
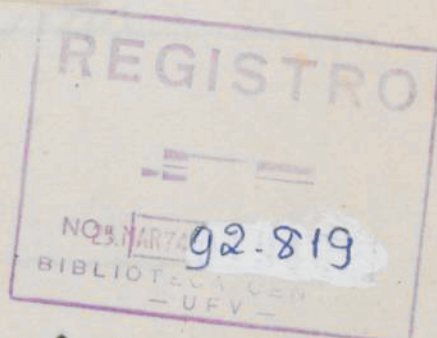


Efeito de Baixas Temperaturas e do Binômio Temperatura-Umidade Relativa sobre a Viabilidade dos Uredosporos de Hemileia vastatrix Berk. et Br. e Uromyces phaseoli typica Arth.

Tese
Apresentada à
Universidade Federal de Viçosa

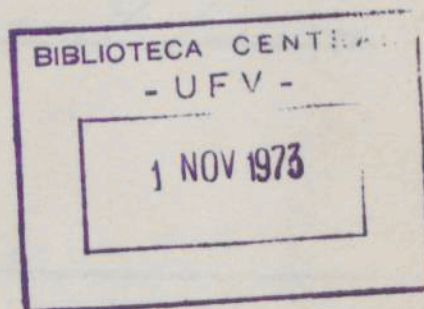
UFV	BIBLIOTECA	BBT	OBRA	RG000176158
	CLASSIFICAÇÃO T 632.4 / Z24e			
TÍTULO Efeito de baixas temperaturas e do binômio				
				
92819		BBT		

por
Laércio Zambolim



T
632.4
Z24e
1973
ex.3

Como parte das Exigências do Curso de Microbiologia Agrícola para o Grau de "Magister Scientiae".



VIÇOSA - MINAS GERAIS
1973

Efeito de Baixas Temperaturas e do Binômio Temperatura-Umididade Relativa sobre a Viabilidade dos Uredosporos de Hemileia vastatrix Berk. et Br. e Uromyces phaseoli typica Arth.

por
Laércio Zambolim

APROVADA: Geraldo M. Chaves
Prof. Geraldo Martins Chaves (Orientador)

Mauro Litoro Reis

Paulo Roberto

Emilio José de Faria

P. Romero

A meus pais,

Avó,

Irmãos e

Tios

Dedico este trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

LAERCIO ZAMBOLIM, filho de Luiz Zambolim e Maria Coely Zambolim, nasceu a 30 de dezembro de 1947, em Ubá, Estado de Minas Gerais.

Concluiu seu curso primário no "Grupo Escolar Senador Levindo Coelho" e os cursos Ginásial e Colegial no "Colégio Estadual Raul Soares".

Em 1967 prestou Vestibular na Escola Superior de Agricultura da Universidade Federal de Viçosa, havendo recebido o título de Engenheiro-Agrônomo em 1970.

Em 1971, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir o presente trabalho, é desejo do autor externar o seu mais profundo agradecimento às pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para a sua realização.

Ao Professor Geraldo Martins Chaves, pelo estímulo e orientação recebidos.

Aos Professores Murilo Geraldo Carvalho, Reginaldo da Silva Romeiro, João da Cruz Filho, Mauro Silva Reis e Emílio Gomide Loures, pela co-orientação, sugestões e colaboração.

Ao Conselho de Pós-Graduação, pela oportunidade oferecida de realizar o curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas), pela ajuda financeira recebida sob forma de bolsa de estudos.

Ao Convênio IBC/GERCA-UFV-ESA que forneceu os recursos necessários à execução do trabalho.

Ao Professor Carlos S. Sedyama pela colaboração prestada na feitura das análises estatísticas.

Ao Centro de Pesquisas do Café de Caratinga nas pessoas dos Srs. Clauzer Souza Duarte e Joaquim Eure Pereira, pela colaboração prestada na coleta do material.

Ao amigo e Colega Fernando de Assis Paiva, pelas sugestões, apoio e estímulo.

Aos Colegas de Pós-Graduação pelo convívio feliz.

Aos funcionários Antonio Victor de Oliveira, João Bosco Soares, Paulo Cesar e José Helvécio Gomes, pela dedicada colaboração.

O autor agradece ainda aos professores e funcionários da UFV e a todos aqueles que de uma maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Teste de Germinação	8
3.2. Teste de Infectividade	8
3.3. Germinação e Infectividade dos uredosporos de <u>H. vastatrix</u> e <u>U. phaseoli typica</u> , mantidos sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa	9
3.4. Preservação da Viabilidade dos uredosporos de <u>H. vastatrix</u> e <u>U. phaseoli</u> em Congelador	11
3.4.1. Ferrugem do cafeeiro (<u>H. vastatrix</u>)	11
3.4.2. Ferrugem do feijoeiro (<u>U. phaseoli typica</u>)	12
3.5. Preservação da viabilidade dos uredosporos de <u>H. vastatrix</u> e <u>U. phaseoli typica</u> em nitrogênio líquido.....	13
3.5.1. Ferrugem do cafeeiro (<u>H. vastatrix</u>)....	13
3.5.2. Ferrugem do feijoeiro (<u>U. phaseoli typica</u>)	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Germinação e infectividade dos uredosporos de <u>H. vastatrix</u> e <u>U. phaseoli typica</u> , mantidos sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa	17
4.1.1. Ferrugem do cafeeiro (<u>H. vastatrix</u>) ...	17
4.1.2. Ferrugem do feijoeiro (<u>U. phaseoli typica</u>)	21
4.2. Preservação da viabilidade dos uredosporos de <u>H. vastatrix</u> e <u>U. phaseoli typica</u> em congelador	25

4.3. Preservação da viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli em nitrogênio líquido 32

5. CONCLUSÕES 40

5.1. Germinação e infectividade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, mantidos sobre diferentes combinações de temperatura e umidade relativa 40

5.2. Preservação da viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli em congelador 41

5.3. Preservação da viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em Nitrogênio líquido 41

6. SUMÁRIO 44

7. LITERATURA CITADA 47

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre genética, fisiologia e patogenicidade das ferrugens requerem a manutenção de culturas de uredosporos por períodos longos. Usualmente, as culturas de ferrugens são mantidas, por passagens periódicas através do hospedeiro, alternadas com estocagem em refrigerador. Essa técnica, entretanto, apresenta vários inconvenientes, pois, além de ser um trabalho moroso, exige dedicação constante, tornando-se assim a manutenção um processo muito oneroso. Além disso, pode acarretar contaminações, quer seja por outras raças do mesmo patógeno, quer seja por outros fungos; ademais a possibilidade da ocorrência de mutação nas culturas, com as sucessivas passagens através do hospedeiro também não deve ser desprezada.

Devido ao alto valor que uma cultura representa, quando se proceder a um trabalho de identificação de raças fisiológicas, para utilização posterior em trabalhos de melhoramento visando resistência, para estudos de taxonomia e produção comercial de produtos metabólicos, deve ser acondicionada de tal modo que a sua viabilidade seja prolongada por muito tempo. Portanto ao se proceder ao armazenamento de uma cultura, sob condições de

temperatura e umidade relativa controladas, após ter sido multiplicada, elimina-se em grande parte a possibilidade de contaminações e suprime-se o dispêndio de tempo e material que advém da manutenção por inoculações periódicas. E, o que é mais importante, garante a estabilidade genética da cultura (24).

Estudaram-se neste trabalho os efeitos do binômio temperatura-umidade relativa, da temperatura do congelador e do nitrogênio líquido sobre a germinação e infectividade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica Arth.

2. REVISÃO DE LITERATURA

SCHEIN (29) adverte que os uredosporos das ferrugens perdem rapidamente sua viabilidade quando cuidados especiais não são tomados no sentido de preservá-la.

No tocante à preservação "in vitro" da viabilidade dos uredosporos das ferrugens, KIRALI (14), ROSEN & WETMAN (26), SACKSTON (27) e SCHEIN & ROTEM (30) afirmam que temperatura de 5°C e umidade relativa em torno de 50%, são condições ideais para o armazenamento a curto e a médio prazo. NUTMAN & ROBERTS (23) estudando a biologia de H. vastatrix encontraram que uredosporos armazenados secos possuíam vida relativamente curta, perdendo 50% da viabilidade após 2 dias. ROMEIRO (25), estudando o efeito do binômio temperatura-umidade dos uredosporos de H. vastatrix mantidos sobre diferentes produtos vegetais, relatou que a 25°C, independentemente da umidade relativa, a viabilidade se tornou nula após 40 dias; o armazenamento a 5°C foi relativamente mais eficiente do que às demais temperaturas.

Com relação a preservação dos uredosporos em folhas infeta-

das, FERRAZ (9), FORBES (12), MANEVAL (21), relatam que a viabilidade tem sido prolongada por curto espaço de tempo, quando mantidos em refrigerador.

Para manutenção da umidade relativa desejada tem sido usado diversas soluções de sais, bem como ácido sulfúrico para armazenamento dos uredosporos de H. vastatrix. SCHEIN & ROTEM (30) armazenaram uredosporos de U. phaseoli var. phaseoli em cápsulas de gelatina no interior de dessecadores contendo solução saturada de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaCl e ZnSO_4 , as quais proporcionaram diferentes umidades relativas a diferentes temperaturas. FLOR (11), também relata que os uredosporos de Melampsora lini eram preservados em ampolas de vidro, contendo CaCl_2 em seu interior. ROMEIRO (25), usou armazenar uredosporos de H. vastatrix em capsulas de gelatina, no interior de dessecadores contendo uma solução de ácido sulfúrico de densidade 1,83, na concentração de 32,6% (v/v), que proporcionava uma umidade relativa em torno de 50%, no interior do dessecador.

Em congelador, à temperatura de -10°C , AKAI (1) encontrou que os uredosporos de Puccinia triticina não germinavam após 60 dias de armazenamento; FLOR (10) trabalhando com uredosporos de Melampsora lini, verificou que a percentagem de germinação após 1 ano de armazenamento, a esta mesma temperatura, caiu para 1%.

Os métodos de armazenagem anteriormente descritos, são usados para a preservação da viabilidade dos uredosporos a prazo relativamente curto. MERYMAN (22) recomenda a utilização de baixas temperaturas para preservação de materiais biológicos. HARTER & ZAUMEYER citados por DAVISON & VAUGHAN (6), relataram que a -20°C os uredosporos de U. phaseoli var. phaseoli foram capazes de causar infecção após um período de armazenagem de

mais de 2 anos. SCHEIN (29), constatou que a -60°C os uredosporos de U. phaseoli var. phaseoli mantiveram viabilidade residual de 40%, após um período de 670 dias de armazenamento; contudo, a -16°C os esporos estavam inviáveis 1 a 5 meses após a instalação do experimento. Quando se utiliza nitrogênio líquido (-196°C), a preservação da viabilidade dos microorganismos tem sido muito mais eficiente (4, 15, 16, 18, 19, 20 e 32). KILPATRICK et alii (16), encontraram que após 10 anos, houve pouca perda na viabilidade quando os uredosporos de P. graminis var. tritici foram armazenados em nitrogênio líquido. LOEGERING et alii (19), armazenaram uredosporos de P. graminis var. tritici em nitrogênio líquido por 5 anos, sem alteração aparente na redução da viabilidade. TUIITE (32), com grande sucesso, armazenou 13 fungos em nitrogênio líquido por um período de 7 meses.

