de cadeias longas, aldeídos graxos, álcoois primários e secundários, cetonas e ésteres. A proporção destes compostos difere entre as espécies de plantas, entre os diferentes tecidos de uma única planta e com a fenologia, em função das condições ambientais (Poste-Beittenmiller, 1996).

Na comparação entre as cultivares, os extratos de frutos da cv. Rica apresentaram maior efeito inibitório sobre a germinação de uredíniosporos em relação aos da cv. Paluma. Tais resultados apoiam a afirmação de Rocabado (2003) quanto à resistência da cv. Rica à ferrugem em relação à cv. Paluma. Outra relação a ser levantada sobre a resistência da cv. Rica a ferrugem seria a maior quantidade de ceras, pois constatou-se maior peso seco dos extratos de ceras epicuticulares por fruto obtidos da cv. Rica, como já aventado por Rocabado (2003).

Extratos epicuticulares diluídos ( $10^{-1}$ ) dos frutos da cv. Rica, independentemente do solvente testado, apresentaram maiores percentuais de germinação de uredíniosporos em comparação à cv. Paluma. Há, então, que se investigar a composição deste extrato para as diferentes cultivares. Resultados semelhantes foram observados por Filho (2003), no efeito de extratos diluídos de albedo de *Citrus sinensis* na germinação de *Phyllosticta citricarpa* *in vitro*. Ao comparar o efeito dos extratos epicuticulares diluídos ( $10^{-1}$ ) dos frutos da cv. Paluma com o efeito dos extratos epicuticulares brutos (não diluídos) sobre a germinação de *P. psidii*, independente do solvente testado, não se observou diferença quantitativa na germinação *in vitro* de *P. psidii* (Quadro 3).

**Quadro 3.** Efeito dos extratos epicuticulares obtidos com vários solventes a partir de frutos de 2 e 4 cm de diâmetro e de duas cultivares de goiaba (Rica e Paluma) sobre a germinação de uredíniosporos de *P. psidii* (%).

Extratores	Frutos das cultivares em diferentes diâmetros			
	Paluma		Rica	
	2cm	4cm	2cm	4cm
Diclorometano	33,3Ba	36,3Aa	42,8Aa	36,5Ab
Etanol	23,8Ab	60,5Aa	26,2Ab	49,8Ba
Metanol	21,3Aa	22,0Aa	20,2Ab	26,3Aa
Clorofórmio	40,3Aa	32,3Ab	39,5Aa	36,2Aa
Acetona	32,5Ab	47,0Aa	26,5Ba	27,0Ba
<b>Testemunha</b>	<b>82</b>			

As letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). As letras maiúsculas informam o efeito dos extratos com relação aos cultivares sobre a germinação de *P. psidii*. As letras minúsculas informam o efeito do extrato com relação ao tamanho do fruto de goiaba sobre a germinação de *P. psidii*.

Constituintes ativos das ceras epicuticulares, influenciam o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (Flaishman, 1995). Segundo Kalattukudy *et al.* (1995), compostos epicuticulares e seus derivados devem constituir nos principais e primeiros sinalizadores da interação entre plantas e seus patógenos.

Por ser um trabalho inédito voltado à resistência em frutos de goiaba à *P. psidii*, são sugeridos novos estudos no intuito de se isolar os compostos epicuticulares que afetem diferencialmente a germinação dos esporos de *P. psidii*, visando elucidar mecanismos de resistência na fase de pré-penetração. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, acredita-se que a partir do extrato etanólico poderão ser avaliadas sub-frações deste extrato quanto à presença de compostos que possam inibir diferencialmente a germinação dos uredíniosporos e que estejam presentes em maior quantidade nos extratos obtidos a partir de frutos da cultivar Rica, em relação a cultivar Paluma. Apesar de, neste trabalho, os extratos epicuticulares apresentarem similaridade qualitativa na sua composição entre as cvs., é possível que o efeito inibitório dos extratos da cv. Rica na

germinação dos uredíniosporos possa estar também associado à quantidade e proporção relativa de compostos químicos, os quais podem atuar de forma isolada ou conjunta. Outro fato já mencionado nos resultados obtidos que pode apoiar essa suposição, é a evidência de diferenças quantitativas entre o peso seco dos extratos epicuticulares dos frutos da cv. Rica e da cv. Paluma. Evidência também citada por Rocabado (2003), ao observar por MEV, maior quantidade de ceras na superfície de frutos da cv. Rica e relacioná-la com a menor germinação de *P. psidii* em frutos desta variedade. Comprovado o envolvimento de compostos epicuticulares na resistência de pré-penetração a *P. psidii* em frutos de goiaba, a análise quantitativa ou qualitativa de extratos de frutos de diferentes cultivares e materiais genéticos poderá servir de suporte ao melhoramento, visando a resistência a ferrugem. Pelo fato de ser este um mecanismo associado a fatores estruturais e químicos na fase de pré-penetração, é possível que este tipo de resistência seja mais durável, não exercendo, portanto, pressão de seleção, o que condicionaria o aparecimento de raças mais virulentas, como em interações pós-infeccionais, muitas das quais são do tipo raça-específicas.

