

Efecto Inhibidor del Extracto Acuoso de las Teliosporas Telióides del Hongo *Puccinia pampeana* Speg., sobre Agentes Causales de Royas

Martha Maria Passador, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas (DPV-SDFFCA), Botucatu-SP, Brasil CP 18610-307; **Mário Barreto Figueiredo(+)**, Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Laboratório de Micologia Fitopatológica, SP, Brasil CP 04014-002; y **Edson Luiz Furtado**, UNESP-DPV-SDFFCA. Correspondencia: marthamaria_p@yahoo.com.br

(Recibido: Mayo 20, 2008 Aceptado: Junio 24, 2008)

Passador, M.M., Barreto Figueiredo, M. y Furtado, E.L. 2008. Efecto inhibidor del extracto acuoso de las teliosporas telióides del hongo *Puccinia pampeana* Speg., sobre agentes causales de royas. Revista Mexicana de Fitopatología 26:138-146.

Resumen. La roya de ají y del pimentón es provocada por el hongo *Puccinia pampeana*. Este hongo presenta dos clases teliales distintas, por eso es clasificada como una roya biteliomórfica. La primera ocurre en el inicio de los síntomas, puede producir las teliosporas aecidióides, en cadenas de color amarillo-oro y envueltos por el peridio. La segunda ocurre al final del ciclo vital del hongo en el hospedante, con las teliosporas telióides pulvinadas, bicelulares, pediceladas de color marrón oscuro. Estas teliosporas bicelulares contienen en sus paredes sustancias auto-inhibidoras de la germinación que se pueden remover con lavados de estas esporas. Extractos acuosos de las esporas fueron hechos con 20 mg de teliosporas telióides de *Puccinia pampeana*, evaluándose la inhibición producida en la germinación de las teliosporas aecidióides de la misma roya, en urediniosporas de *Coleosporium plumierae* y *Hemileia vastratrix*. Ese efecto inhibidor fue demostrado a lo largo de los metabasidios (teliosporas aecidióides de *P. pampeana*) y de los tubos germinales del *C. plumierae* y *H. vastratrix*. El efecto inhibidor fue comprobado después de 4 y 6 h del contacto de las esporas con los extractos.

Palabras clave adicionales: Auto-inhibidor, germinación, metabasidio, tubo germinal.

La roya (*Puccinia pampeana* Speg.) del ají (*Capsicum baccatum* L.) y del pimentón (*Capsicum annuum* L.) es conocida como una roya biteliomórfica (López-Franco *et al.*, 1990), pues presenta dos clases sexuales (teleomorfos) provenientes del mismo micelio, siendo uno aecidióide (en cadena y polvoriento) del tipo *Endophyllum*, y otro telióide (pulvinado) del tipo *Puccinia* (Hennen *et al.*, 1987; Lindquist,

Abstract. Green pepper rust is caused by the fungus *Puccinia pampeana*. Since this fungus has two distinct telial forms, it is classified as a biteliomorphic rust. The first form occurs at the beginning of symptom appearance, with aecidioid, golden-yellow, catenulate teliospores surrounded by a peridium. The second one occurs at the end of the fungus cycle in the host, with dark brown, pulvinate, bicellular, pedicellate telioid teliospores, which contain germination self-inhibiting substances in their walls, that can be removed by washing. Aqueous extracts were prepared with 20 mg of *Puccinia pampeana* telioid teliospores, and tested on germination inhibition of aecidioid teliospores of the same rust and of urediniospores of *Coleosporium plumierae* and *Hemileia vastratrix*. The inhibiting effect was demonstrated by measuring metabasidial length (aecidioid teliospores of *P. pampeana*) and germ tube length of *C. plumierae* and *H. vastratrix*. The inhibiting effect was verified after 4 and 6 h of contact of spores with the extracts.

Additional keywords: Self-inhibitor, germination, metabasidium, germinative tube.

abbreviated article.

Rust (*Puccinia pampeana* Speg.) of locoto (*Capsicum baccatum* L.) and green pepper (*Capsicum annuum* L.) is known as a biteliomorphic rust (López-Franco *et al.*, 1990), since it has two sexual classes (teleomorphs) from the same mycelium, one is aecidioid (dusty and in chains) of the *Endophyllum* type, and the other telioid (pulvinate) of the *Puccinia* type (Hennen *et al.*, 1987; Lindquist, 1963). This characteristic make it an important pathogen for studies on possible variations in the rust life cycles (Martins *et al.*, 1995). Through laboratory studies, it was proved the existence of self-inhibitor substances of germination in telioid teliospores. This allows spores to remain dormant during unfavorable periods for infection, since fast germination of all the spores at the same time is inhibited, and also enable survival of the

1963). Esa característica hace que sea un importante patógeno para estudios de posibles variaciones de los ciclos vitales de las royas (Martins *et al.*, 1995). En las teliosporas telióides, por medio de estudios en laboratorio, se comprobó la existencia de sustancias auto-inhedoras de la germinación. Eso permite que las esporas permanezcan en estado latente durante los períodos desfavorables a la infección, pues impiden la germinación rápida de todas las esporas al mismo tiempo, y también posibilitan la supervivencia del patógeno en la ausencia del hospedante. Tales sustancias son hidrosolubles y son removidas durante el período de las lluvias al final del verano, posibilitando la infección de nuevos hospedantes (Figueiredo y Carvalho Jr., 1994a, 1995). Los auto inhibidores de las esporas de las royas son factores importantes que previenen la germinación prematura y contribuyen a una dispersión eficiente de las esporas (Wolf, 1982). Figueiredo y Carvalho Jr. (1994a), y Figueiredo y Coutinho (1994) comprobaron en laboratorio, la relación entre el lavado de los soros y la germinación de las teliosporas de las royas, determinando que el lavado promueve una lenta solubilización de los auto-inhedoros, lo cual provoca que las esporas germinen normalmente. Algunos extractos acuosos que utilizan otras estructuras fúngicas han sido estudiados para algunas enfermedades de las plantas. Piero (2003) utilizó extractos obtenidos a partir del polvo seco de basidiocarpos del hongo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler y *Agaricus blazei* Murill, comprobando que presentaron compuestos que activan las respuestas de defensa en plantas y pueden auxiliar en el control de enfermedades vegetales, dependiendo de la naturaleza del agente causal, como por ejemplo, la antracnosis en el pepino (*Cucumis sativus* L.). Tonucci y Pascholati (2004), verificaron y comprobaron en experimentos *in vitro* la acción inhibitoria de los extractos preparados con *L. edodes* sobre el crecimiento del *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves y Rosato y *Colletotrichum sublineolum* Henn. Aún con extractos de *L. edodes* y *A. blazei*, Silva *et al.* (2006), demostraron el potencial de éstos en el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta y Nishiuchi. Diversos trabajos mostraron el potencial del *Saccharomyces cerevisiae* Meyen en el control de enfermedades de las plantas. La acción protectora de la levadura formulada con la levadura Fleischmann® fue constatada por Piccinin *et al.* (2005), en sorgo (*Sorghum* spp. L.) contra la antracnosis causada por *C. sublineolum* y la mancha de las hojas, provocada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard y E.G. Suggs. En experimento conducido en campo, por medio de aplicaciones semanales de *S. cerevisiae*, hubo reducción significativa de la antracnosis en sorgo, y también una única aplicación con la levadura fue suficiente para reducir el progreso de la mancha de las hojas. Esta levadura presenta un buen desempeño en campo para el control de enfermedades foliares en sorgo. Utilizando extractos de *S. cerevisiae*, Bonaldo y Pascholati (2007), obtuvieron inhibición de la formación de apresorios

