



T/UNICAMP
H676s
FOP

1150015985

J O S É F R A N C I S C O H O F L I N G

Departamento de Bioquímica - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas

SEROLOGIA APLICADA AO ESTUDO DE ALGUMAS
ESPÉCIES DE COFFEA E SUAS IMPLICAÇÕES
NA ORIGEM DE C.ARABICA L

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

T 552

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. AVELINO R. DE OLIVEIRA

Campinas - São Paulo
1976

Tenho plena consciência de que este trabalho não foi o melhor que se pode realizar, mas vale como experiência para que se possa fazer melhor no futuro.

Aqueles que nos escoram e tornam possível o que fazemos, embora distantes, dedico este meu trabalho na esperança de que possam também serem beneficiados.

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, os quais quer pela orientação, incentivo, fornecimento de material, auxílio e sugestões, concorreram efetivamente para a execução e apresentação desta Tese.

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira
Instituto de Biologia da UNICAMP

Prof. Dr. Walter August Hadler
Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP

Dr. Alcides Carvalho
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. Marconi Freire Montezuma
Faculdade de Educação da UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Muniz de Resende
Diretor da Faculdade de Educação da UNICAMP

Prof. Dr. Aluisio Paiva de Carvalho Alba
Instituto Biológico de São Paulo

Dra. Dixier Marozzi Medina
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros"

Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior
Instituto de Biologia da UNICAMP

Dra. Walkyria Bueno de Camargo Moraes
Instituto Biológico de São Paulo

Dr. Quivo S. Tahin
Instituto de Biologia da UNICAMP

Srta. Ione Salgado

Srta. Kikyo Yamamoto

Sr. Antonio Frutuoso Leite

Sr. Francisco Carlos de Freitas

Em particular a minha esposa Eloisa de Mattos Höfling
Faculdade de Educação da UNICAMP

Demais funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto
de Biologia da UNICAMP

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. MATERIAIS	10
3.2. MÉTODOS	10
3.2.1. Preparo e extração dos antígenos de sementes	10
3.2.2. Preparo de anti-soros para <u>C.arabica</u> e <u>C.canephora</u> (FD e S-NaCl)	13
3.2.3. Sangria, preparo e conservação dos anti-soros ...	14
3.2.4. Testes serológicos	14
3.2.5. Determinação do título dos anti-soros	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Título dos anti-soros	17
4.2. Testes serológicos	17
4.2.1. Testes serológicos empregando-se AS-C.a.A.Mix (S-NaCl)160	19
4.2.2. Testes serológicos empregando-se AS-C.a.A.Mix(FD) 161	30
4.2.3. Testes serológicos empregando-se AS-C.ca.(FD)175.	39
4.2.4. Testes serológicos empregando-se AS-C.ca.(S-NaCl) 176	46
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	74
7. RESUMO	76
8. SUMMARY	78
9. LITERATURA CITADA	80

1. INTRODUÇÃO

O estudo da evolução da espécie Coffea arabica L tem sido objeto de várias pesquisas no Instituto Agronômico de Campinas. As informações existentes indicam que essa espécie é provavelmente um alotetraploide. Várias espécies do gênero Coffea vêm sendo estudadas, tanto do ponto de vista genético como citológico, sistemático, evolutivo, etc., a fim de estabelecer as relações entre espécies diploides e C.arabica.

Os resultados dos cruzamentos entre as espécies Coffea canephora Pierre ex Froehner com Coffea eugenioides Moore, indicaram a possibilidade destas espécies estarem envolvidas na origem da espécie alotetraploide C.arabica, (CARVALHO & MONACO, 1967). Por outro lado, NARASINHASWANY (1962), considera Coffea liberica Hiern e C.eugenioides como ancestrais de C.arabica.

Estudos serológicos com antígenos presentes em sementes de C.arabica foram realizados preliminarmente, visando a aplicação desta técnica na taxonomia do gênero Coffea em geral e ao programa de melhoramento das variedades e cultivares em particular. Padronizada uma metodologia específica para C.arabica, introduziram-se tais técnicas na pesquisa em questão (HÖFLING, 1975).