Há necessidade, ainda, de estudos envolvendo uma gama maior de materiais genéticos que possam servir como fontes de resistência a ferrugem em frutos de goiaba, tanto em nível intra-específico quando em nível interespecífico. Estudando a interação *P. psidii* clones de *Eucalyptus spp.*, Xavier (1997) observou a ocorrência de interação diferencial entre clones e isolados (biótipos) de *P. psidii* e a análise histológica de reações de resistência revelou a ocorrência de outros mecanismos de resistência neste patossistema, tais como reação de hipersensibilidade, fenômeno este ainda não observado em frutos nem tão pouco em folhas de genótipos de goiabeira. Não se pode, portanto, descartar a possibilidade de mecanismos em pós-penetração atuarem na resistência de frutos de goiaba a ferrugem.

## 5. RESUMOS E CONCLUSÕES

Estudaram-se os efeitos de extratos epicuticulares de frutos de goiabeira sobre eventos de pré-penetração por *P. psidii* *in vitro*, com os objetivos de associar a composição das ceras à resistência pré-formada a ferrugem em frutos de cultivar resistente e de caracterizar quimicamente a composição das ceras epicuticulares, testando extratos obtidos com diferentes solventes orgânicos sobre a germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii*.

Para testar qual melhor suporte físico para a germinação de uredíniosporos de *P. psidii* foram testados filmes de papel celofane e paleofane embebidos em água esterilizada. O filme de papel celofane foi o melhor suporte físico, favorecendo a germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii* veiculados em óleo mineral.

A suspensão dos esporos em óleo mineral apresentou maiores percentuais de germinação que a suspensão dos esporos em água.

Ao avaliar a quantidade de ceras epicuticulares extraídas da superfície de frutos de diferentes tamanhos, observou-se que a cultivar Rica apresentou maior peso seco de extrato comparado a cultivar Paluma, independente do solvente utilizado.

A acetona foi o solvente que mais extraiu ceras epicuticulares da superfície de frutos de goiaba (*Psidium guajava*) seguido do metanol, etanol, diclorometano e clorofórmio.

Todos os extratos obtidos da superfície de frutos de ambas cultivares reduziram a germinação “in vitro” de *P. psidii*, indicando a presença de algum princípio ativo responsável por essa atividade. No entanto, extratos epicuticulares de frutos da cultivar Rica apresentaram maior efeito inibitório na germinação de *P. psidii*, que os extratos de frutos da cultivar Paluma, quando se utilizou extrato etanólico.

O extrato etanólico possibilitou diferenciar os cultivares no ensaio de germinação *in vitro*, sugerindo análises posteriores que possibilitem a purificação de suas frações, caracterizando quais substâncias químicas estão contidas na sua composição.

Os perfis característicos da composição química dos extratos epicuticulares testados no atual trabalho, obtidos pela extração em acetona e clorofórmio, indicam similaridade na constituição química dos frutos da cv. Rica e da cv. Paluma, tendo como principais grupos compostos alifáticos, alcanos, alcenos e compostos aromáticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anagnostopoulou, M. A. *et al.* (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*. London, 94: p.19 -25.
- Alfenas, A. C. M., Maffia, L. A., Santorio, R. C. (1993). Eficiência de tridimenol, oxicarboxim e diniconazole para controle de ferrugem, *P. psidii*, em brotações de *Eucalyptus cloeziana*, em condições de campo. *Revista Árvore* 17: p.247-263.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant Pathology*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Aherens, W. H. (1994). *Herbicide handbook*. 7 ed. Champaign: Leed Science Society of America. p 149 – 52.
- Allen, E. A., Hazen, B. E., Hoch, H. C., Kwon, Y., Leinhos, G. M. E., Staples, R. C., Stumpf, M. A., Terhune, B.T. (1991). Appressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. *Phytopathology*,81:p.323–331.
- Appezzato, B.,Guerreiro,C.M.S. (2003). *Anatomia Vegetal*. Universidade Federal de Viçosa.p 9.

- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. Em Oh, B. J., K. D. Kim, Y. S. Kim., (1999). Effect of Cuticular Wax Layers of Green and Red Pepper Fruits on Infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, 147: p 547- 552.
- Baker, E. A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Jetter R. Schaffer S. (2001). Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. *Plant Physiology*, 126: p1725 - 35.
- Baker, E. A., Procopiou, J. (1975). The cuticles of Citrus species. Composition of the intracuticular lipids of leaves and fruits. Em Terhune, B. T., Hoch, H.C. (1993). Substrate Hydrophobicity and Adesion of Urdiospores and Germlings. *Experimental Mycology*, 17: p241-252.
- Balardini, R. (2005). Fundamentos da Resistência em Plantas. Em: [www.balardin.com](http://www.balardin.com) 09/ 08/2006.
- Barnes, J.D., Percy, K.E., Paul, N.D., Jones, P., Mc Laughlin, C.K., Mullineaux, P.M., et al. (1996). *J. Exp Bot.* 47: p.99 - 109.
- Barthlott, W., Christoph Neinhuis, C., David, C., Friedrich, D., Iris, M., Inge, T., Hiltrud, W. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: p.237–260.
- Belding, R. D., Sutton, T. B., Blankenship, S. M., Young, E. (2000). Relationship between apple fruit epicuticular wax and growth of *Peltaster fructicola* and *Leptodontidium elatius*, two fungi that cause sooty blotch disease. *Plant Dis.* 84: p.767-772.
- Bianchi G., Murelli C., Ottaviano E. (1990). *Phytochemistry*. 29: p.739 –744.

- Bourett, T.M., Howard, R.J. (1990). In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Canadian Journal of Botany*. 68: p.329-342.
- Bozzola, J. J., Russell, L. D. (1992). Electron Microscopy: principles and techniques for biologists. *Jones & Bartlett Publishers*, London, p.542.
- Camargo, P.N., Silva, O. (2002). O Apoplasto Foliar In: Manual de Adubação Foliar. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola.São Paulo, Brasil.
- Campacci, C. A. (1983) O controle da ferrugem da goiabeira. In: Martins, V. V. M. (2003). *Danos à Produção e o Controle Químico da Ferrugem (P. psidii) na Cultura da Goiabeira*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, p.56.
- Campacci, C. A., Chiba, S. (1983). Principais doenças da goiabeira: Identificação e controle. In: Ribeiro, A. I. J., Pommer, C. V. (2000). Seleção para Resistência à Ferrugem Causada por *P. psidii* Wint. na Goiabeira (*Psidium guajava* L.): [www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais\\_xvii\\_cbf/genetica\\_melhoramento/315.htm](http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/genetica_melhoramento/315.htm)
- Carver, T.W.L., Thomas, B.J., Ingerson-Morris, S.M., Roderick, H.W., (1990). The role of abaxial leaf surface waxes of *Lolium* spp. in resistance to *Erysiphe graminis*. *Plant Pathol.* 39: p.573-583.
- Carvalho, A.C., Alfenas, A.C., Mafia, L.A., Carmo, M.G (1994). Avaliação do progresso da ferrugem (*P. psidii*) em brotações de Eucaliptos cloeziana no Sudeste da Bahia de 1987 a 1989. *Revista Árvore Viçosa*, 18: p.265 - 274.
- Castilho, A., Martins, M.C.P., Chaves, G. M., Maffia, L.A. (1982). Técnicas de inoculação e seleção de cultivares de goiabeira com resistência a ferrugem (*P. psidii*). *Fitopatologia Brasileira*. 7: p.511.

- Chacalis, J., Anderson K., Mors, M. e Vaillan C. L. (2001). Hidrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 91:p.558 – 564.
- Chasan, R. (1992). Cutinase-Not a Weapon in Fungal Combat?. *The Plant Cell*. 4: 617.
- Charudattan, R., McKinney, D.E., Hepting, K. (1981). Production, storage, germination, and infectivity of uredospores of *Uredo eichhoniae* and *Uromyces pontederiae*. *Phytopathology*. 71: p.1203-1207.
- Clement, J. A., Porter, R., Butt, T. M., Beckett. A. (1994). The role of hidrophobicity in attachment of urediniospores and sporelings of *Uromyces viciae-fabae*. *Mycological Research*. 98: p.1217-1228.
- Collins, T.J., Read, N.D. (1997). Apressorium induction by topographical signals in six cereal rusts. *Physiol. Mol. Pl. Pathol*. 51: p.169-179.
- Coutinho, T. A., Figueredo, M. B. (1984). Influência da temperatura na germinação de teliosporos e liberação de basidiósporos de *P. psidii* Winter. Anais do VII Congresso Paulista de Fitopatologia, São Paulo: UNESP, Botucatu, 33.
- Cutter, E.C. (1987). *Anatomia vegetal. I – Células e Tecidos*. São Paulo: Roca. Cap. 7: Epiderme, p. 97-145.
- Dixon, R. A., (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411: p. 843 – 847.
- Devine, M. D., Duke, S. O., Fedtke, C. (1993). *Physiology of herbicide action*. London: Prentice Hall International. p.441.
- Dey, P. M., Harbone, J. B., (1997). Plant biochemistry. Em: Filho, C. A.J. (2003). Efeito de extratos de Albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de