pathogen in the absence of a host. Such substances are hydrosoluble and they are removed during the rainfall season at the end of the summer, enabling infection of new hosts (Figueiredo y Carvalho Jr., 1994a, 1995). Rust spore self-inhibitors are important factors which prevent premature germination and contribute to an efficient dissemination (Wolf, 1982). Figueiredo and Carvalho Jr. (1994a), and Figueiredo and Coutinho (1994) proved in the laboratory the relation between washing of sori and germination of rust teliospores and determined that washing promotes a slow solubilization of the self-inhibitors, which make spore to a normal germination. Some aqueous extracts that use fungal structures have been studied for some plant diseases. Piero (2003) used extracts obtained from dry powder of basidiocarps from the fungus *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Agaricus blazei* Murill, corroborating that have compounds that activate plant defense response and may help in the control of plant diseases, depending on the nature of the causal agent, as for example, antracnosis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Tonucci and Pascholati (2004), verified and corroborated through *in vitro* experiments the inhibitory action of extracts from *L. edodes* upon growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves and Rosato and *Colletotrichum sublineolum* Henn. Even with extracts from *L. edodes* and *A. blazei*, Silva *et al.* (2006), demonstrated their potential to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta and Nishiuchi. Several studies showed the potential of *Saccharomyces cerevisiae* Meyen for plant disease control. The protecting action by the yeast formulated with the yeast Fleischmann® was verified by Piccinin *et al.* (2005), in sorghum (*Sorghum* spp. L.) against antracnosis caused by *C. sublineolum* and leaf blotch caused by *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard and E.G. Suggs. In a field experiment by weekly applications of *S. cerevisiae*, a significant reduction of antracnosis was achieved in sorghum; also, one application of the yeast was enough to reduce progress of leaf blotch. This yeast has good performance in the field for control of foliar diseases of sorghum. Using extracts of *S. cerevisiae*, Bonaldo and Pascholati (2007), obtained inhibition of appresoria formation in *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis and Halst. and *C. sublineolum*. According to Martins *et al.* (1986), application of the culture filtrate of *S. cerevisiae* on coffee (*Coffea arabica* L.) leaves, 72 h before inoculation with *Hemileia vastratrix* Berk. and Broome, causal agent of coffee rust, induced resistance to the pathogen without affecting germination and appresoria formation by urediniospores of the fungus. This investigation was carried out in 2006 with the objectives to experiment and evaluate the action of aqueous extracts of spores (EAE) prepared from telioid teliospores, on germination of aecioid teliospores of *Puccinia pampeana*, as well as in urediniospores of *Coleosporium plumierae* Pat., causal agent of frangipani (*Plumeria rubra* L.) rust, and *Hemileia vastratrix*.

en *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis y Halst. y *C. sublineolum*. De acuerdo con Martins *et al.* (1986), la aplicación del filtrado del cultivo de *S. cerevisiae* en hojas de café (*Coffea arabica* L.), 72 h antes de la inoculación con *Hemileia vastratrix* Berk. y Broome, agente causal de la roya del cafeto, indujo resistencia al patógeno, sin afectar la germinación y formación de apresorios de las urediniosporas del hongo. La presente investigación que se realizó durante el año 2006, tuvo como objetivo experimentar y evaluar la acción de los extractos acuosos de esporas (EAE) preparados a partir de teliosporas telioides, en la geminación de las teliosporas aecidioides de *Puccinia pampeana*, y también, sobre urediniosporas de *Coleosporium plumierae* Pat., agente causal de la roya de frangipani (*Plumeria rubra* L.), y de *Hemileia vastratrix*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las teliosporas telioides de *Puccinia pampeana*. Las teliosporas telioides, tipo *Puccinia*, fueron obtenidas a partir de plantas de ají escabeche (*Capsicum baccatum* L.), previamente inoculadas con aislados de *P. pampeana*, colectada de ají panca (*C. chinense* Jacq.), proveniente de Botucatu-SP (FCA-UNESP, Campus de la Hacienda Lageado - Brazil). Las plantas de ají inoculadas con la roya, fueron plantadas en macetas de 10 cm de diámetro y 10 cm de altura, permaneciendo en invernadero, luego se transfirieron a una cámara con temperatura controlada (18-20°C) y fotoperíodo de 14 h con luz, donde se realizó la inoculación. Después de aproximadamente 65 días de la inoculación, cuando la enfermedad termina su ciclo, las teliosporas fueron colectadas bajo microscopio estereoscópico con ayuda de una aguja histológica, e inmediatamente fueron acondicionadas en criotubos con capacidad para 1.5 mL, y éstos se almacenaron a 9°C hasta su utilización.