Neste trabalho nós procuramos analisar algumas espécies do gênero Coffea do ponto de vista serológico, com o objetivo de contribuir nos estudos das origens da espécie C.arabica e ao programa de melhoramento das variedades e cultivares em particular. A análise de anti-soros obtidos contra as substâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) e para a farinha delipidificada ultrafina (FD), em reação com antígenos obtidos por tratamentos diversos de sementes das espécies C.arabica, C.canephora, C.liberica, C.augenoides, C.dewevrei e C.congensis, foi efetuada através de reações serológicas, com ênfase a um estudo das relações de afinidade serológica entre essas espécies.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A sistemática, tem a função de resolver duas questões de interesse, isto é, coordenar em grupos a enorme variedade de formas observadas na natureza e classificar esses grupos de maneira a permitir o reconhecimento de suas múltiplas relações de afinidade.

A idéia de estabelecer relações entre a morfologia e os grupos de substâncias químicas para elaboração de um sistema de classificação das espécies vegetais é antiga. Petiver em 1699, publicou um trabalho no qual menciona a correlação de "certas substâncias químicas" com certos grupos morfológicos como Umbelliferae, Labiatae, etc. (cf. FAIRBROTHERS, 1968).

A pesquisa de métodos para auxiliar o estudo das afinidades filogenéticas entre espécies vegetais data do início deste século. Com base na especificidade das reações entre antígenos e anticorpos, MAGMUS (1908) sugeriu a utilização de técnicas serológicas na taxonomia. Botânicos alemães ficaram entusiasmados com as possibilidades da serologia nesse campo e canalizaram recursos consideráveis do Instituto de Botânica da Universidade de Königsberg (Alemanha) para estudos da metodologia das

reações serológicas, (MEZ, 1922) visando a aplicação dos resultados para estabelecimento de uma árvore genealógica botânica, (MEZ, 1926).

Antes mesmo de se detectar quimicamente diferenças na estrutura da molécula proteica nas diferentes espécies de plantas, trabalhos preliminares relatam o desenvolvimento de um sistema, cujas diferenças não foram verificadas por métodos químicos, mas deduzidas a partir da reação do animal à injeção de extratos de plantas. Hanning em 1929, Moritz em 1932 e Link em 1933 em suas investigações, sugeriram que métodos serológicos poderiam ser aperfeiçoados de modo a se tornarem um instrumento de valor para a sistemática de plantas. LISSITZIN & ALEXANDROWSKAJA (1935) e Molisch em 1933, empregaram também métodos químicos sistemáticos para reconhecimento de substâncias proteicas com ênfase em sistemática de plantas (cf. SILBERSCHMIDT, 1936).

Com o desenvolvimento dos trabalhos sobre química dos produtos naturais, botânicos e químicos passaram a sugerir a possibilidade de se utilizarem constituintes químicos em estudos taxonômicos, Molisch em 1933, Macnair em 1934, Carles em 1935, Weevers em 1936 (cf. SILBERSCHMIDT, 1936). Destacamos também os trabalhos de KLOZ et al. (1966 a, b), KLOSOVA (1966) e MORITZ (1966).

KLOZ (1960) e GHETIE (1966 a, b) sugeriram que as proteínas estruturais e de reserva poderiam ser empregadas em estudos de sistemática. JOHNSON & FAIRBROTHERS (1964) estudaram proteínas dos gêneros e espécies de plantas pertencentes às famílias Magnoliaceae, Iliaceae e Schizandraceae, demonstrando que os dados sobre o relacionamento com base nas proteínas são utilizáveis e podem ser de valor complementar a observações de outras disciplinas para avaliação em sistemática. STEWARD & BARBER (1964), trabalhando com proteínas de fungos do gênero Neurospora, verificaram que a técnica de eletroforese de disco era de grande u-

tilidade quando aplicada a problemas de genética e morfogenética.