resistência Ácido Salicílico, acilbenzolar – S – Metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllostica citricarpa* (Telemorfo: *Guinardia citricarpa*). Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Edwards, M.C., Bowling, D.J.F., (1986). The growth of rust germ tubes towards stomata in relation to pH gradients. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 29: p.185 - 196.

Eigenbrode S.D., Espelie K.E., (1995). *Annu Rev. Entomol*: 40;p.171 – 194.

Espelie, K. E., Davis, R. W., Kolattukudy, P. E. (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutis and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed). *In*: Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutis And Suberin. *Ann Rev. Plant Physiol*. 32: p.536 – 67.

Euclides, R. F. Sistema para Análise Estatísticas e Genéticas (SAEG) - Manual provisório. CPD/UFV, Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Viçosa, MG, 1983, 74p.

Ferreira, F. A., (1989). Ferrugem do Eucalipto. *Patologia Florestal*. Viçosa. p.129 - 152.

Ferreira, F. A., (1983). Ferrugem do Eucalipto. *Revista Árvore*. Viçosa, 7: p.91-109.

Figueredo, M.B., (2001). Doenças Fúngicas em Grandes Culturas. *Biológico São Paulo*, n.1/2, 63: p. 29 – 32.

Figueredo, M.B.; Coutinho, L.N.; Hennen, J.F.(1984) Estudos para determinação do ciclo vital de *P. psidii* Winter. *Summa Phytopathologica*, 10, p.53-54.

- Filho, C. A.J. (2003). *Efeito de extratos de Albedo de laranja (Citrus sinensis) dos indutores de resistência Ácido Salicílico, acilbenzolar – S – Metil e Saccharomyces cerevisiae no controle de Phyllostica citricarpa (Telemorfo:Guinardia citricarpa)*. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 126p.
- French, R.C., Galimore, M.D. (1971). Effect of some nonyl derivates and related compounds on germination of uredósporos. *Jornal of Agriculture and Food chemistry*, 19: p.912 – 915.
- French, R.C. (1992). Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. *Mycologia*, 84:p.277-288.
- Flaishman, M.A., Kolattukudy, P. E. (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91: p. 6579 – 6583.
- Fujihashi, G.A., Diniz, M.C.B. (2002). Ananas erectifolius (curauá): Padronização do extrato, frações e do material vegetal. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde - Belém, Universidade Federal do Pará,
- Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*. 2nd ed. New York. Wiley-Liss.
- Góes, A. D., Martins , R. D., Reis, R. F.(2004). Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com Mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *P. psidii* mm goiabeira. *Revista Brasileira. Fruticultura.*, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 2, p. 237-240.

- Gonzaga Neto, L., Bezerra, J.E.F., Abramo, F.L., Pedrosa, C. (1990). Cultivo de goiaba (*Psidium guajava* L.) nas condições do vale Rio Moxotó. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 8, Brasília, DF, 2: p.87-92.
- Gonzaga Neto, L., Soares, J.M. (1994). Goiaba para exportação: Aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA – SPI, *FRUPEX*, p.49.
- Hammer, J.E., Howard, R.J., Chumely, F. G. E., Valent, B. (1988). A mechanism for surface attachment in spore of a plant pathogenic fungus, *Science* 239: p.288 –290.
- Hegde, Y., Kolattukudy, P.E. (1997). Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: p.75-84.
- Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitead. B., Comeau, J., Wolf, E.D. (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science*, 235: p.1659-1662.
- Holloway, P.J., Hunt, G.M., Baker, E.A., Macey M.J.K. (1977). Chemical composition and ultrastructure of the epicuticular wax in four mutants of *Psidium sativum* (L.). *Chem Phys Lipids*. 20:p.141-155.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach D.H., Money,N.P.(1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures.*Proceedings of the National Academy of Science*. U.S.A. 88:p.11281-11284.
- IBGE (Rio de Janeiro, RJ). Área colhida, quantidade produzida e valor da produção dos produtos agrícolas, segundo as Unidades da Federação.  
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp>
- Jeffree, C.E. (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. Em G. Kerstiens, ed, *Plant Cuticles. An Integrated Approach*, Ed 1. BIOS Scientific, Oxford, p.33–82.