Outros estudos têm sugerido que nem todos os fungos podem ser preservados em nitrogênio líquido (7, 33). LOEGERING et alii (19) afirmaram que temperatura de -196°C induz dormência nos uredosporos. BROMFIELD (3) e LOEGERING et alii (18) trabalhando com P. graminis var. tritici, concluíram que a temperatura ultra-fria do nitrogênio líquido não mata os uredosporos, mas induz uma dormência que é reversível pelo calor. Nesse caso, torna-se necessário algum tratamento prévio ou posterior à armazenagem, visando quebrar a dormência induzida nos uredosporos. GOOS et alii (13), verificaram que os melhores resultados na preservação de fungos em nitrogênio líquido têm sido alcançado quando o resfriamento é de, aproximadamente, 1°C por minuto, seguido de rápido aquecimento. BROMFIELD (3), LOEGERING et alii (18) e LEATH et alii (17), foram unânimes em afirmar que, com choque térmico a 40°C por 5 minutos, obtêm-se os melhores resultados na quebra da dormência dos uredosporos.

As técnicas de inoculação utilizadas pela maioria dos autores para testar a infectividade consistem em atomizar as folhas da planta a ser inoculada com uma suspensão de uredosporos (5, 6, 8, 9, 14, e 20). ROMEIRO (25), inoculou mudas de cafeeiro com uredosporos de H. vastatrix, espalhando, cuidadosamente, os esporos na superfície dorsal das folhas a serem inoculadas com um pincel macio. As folhas inoculadas eram, em seguida, atomizadas com água e as plantas incubadas em câmara úmida, por 48-72 horas. Para avaliação quantitativa do poder germinativo dos uredosporos das ferrugens, o método da germinação em ágar-água tem tido grande aceitação (19, 27, 31). ROMEIRO (25) trabalhando com uredosporos de H. vastatrix, concluiu que os melhores resultados nos testes de germinação foram obtidos quando usou ágar-água a 2%.

De acordo com KILPATRICK et alii, (16), somente os dados do teste de germinação são insuficientes para se afirmar que uma dada cultura possua maior capacidade de causar infecção de que outra. Torna-se necessário, portanto, correlacionar os dados dos testes de germinação com a infectividade. SCHEIN & ROTEM (30), trabalhando com a ferrugem do feijoeiro, usaram medir o grau de infecção contando o número de lesões por cm^2 , dividindo-se esse valor pelo número de esporos por cm^2 depositados na folhagem. DAVISON & VAUGHAN (6), usando uredosporos da raça 33 de U. phaseoli var. phaseoli, avaliaram o grau de infecção contando o número de pústulas por cm^2 de folha. ROMEIRO (25), utilizando a variedade de café 'Mundo Novo', inoculou os 2 pares de folhas adjacentes mais jovens das mudas e mediu o grau de infecção adotando apenas o critério qualitativo, ou seja, considerando apenas a muda infetada (+) ou não infetada (0).

MATERIAL E METODOS

Os uredosporos necessários à instalação dos diferentes experimentos foram coletados na mesma época, tomando-se o cuidado, sempre que possível, em se utilizar somente esporos de colheita recente.

Os testes com U. phaseoli typica foram feitos utilizando-se uredosporos obtidos em casa-de-vegetação, pois, em testes preliminares, os oriundos do campo mostraram poder germinativo inferior.

Os uredosporos foram coletados com coletor do tipo "ciclone", metálico, idêntico ao utilizado por ROMEIRO (25).

Inocularam-se plantas de feijão da variedade "Pinto 111", com suspensão de uredosporos colhidos de diferentes variedades, utilizando-se um atomizador De Vilbiss nº 15 acionado por compressor. Após 14 dias as folhas com pústulas de U. phaseoli typica eram colhidas e, quando não se processava a coleta dos uredosporos no mesmo dia, as folhas eram armazenadas em refrigerador entre folhas de papel, a 5°C, onde mantiveram um poder germinativo por várias semanas.

O inóculo necessário aos testes com H. vastatrix, coletado

em cafeeiros cultivados à sombra, apresentava boa porcentagem de germinação. Quando não se processava a coleta dos uredosporos no mesmo dia, as folhas eram armazenadas em refrigerador a 5°C, como no caso de U. phaseoli typica.

A fim de se conseguir melhor uniformização do inóculo e eliminar algumas impurezas, os uredosporos eram passados pelas malhas de um tamis de 100 mesh por 3 vezes consecutivas, segundo a técnica descrita por ROMEIRO (25).

3.1. Teste de Germinação -

Para H. vastatrix, a concentração de uredosporos na suspensão foi de 0,5 mg/ml e para U. phaseoli typica, de 0,25 mg/ml.

Para avaliação quantitativa do poder germinativo dos uredosporos de ambos os organismos, adotou-se a técnica descrita por SCHEIN (29) e SCHEIN & ROTEM (30), com algumas modificações; a suspensão de esporos era espalhada cuidadosamente na superfície de placa de Petri, contendo ágar-água a 2%, com auxílio de pincel fino. As placas eram incubadas a 20°C por 18 a 24 horas. Findado esse período procedia-se à contagem ao microscópio de 100 uredosporos por placa.

3.2. Teste de Infectividade -

A avaliação quantitativa da infectividade dos uredosporos de H. vastatrix, foi feita utilizando-se mudas de café da variedade 'Mundo Novo'. Inoculou-se o par de folha adjacente mais jovem, cujo crescimento já se havia completado de plantas com 4 meses de idade gastando-se 1,2g de uredosporos por folha, aproximadamente. A técnica de inoculação foi a mesma usada por ROMEIRO (25). As mudas eram incubadas em câmara úmida

por um período de 48 horas. A câmara úmida consistia de uma caixa de amianto de 250 l de capacidade, bem vedada, com uma camada de cascalho grosso no fundo, recoberto por um filme d'água.

O grau de infectividade foi avaliado dividindo-se o número de pústulas por folha pela área foliar (y). Esta foi calculada pela aplicação da fórmula de BARROS et alii (2): $y = 0,667x$, onde x é a área do retângulo circunscrito. O grau de infectividade era avaliado 40 a 50 dias após a inoculação.

Para o teste de infectividade dos uredosporos de U. phaseoli typica, foi usada a variedade 'RICO-23', devido à facilidade de obtenção das sementes. Inoculou-se o par de folhas primário de plantas com 16 dias de idade; utilizou-se uma suspensão de uredosporos na concentração de 0,25 mg/ml, gastando-se 5ml da suspensão para cada 10 folhas primárias. As mudas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas.

Para avaliação da infectividade dos uredosporos, adotaram-se dois métodos distintos: um qualitativo e outro quantitativo. O método qualitativo consistia apenas no registro da presença ou ausência de infecção, considerando-se infetada a planta que apresentasse uma única pústula; o método quantitativo consistia na contagem sob a binocular com aumento de 150 vezes, do número de pústulas em 10 campos escolhidos ao acaso, sendo 5 campos de um lado e 5 do outro lado da nervura principal.

3.3. Germinação e Infectividade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, Mantidos sob Diferentes Combinações de Temperatura e Umidade Relativa -

As temperaturas escolhidas foram 5, 10, 15°C, obtidas em

incubadores de precisão. A temperatura ambiente variou de 20 a 26°C em condições de laboratório.

Para manutenção da umidade relativa usaram-se soluções saturadas das seguintes substâncias: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgCl_2 , LiCl e H_2SO_4 ($d = 1,83$ na concentração de 32,6% v/v).

As determinações da umidade relativa nas diferentes temperaturas foram feitas com auxílio de um higrômetro de cabelo (Lambrecht Hygrometer) colocado no interior do dessecador.

Foram eleitas as seguintes umidades relativas: 20-24%; 50%; 74-75%; 80-83%. A umidade relativa ambiente (50-80%) foi determinada utilizando-se um higrógrafo.

Foram acondicionados nove miligramas de uredosporos de H vastatrix e três miligramas de uredosporos U. phaseoli typica, respectivamente, em cápsulas de gelatina, e estas em tubos de vidro com 7 x 2 cm. Estes tubos foram colocados no interior de frascos com 10 x 5 cm que serviram de câmara úmida, cada um com 50 ml de solução saturada dos diversos sais usados e do ácido sulfúrico (Figura 1).

Estudaram-se três temperaturas para cada solução saturada dos diversos sais, uma temperatura para ácido sulfúrico e uma condição ambiente, em cinco situações diferentes de umidade relativa. A duração do experimento foi de 100 dias, tendo sido preparados 5 frascos para cada tratamento.

Em intervalos de 20 dias, os uredosporos contidos em cápsulas de gelatina eram retirados e testados quanto ao poder de germinação e infectividade, para cada tratamento.

No teste de germinação, foram preparadas 10 placas de Petri de plástico contendo ágar-água a 2% sendo que cada placa foi considerada com uma repetição.

Para a avaliação do grau de infectividade dos uredosporos

de U. phaseoli typica adotou-se o método qualitativo. A temperatura de 10°C . e a duração prevista do experimento foi de 6 meses.

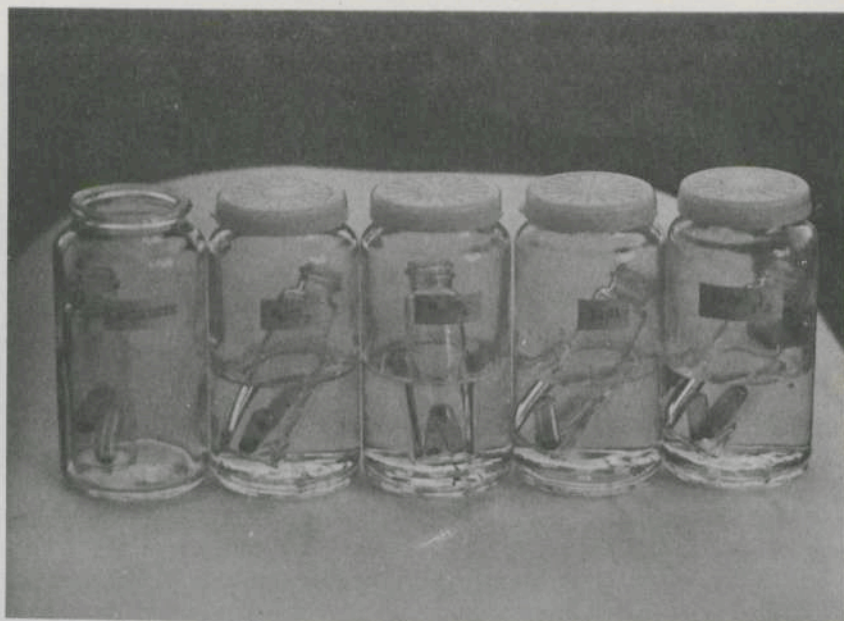


FIGURA 1. Cápsulas de gelatina com uredosporos no interior dos tubos colocados nos frascos que serviram de câmara úmida.

3.4. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em congelador (-18 a -16°C) -

3.4.1. Ferrugem do Cafeeiro (H. vastatrix) -

Uma alíquota de seis miligramas de uredosporos foi acondicionada no interior de cápsulas de gelatina e estas, em tubos de vidro com 7 x 2 cm vedados por tampa de rosca, perfazendo-se um total de 48 tubos (Figura 2). Destes, 36 foram colocados diretamente no congelador; 6 foram colocados no interior de de outro tubo de vidro com 10 x 5 cm, contendo uma solução de

ácido sulfúrico, que proporcionava 50% de umidade relativa à temperatura de 5°C. A duração prevista do experimento foi de 6 meses.