FAIRBROTHERS & JOHNSON (1964) verificaram que as proteínas solúveis, em solução salina, de sementes de plantas das famílias Cornaceae e Nyssaceae induziram a formação de anticorpos específicos quando injetadas em coelhos. Testes de precipitação indicaram que espécies de Cornus podem ser divididas em grupos serológicos. Um relacionamento serológico foi obtido com antígenos de C.florida e C.kousa, mesmo sendo de regiões geográficas distintas. Outros gêneros e espécies puderam ser avaliadas serologicamente. FAIRBROTHERS (1966) demonstrou também que o estudo das proteínas de plantas do gênero Cornus, Nyssa, Davidia e Carrya, através de reações de precipitação e dupla difusão em gel de ágar, fornecem dados importantes que podem ser comparados e interpretados em relação a dados obtidos por outras investigações no campo da sistemática.

FAIRBROTHERS (1968) estudando proteínas de diversas partes da planta, como esporos, pólen, folhas e sementes do gênero Typha, através de técnicas serológicas e de eletroforese de disco, mostrou que as sementes são mais adequadas do que o pólen e esporos para avaliação em estudos taxonômicos, não excluindo, porém, o uso das demais estruturas.

CHERRY et al. (1969) demonstraram que as proteínas de sementes do gênero Gossypium, determinadas pela técnica de gel de acrílamida, indicam possibilidades de uma aproximação de caráter filogenética entre seis grupos de genomas estudados, onde se verificou uma maior aproximação entre certas espécies, pela observação dos padrões proteicos.

Segundo FAIRBROTHERS (1971) o emprego das substâncias solúveis extraídas de vegetais tem indicado possibilidades de utilização

em estudos taxonômicos. Muitas pesquisas tem demonstrado que extratos de sementes, polem, folhas, tubérculos e esporos, podem ser utilizados, dependendo do procedimento empregado (PETERSEN et al., 1967; LEE et al., 1967; PICKERING et al., 1967). Em sistemática, técnicas imunológicas quantitativas e qualitativas tem indicado que os dados obtidos da combinação de ambos procedimentos podem ser complementados. Assim, as pesquisas em quemo e serotaxonomia tem fornecido dados que demonstram ser as características químicas elementos valiosos para taxonomistas e sistemáticos. PICKERING et al. (1968) mostraram que os resultados obtidos, empregando-se métodos serológicos e de eletroforese em gel de acrilamida na investigação de algumas espécies do gênero Magnolia, foram de valor complementar para os dados morfológicos e citológicos, os quais indicaram também, haver uma correlação do possível aumento da complexidade imunoquímica com o aumento do nível de ploidia. TUCKER (1969) ao estudar proteínas solúveis em solução salina de sementes de 15 gêneros representantes da família Solanaceae, demonstrou através de testes serológicos que, os dados obtidos são de grande valor taxonômico, principalmente quando associados aos obtidos de outras disciplinas como morfologia, citologia, etc.. FAIRBROTHERS (1966) pode estabelecer uma correspondência serológica do gênero Corokia com representantes das famílias Cornaceae, Nyssaceae e Garryaceae, através de métodos quantitativos (método de Boyden) e qualitativos, como dupla difusão e imuno-eletroforese. HILLEBRAND & FAIRBROTHERS (1966), empregando estes mesmos métodos com gêneros representantes das ordens Rubiales e Umbellales, demonstraram que os resultados de tais análises, fornecem critérios adicionais para estudos taxonômicos desses "taxa".

A aplicação de novas técnicas analíticas em sistemática tem proporcionado novas condições para uma visão mais ampla da taxonomia nos últimos anos. O uso de testes bioquímicos sensíveis para avaliação em taxonomia, tem sido responsáveis pela nova es-

truturação das plantas. Assim, podemos destacar os trabalhos de HILLEBRAND & FAIRBROTHERS (1969) em investigações serológicas do gênero Viburnum (Caprifoliaceae); TURCKER & FAIRBROTHERS (1969), empregando a técnica de eletroforese de disco em estudos de extratos proteicos de folhas de Mentha (Labiatae); LEE & FAIRBROTHERS (1969), em estudos serológicos e eletroforese de disco do gênero Typha; PICKERING & FAIRBROTHERS (1970), realizando estudos serológicos comparativos das subfamílias de Umbelliferae; CLARCKSON & FAIRBROTHERS (1970), cujas pesquisas com o gênero Abies (Pinaceae) foram feitas empregando-se testes serológicos e eletroforese de disco; BOZZINI et al. (1970), investigando espécies do gênero Triticum através de testes serológicos de dupla difusão e imuno-eletroforese; PICKERING & FAIRBROTHERS (1971), utilizando dados serológicos em estudos comparativos de tribos em Apioideae; PETERSEN & FAIRBROTHERS (1971) com análises de proteínas de esporos do gênero Osmunda, através de técnicas serológicas e de eletroforese de disco; PAYNE & FAIRBROTHERS (1972) em investigações de proteínas do pólen, através de eletroforese de disco de populações naturais de Betula populifolia; PICKERING (1972), estudando proteínas do fruto dos gêneros Taenidia e Pseudotaenidia (Umbelliferae); LEE & FAIRBROTHERS (1972) em investigações serológicas da ordem Thymales e KAPALA et al. (1975) cujos estudos serológicos comparativos foram feitos com variedades de trigo.