Preparación de los extractos. La preparación de los extractos se realizó de acuerdo a Figueiredo y Carvalho Jr. (1995), con algunas modificaciones. Muestras de 20 mg de teliosporas telioides se colocaron en tubos de PVC con capacidad para 12 mL, luego se les adicionaron 1.5 mL de agua destilada estéril conteniendo tween a 0.01%. Los tubos se cerraron y las teliosporas permanecieron a 9°C por 24 h; luego fueron centrifugados durante 10 min a 3,500 rpm, en una centrífuga Tominaga de mesa, modelo TD65, que posee un rotor con aproximadamente 19.8 cm de diámetro. Después, el líquido sobrenadante se recogió en criotubos los cuales se almacenaron en un congelador a -5°C hasta su utilización. El proceso se repitió durante 4 días, reutilizando los residuos de las teliosporas del lavado anterior, constituyendo de esta manera 4 muestras de extracto acuoso de esporas denominadas EAE₁, EAE₂, EAE₃, EAE₄. En cada repetición el producto final fue diluido. Para evaluar el efecto de los extractos acuosos en la germinación de las esporas de royas, se midió de longitud de los tubos germinales de las urediniosporas, y de los metabasidios para las teliosporas

MATERIALS AND METHODS

Isolation of teloid teliospores of *Puccinia pampeana*. Teloid teliospores of the *Puccinia* type, were obtained from *Capsicum baccatum* plants previously inoculated with isolates of *P. pampeana*, collected from *C. chinense* Jacq., in de Botucatu-SP (FCA-UNESP, Campus de la Hacienda Lageado - Brazil). Rust inoculated plants were planted in pots 10 cm in diameter and 10 cm height, in the greenhouse, then, they were transferred to a chamber with controlled temperature (18-20°C) and 14 h photoperiod where inoculation took place. Approximately 65 days after inoculation, when the disease finishes its cycle, using a dissecting microscope teliospores were collected with a histological needle and transferred to 1.5 mL cryotubes and were kept at 9°C until use.

Extract preparation. Extract preparation was carried out according to Figueiredo and Carvalho Jr. (1995), with some modifications. Samples consisting of 20 mg of teloid teliospores were placed in 12 mL PVC tubes, then 1.5 mL of sterile distilled water with tween a 0.01% were added. Tubes were closed and incubated at 9°C for 24 h; then, they were centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. The supernatant was collected in cryotubes and kept at -5°C for further use. The process was repeated during 4 days reusing teliospore residues from the previous washing, so that a set of four samples of aqueous teliospore extracts (EAE₁, EAE₂, EAE₃, EAE₄) were obtained for testing. The final product of each replicate was diluted. In order to evaluate the effect of extracts on rust spore germination, germination tube length of urediniospores were measured as well as metabasidia from aecidioid teliospores.

Pathogens used in studies with aqueous spore extracts (EAE). For the study, aecidioid teliospores (*Endophyllum* type) of *Puccinia pampeana* [= *Endophyllum pampeanum* (Speg.) Lindq.] were used; they were collected from *C. baccatum* previously inoculated with an isolate of *P. pampeana*, obtained from *C. chinense* from Botucatu-SP, Brazil. Urediniospores of *Coleosporium plumierae* and *Hemileia vastratrix* from naturally infected plants around the Biological Institute of São Paulo- SP, Brazil, were also included in the study. Experiments were carried out in excavated slides with one to three cavities. There were four replications for each spore sample (EAE) and treatment, under a completely randomized design, and the mean comparison was done with Tukey's test (0.05). The analysis of variance was done with the program Estat (Sistema para Análises Estatísticas, v. 2.0; Universidad Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal). Metabasidia of *P. pampeana* and germination tubes of *C. plumierae* and *H. vastratrix* were measured with an optic ocular microscope using 20 spores at random. Readings for each rust structure and extract were taken 4 and 6 h later (Figueiredo and Carvalho Jr., 1995). Aecidioid teliospores of *P. pampeana* and urediniospores of *H. vastratrix* were collected with a histological needle and then the spore suspension was prepared. For *C. plumierae*, according to the technique of Figueiredo and Carvalho Jr. (1994b),

aecidioides.

Patógenos utilizados en estudios con extracto acuoso de esporas (EAE). Se utilizaron teliosporas aecidioides (tipo *Endophyllum*) de *Puccinia pampeana* [= *Endophyllum pampeanum* (Speg.) Lindq.], colectadas de plantas de ají de la variedad ají escabeche, anteriormente inoculadas con un aislado de *P. pampeana*, colectado de ají panca (*C. chinense*) proveniente de Botucatu-SP, Brasil, como se mencionó anteriormente. También se utilizaron urediniosporas de *Coleosporium plumierae*, agente causal de la roya de la frangipani (*Plumeria* spp.) y de *Hemileia vastratrix*, agente causal de la roya del cafeto, colectadas de plantas naturalmente infectadas existentes en la área del Instituto Biológico de São Paulo- SP, Brazil. Los experimentos se realizaron en láminas excavadas con una a tres cavidades. Para cada muestra de spora y tratamiento (EAE) se hicieron 4 repeticiones en un diseño completamente al azar y la comparación de media se hizo mediante la prueba de Tukey (0.05). El análisis de varianza se hizo mediante el programa Estat (Sistema para Análisis Estadísticas, v. 2.0; Universidad Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal). Los metabasidios de *P. pampeana* y los tubos germinales de *C. plumierae* y *H. vastratrix* fueron medidos en microscopio óptico con ocular de medida, utilizando 20 esporas elegidas al azar. Las lecturas se realizaron después de 4 a 6 h (Figueiredo y Carvalho Jr., 1995) para cada estructura de roya y de extracto. Las teliosporas aecidioides de *P. pampeana* y las urediniosporas de *H. vastratrix* se colectaron con una aguja histológica, y enseguida se preparó la suspensión de esporas. Para *C. plumierae*, de acuerdo con la técnica de Figueiredo y Carvalho Jr. (1994b), las hojas de frangipani infectadas con roya se colectaron y se rasparon con un pincel de pelos ásperos, bajo agua corriente. Enseguida se colocaron en cajón plástico con tapón, midiendo 35 x 30 cm y 12 cm de altura, forradas con espuma de nylon humedecida. Después de 24 h, se colectaron las urediniosporas que se desarrollaron, para la preparación de suspensión. Este procedimiento se realizó porque estudios previos han demostrado que urediniosporas recién producidas tienen la capacidad de germinación de 80 a 90%, mientras que las más viejas presentan un 45%. Para las tres royas utilizadas en los experimentos, la suspensión se preparó en agua destilada a una concentración de 10^4 esporas por mL⁻¹ y tween a 0.01%. Luego se distribuyeron 50 µL de la suspensión en las cavidades de las láminas, y en seguida se añadieron 50 µL del extracto acuoso en proporción 1:1. El tratamiento testigo se constituyó de 100 µL de la suspensión de esporas. Las láminas excavadas se colocaron en cristalizadores de 20 cm de diámetro y 4 cm de altura, forrados con espuma de nylon humedecida para evitar deshidratación, manteniéndolas en la oscuridad y en cámara de temperatura controlada a 12°C para *P. pampeana*, a 21°C para *C. plumierae*, y a 24°C para *H. vastratrix*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios acerca de la influencia de los extractos acuosos de