- Jelitto, T.C., Page, H.A., Read, N.D. (1994). Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus. *Magnaporthe grisea. Planta.* 194: p.471-477.
- Julkunen-Tiito, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics em Andreo, D e Jorge. N. (2006). Antioxidantes Naturais. Técnicas de Extração. B. *CEPPA.* 2: p.319 – 336.
- Junqueira, N. T., Costa, H. (2002) Controle das doenças da goiabeira. In: Zambolin, L. (Eds.) *Controle de doenças de plantas: Fruteiras.* Viçosa. 2: p.1313.
- Kolattukudy, P. E.(1980). Cutis, suberin and Waxes. *In: Kolattukudy, P. E. (1984) The Biochemistry of plants.* Can.J.Bot. 62:p.2918 – 2933.
- Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutis And Suberin. *Ann Rev. Plant Physiol.* 32: p.536 – 67.
- Kalattukudy, P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C. S., Flaishaman, M.A. (1995). Surface Signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 92: 4080 – 4087.
- Kerstiens, G. (1997) *Trends Plant Sci.* 1:p.125 – 129.
- Kavati, R. (1997). Cultivares. In: *Simpósio Brasileiro sobre a cultura da Goiabeira,* Anais, p.1-16.
- Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp Bot.* 47: p.1813 -1832.
- Koornneef M., Hanhart C.J.,Thiel F. (1989). *J. Hered.* 80: p.118 – 122.

- Kumar, S., Sridhar, R.(1987). Significance of epicuticular wax in the specificity of blast fungus to rice varieties. *International Journal of tropical plant disease* . 5:p.131-139.
- Kunst, L., Samuels, A. L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*. 42: p.51–80.
- Kuo, K. C., Hoch, H. C. (1996) Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: prerequisites of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wettability. In: Thines, E., Anke, H., Weber, W. S. R. (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycol. Res.* 108 (1): p.14–25.
- Lee, Y.H., Dean R.A. (1994). Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnosporthe grisea*. *FEMS microbiology Lettes*. 115: p.71-74.
- Lewis, B. G. e DAY, J. R. (1972) Behaviour of uredopore germ tube of *P. psidii* tritici in relation to the fine structures of wheat leaf surface. *Transactions Bristish Mycological Society*. n.1, 58: p. 139 –145.
- Littlefield, L. J., Heath, M.C. (1979) Ultrastructure of rust fungi. Academic Press. New York. 277p.
- Lo, L. C., Weiergang, I., Bonham, C., Hipskind, J., Wood, K., Nicholson, R.C. (1996). Phytoalexin accumulation in sorghum; Identification of a methyl ether of enteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49: p21 – 31.
- Lucas, J., Knights, I. (1987).Spores on leaves: endogenous and exogenous control of development. In: Pegg, G.F. & Ayres, P.G. (Eds.) *Fungal Infection of Plants*. Cambridge, Cambridge University Press. p. 45-59.

- Mac Lachlan, J. D. (1939) A rust of the pimento tree in Jamaica, B. W. I. *Phytopathology*. 28: p.157 – 170.
- Maheshwari, R., Allen., P.J. e Hildebrandt, A.C. (1967) Physical and chemical factors controlling the development of infection structures from urediospore germ tubes of rust fungi. *Phytopathology*, 57, p.855-826.
- Manica, I., Icuma, I. M., Junqueira, N. T. V., Salvador, J. O., Moreira, A., Malavolta, E. (2000). Fruticultura Tropical 6. Goiaba. *In: Martins V V M (2003). Danos à Produção e o Controle Químico da Ferrugem (P. psidii) na Cultura da Goiabeira.*Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, p.56.
- Marchetti, M.A., Uecker, F.A., Bromfield, K.R. (1975) Uredial development of *Phakospora pachyrhizil* in soybeans. *Phytopathology*. n.7, 65: p.822-823.
- Mares, D. L., Cousen, S. (1977). The interaction of yellow rust (*Puccinia striiformis*) with winter wheat cultivars showing adult plant resistance: Macroscopic and microscopic events associated with the resistant reaction. *In: Feng, J., Zhang, Z. J., Li, G. H., Zhou, Y., Wang, H. H., Guo, Q. G., et al. (2008). Relationships and genetics of wheat effects on infection frequency and colony extension of Puccinia striiformis f. sp. Tritici Eur J Plant Pathol.* 120: p 223–232.
- Martin, J.T, Juniper, B.E. (1970). The cuticles of plants. London. *Physiological Plant Pathology*, 10: p 257–274.
- Martins, V. V. M. (2003). *Danos à Produção e o Controle Químico da Ferrugem (P. psidii) na Cultura da Goiabeira.*Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, p.56.