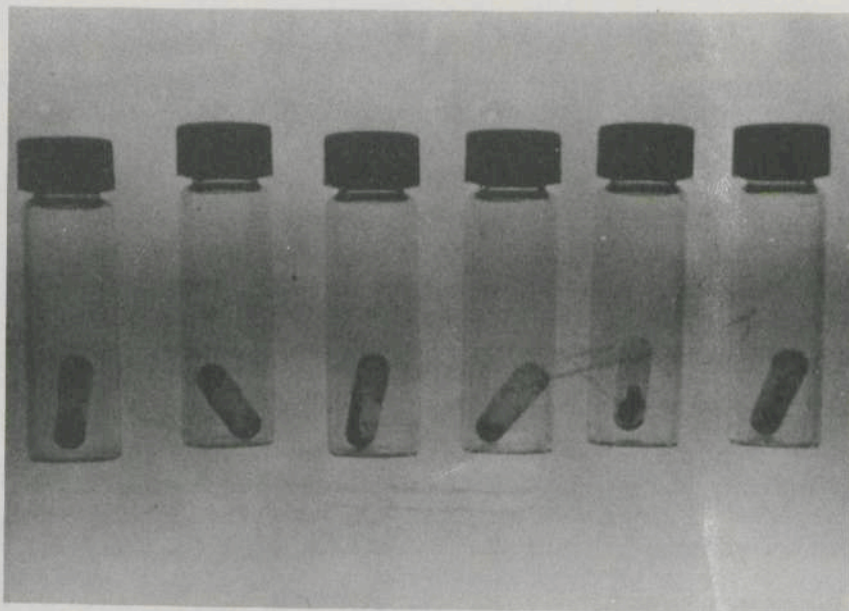


FIGURA 2. Cápsulas de gelatina com uredosporos de H. vastatrix (direita) e U. phaseoli (esquerda).

A intervalos de 30 dias, retiravam-se 6 tubos do congelador, submetendo-os a choques de 40 e 50°C, por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. Um tubo de cada um dos outros dois tratamentos era também retirado para os testes de germinação e infectividade.

3.4.2. Ferrugem do Feijoeiro (U. phaseoli typica) -

Foram acondicionados três miligramas de uredosporos no interior de cápsulas de gelatina e estas em tubos de vidro com

7 x 2 cm, vedados por tampa de rosca perfazendo um total de 60 tubos (Figura 2). Destes, 48 foram colocados diretamente em congelador; os 12 restantes foram colocados em condições idênticas ao armazenamento de H. vastatrix. A duração prevista do armazenamento foi de 6 meses.

A intervalos de 30 dias, retiravam-se 10 tubos, sendo 8 provenientes do congelador, um das condições ambientes e o outro de incubador à temperatura de 5°C armazenado em solução de ácido sulfúrico. Dos 8 tubos retirados do congelador, 3 eram submetidos ao choque térmico de 40°C por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente; 3 eram submetidos ao choque térmico de 50°C por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente; dois eram retirados diretamente do congelador, sendo um deles submetido a uma elevação gradativa de temperatura, de -18 a -16°C passando a 0, 5, 10, 15 e 20°C por 5 minutos em cada temperatura. Daí, procedia-se, em todos os casos, ao teste de germinação e infectividade.

3.5. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em Nitrogênio Líquido (- 196°C) -

3.5.1. Ferrugem do Cafeeiro (H. vastatrix) -

Alíquotas de nove miligramas de uredosporos foram colocados no interior de ampolas de vidro, perfazendo um total de 36 ampolas, vedadas com bico de Bynsen. As ampolas uma vez vedadas, eram colocadas no interior de caniços de alumínio colocados em caneca (Figura 3) e levadas diretamente ao interior do butijão contendo nitrogênio líquido.

Os outros tratamentos foram:

- armazenagem de alíquotas de três miligramas de uredosporos em cápsulas de gelatina, no interior de tubos de vidro, à temperatura ambiente;

- armazenagem de alíquotas de três miligramas de uredosporos, em cápsulas de gelatina, em tubos com 7 x 2 cm, estes no interior de um frasco de 10 x 5 cm contendo uma solução de 50 ml de ácido sulfúrico, como no caso anterior para H. vastatrix. A duração prevista foi de 6 meses.

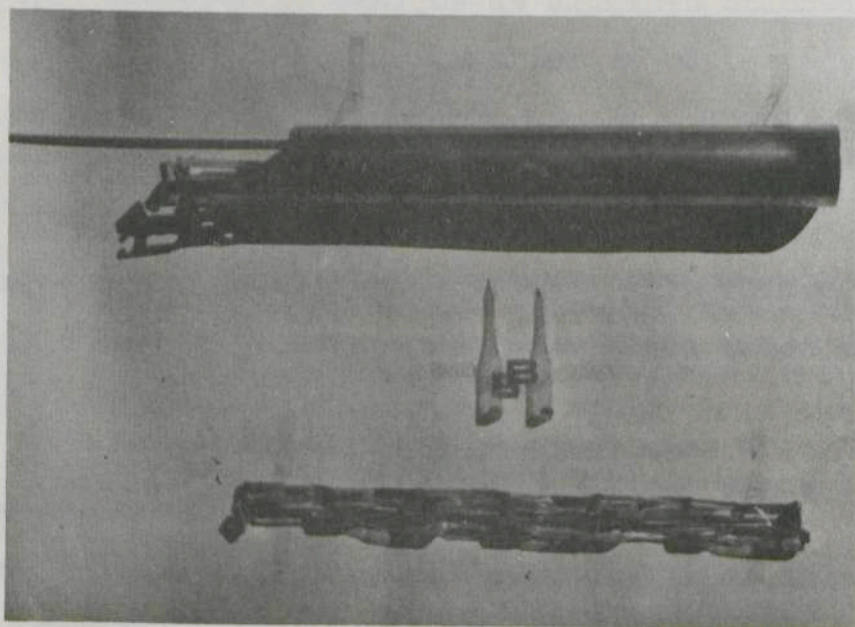


FIGURA 3. Detalhe mostrando caneca contendo os caniços (A); ampolas de vidro contendo uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli (B); e caniços suportando as ampolas (C).

A intervalos de 30 dias, retiravam-se 6 ampolas de nitrogênio líquido, 1 cápsula de gelatina da temperatura ambiente e outra da temperatura de 5°C, 50% de umidade relativa. Das 6 ampolas retiradas do nitrogênio líquido, 3 eram submetidas ao choque térmico de 40°C por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente e 3 eram submetidas ao choque térmico de 50°C por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. Daí, procedia-se aos testes de germinação e infectividade.

3.5.2. Ferrugem do Feijoeiro (U. phaseoli typica) -

Alíquotas de três miligramas de uredosporos foram colocadas no interior de ampolas de vidro perfazendo um total de 48.

Como no caso anterior, as ampolas uma vez vedadas, eram colocadas no interior de caniços de alumínio colocadas em canecas (Figura 3), e levadas ao interior do butijão de nitrogênio líquido.

Os outros tratamentos foram:

- armazenagem de alíquotas de três miligramas de uredosporos em cápsulas de gelatina, no interior de tubos de vidros, à temperatura ambiente;

- armazenagem de alíquotas de três miligramas de uredosporos em cápsulas de gelatina, em tubos com 7x2cm, estes no interior de um frasco de 10 x 5 cm contendo uma solução de 50 ml de ácido sulfúrico, como no caso anterior para H. vastatrix. A duração prevista foi de 6 meses.

Em intervalo de 30 dias, retirava-se 8 ampolas do nitrogênio

nio líquido, 1 tubo da temperatura ambiente e outro da temperatura de 5°C , 50% de umidade relativa. Das 8 ampolas retiradas do nitrogênio líquido, 3 foram submetidas ao choque térmico de 40°C por 5, 10 e 15 minutos respectivamente; 3 foram submetidas ao choque térmico de 50°C por 5, 10 e 15 minutos cada; 1 era levada diretamente à temperatura ambiente e a outra submetida a uma elevação de temperatura iniciando em -196°C e passando por -18 a -16 , 0, 5, 10, 15 e 20°C por 5 minutos cada. Daí procedia-se aos testes de germinação e infectividade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Germinação e Infectividades dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, mantidos sob Diferentes Combinações de Temperatura e Umidade Relativa -

4.1.1. Ferrugem do Cafeeiro (H. vastatrix) -

Os dados referentes aos testes de germinabilidade e infectividade encontram-se, respectivamente, na Figura 4 e no Quadro 1. Em conformidade com esses dados, verifica-se que, temperaturas mais baixas e umidades relativas em torno de 50 a 80%, ofereceram boas condições para a preservação da viabilidade dos uredosporos. Nas condições do ensaio, os esporos armazenados à temperatura ambiente de 20-26°C, muito embora apresentassem uma capacidade de germinação de 1,4% aos 20 dias e 0,2% aos 40 dias, não foram capazes de causar infecção perdendo portanto sua viabilidade após 20 dias de armazenamento. Este mesmo fenômeno pode ser evidenciado nas temperaturas de 10 e 15°C. NUTMAN & ROBERTS (23) estudando o efeito da concentração de inóculo sobre a infecção encontraram que, 62% dos u-