frangipani leaves infected with rusts were collected and scrapped with a brush with rough hairs, under running water. The, they were placed in a plastic container 35 x 30 cm and 12 cm high with a cap, covered with moist nylon foam. Urediniospores produced were collected 24 h later to prepare the suspension. This procedure was chosen because previous studies have demonstrated that recently produced urediniospores have the capacity of germination ranging from 80 to 90%, while older ones have about 45%. For the three rusts used in the experiments, the suspension was prepared with distilled water at a concentration of 10^4 spores per mL⁻¹ and tween 0.01%. Then, 50 µL of the suspension were distributed in the slide cavities, followed by the addition of 50 µL of the aqueous extract in proportion of 1:1. The control treatment consisted of 100 µL of the spore suspension. Las láminas excavadas were placed in cristalizadores 20 cm in diameter and 4 cm high, covered with moist nylon foam to avoid dehydration, and kept in darkness at 12°C for *P. pampeana*, 21°C for *C. plumierae*, and 24°C for *H. vastratrix*.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of aqueous spore extracts (EAE) on rust spore germination. After preparation, extracts had a straw yellow color which changed to lighter as dilutions were made (EAE₁ to EAE₄). For experiments with aecidioid teliospores of *P. pampeana*, readings for EAE₁ indicated no germination after 4 and 6 h. Those teliospores do not have a latent phase and germinate under appropriate conditions (Figueiredo and Carvalho Jr., 1995). With the diluted extracts EAE₂, EAE₃ and EAE₄, metabasidia could be measured, there was length increase corresponding to the extract dilution in the EAE as well as after 4 and 6 h. For the control, germination was complete and metabasidia showed greater length than the other treatments. These extracts do not cause spore death, but only delay germination (Figueiredo and Carvalho Jr., 1995). In the experiments with urediniospores of *C. plumierae*, there was also a correlation between germination and treatments with EAE. The control had the longest germination tube. Recent produced urediniospores of this rust placed in distilled water at 18 to 21°C, show about 90% germination after 4 h and produce 1 to 2 germination tubes (Figueiredo and Carvalho Jr., 1994b). Spores from a great number of rust causal agents have self-inhibitors of germination (Figueiredo and Carvalho Jr., 1994a). This make spores not to germinate at the same time, as long as they are under the presence of water and appropriate temperature. This mechanism allows the pathogen not to be extint, since it does not germinate without a host. Thus, the percentage germination of a population may have fluctuations between 30 to 40%. In studies with urediniospores of *H. vastratrix*, percentage germination was between 30 and 40%, even when urediniospores used were from recent collected leaves infected in natural way. In these tests there was also a correlation between germination and treatments with EAE. Urediniospores of this rust are capable of germinating at 23 to 24°C within 6 h in presence of

esporas (EAE) en la germinación de esporas de royas. Después de la preparación, los extractos presentaron color amarillo paja, cambiando a más claro a medida que fueron hechas las diluciones (EAE₁ para EAE₄). Para los experimentos con teliosporas aecidioides de *P. pampeana*, las lecturas para EAE₁ (extracto acuoso de esporas), después de 4 h como después de 6 h, no hubo germinación. Esas teliosporas no tienen estado latente y germinan bajo condiciones apropiadas (Figueiredo y Carvalho Jr., 1995). Con los extractos acuosos diluidos EAE₂, EAE₃ y EAE₄ los metabasidios pudieron ser medidos, y hubo aumento de longitud correspondiente con la dilución del extracto, tanto en los EAE como después de 4 y 6 h. Para el testigo, fue notada germinación completa, y los metabasidios presentaron mayor longitud que los otros tratamientos. Como se sabe, esos extractos no provocan la muerte de las esporas, pero solamente retrasan la germinación (Figueiredo y Carvalho Jr., 1995). En los experimentos realizados con urediniosporas de *C. plumierae*, también hubo correlación entre la germinación y los tratamientos con EAE. El testigo presentó mayor longitud del tubo germinativo. Las urediniosporas recién producidas de esta roya se colocan en agua destilada a temperaturas entre 18 a 21°C, presentan una germinación de alrededor del 90%, después de 4 h, produciendo 1 a 2 tubos germinativos (Figueiredo y Carvalho Jr., 1994b). Esporas de un gran número de agentes causales de royas contienen auto-inhibidores de la germinación (Figueiredo y Carvalho Jr., 1994a). Eso evita la germinación de todas las esporas al mismo tiempo, siempre que estén en presencia de agua y temperatura adecuada. Este mecanismo impide la extinción del patógeno, pues no germinan sin su hospedante. Así el porcentaje de germinación de una población puede presentar variaciones entre 30 a 40%. En los trabajos con urediniosporas de *H. vastratrix*, los porcentajes de germinación se quedaron entre 30 a 40%, aún cuando se utilizaron urediniosporas de hojas recién colectadas, y naturalmente infectadas. En estas pruebas también hubo correlación entre la germinación y los tratamientos con EAE. Las urediniosporas de esta roya son capaces de germinar dentro de 6 h a temperaturas entre 23 a 24°C, en presencia de agua, bajo condiciones de oscuridad y elevada humedad (Godoy *et al.*, 1997; Guzzo, 2004; Zambolim, 1973). La presencia de sustancias inhibitoras de la germinación en las urediniosporas de *H. vastratrix* fue estudiada por Musumeci *et al.* (1974), por medio del lavado en agua destilada. Los autores también observaron que en suspensiones con el mismo volumen de agua, pero con cantidades crecientes de urediniosporas, el porcentaje de germinación disminuye. Ayliffe *et al.* (1997) constataron la presencia de sustancias auto-inhibidoras de la germinación en urediniosporas de *Melampsora lini* (Ehrenb.) Desmaz. Este efecto se observó también en urediniosporas de otras royas (Allen, 1955; Bell y Daly, 1962; Staples y Macko, 1984), lográndose aislar algunas sustancias activas para la identificación de la naturaleza química de algunos inhibidores; por ejemplo, la roya del frijol [*Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint.], la roya del maíz (*Puccinia*