- Mauseth, J.D., (1988). Plant Anatomy. California: Commings Publishing Co.
- McWhorter, C. G., Paul, R. N., and Barrentine, W. L. (1990). Morphology, development and recrystallization of epicuticular waxes of Johnsongrass (*Sorghum helepense*). Em.: Belding, R. D., Sutton, T. B., Blankenship, M., Young, E. (2000). Relationship between apple fruit epicuticular wax and growth of *Peltaster fruticola* and *Leptodontidium elatius*, two fungi that cause sooty blotch disease. *Plant Dis.* 84:p.767-772.
- Medina, J.C. (1991) Cultura da goiaba. In: Medina, J. C. (org.) *Goiaba – cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-120.
- Medina, J.C., Bleinroth, E. W. (1978). Goiaba, da cultura ao processamento e comercialização. Em: Pereira, F. M., é Nachtigal, J. C. (2002). *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. UFV, Viçosa – MG. p.267 – 287.
- Mendgen, K., Deising, H. (1993). Infection structures of fungal pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*.124: p.193-213.
- Mendgen, K., Hahn, M. & Deising, H. (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: p.367–386.
- Morrissey, J. P., Osbourn, A. E. (1999). Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 63: p. 708 –724.
- Motta, V.T. (2000). Bioquímica Básica: Lipídios e Membranas. <http://www.laboratorioautolab.com/infomed/fulltext/9lipidios.pdf> 15/12/2007.
- Nicholson, R.L., Epstein, L. (1991). Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G.T. & Hoch, H.C. (Eds.) *The fungal*

spore and disease initiation in plants and animals. New York, *Plenum Press*. p. 3 –23.

Niks, R.E. (1990) Effect of germ tube length on the fate of sporelings of *Puccinia hordei* in susceptible and resistant barley. *Phytopathology* 80: 57–60

Niks, E. R., Rubiales, D. (2002). Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica*. 124: p201–216.

Oh, B. J., K. D. Kim., Y. S Kim. (1999). Effect of Cuticular Wax Layers of Green and Red Pepper Fruits on Infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*. 147:p.547- 552.

Olesen, P. (1979). Ultrastructural observations on the cuticular envelope in salt glands of *Frankenia pauciflora*. In: Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin And Suberin. *Ann Rev. Plant Physiol*. 32: p.536 – 67.

Park, W.M., Kim, S.H., Ko, Y.H. (1989). Susceptibilization of a red pepper (*Capsicum annum* L.) to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In relation to the ripening of fruits. *Korean J. Plant Pathol*. 103:p.267 – 272.

Pascholati, S.F., Leite, B. (1995). Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo. Ceres. p.417-453.

Patto, M.C., Niks, R.E., (2001). Leaf wax layer may prevent differentiation but does not influence orientation of the leaf rust fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. *Eur J. Plant Pathol*. 107:p.795-803.

Peres, L. E. P. (2004). Metabolismo Secundário : <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSecpdf> em 15/12/2007.

- Pereira, F. M. (1995). *Cultura da Goiabeira*. Jaboticabal, SP. Funep, 47 p.
- Piccinin, E., Pascholati, S. F. (1997). Doenças da Goiabeira. *In*: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A. Camargo, L.E.A. Rezende, J.A.M. *Manual de Fitopatologia*, ed., São Paulo, SP. 2: p. 450-455.
- Pinheiro, M. M., Sandroni, M., Lummerzheim, M., Oliveira D., E. <http://cienciahoje.uol.com.br/materia/resources/files/chmais/pass/ch147/planta.rtf> 15/12/2007.
- Pio, R., Vale, M.R., Junqueira, K.P., Ramos, J.D. *Cultura da Goiabeira* (2007). [www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol\\_27.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_27.pdf) em 15/12/2007.
- Podila, G.K., Rogers, L., Kolattukudy, P.E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology*. 103: p.267-272.
- Ponciano, N.J., Moreira, F. R., Constantino, C.O.R., Souza, P. M. (2006). Perfil dos goiabicultores da região Norte do estado do Rio de Janeiro. *In*: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio-RJ. Frutas do Brasil: saúde para o mundo. Cabo Frio-RJ : SBF/UENF/UFRuralRJ,1: p.567-567.
- Post-Beittenmiller, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 47: p.405–430.
- Prusky, D., Plumbley, R. A., Kobilier, I. (1991). The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathol* 40: p. 45-52
- Purkayastha, R.P., (1995). Progress in phytoalexin reseach during the past 50 years. *In*: Schwan-estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S (2005). *Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos*. Floresta, 30:p.129 -137.