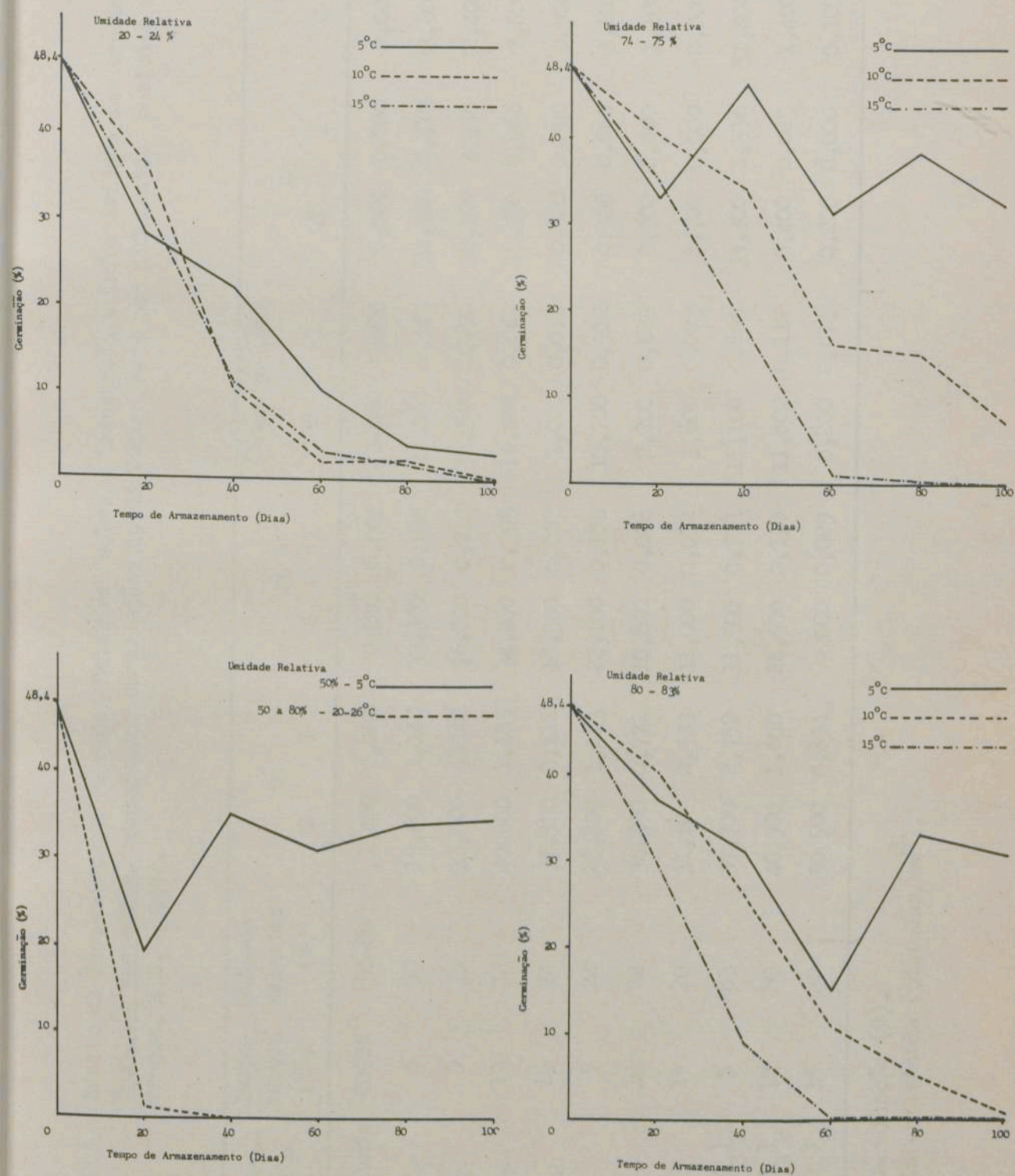


FIGURA 4 - Germinabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix*, armazenados sob diferentes combinações de temperatura (°C) e umidade relativa(%).

QUADRO 1 - Efeito da Temperatura e Umidade Relativa sobre a Germinação e Infectividade dos uredosporos de Hemileia vastatrix, armazenados em soluções de diversos sais por diferentes períodos de tempo. Viçosa, M.G. -- 1972.

Tratamento	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Tempo em Dias												
			20		40		60		80		100				
			G	I	G	I	G	I	G	I	G	I			
Ambiente	20-26	50-80	1,400	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H ₂ SO ₄	5	50	19,600	1,140	35,300	0,038	31,800	0,379	34,400	0,417	33,300	2,124			
MgCl ₂	5	75	33,000	4,040	46,200	0,717	31,100	0,790	38,100	3,938	32,400	1,160			
MgCl ₂	10	74	40,600	1,185	34,200	0,395	16,600	0,063	15,700	0,066	7,600	0,005			
MgCl ₂	15	74	35,500	2,112	18,500	0,002	1,000	0,010	0,300	0,000	0,000	0,000			
I ₂ Cl	5	24	28,800	1,213	22,100	0,188	10,700	0,912	4,300	0,060	3,100	0,005			
I ₂ Cl	10	22	36,500	0,772	10,800	0,008	2,200	0,629	2,900	0,000	1,100	0,000			
I ₂ Cl	15	20	31,40	0,533	11,000	0,012	3,600	0,023	2,700	0,000	0,000	0,000			
Ca(NO ₃) ₂	5	83	37,700	2,752	31,500	0,773	15,100	0,699	33,300	1,336	31,800	2,520			
Ca(NO ₃) ₂	10	80	40,900	1,680	26,500	0,130	11,800	0,112	5,400	0,025	1,400	0,000			
Ca(NO ₃) ₂	15	80	30,500	0,834	9,000	0,009	0,200	0,013	0,200	0,000	0,100	0,000			

G = Germinação (%).
I = Infectividade (pústulas/cm²).

redosporos que germinaram não penetraram nos estômatos; 24% haviam formado apressórios sobre os estômatos e, presumivelmente, penetrado; 14% haviam penetrado diretamente, sem formação de apressórios. Verificaram, ainda, que 10-20 esporos raramente determinam formação de lesão. Torna-se necessário, portanto, uma concentração de esporos bastante superior a esta, para que se obtenha a formação da lesão, pois como vimos anteriormente, grande parte dos esporos que germinaram, não penetraram nos estômatos para causar infecção. Esses fatos explicam o não aparecimento de lesões, quando se inocula com esporos que tenham percentagem de germinação muito baixa.

Somente os uredosporos mantidos a 74-75% de U.R. à temperatura de 10°C, foram capazes de germinar e causar infecção após 100 dias de instalado o experimento, sendo que na umidade relativa de 20-24%, nesta mesma temperatura, os esporos perderam sua capacidade de causar infecção após 80 dias. A 5°C os uredosporos armazenados nas umidades relativas de 50, 74-75 e 80-83%, permaneceram com uma percentagem de germinação superior a 30%, por um período de 100 dias; os esporos mantidos nas condições ambientes de 20-24%, perderam o poder germinativo nesse período, chegando a 3,1%. O armazenamento a umidades relativas baixas, portanto, parece tornar-se desfavorável à manutenção da viabilidade dos uredosporos.

O coeficiente de correlação entre poder germinativo e capacidade de infecção, considerando os cinco períodos de leitura, de acordo com o Quadro 1, mostrou valor positivo altamente significativo de $r = 0,6483$ ($p < 0,01$). Isto mostra evidente possibilidade de obtenção de pesadas infecções quando se inocula com esporos de alto poder germinativo.

4.1.2. Ferrugem do Feijoeiro (*Uromyces phaseoli typica*) -

Conforme ilustram os dados da Figura 5, Quadros 2 e 3, na temperatura de 5°C e nas umidades relativas de 50, 74-75 e 80-83% os uredosporos mantiveram poder germinativo superior a 70% após 100 dias de armazenamento, tendo alcançado as maiores médias nas umidades relativas de 50 e 74-75%. Na umidade relativa de 20-24%) não obstante os uredosporos tenham produzido infecção nas mudas inoculadas, mantiveram poder germinativo apenas de 21,5%.

À temperatura ambiente, que variou de 20 a 26°C, após 40 dias de armazenamento, os uredosporos foram capazes de produzir infecção, muito embora o poder germinativo tenha sido aparentemente nulo. Contudo aos 60 dias, tanto o poder germinativo quanto a infectividade eram nulos. Esta discrepância pode ser explicada baseando-se no número de esporos envolvidos. O teste de germinação, usualmente, é feito pela contagem de centenas de esporos, ao passo que quando se procede ao de infectividade, milhares de esporos são aplicados em cada folha quando se procede à inoculação. Resultado semelhante a este, foi obtido por SACKSTON (27), inoculando plantas de girasol com uredosporos de *Puccinia helianthi*.

Os uredosporos armazenados à temperatura de 10°C, permaneceram com maior poder germinativo à umidade relativa de 74-75%, vindo em seguida os mantidos a 80-83% e, finalmente aqueles mantidos a 20-24%, sendo que os uredosporos de todos esses tratamentos, foram capazes de causar infecção após 100 dias de armazenamento. Este mesmo fenômeno foi observado à temperatura de 15°C, evidenciando que condições de umidades relativas baixas (20-24%) e altas (80-83%), são desfavoráveis à preservação

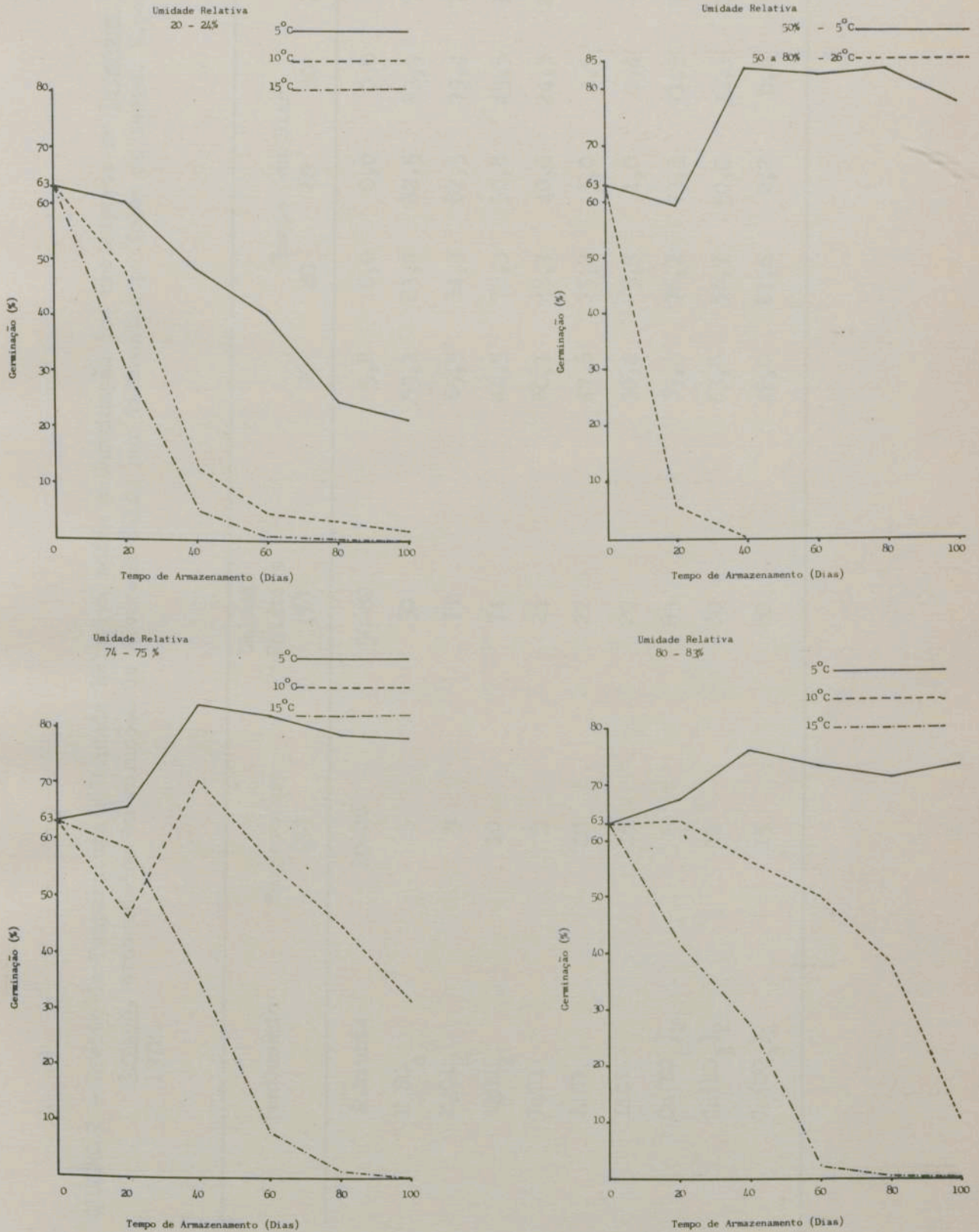


FIGURA 5 - Germinabilidade dos uredosporos de *Uromyces phaseoli typica*, armazenados sob diferentes combinações de temperatura (°C) e umidade relativa (%).

QUADRO 2 - Efeito da Temperatura e Umidade Relativa sobre a Germinação dos uredosporos de *Uromyces phaseoli* típica, armazenados em soluções de diversos sais, por diferentes períodos de tempo. Viçosa, M.G. 1972.