water in darkness and high humidity (Godoy *et al.*, 1997; Guzzo, 2004; Zambolim, 1973). The presence of substances that inhibit germination of urediniospores of *H. vastratrix* was studied by Musumeci *et al.* (1974), through washing with distilled water. The authors also observed that in suspensions with the same volume of water, but with increasing amounts of urediniospores, the percentage of germination decreases. Ayliffe *et al.* (1997) verified the presence of self-inhibitor substances of germination with urediniospores of *Melampsora lini* (Ehrenb.) Desmaz. This effect was also observed in urediniospores of other rusts (Allen, 1955; Bell and Daly, 1962; Staples and Macko, 1984), being able to isolate some active substances for identification of the chemical nature of some inhibitors; for example, bean rust [*Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint.], corn rust (*Puccinia polysora* Underw.), peanut rust (*Puccinia arachidis* Speg.), rust (*Puccinia antirrhini* Dietel and Holw.) of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.), and sunflower rust (*Puccinia helianthi* Schwein.), whose self-inhibitor was found to be methyl cis-3,4-dimethoxinnamate, and methyl cis-4-hydroxy-3-methoxinnamate (methyl cis-ferulate) from stem rust of wheat (*Puccinia graminis* Pers.: Pers. f. sp. *tritici* Eriks. and E. Henn.) (Foundin and Macko, 1974; Macko *et al.*, 1971a, b, 1976, 1977). Positive results have also been found in studies with fungal and yeast extracts (Martins *et al.*, 1986; Piero, 2003). Complete results of readings are shown in Table 1; an increase of length of metabasidia and germination tubes were observed accordingly to the different extracts evaluated (EAE₁ to EAE₄). In all control treatments, metabasidia and germination tubes were more developed than the other treatments (Figs. 1 y 2A, F, K), and after 6 h there was sterigma formation and incipient basidiospores. EAE₁ inhibited totally metabasidia germination of *P. pampeana* after 4 and 6 h (Figs. 1A and 2B), as well as germination tubes of *H. vastratrix* after 4 h (Figs. 1C and 2L), while *C. plumierae* showed growth of germination tubes after 4 h and even greater after 6 h (Figs. 1B and 2G). EAE₂ had a similar effect on the three rusts; the length range of metabasidia and germination tubes was from 13.66 to 28.26 µm after 4 h and from 24.99 to 41.94 µm after 6 h (Figs. 1 and 2C, H, M). The elongation pattern of structures was similar with EAE₃, but greater than EAE₂ (Figs. 1 and 2D, I, N); a similar pattern occurred with EAE₄ (Figs. 1 and 2E, J, O) which had a length range from 46.84 to 58.31 µm after 4 h, and from 69.91 to 80.62 µm after 6 h. The maximum elongation differences between treatments EAE₁ and EAE₄ were 56.52 after 4 h, and 69.91 µm after 6 h for *P. pampeana*; 35.85 after 4 h, and 55.99 µm after 6 for *C. plumierae*; and 58.31 after 4 h, and 64.62 µm after 6 h for *H. vastratrix*. There was a consistent length increase of metabasidia and germination tubes with the consecutive dilutions. Urediniospores of *C. plumierae* used as controls had significant greater length of germination tubes especially after 6 h (Figs. 1B and 2F). Urediniospores of *Hemileia vastratrix* used as controls had long germination tubes after 6 h. It is important to indicate that auto-inhibitors present in the extracts cause delay in spore germination.

polysora Underw.), la roya del maní (*Puccinia arachidis* Speg.), la roya de la boca de león o boca del dragón (*Puccinia antirrhini* Dietel y Holw.) y la roya del girasol (*Puccinia helianthi* Schwein.), cuyo auto-inhibidor fue determinado como metil cis-3,4-dimetoxycinamato, y el de la roya del tallo del trigo (*Puccinia graminis* Pers.: Pers. f. sp. *tritici* Eriks. y E. Henn.) fue identificado como metil cis-4-hidroxi-3-metoxycinamato (metil cis-ferulato) (Foundin y Macko, 1974; Macko *et al.*, 1971a, b, 1976, 1977). También se han encontrado resultados positivos en estudios con extractos de hongos y levaduras (Martins *et al.*, 1986; Piero, 2003). Resultados completos de las lecturas se presentan en el Cuadro 1, donde se observa que para las estructuras de los agentes causales de roya, hubo un aumento en la longitud de los metabasidios y de los tubos germinativos a medida que se fueron tratando con los diferentes extractos (EAE₁ a EAE₄). En todos los tratamientos testigo, los metabasidios y tubos germinativos se presentaron más desarrollados que en los otros tratamientos (Figs. 1 y 2A, F, K), y después de 6 h ya había formación de esterigmas e indicios de los basidiosporos. El tratamiento EAE₁ inhibió totalmente la germinación de metabasidios a las 4 y 6 h en *P. pampeana* (Figs. 1A y 2B), así como los tubos germinativos de *H. vastratrix* a las 4 h, pero a las 6 h mostraron un pequeño crecimiento (Figs. 1C y 2L), mientras que *C. plumierae* presentó crecimiento de los tubos germinativos a las 4 h y aún mayor a las 6 h (Figs. 1B y 2G). El tratamiento con el extracto EAE₂ tuvo un efecto similar en las tres royas; el rango de longitud de los metabasidios y tubos

Aecidioid teliospores of *P. pampeana* treated with EAE₁, did not germinate after 6 h of contact with the extract, possibly because spores are from the same organism from which extracts were made and might be sensitive to its own auto-inhibitor. The results obtained agree with Figueiredo and Carvalho Jr. (1994a), who in a similar study used teliospores of *P. pampeana* and urediniospores of *C. plumierae*. The amount of teloid teliospore used to prepare the extract was less (20 mg) than the amount tested by the authors, but results were similar. The length increase of metabasidia and germination tubes detected with extract EAE₂ to EAE₄, was greater after 6 h, which indicates that germination auto-inhibitors present in cell walls of teloid teliospores promote germination delay and not the total death of teliospores. Aecidioid teliospores of *P. pampeana* in contact with EAE₁ did not germinate, even after 6 h; however, there was germination with EAE₂. It is possible that concentration of auto-inhibitors is greater in the first teliospore washing, and gradually decreases in the other dilutions. Figure 2 shows germination differences of structures of the rusts used in the study. It seems that aecidioid teliospores of *P. pampeana* are more sensitive to action of inhibitors present in teloid teliospores. Figueiredo *et al.* (1990) demonstrated through successive washings the presence of auto-inhibitors in teliospores of *Puccinia cnici-oleracei* Pers., which occurs on *Emilia sonchifolia* L.

End of the abbreviated article.