- Ralf, T. V. (2005). *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiology Letters*. p.259:165.
- Read, N.D., Kellock, L.J., Collins, T.J., Gundlach, A.M., (1997). Role of topography for infection-structure differentiation in cereal rust fungi. *Planta*. 202: p.163–170.
- Rubiales, D., Moreno, I., Moreno, M.T., Sillero, J.C. (2001). Identification of partial resistance to chickpea rust (*Uromyces ciceris-arietini*). In: AEP (Ed.), *Proc 4th European Conf Grain Legumes*, Cracow, Poland. p. 194–195.
- Reicosky, D.A., Hanover, J.W. (1978). *Plan physiol*. 62:p.101 – 104.
- Reina, J. J., Borraz Y. (1982). Ceras epicuticulares en el reino vegetal: química, ultraestructura y aspectos evolutivos. <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS43/ce ras.html> 15/12/2007.
- Reiter, B., Lechner, M., Lobber, E., Aichholz, R.,J. (1997). *High Res Chromatorg*. 22: p.514 – 520.
- Ribeiro, A.I.J., Pommer, C.V.(2000). Seleção para Resistência à Ferrugem Causada por *P. psidii* Wint. na Goiabeira (*Psidium guajava* L.) [www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais\\_xvii\\_cbf/genetica\\_melhoramento/315.htm](http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/genetica_melhoramento/315.htm)
- Riederer, M., Schreiber, L.(1995). Waxes – The transport barriers of plants cuticles. In: Gnwotta, F., Gerd, V., Gartmann, V., Carver, L.W., Riederer, M., Jetter, R. (2005). What do Microbes Encounter at the Plant Surface? Chemical Composition of Pea Leaf Cuticular Waxes. *Plant Physiology* 139:p.519-530.
- Riederer, M. (2006). Introduction: Biology of plant Cuticle. In: Rieder, M., Muller, C. *Biology of plant Cuticle*. Blackwell, Gemany, 445 p.

- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Nagy, S., Attaway, J. (1980). Citrus nutrition and quality. *American Chemistry Society*. p. 43-59.
- Robert, P.D., Sandra, W.P., Gary, AC., James, K.C. (1993). Adhesion of Nongerminated *Botrytis cinerea* Conidia to Several Substrata. *Apple Environmental Microbiology*. 6: p.1786-1791.
- Rocabado, J. M. A. (1998). *Progresso da ferrugem da goiabeira causada por P. psidii, Winter em São Francisco de Itabapoana-RJ*.(Tese Mestrado).- Campos dos Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 36p.
- Rocabado, J. M. A., (2003). *Epidemiologia e patogênese da ferrugem da goiabeira, causada por P. psidii*. (Tese de Doutorado) - Campos dos Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 118 p.
- Rubiales, D., Ramirez, M., Carnver, T., Niks, R. (2001). Abnormal germinating by brown rust and powdery mildew on cereals barley mutants. *Hereditas*, 135: p.271-276.
- Ruiz, R. A., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Barbosa, M.M. (1989). Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *P. psidii*. *Fitopatologia Brasileira*.14: p.73 – 81.
- Sela – Burnlage, M.B., Epstein, L., Rodríguez, R. J. (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiol. Mol.Plant Pathol*. 39: p.345-352.
- Shaidl, F., Naczki, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. *Lancaster: Technomic Publishing*, 1995. p. 281-319.

- Shaw, B.D., Hoch, H.C. (1999). The pycnidíópore of *Phyllosticta ampelícida* : Surface Propíeties Envolved in Substratum Attachment and Germination. *Mycol.Res.* 103: p.915 – 924.
- Sillero, J.C., Moreno, M.T., Rubiales, D. (2000). Characterization of new sources of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba*. *Plant Pathol.* 49: p.389–395.
- Silva, F.M.S., Baker, E.A., Martin, T.J. (1964) Studies on plant cuticle. VIII. The isolation and fractionation of cuticular waxes. Em: Terhune, B. T., Hoch, H.C. (1993). Substrate Hydrophobicity and Adesion of Urdiospores and Germlings. *Experimental Mycology.* 17: p.241-252.
- Silva, I., Franco, S.L., Molinari, S.L., Conegero, C.I., Miranda M.H., Cardoso, M.L.C., Santiana, D.M.G., Iwanko, N.S.(1995). Noções sobre organismo Humano e Utilização de Plantas Mediciniais: Em: Schwan-estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Cruz, M.E.S. (2005). *Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos.* Floresta, 30, .p.129 -137.
- Silva, P. C. S. (1994). *Goiaba, uma fruta tropical.* Boletim técnico. EMATER – RIO, Niterói, RJ, Série Agropecuária Fluminense, nº 12, 24 p.
- Silveira, S. F., Rocabado, J. M. A., Moreira, A. H., Silva, E. A. (1997). Ferrugem e escaldadura dos ramos da goiabeira no Norte Fluminense. *Fitopatologia Brasileira*, 22: p.308.
- Soubihe, J.S., Gurgei, J.T.A. (1962). Taxa de Pamixia na Goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Bragantia*, 21: p.15 – 20.
- Stahl, D.J., Schafer, W. (1992). Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *Plant Cell.* 4: p.621-629.