Tratamento	Temperatura (%)	Umidade Relativa (%)	Tempo em Dias				
			20	40	60	80	
Ambiente	20-26	50-80	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0
H ₂ SO ₄	5	50	59,1	83,7	82,5	83,9	77,9
MgCl ₂	5	75	65,5	84,3	82,3	79,4	78,5
MgCl ₂	10	74	46,5	70,3	56,8	45,5	31,8
LiCl	5	24	60,1	48,7	40,0	24,5	21,5
LiCl	10	22	47,6	15,2	5,0	3,5	1,7
LiCl	15	20	30,4	5,3	1,0	0,4	0,1
Ca(NO ₃) ₂	5	83	67,4	76,1	73,3	71,5	74,4
Ca(NO ₃) ₂	10	80	63,8	56,7	50,0	38,3	10,8
Ca(NO ₃) ₂	15	80	42,0	27,6	2,2	0,6	0,1

QUADRO 3 - Infectividade dos uredosporos de Uromyces phaseoli typica, mantidos em soluções de diversos sais em diferentes combinações de temperatura e unidade relativa. Viçosa, M.G. - 1972.

Tratamento	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Tempo em Dias																																		
			20					40					60					80					100														
			Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas	Mudas										
Ambiente	20-26	50-80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ SO ₄	5	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl ₂	5	75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl ₂	10	74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl ₂	15	74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LiCl ₂	5	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LiCl ₂	10	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LiCl ₂	15	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca(NO ₃) ₂	5	83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca(NO ₃) ₂	10	80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca(NO ₃) ₂	15	80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Infecção.
 0 = Não ocorreu infecção.

da viabilidade dos uredosporos. Os Gráficos da Figura 5 ilustram também que ocorreu um ligeiro acréscimo na viabilidade dos uredosporos mantidos a 5°C, excetuando-se aqueles armazenados nas umidades relativas de 20-24%. Esse acréscimo na germinabilidade, talvez tenha sido motivado por falhas no ato da amostragem e/ou volatilização de auto-inibidores da germinação durante o armazenamento à baixa temperatura.

4.2. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em Congelador (-18 a -16°C) -

Os dados atinentes aos testes de germinabilidade encontram-se nos Quadros 4 e 5 e na Figura 6, elaborada com os Quadros 4 e 5; os de infectividade acham-se nos Quadros 6 e 7.

Em conformidade com esses dados, verifica-se que a temperatura de 5°C e umidade relativa em torno de 50%, mostraram ser mais favorável à manutenção da viabilidade dos uredosporos, do que a temperatura do congelador, tanto para H. vastatrix, como para U. phaseoli typica.

Os uredosporos de U. phaseoli typica, mantidos a 5°C e 50% de umidade relativa, além de apresentarem maior percentagem de germinação aos 180 dias de armazenamento, também foram os que produziram maior infecção. O mesmo fenômeno pode ser observado com relação a H. vastatrix.

À temperatura ambiente após 60 dias de armazenamento, os uredosporos de ambos os organismos estavam inviáveis. Muito embora H. vastatrix apresentasse 0,33% de germinação aos 30 dias de armazenamento, não foi capaz de causar infecção (já explicado em 4.1.1.).

A percentagem de germinação dos uredosporos de H. vastatrix

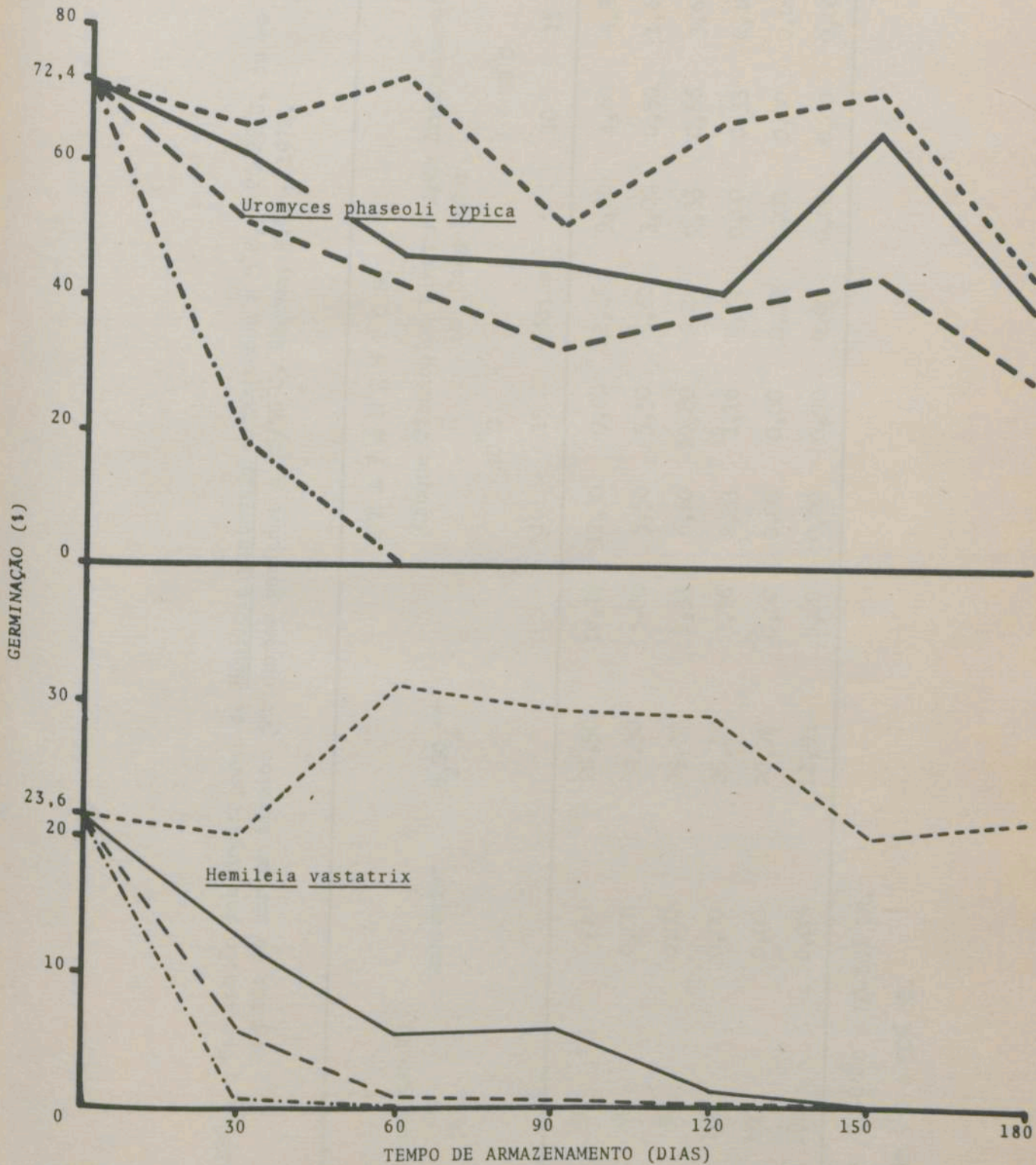


FIGURA 6 - Germinabilidade dos uredosporos de *Uromyces phaseoli typica* e *Hemileia vastatrix* armazenados sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa (U.R.). Temperatura de 5°C e 50% U.R. (-----); temperatura ambiente de 20-26°C e 50-80% U.R. (-.-.-.-), e ao serem submetidos a choques térmicos de 40°C (____) e 50°C (___), por 5 a 15 minutos, após permanência em congelador - 18° a - 16°C.

QUADRO 4 - Germinação dos uredosporos de Hemileia vastatrix armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em congelador seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias	Ambiente*	H ₂ SO ₄ **	T R A T A M E N T O S							
			Choque Térmico em Minutos Após Armazenamento Em Congelador							
			40°C			50°C				
			5	10	15	Médias	5	10	15	Médias
30	0,33	20,50	16,10	12,30	9,00	12,46	9,80	4,60	5,80	6,73
60	0,00	32,30	5,80	5,50	5,50	5,60	3,00	0,50	1,66	1,72
90	0,00	29,30	1,33	6,60	10,80	6,24	0,33	0,66	3,66	1,55
120	0,00	28,66	3,16	2,33	1,16	2,21	0,00	0,33	0,16	0,16
150	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	22,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

QUADRO 5 - Germinação dos uredosporos de Uromyces phaseoli typica, armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em Congelador seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C, sem choque térmico com aumento gradual da temperatura e, sem aumento gradual da temperatura. Viçosa, M.G. - 1972.

T R A T A M E N T O S												
Armazenamento		Congelador			Com Choque Térmico (min.)			Sem Choque Térmico				
Em	Ambiente*	40°C	50°C	5	10	15	5	10	15			
Dias	H ₂ SO ₄ **	Médias			Médias			Sem Aumen- to Gradua- al da Tem- peratu- ra***	Com Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***			
30	18,1	68,9	61,0	66,6	57,7	61,7	61,0	53,6	40,1	51,5	54,4	61,4
60	0,0	73,0	56,3	45,0	37,5	46,2	39,3	38,1	49,3	42,2	71,0	51,1
90	0,0	51,5	54,3	28,6	53,0	45,3	37,6	38,3	25,5	33,7	50,3	51,3
120	0,0	66,0	11,5	62,0	51,5	41,6	58,0	43,0	14,6	38,5	63,0	65,3
150	0,0	71,33	64,0	63,0	68,0	65,0	37,3	46,0	47,3	43,5	70,6	75,0
180	0,0	43,40	42,2	38,0	35,5	38,5	32,4	27,0	27,4	28,9	40,0	37,7

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

*** -18a - 16°C; 0; 5; 10; 15 e 20°C.

QUADRO 6 - Germinação e Infectividade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix*, armazenados a 5°C, a 20-26°C ou em congelador seguido de choque térmico, por curtos períodos, a 40/50°C. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias		T R A T A M E N T O S													
		Ambiente*		H ₂ SO ₄ **		Choque Térmico em Minutos Após Armazenamento En Congelador						50°C			
		40°C		50°C		5		10		15		5		10	
30	G	0,330	0,000	20,500	16,100	12,300	9,000	9,800	4,600	5,800	0,000	0,025	0,018	0,003	0,013
	I	0,000	0,000	0,005	0,030	0,020	0,025	0,018	0,003	0,013					
60	G	0,000	0,000	32,300	5,800	5,500	5,500	3,000	0,500	1,660	0,000	0,008	0,050	0,003	0,000
	I	0,000	0,000	0,480	0,000	0,000	0,008	0,050	0,003	0,000					
90	G	0,000	0,000	29,300	1,330	6,600	10,800	0,330	0,660	3,660	0,000	0,016	0,000	0,004	0,000
	I	0,000	0,000	1,160	0,004	0,000	0,016	0,000	0,004	0,000					
120	G	0,000	0,000	28,660	3,160	2,330	1,160	0,000	0,330	0,160	0,000	0,000	0,000	0,330	0,160
	I	0,000	0,000	0,660	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000				0,000	0,000
150	G	0,000	0,000	20,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	I	0,000	0,000	0,460	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				0,000	0,000
180	G	0,000	0,000	25,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	I	0,000	0,000	0,290	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				0,000	0,000

G = Germinação (%).

I = Infectividade (pústulas/cm²).