Cuadro 1. Efecto inhibitor del extracto acuoso de teliosporas telióides de *Puccinia pampeana* (EAE) sobre la longitud de metabasidios de teliosporas aecidióides de *P. pampeana* y tubos germinativos de urediniosporas de *Coleosporium plumierae* y *Hemileia vastratrix* después de 4 y 6 h de estar en contacto.

Table 1. Inhibition effect of teloid teliospore aqueous extract of *Puccinia pampeana* spore (EAE) on length of aecidioid teliospore metabasidia of *Puccinia pampeana* and urediniospore germination tubes of *Coleosporium plumierae* and *Hemileia vastratrix* after 4 and 6 h of contact.

Tratamientos		Longitud promedio de metabasidios de teliosporas aecidióides de <i>Puccinia pampeana</i>		Longitud promedio de tubos germinales de uredinioporas <i>Coleosporium plumierae</i>		Longitud promedio de tubos germinales de uredinioporas <i>Hemileia vastratrix</i>	
		Comparación de medias		Comparación de medias		Comparación de medias	
		µm		µm		µm	
Testigo	4 h	11.66	10.86 A b	129.65	11.41 A b	147.5	12.16 A b
	6 h	139.67	11.83 A a	171.2	13.1 A a	219.55	14.79 A a
EAE ₁	4 h	0	0.7 E a	10.99	3.38 D b	0	0.7 D b
	6 h	0	0.7 E a	16.22	4.08 D a	16.00	4.05 D a
EAE ₂	4 h	15.76	4.02 D b	13.66	3.76 D b	28.26	5.31 C b
	6 h	24.99	5.04 D a	25.13	5.05 C a	41.94	6.5 C a
EAE ₃	4 h	33.91	5.86 C b	35.83	6.01 C b	35.7	5.97 C b
	6 h	38.08	6.2 C a	63.21	8.28 B a	66.93	8.2 B a
EAE ₄	4 h	56.52	7.52 B b	46.84	6.87 B b	58.31	7.66 B b
	6 h	69.91	8.36 B a	72.21	8.51 B a	80.62	9 B a
Coeficiente de variación			7.93		5.10		7.62

Para análisis estadística los datos fueron transformados en $\sqrt{x + 0.50}$. Letras minúsculas y mayúsculas en la columna no difieren entre si (Tukey, p = 0.05).

germinativos fue de 13.66 a 28.26 μm a las 4 h y de 24.99 a 41.94 μm las 6 h (Figs. 1 y 2C, H, M). El patrón de elongación

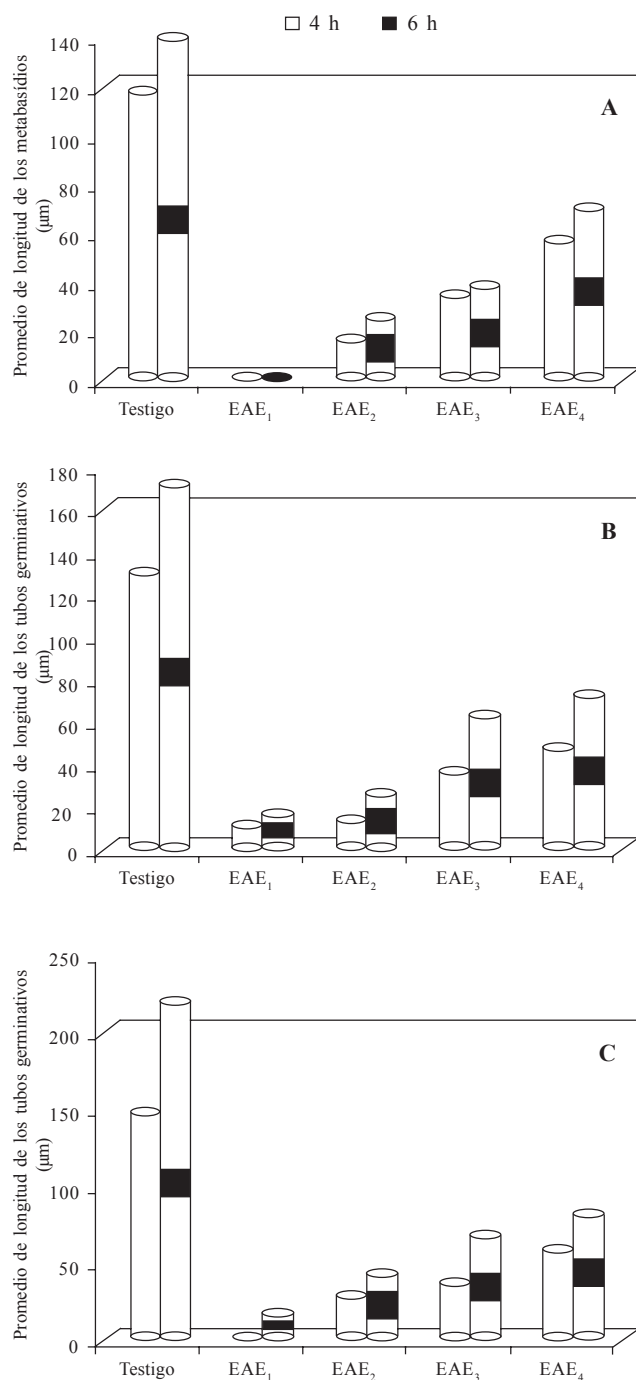


Fig. 1. Germinación de esporas de royas en contacto con extractos acuosos de teliosporas (EAE₁, EAE₂, EAE₃, EAE₄) telioides de *Puccinia pampeana*, y sin contacto (testigo). A. *Puccinia pampeana*. B. *Coleosporium plumierae*. C. *Hemileia vastratrix*.