- Staples, R.C., Grambow, H.J., Wynn, W. (1983). Contact with membrane grooves induces wheat stem rust uredospore germlings to differentiate appressoria but not vesicles. *Phytopathology*. 73: p.1436 – 1439.
- St. Leger, R.J., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C., Roberts, D.W. (1989). Production in Vitro of Appressoria by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*. 13: p.274 – 288.
- Stark, R.E., Tian, S.(2006). The cutin biopolymer matrix. In: Riederer, M., Muller, C. *Biology of Plant Cuticle*. Blackwell, Germany, 445 p.
- Stockwell, V., Hanchey, P. (1985). Effect of cuticle treatments on infection of *Phaseolus vulgaris* in *Rhizoctonia solani* . *J.Phytopathol*. 114: p.6-12.
- Takano,Y., Kikuch,T., Kubo,Y., Harper ,J.E., Mise,K., Furusawa,I. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP Kinase gene CMKI regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol.Plant Microb Interact*. 13: p.374 – 383.
- Terhune, B.T., Hoch, A.C. (1993).Substrate Hydrophobicity e adhesión of *Uromyces Uredióspores* and germlins. *Experimental Mycololy*. 17: p.241 – 252.
- Tessmann, D.J., Dianese, J.C. (2002). Hentiacontane: A leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulator effects on the germination of urediniodpores of *P. psidii*. *Fitopatologia Brasileira*. 27: p.538-542.
- Thines, E., Anke, H., Weber, S. W. (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic. *Mycol.Res*. 1: p 14 – 25.
- Tsuba, M., Katagiri, C., Takeuchi, Y., Takada, Y., Yamaoka, N. (2002). Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 60: p.51 – 57.

- Uchiyama, T., Ogasawara, N., Nanba, Y., Ito, H. (1979). Conidial germination and appressorial formation of the plant pathogenic fungi on the coverglass or cellophane coated with various lipid components of plant leaf waxes. *Agricultural and Biological Chemistry*. 43: p.383-384.
- Vallavieille-Pope, C. de., Huber, L., Leconte, M., Goyeau, H. (1995). Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and *P. striiformis* on wheat seedlings. Em: Feng, J., Zhang, Z. J., Li, G. H., Zhou, Y., Wang, H. H., Guo, Q. G., *et al.* (2008). Relationships and genetics of wheat effects on infection frequency and colony extension of *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici Eur J Plant Pathol*. 120: p 223–232.
- Vasconcelos, L.F.L., Alfenas, A.C., Maffia, L. A. (1998). Resistência de cultivares de goiabeira a *P. psidii*. *Fitopatologia Brasileira*. 23: p.492 – 494.
- Voegele, R. T. (2005). *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiology Letters*. 259: 165 p.
- Xavier, A. (1997). *A patogênese da ferrugem (P. psidii, Winter) em folhas de genótipos suscetíveis e resistentes Eucalyptus grandis Hill*. Tese (Mestrado em fitopatologia). Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa.
- Xiao, J.Z., Watanabe, T., Kamakura T., Ohshima, A., Yamaguchi. I. (1994). Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 44: p.227-236.
- Waterman, P. G., Mole, S. (1994). Methods in ecology: Analysis of phenolic plant metabolites. *Blacwell Scientific*. 238p.

- Wynn, W.K. (1976). Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. *Phytopathology*. 66: 136–146.
- Wynn, W. R. e Staples, R. C. (1981) Tropism of fungi in host recognition. In: Staples, R. C. and Toenniessen, G. H. (Eds.) Plant disease control: resistance and susceptibility. New York, London: Wiley, 325 p.
- Wolfram, K., Yao, C., Trial, F. *et al.* (1995). Role of cutinase in the invasion of plants. In: Xavier, A. (1997). *A patogênese da ferrugem (P. psidii, Winter) em folhas de genótipos suscetíveis e resistentes Eucalyptus grandis Hill*. Tese (Mestrado em fitopatologia). Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa.
- Woloshuk, C. P., Kolattukudy, P. E. (1986). Mechanisms by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:p.1704 -1717.