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

QUADRO 7 - Germinação e Infectividade dos uredosporos de *Uromyces phaseoli* *typica*, armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em congelador seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C, sem choque térmico com aumento gradual da temperatura e, sem aumento gradual da temperatura. Viçosa, M.G. 1972.

Armazenamento		T R A T A M E N T O S										Sem Choque Térmico			
		Congelador												Sem Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***	
		Com Choque Térmico (min.)					50°C								
Em Dias	Ambiente*	H ₂ SO ₄ **	5	10	15	5	10	15	5	10	15	Sem Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***	Com Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***		
30	G	18,1	68,9	61,0	66,6	57,7	61,0	53,6	40,1	54,4	61,4				
	I	64,3	50,2	26,3	40,7	38,7	25,3	10,3	28,4	41,7	84,7				
60	G	0,0	73,8	56,3	45,0	37,5	39,3	38,1	49,3	71,0	51,1				
	I	0,0	7,8	7,3	36,1	18,2	55,7	21,3	11,2	26,2	22,7				
90	G	0,0	51,5	54,3	28,6	53,0	37,6	38,3	25,5	50,3	51,3				
	I	0,0	39,9	16,7	5,3	26,1	21,4	17,7	14,6	29,9	21,4				
120	G	0,0	66,0	11,5	62,0	51,5	58,0	43,0	14,6	63,0	65,3				
	I	0,0	13,3	2,7	8,9	5,6	3,5	7,0	1,8	13,2	10,5				
150	G	0,0	71,3	64,0	63,0	68,0	37,3	46,0	47,3	70,6	75,0				
	I	0,0	3,60	3,2	5,2	1,8	3,9	1,6	1,4	0,7	0,5				
180	G	0,0	43,4	42,2	38,0	35,5	32,4	27,0	27,4	40,0	37,7				
	I	0,0	12,6	5,1	2,6	2,5	1,0	3,8	4,2	1,1	7,8				

G = Germinação (%).

I = Infectividade (pústulas/10 campos ao acaso).

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

*** -18a -16; 0; 5; 10; 15 e 20°C.

mantidos em congelador e submetidos a choques térmicos de 40 ou 50°C por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, foi declinando gradativamente. Aos 120 dias de armazenamento praticamente todos já estavam inviáveis. Portanto a temperatura de -18 a -16°C, não parece ser favorável à manutenção da viabilidade dos esporos de H. vastatrix. Com relação a U. phaseoli, embora o armazenamento à temperatura do congelador apresentasse índice de germinação e infectividade inferior ao das condições de 5°C e 50% de umidade relativa, os uredosporos mantiveram uma percentagem de germinação, num período de 180 dias, em torno de 28 a 40%. SCHEIN (29) encontrou resultados diferentes quando armazenou uredosporos de U. phaseoli var. phaseoli a -16°C; segundo ele, a esta temperatura, após 1 a 5 meses de armazenamento, os uredosporos estavam inviáveis.

Os uredosporos de H. vastatrix mantidos em congelador só germinaram quando submetidos a choques térmicos logo após sua retirada, obtendo-se os melhores resultados com o tratamento de 40°C por 5 a 15 minutos. No caso de U. phaseoli typica, os uredosporos não necessitam de choques térmicos após sua retirada do congelador, tendo-se conseguido 40% de germinação, quando os esporos foram retirados sem sofrer nenhum tratamento, e 37,7% quando submetidos a uma elevação de temperatura iniciando-se de -18 a -16°C, passando por 0, 5, 10, 15 e 20°C, por 5 minutos em cada temperatura. Resultado semelhante a este foi obtido por BROMFIELD (3), com os uredosporos da ferrugem do feijoeiro a -72°C.

Examinando-se os dados referentes aos testes de germinação de H. vastatrix e U. phaseoli typica, nos experimentos de armazenamento em congelador, nitrogênio líquido, 5, 10, 15 e 20-26°C notamos que, no início, a percentagem de germinação

dos uredosporos de H. vastatrix foi bastante inferior à de U. phaseoli typica. Isto se prende ao fato de terem sido os esporos de U. phaseoli typica, produzidos em casa-de-vegetação e de H. vastatrix, colhidos no campo. Quando se procede à coleta no campo, verifica-se grande variação no poder germinativo dos uredosporos, sendo portanto quase impossível obter u'a amostra homogênea e com alto poder germinativo.

O coeficiente de correlação entre poder germinativo e capacidade de infecção dos uredosporos de H. vastatrix, considerando os 6 intervalos de leitura, segundo os resultados apresentados no quadro 6, mostrou valor positivo altamente significativo de $r = 0,7894$ ($p < 0,01$) mostrando que um caráter variou dependendo de outro, sendo possível, portanto, correlacionar percentagem de germinação com infectividade nas condições em que o experimento foi realizado.

O coeficiente de correlação, entre poder germinativo e capacidade de infecção dos uredosporos de U. phaseoli typica, considerando também os 6 intervalos de leitura, segundo os resultados apresentados no quadro 7, ($r = 0,2405$, não significativo), mostrou que a percentagem de germinação variou independentemente do grau de infectividade, nos moldes do experimento. Esta discrepância talvez possa ser explicada pelo efeito da temperatura durante o período latente de infecção do patógeno, pois a temperatura no interior da casa-de-vegetação, onde se procedia aos testes de infectividade, chegou a atingir valores superiores a 30°C por período de até 5 horas ao dia, o que impedia o aparecimento de sintomas. SCHEIN (28) estudando o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento dos sintomas de ferrugem do feijoeiro, encontrou que um regime de $32,2^{\circ}\text{C}$ por 4 dias era o suficiente para matar o patógeno e, que um regime

de 32,2°C e 26,6°C dia-noite retardava o desenvolvimento dos sintomas por 10 dias, só sendo restabelecida a infecção após esse período, quando condições ideais eram fornecidas.

Examinando-se os dados referentes ao grau de infectividade de U. phaseoli typica, observa-se um declínio gradativo desde os 60 até 180 dias, quando quase todos os tratamentos apresentaram índice de infecção menor que 12,6% (Quadro 7) e 0,0% aos 150 dias (Quadro 11).

4.3. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em Nitrogênio Líquido (-196°C) -

Os dados referentes às percentagens de germinação observados nos vários tratamentos encontram-se na Figura 7 e nos Quadros 8 e 9, enquanto os de infectividade são apresentados nos Quadros 10 e 11. Os gráficos da Figura 7 foram feitos tomando-se as médias apresentadas nos Quadros 8 e 9.

Conforme demonstram os dados, quando se procedeu à armazenagem dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em nitrogênio líquido, com choques térmicos, posteriores à retirada, de 40°C por 5 a 15 minutos, obtiveram-se os melhores resultados na preservação da viabilidade.

Os uredosporos de H. vastatrix mantidos à temperatura ambiente, mesmo apresentando um poder germinativo de 0,33% aos 30 dias, não foram capazes de causar infecção, ao passo que os esporos de U. phaseoli typica neste período, mesmo sendo nula sua capacidade de germinação em ágar-água a 2%, conseguiu produzir infecção; essas discrepâncias já foram discutidas em

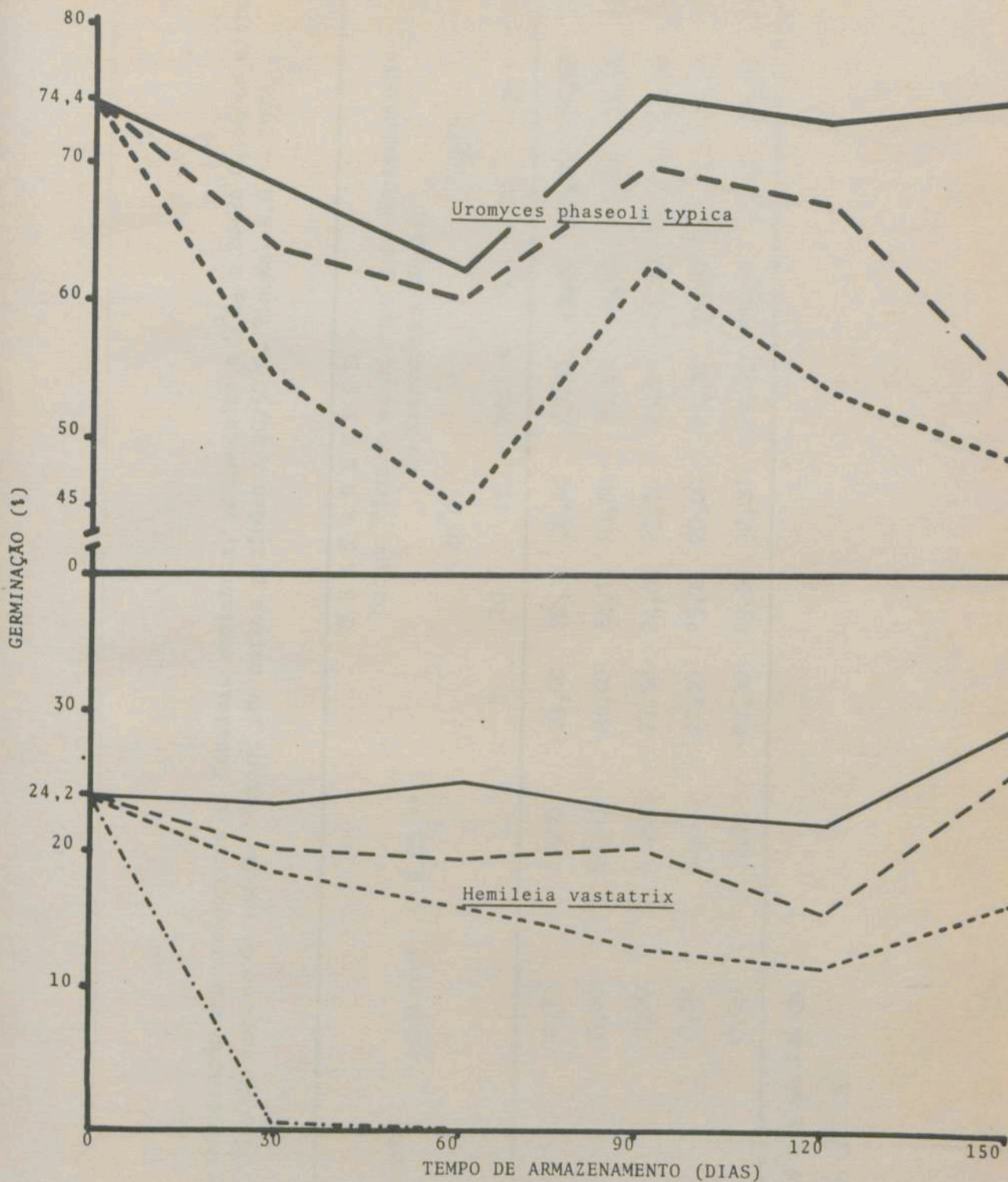


FIGURA 7 - Germinabilidade dos uredosporos de *Uromyces phaseoli typica* e *Hemileia vastatrix* mantidos sob diferentes combinações de temperatura e umidade relativa (U.R.). Temperatura de 5°C e 50% U.R. (....); temperatura ambiente de 20-26°C e 50-80% U.R. (-.-.-), e ao serem submetidos a choques térmicos de 40°C (—) e 50°C (---), por 5 a 15 minutos, após permanência em nitrogênio líquido - 196°C.