Fig. 1. Rust spore germination after contact with telioid teliospore aqueous extracts (EAE₁, EAE₂, EAE₃, EAE₄) of *Puccinia pampeana*, and without contact (testigo). A. *Puccinia pampeana*. B. *Coleosporium plumierae*. C. *Hemileia vastratrix*.

de las estructuras fue similar con el EAE₃, pero mayor que EAE₂ (Figs. 1 y 2D, I, N); lo mismo sucedió con el extracto EAE₄ (Figs. 1 y 2E, J, O). En este último tratamiento el rango de longitud fue de 46.84 a 58.31 μm a las 4 h, y de 69.91 a 80.62 μm a las 6 h. La máxima diferencia en la elongación de las estructuras entre el tratamiento con el extracto acuoso EAE₁ y EAE₄ fue de 56.52 a las 4 h, y de 69.91 μm a las 6 h para *P. pampeana*, de 35.85 a las 4 h, y de 55.99 μm a las 6 h para *C. plumierae* y de 58.31 a las 4 h, y de 64.62 μm a las 6 h para *H. vastratrix*. Fue notable la consistencia en el incremento en cada uno de los metabasidios y tubos germinativos con las diluciones consecutivas de los extractos en las lecturas después de 4 y 6 h. Las urediniosporas de *C. plumierae* utilizadas como testigo, germinaron produciendo un tubo germinal significativamente largo, principalmente después de 6 h (Figs. 1B y 2F). Las urediniosporas de *Hemileia vastratrix* utilizadas como testigo germinaron como los testigos anteriores, con esta roya se observaron tubos germinales largos en la lectura realizada después de 6 h. Cabe resaltar que el auto-inhibidor presente en los extractos provoca atraso en la germinación de esporas. En las teliosporas aecidioides de *P. pampeana*, tratados con EAE₁, y pasadas 6 h del contacto de las esporas con los extractos no hubo germinación. Posiblemente porque son esporas de la misma especie que originó el extracto utilizado, y así más sensible a su propio auto-inhibidor. Los resultados obtenidos están de acuerdo con Figueiredo y Carvalho Jr. (1994a), que además de teliosporas de *P. pampeana* también utilizaron urediniosporas de *C. plumierae*, en un estudio semejante. La cantidad de teliosporas telioides utilizada para la extracción del EAE fue menor (20 mg) que la cantidad utilizada por los autores (35 mg), aún así, los resultados fueron similares. Se detectó aumento creciente en la longitud de las estructuras medidas (metabasidio y tubo germinal) a partir del EAE₂ al EAE₄, siendo ese aumento más grande en las lecturas después de 6 h. Eso comprobó que las sustancias auto-inhibidoras de la germinación presentes en las paredes de las teliosporas telioides son capaces de promover un retraso en la germinación, y no la muerte total de las teliosporas. En las teliosporas aecidioides de *P. pampeana* en contacto con EAE₁ no se observó germinación, aún pasadas 6 h. Pero en tratamiento con EAE₂ hubo germinación, eso puede ser porque en el primer lavado de las teliosporas (EAE₁) es posible obtener un extracto con mayor concentración de sustancias inhibidoras, y el mismo disminuye en los lavados siguientes. El retraso en la germinación de estructuras de royas, en el hábitat del hongo, deberá interferir en la ocurrencia de la enfermedad, pues, siendo necesario un período de temperatura favorable y agua libre, ocurre retraso de germinación de las esporas de un agente causal de alguna roya, impidiendo la infección y la ocurrencia de la enfermedad. En el caso de la roya del café, las urediniosporas de *H. vastratrix*, para que penetren en su hospedante, necesitan la abertura de los estomas, y eso ocurre por la noche. En caso de que haya retraso de germinación de las urediniosporas, los estomas

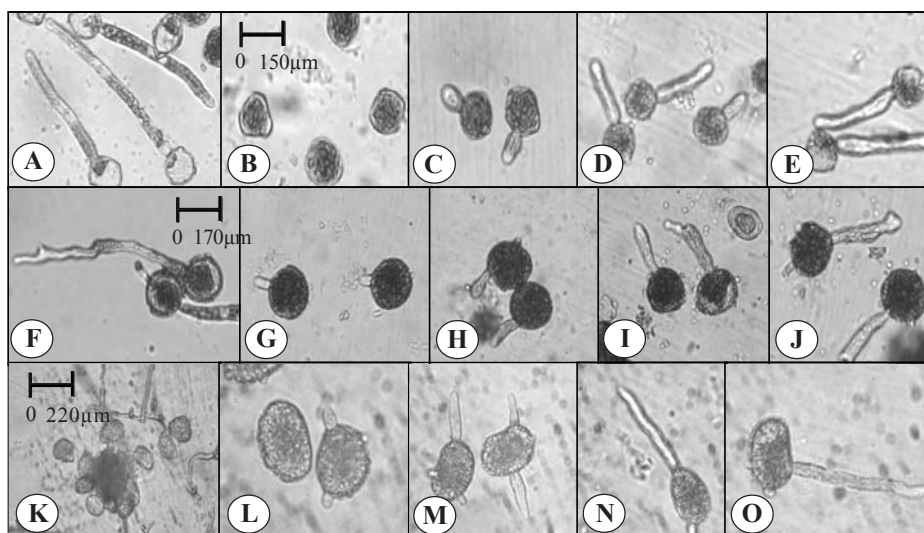


Fig. 2. Diferencias entre los crecimientos de los metabasidios y tubos germinales en los tratamientos realizados, después de 6 h. Teliosporas aecidioides de *Puccinia pampeana*: Testigo (A), EAE₁ (B), EAE₂ (C), EAE₃ (D), EAE₄ (E). Urediniosporas de *Coleosporium plumierae*: Testigo (F), EAE₁ (G), EAE₂ (H), EAE₃ (I), EAE₄ (J). Urediniosporas de *Hemileia vastratrix*: Testigo (K), EAE₁ (L), EAE₂ (M), EAE₃ (N), EAE₄ (O).

Fig. 2. Growth differences between metabasidia and germination tubes in treatments after 6 h of contact. Aecidioid teliospores of *Puccinia pampeana*: Control (A), EAE₁ (B), EAE₂ (C), EAE₃ (D), EAE₄ (E). Urediniospores of *Coleosporium plumierae*: Control (F), EAE₁ (G), EAE₂ (H), EAE₃ (I), EAE₄ (J). Urediniospores of *Hemileia vastratrix*: Control (K), EAE₁ (L), EAE₂ (M), EAE₃ (N), EAE₄ (O).

cierran bajo la luz del día y los tubos germinales pueden desecarse al sol, entonces las urediniosporas se vuelven inviables. Las diferencias en la germinación de las tres estructuras de agentes causales de royas utilizadas en este experimento están ilustradas y comparadas en la Figura 2. Existe un comportamiento diferenciado entre estructuras de cada especie de royas utilizadas en este estudio, cuando son puestas en contacto con los extractos. Parece que las teliosporas aecidioides de *P. pampeana* son más sensibles a la acción de la sustancia inhibidora presente en las teliosporas telioides, aunque pasadas 6 h no mostraron germinación. La presencia de sustancias auto-inhibidoras de la germinación en teliosporas de otras royas fue constatada por Figueiredo *et al.* (1990). Los autores comprobaron la presencia de estas sustancias en teliosporas de *Puccinia cnici-oleracei* Pers., roya que ocurre en pincilito o hierba socialista (*Emilia sonchifolia* L.), por medio de lavados sucesivos, utilizando un aparato denominado germinatêlio, desarrollado en el laboratorio de Micología Fitopatológica del Instituto Biológico de São Paulo (Figueiredo y Coutinho, 1984).