QUADRO 8 - Germinação dos uredosporos de *Hemileia vastatrix*, armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em nitrogênio líquido seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias	Ambiente*	H ₂ SO ₄ **	T R A T A M E N T O S							
			Choque Térmico em Minutos Após Armazenamento							
			40°C			50°C				
			5	10	15	Médias	5	10	15	Médias
30	0,33	19,00	23,00	28,30	18,60	23,30	19,60	22,30	18,60	20,16
60	0,00	16,60	26,60	24,60	23,80	25,00	23,50	22,60	13,60	19,90
90	0,00	13,83	21,50	24,00	23,70	23,00	25,70	20,20	16,33	20,70
120	0,00	12,83	22,00	25,11	20,00	23,30	18,00	12,11	18,16	16,09
150	0,00	17,00	27,30	29,60	32,00	29,60	29,30	25,10	25,00	26,46

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

QUADRO 9 - Germinação dos uredosporos de Uromyces phaseoli typica, armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em nitrogênio líquido seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C, sem choque térmico com aumento gradual da temperatura e, sem aumento gradual da temperatura. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias	Ambiente* H ₂ SO ₄ **	T R A T A M E N T O S						Sem Choque Térmico				
		Nitrogênio Líquido						Sem Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra	Com Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***			
		Com Choque Térmico (min.)		40°C		50°C						
		5	10	15	Médias	5	10	15	Médias			
30	0,0	54,6	68,1	66,0	69,8	67,9	63,5	66,6	62,0	64,0	73,5	68,8
60	0,0	45,0	66,3	63,0	57,0	62,1	57,6	64,3	61,0	60,9	69,0	60,0
90	0,0	63,0	73,3	78,0	74,0	75,1	76,6	68,6	67,3	70,8	78,3	76,3
120	0,0	54,0	70,6	72,3	73,3	72,0	69,3	60,3	64,6	64,7	68,3	62,3
150	0,0	49,6	77,3	77,3	72,3	75,6	73,0	65,3	25,0	54,4	72,0	70,3

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

*** -196; -18a - 16; 0; 5; 10; 15 e 20°C.

QUADRO 10 - Germinação e Infectividade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix*, armazenados a 5°C, a 20-26°C ou em nitrogênio líquido seguido de choque térmico, por curtos períodos, a 40/50°C. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias	Ambiente*	H ₂ O ** 4	T R A T A M E N T O S					
			40°C			50°C		
			5	10	15	5	10	15
			Nitrogênio Líquido Com Choque Térmico (min.)					
G	0,330	19,000	23,000	28,300	18,600	19,600	22,300	18,600
I	0,000	0,440	1,130	0,990	0,390	0,550	1,170	0,740
G	0,000	16,600	26,600	24,600	23,800	23,500	22,600	13,600
I	0,000	0,800	2,420	1,260	1,080	1,250	0,750	1,730
G	0,000	13,830	21,500	24,000	23,700	25,700	20,200	16,330
I	0,000	0,090	0,450	0,800	0,230	0,320	0,050	0,160
G	0,000	12,830	22,000	25,110	20,000	18,000	12,110	18,160
I	0,000	0,550	0,080	1,050	0,700	0,460	0,420	1,920
G	0,000	17,000	27,300	29,600	32,000	29,300	25,100	25,000
I	0,000	0,240	0,395	0,571	0,377	0,322	0,442	0,913

G = Germinação (%).

I = Infectividade (pústulas/cm²)

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

QUADRO 11 - Germinação e Infectividade dos uredosporos de *Uromyces phaseoli* típica, armazenados a 5°C, a 20-26°C, ou em nitrogênio líquido seguido de choque térmico por curtos períodos a 40/50°C, sem choque térmico com aumento gradual da temperatura e, sem aumento gradual da temperatura. Viçosa, M.G. - 1972.

Armazenamento Em Dias	Ambiente*	H ₂ SO ₄ **	T R A T A M E N T O S						Sem Choque Térmico		
			Nitrogênio Líquido						Sem Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra	Com Aumen- to Gradu- al da Tem- peratu- ra***	
			Com Choque Térmico (min.)			50°C					
			5	10	15	5	10	15	5	10	15
30	G	0,0	68,1	66,0	69,8	63,5	66,6	62,0	73,5	68,8	
	I	0,8	48,6	22,7	74,5	67,9	65,5	19,5	80,5	39,8	
60	G	0,0	66,3	63,0	57,0	57,6	64,3	61,0	69,0	60,0	
	I	0,0	7,7	6,0	4,6	5,2	5,7	3,5	1,1	4,5	
90	G	0,0	73,3	78,0	74,0	76,6	68,6	67,3	78,3	76,3	
	I	0,0	1,9	2,1	5,1	3,1	2,4	2,1	3,8	3,4	
120	G	0,0	70,6	72,3	73,3	69,3	60,3	64,6	68,3	62,3	
	I	0,0	4,7	0,3	4,3	0,8	5,7	4,0	2,9	2,4	
150	G	0,0	77,3	77,3	72,3	73,0	65,3	25,0	72,0	70,3	
	I	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

G = Germinação (%).

I = Infectividade (pústulas/10 campos ao acaso).

* 20-26°C e 50-80% UR.

** 5°C e 50% UR.

*** -196; -18a -16; 0; 5; 10; 15 e 20°C.

4.1.1. e 4.1.2. Aos 60 dias todos perderam o poder de infectividade.

Os uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica mantidos a 5°C e 50% de umidade relativa, após 150 dias, apresentaram um poder germinativo residual de 17 e 49,6% respectivamente. Quando se procedeu à armazenagem de nitrogênio líquido, após esse mesmo período, com choques posteriores de 40 e até 50°C por 5 a 15 minutos, obteve-se uma percentagem de germinação bastante superior. Tudo levando a crer que o armazenamento em nitrogênio líquido seja ideal para a preservação da viabilidade dos uredosporos. A quebra da dormência induzida nos esporos de H. vastatrix foi conseguida satisfatoriamente com choques de 40 ou 50°C por 5 a 15 minutos.

Para H. vastatrix o armazenamento só foi possível quando se submeteu os uredosporos a choques térmicos após sua retirada do nitrogênio líquido. Com relação a U. phaseoli typica o mesmo fenômeno não ocorreu; a retirada dos uredosporos diretamente, sem sofrer nenhum tratamento, apresentou resultados praticamente idênticos aos daqueles que foram submetidos à elevação de temperatura iniciando em -196°C, passando por -18 a -16, 0, 5, 10, 15 e 20°C, por 5 minutos cada temperatura, respectivamente.

O coeficiente de correlação entre o poder germinativo e a capacidade de infecção dos uredosporos de H. vastatrix, considerando os 5 períodos de leitura, segundo os dados apresentados no Quadro 10 foi de $r = 0,4111$ ($p < 0,01$) altamente significativo, sendo possível portanto correlacionar os dois parâmetros.

Para U. phaseoli typica, não se encontrou correlação positiva entre poder germinativo e capacidade de infecção. Encon-

trou-se um valor de $r = - 0,3971$, indicando a impossibilidade de interrelacionar os dois parâmetros nas condições que predominaram durante a realização do experimento. Este resultado já foi discutido em 4.2.

5. CONCLUSÕES

5.1. Germinação e Infectividade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, Mantidos sob Diferentes Combinações de Temperatura e Umidade Relativa -

O armazenamento a 5°C e umidade relativas em torno de 50-80% tornaram-se condições propícias à preservação da viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix, ao passo que para os esporos de U. phaseoli typica, os melhores resultados foram obtidos nas umidades relativas de 50 a 74-75%.

Os uredosporos de ambos os organismos mantidos a 5°C, a 20-24% de umidade relativa, e nas temperaturas de 10 e 15°C, independentemente da umidade relativa, mostraram um decréscimo gradativo da viabilidade, sendo mais acentuado nas temperaturas mais elevadas e umidades relativas mais baixas. Esse decréscimo, contudo, foi mais rápido à temperatura ambiente, pois a germinabilidade se tornou nula aos 60 dias para H. vastatrix e aos 40 dias para U. phaseoli typica.

Quando se procurou correlacionar germinabilidade com infectividade dos uredosporos de H. vastatrix encontrou-se o valor

de $r = 0,6483$ ($p < 0,01$) altamente significativo, o que demonstra o interrelacionamento dos dois parâmetros, embora, em alguns casos, a infectividade não acompanhasse a germinabilidade. Em se tratando dos esporos de U. phaseoli typica a infectividade não foi satisfatoriamente correlacionada com a germinabilidade na metodologia empregada. Ocorreu infecção do susceptível nos casos em que era muito reduzido ou nulo o poder germinativo dos uredosporos.

5.2. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, em Congelador, (-18 a -16°C) -

Os resultados mostraram, que o poder germinativo e infeccioso dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica mantidos em congelador, foi bastante inferior ao dos armazenados a 5°C e 50% de umidade relativa. Esse fenômeno foi bem mais acentuado para H. vastatrix, pois com 60 dias de armazenamento a percentagem de germinação atingiu valores inferiores a 6%; daí foi declinando até ser nula, aos 150 dias.

À temperatura ambiente, ambos os organismos perderam a capacidade de germinação aos 60 dias de armazenamento.

A temperatura em que os uredosporos apresentaram maiores índices de germinação e infecção foi 5°C, na umidade relativa de 50%.

Pelos resultados dos Quadros 4 e 5, verifica-se que a percentagem de germinação dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, mantidos em congelador e submetidos a choques térmicos de 50°C por 5 a 15 minutos, foi inferior àquela obtida com choques térmicos de 40°C por 5 a 15 minutos. Isto evi-

dencia que alguma injúria ocorreu nos uredosporos, quando foram submetidos a choques de 50°C por 5 a 15 minutos.

Os uredosporos de H. vastatrix mantidos em congelador parecem entrar em dormência. Quando se ministrou choques térmicos de 40°C por 5 a 15 minutos, obtiveram-se os melhores resultados na preservação da viabilidade. Por outro lado, os uredosporos de U. phaseoli typica, quando são armazenados em congelador, mantiveram um poder germinativo de 40% num período de 180 dias, sem nenhum tratamento após a retirada do congelador e, 37,7% quando submetidos a elevação da temperatura iniciando em -18 a -16°C e passando por 0, 5, 10, 15 e 20°C por 5 minutos em cada temperatura.

O coeficiente de correlação entre poder germinativo e capacidade de infecção para os uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, foi $r = 0,7894$ ($p < 0,01$) $r = 0,2405$, respectivamente. Mostrando ser altamente significativo para o primeiro e não significativo para o segundo. Temperaturas acima de 30°C por um período de 5 horas ao dia, durante a realização do experimento, foi provavelmente o fator responsável pelo não aparecimento de sintomas de ferrugem do feijoeiro.

5.3. Preservação da Viabilidade dos Uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em Nitrogênio Líquido (-196°C) -

O armazenamento dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica em nitrogênio líquido mostrou resultados bastante promissores, no que diz respeito à preservação da viabilidade.

O poder germinativo e infectivo dos uredosporos de ambos os

patógenos mantidos a -196°C , tanto com choques posteriores à armazenagem de 40°C , como 50°C por 5 a 15 minutos respectivamente, foi bastante superior ao dos armazenados a 5°C , a 50% de umidade relativa. Os melhores resultados na quebra da dormência dos esporos de H. vastatrix mantidos em nitrogênio líquido, foram obtidos com choques de 40°C por 5 a 15 minutos, pois a 50°C pelo mesmo período, parece ter ocorrido injúria nos uredosporos, afetando o poder germinativo.

À temperatura ambiente, os uredosporos de U. phaseoli e H. vastatrix tornaram-se inviáveis aos 60 e 30 dias respectivamente.

Os uredosporos de U. phaseoli typica (Quadro 9), mantidos em nitrogênio líquido, não necessitam de tratamentos posteriores a retirada. Obtiveram-se 72% de germinação quando foram retirados sem sofrer nenhum tratamento e 70,3% com elevação da temperatura, iniciando em -196°C passando por -18 a -16 , 0 , 5 , 10 , 15 e 20°C por 5 minutos em cada temperatura, após 150 dias de armazenamento. Por outro lado, verificou-se que o armazenamento em nitrogênio líquido induz dormência nos uredosporos de H. vastatrix, sendo necessário choques térmicos após a retirada.

O coeficiente de correlação para H. vastatrix mostrou valor de $r = 0,4111$ ($p < 0,01$) evidenciando que é possível obter pesadas infecções quando se dispõe de esporos com alto poder germinativo. Por outro lado, o coeficiente de correlação para U. phaseoli typica, $r = 0,3971$, mostrou a impossibilidade de correlacionar capacidade de germinação e poder infectivo, nas condições que prevaleceram durante a realização do experimento.

6. SUMARIO

Foi estudado o efeito da temperatura do congelador (-18 a -16°C), do nitrogênio líquido (-196°C) e do binômio temperatura-umidade relativa, sobre a germinação e infectividade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica.

Foram utilizados uredosporos de H. vastatrix colhidos de cafeeiros sombreados; os de U. phaseoli typica de plantas inoculadas artificialmente em casa-de-vegetação. O inóculo foi uniformizado em ambos os casos pela passagem em peneiras de 100 mesh.

Os testes de germinabilidade foram feitos por meio do se-meio em placas contendo ágar-água a 2% e incubadas a 20-22°C na ausência de luz, por 16 a 24 horas. Após esse período, procedia-se à contagem de 100 uredosporos por placa.

Os testes de infectividade de H. vastatrix, foram feitos utilizando-se mudas de café da variedade 'Mundo Novo'; para U. phaseoli typica, usou-se a variedade 'Rico-23'.

Para verificar o efeito do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix e U. phaseoli typica, foram adotadas as temperaturas de 5, 10,

15°C e ambiente, com as seguintes umidades relativas: 20-24, 50, 74-75, 80-83 e 50-80%. Nas observações feitas em intervalos de 20 dias, constatou-se que, os uredosporos de H. vastatrix mantidos à temperatura ambiente, perderam o poder germinativo decorridos 60 dias após o início do experimento, embora aos 20 dias já não fossem capazes de causar infecção. Os uredosporos de U. phaseoli typica, mesmo perdendo a capacidade de germinação aos 40 dias, foram capazes de causar infecção. Aos 60 dias, entretanto, apresentaram-se inviáveis.

Os uredosporos de H. vastatrix, armazenados a 10 e 15°C, independentemente da umidade relativa, praticamente perderam a capacidade de causar infecção aos 80 dias de instalado o experimento; U. phaseoli typica, nas mesmas condições, aos 100 dias de armazenamento, ainda foi capaz de causar infecção.

A temperatura de 5°C e 50 a 80% de umidade relativa mostrou-se ideal para a preservação da viabilidade dos uredosporos de H. vastatrix; para U. phaseoli typica a combinação que se mostrou mais propícia à preservação da viabilidade foi 5°C e 50 a 74-75% de umidade relativa.

Em congelador com temperatura de -18 a -16°C, verificou-se que somente os uredosporos de U. phaseoli typica permanecera viáveis até 180 dias; os esporos de H. vastatrix, com 120 dias de instalado o experimento apresentaram poder germinativo quase nulo. Quando se comparou o armazenamento em congelador e a 5°C, a 50% de umidade relativa, verificou-se que para ambos os organismos, a segunda condição foi mais favorável, pois, além de apresentar maior índice de germinação aos 180 dias, foi os que produziram maior índice de infecção. Observou-se também que os uredosporos de U. phaseoli typica podem ser retirados diretamente do congelador, sem alteração do poder germinativo,

o que não aconteceu à H. vastatrix, pois foi necessário choques térmicos para quebra da dormência. O tratamento de 40°C por 5 a 15 minutos foi o mais eficiente.

À temperatura ambiente, aos 60 dias, os uredosporos perderam a capacidade de germinação.

O armazenamento em nitrogênio líquido, à temperatura de -196°C, mostrou-se mais eficiente para preservação da viabilidade dos uredosporos, do que a condição de 5°C e 50% de umidade relativa, conseguindo mantê-los viáveis por um período de 150 dias.

Os uredosporos de U. phaseoli typica quando mantidos a -196°C, podem ser retirados sem nenhum tratamento posterior, não havendo redução do poder germinativo; por outro lado, H. vastatrix entre em dormência, necessitando de choques térmicos após sua retirada do nitrogênio líquido. 40°C por 5 a 15 minutos foi o tratamento mais eficiente.

À temperatura ambiente, aos 60 dias, ambos os organismos não germinaram e nem causaram infecção.

Em ambos os experimentos a percentagem de germinação de H. vastatrix foi satisfatoriamente correlacionada com a infectividade do patógeno; o que não ocorreu à U. phaseoli typica, nas condições que prevaleceram durante o experimento.

LITERATURA CITADA

1. AKAI, S. On the resistance of urediospores of Puccinia triticina to low temperature. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 19(1-2): 15-17, 1954. In: Rev. Appl. Mycol. 36:13, 1957.
2. BARROS, R.S.; Maestri, M.; Vieira, M.; Braga Filho, L. J. Determinação da área de folhas do café (Coffea arabica L. cv. 'Bourbon Amarelo'). Rev. Ceres 20(107): 44-52.1973.
3. BRUMFIELD, K. R. Cold-induced dormancy and its reversal in uredospores of Puccinia graminis var. tritici. Phytopathology, 54:68-74, 1964.
4. BUGBEE, W.M. & KERNKAMP, M. F. Storage of Pycniospores of Puccinia graminis secalis in liquid nitrogen. Plant Disease Reporter, 50:576-578, 1966.
5. DAVISON, P.A. & VAUGHAN, E. K. Effect of urediospore concentration on determination of races of rust fungi. Phytopathology, 53(10): 1138, 1963.

6. DAVISON, A. D. & VAUGHAN, E. K. Longevity urediospores of race 33 of Uromyces phaseoli var. phaseoli in storage. *Phytopathology*, 53 (67): 736-737, 1963.
7. DOEBBLER, G. F. & RINFRET, A. P. Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing. *J. Bacteriology*, 85: 485, 1963.
8. DUNDAS, S. Mutation in bean rust uredospores in cold storage. *Phytopathology*, 38:914, 1948.
9. FERRAZ, S. Determinação das raças fisiológicas de Uromyces phaseoli var. phaseoli na Zona da Mata, M. G., e resistência de variedades de Phaseolus vulgaris L. a algumas raças. Tese de M. S., U.F.V., Viçosa, M.G. 50 pp, 1969.
10. FLOR, H. H. Longevity of urediospores of flax rust. *Phytopathology*, 44: 469-471, 1954.
11. ————. Preservation of urediospores of Melampsora lini. *Phytopathology*, 57:320-321, 1967.
12. FORBES, I. L. Factors affecting the development of Puccinia coronata em Lousiana. *Phytopathology*, 29: 659-684, 1939.
13. GOOS, R.D.; DAVIS, E. E. & BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. *Mycologia*, 59: 58-66, 1967.

14. KILPATRICK, R. A. & MOBEY, C. L. Survival of selected fungi stored in liquid nitrogen. *Plant Disease Reporter*, 51:539-540, 1967.
15. KILPATRICK, R. A.; HARMON, D. L.; LOEGERING, W. Q. & CLARK, W. A. Viability of uredospores of Puccinia graminis var. tritici stored in liquid nitrogen. *Plant Disease Reporter*, 55:871-873, 1971.
16. KIRALI, Z. *Methods in Plant Pathology (With special reference to breeding for diseases resistance)*. 1.^a ed. Acad. Kiadó de Budapest. Budapest, Hungria. 600 pp, 1970.
17. LEATH, K.T; ROMIG, R.W.& ROWELL, J.B. A system for storing rust spores in liquid nitrogen. *Phytopathology*, 56: 570, 1966.
18. LOEGERING, W. Q. & HARMON, D. L. Effect of thawing temperature on urediospores of Puccinia graminis var. tritici frozen in liquid nitrogen. *Plant Disease Reporter*, 46: 299-302, 1962.
19. LOEGERING, W. Q.; HARMON, D. L. & CLARK, W. A. Storage of uredospores of Puccinia graminis var. tritici in liquid nitrogen. *Plant Disease Reporter*, 50:502-506, 1966.
20. LOEGERING, W. Q; Mc KINNEY, H. H.; HARMON, D.L. & CLARK, W.A. A long term experiment for preservation of urediospores of Puccinia graminis tritici in liquid nitrogen. *Plant Disease Reporter*, 45(3):384-385, 1961.

21. MANEVAL, W. E. The viability of uredospores. Phytopathology, 14: 403-407, 1924.
22. MERYMAN, H. T. Mechanics of freezing in living cells tissues. Science, 124: 515-521, 1956.
23. NUTMAN, F. J. & ROBERTS, F. M. Studies on the biology of Hemileia vastatrix Berk. et Br. British Mycological Society Transactions, 46(1): 27-48, 1963.
24. PRESCOTT, J. M. & KERNKAMP, M. F. Genetic stability of Puccinia graminis var. tritici in cryogenic storage. Plant Disease Reporter, 55: 695-696, 1971.
25. ROMEIRO, R. Germinação e poder infectivo dos uredospores de Hemileia vastatrix Berk. et Br. mantidos sobre diferentes produtos vegetais e o suscetível. Tese de M. S., U.F.V., Viçosa, M.G., 41 pp. 1971.
26. ROSEN, H. R. & WEETMAN, L. M. Factors affecting the longevity of urediospores of Puccinia coronata avenae. Phytopathology, 29: 21, 1939. (Abstract).
27. SACKSTON, W. E. Studies on sunflower rust. II. Longevity of urediospores of Puccinia helianthi. Can. J. Botany, 38: 883-889, 1960.
28. SCHEIN, R. D. Effects of postinoculation temperatures on rate of bean rust symptom development. Phytopathology, 50: 653, 1960.

29. SCHEIN, R. D. Storage viability of bean rust uredospores. *Phytopathology*, 52: 653-657, 1962.
30. SCHEIN, R. D. & ROTEM, J. Temperature and humidity effects on uredospore viability. *Mycologia*, 57:397-403, 1965.
31. SYAMANANDA, R. & STAPLES, R.C.. The problem of germinating uredospores. *Phytopathology*, 51, 579, 1961.
32. TUITTE, J. Liquid Nitrogen storage of fungi sealed in Polyester film. *Mycologia*, 60: 591-594, 1968.
33. WELLMAN, A. M. & WALDEN, D.B. Qualitative and quantitative estimates of viability for some fungi after periods of storage in liquid nitrogen. *Can. J. Microbiol.* 10:585-593, 1964. In: *Plant Disease Reporter*, 51:539-540, 1967.