Agradecimientos. Nuestros agradecimientos al Ingeniero Agropecuario y alumno de Maestría de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la UNESP, Juan Fernan Sierra Hayer, por la colaboración y sugerencias.

LITERATURACITADA

Allen, P.J. 1955. The role of a self-inhibitor in the germination

of rust uredospores. *Phytopathology* 45:259-266.

Ayliffe, M.A., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., and Pryor, A.J. 1997. Production of a self-inhibitor of urediospore germination in *Melampsora lini* (flax rust) segregates as a recessive, single gene trait. *Canadian Journal of Botany* 75:74-76.

Bell, A.A., and Daly, J.M. 1962. Assay and partial purification of self-inhibitor of spore germination from urediniospores of the bean rust fungus. *Phytopathology* 52:261-266.

Bonaldo, S.M., e Pascholati, S.F. 2007. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineorum* e *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica* 33:233-238.

Figueiredo, M.B., e Carvalho Jr., A.A. 1994a. Efeito da lavagem dos soros na germinação dos teliosporos telioides de *Puccinia pampeana*. *Summa Phytopathologica* 20:101-104.

Figueiredo, M.B., e Carvalho Jr., A.A. 1994b. O emprego de *Coleosporium plumierae* em bioensaios envolvendo germinação de esporos de ferrugens. *Summa Phytopathologica* 20:127-129.

Figueiredo, M.B., e Carvalho Jr., A.A. 1995. Presença de um auto-inibidor nos teliosporos telioides de *Puccinia pampeana* e o seu papel na sobrevivência da espécie. *Summa Phytopathologica* 21:200-205.

Figueiredo, M.B., Carvalho Jr., A.A., and Hennen, J.F. 1990. Basidiospore production by *Puccinia cnici-oleracei* (Uredinales), a microcyclic lepto-form. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 28:89-94.

- Figueiredo, M.B., e Coutinho, L.N. 1983. A germination chamber obtaining pure basidiospores of rust fungi. *Comunicações* 2:61-65.
- Figueiredo, M.B., e Coutinho, L.N. 1984. Avaliação da capacidade de produção de basidiosporos pelos soros teliais de *Puccinia mogiphanes* Arthur. *Arquivos do Instituto Biológico*. Resumos, São Paulo, Brazil. Resúmen, p. 26.
- Foundin, A.S., and Macko, V. 1974. Identification of the self-inhibitor and some germination characteristics of rusts urediniospores. *Phytopathology* 64:900-903.
- Godoy, C.V., Bergamin-Filho, A., e Salgado, C.L. 1997. Doenças do cafeeiro. pp. 185-189. In: H. Kimati, L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin-Filho, e L.E.A. Camargo (eds.). *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo, SP, Brasil. 919 p.
- Guzzo, S.D. 2004. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastratrix*. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agronomia Luís de Queiros. Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil. 236 p.
- Hennen, J.F., Subrahmanyam, P., and Figueiredo, M.B. 1987. The Taxonomy, life history, and evolution of *Puccinia arachidis* Speg. *Internacional Crops Research Institute for the Semi-Ard Tropics* 1:145-155.
- Lindquist, J.C. 1963. La roya del huevo de gallo (*Salpichroa origanifolia*) *Endophyllum pampeanum* Speg. nov. comb. y *Puccinia pampeana* Speg. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 10:113-116.
- López-Franco, R.M., Hennen, J.F., and Figueiredo, M.B. 1990. Development and sporogeny of the biteleomorphic species *Puccinia pampeana* on *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira* 15:68-72.
- Macko, V., Staples, R.C., Allen, P.J., and Renwick, J.A. 1971a. Identification of the self-inhibitor from wheat stem urediniospores. *Science* 173:835-836.
- Macko, V., Staples, R.C., and Renwick, J.A. 1971b. Germination self-inhibitor of sunflower and snapdragon rust urediniospores. *Phytopathology* 61:902.
- Macko, V., Staples, R.C., Yaniv, A., and Granados, R.R. 1976. Self-inhibitors and of fungal spore germination. pp. 73-100. In: P.J. Weber, and W.M. Hess (eds). *The fungal spore*. Academic Press. New York, USA. 895 p.
- Macko, V., Trione, E.J., and Young, S.A. 1977. Identification of the germination self-inhibitor from urediniospores of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 67:1473-1474.
- Martins, E.M.F., Carvalho Jr., A.A., e Figueiredo, M.B. 1995. Relação entre *Capsicum frutescens* e os micélios mono e dicarióticos de *Puccinia pampeana*. *Fitopatologia Brasileira* 20:613-617.
- Martins, E.M.F., De María, A.C., Stocker, G.G., and Moraes, W.B.C. 1986. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat-treatment. *Fitopatologia Brasileira* 11:899-909.
- Musumeci, M.R., Moraes, W.B.C., and Staples, R.C. 1974. A self-inhibitor in urediospores of coffee rust fungus. *Phytopathology* 64:71-73.
- Piccinin, E., Piero, R.M.Di., e Pascholati, S.F. 2005. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. *Fitopatologia Brasileira* 30:5-9.
- Piero, R.M.Di. 2003. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Piracicaba, Brasil. 157 p.
- Silva, R.F., Maciel, S. da C., Pascholati, S.F., e Bedendo, I.P. 2006. Indução de resistência em plantas de beringela à *Ralstonia solanacearum* por extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*. *Summa Phytopathologica* 32:45 (Resumen).
- Staples, R.C., and Macko, V. 1984. Germination of urediniospores and differentiation of infection structures. pp. 255-289. In: W.R. Bushnell, and A.P. Roelfs (eds.). *The Cereal Rusts*. Academic Press. New York, USA. 546 p.
- Tonucci, N.M., e Pascholati, S.F. 2004. Frações de extratos aquosos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* (Shiitake) inibem o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Colletotrichum sublineolum*. *Summa Phytopathologica* 30:91-91.
- Wolf, G. 1982. Physiology and biochemistry of spore germination. pp. 151-178. In: K.J. Scott, and A.K. Chakravorty (eds.). *The Rust Fungi*. Academic Press. London, England. 518 p.
- Zambolim, L. 1973. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastratrix* Berk et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 52 p.