Em Coffea, FUKS et al. (1968) descreveram os resultados obtidos sobre o comportamento antigênico observado entre espécies, variedades e cultivares do gênero Coffea utilizando extratos solúveis em cloreto de sódio 0,85% de sementes como antígenos para aplicação em estudos dos componentes antigênicos. MEDINA (1972), através da análise morfológica de 13 híbridos entre espécies do gênero Coffea e estudando o pareamento em oito desses híbridos, demonstrou a existência de espécies morfológicamente mais próximas entre si. No que se refere às relações fi-

logenéticas entre essas espécies, verificou que o pareamento não é de grande utilidade, pois, nem sempre está relacionado com a esterilidade dos híbridos, nem com os resultados de cruzamento entre os mesmos. LONGO (1972), através de estudos dos pigmentos flavonóides, analisou algumas espécies do gênero Coffea do ponto de vista da biocúmica sistemática, empregando cromatografia bidimensional ascendente em papel, demonstrando que a determinação das afinidades entre as espécies indicadas pela análise cromatográfica, de modo geral, não confirmou os agrupamentos em subseções feitos por Chevalier em sua classificação sistemática em 1947.

Também em Coffea, o emprego de proteínas e isoenzimas de extratos solúveis de folhas e sementes, tem contribuído para estudos de relações de afinidade entre as espécies, variedades e cultivares do gênero. Assim PAYNE et al. (1973) investigaram extratos de sementes de C.arabica solúveis em quatro tipos de extratores, demonstrando que, do ponto de vista da técnica de eletroforese em gel de acrilamida, há diferenças nos padrões proteicos. OLIVEIRA et al. (1972), investigando isoenzimas solúveis contidas em cotilédones, demonstraram que há, pelo menos, quatro isoenzimas da desidrogenase málica (MDH) presentes em C.arabica e C.canephora. Ainda OLIVEIRA et al. (1973), estudando proteínas e isoenzimas da desidrogenase málica (MDH) obtidas de folhas cotiledonares, detectaram pela técnica de eletroforese de disco, diferenças entre espécies, variedades e cultivares de Coffea. PAYNE et al. (1973) analisaram isoenzimas e proteínas de sementes de espécies, variedades e cultivares do gênero Coffea, demonstrando serem esses dados de valor complementar em estudos taxonômicos e comparáveis com observações de outras disciplinas.

Estudos das reações serológicas com antígenos presentes em sementes de C.arabica demonstraram que antígenos podem ser obti-

dos a partir de sementes de C.arabica e que a injeção do extra to solúvel em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) e da farinha de sementes (FD), induzem a formação de anticorpos em coelhos. Os anti-soros obtidos pela inoculação desses antígenos reagem com o antígeno homólogo e apresentam reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão e imunoelektroforese. O conjunto de dados apresentados nesse trabalho, particularmente o método de obtenção de antígenos, o preparo de anti-soros e a padronização dos testes serológicos de dupla difusão e imunoelektroforese, indicaram que o emprego de técnicas simples e bem padronizadas pode contribuir para o estudo de relações de afinidades serológicas aplicáveis ao gênero Coffea (HÖFLING, 1975).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Sementes das espécies Coffea arabica, C.canephora, C.congensis, C.dewevrei, C.eugenioides e C.liberica, foram obtidas da coleção de cafeeiros da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (Quadro 1).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo e extração dos antígenos de sementes

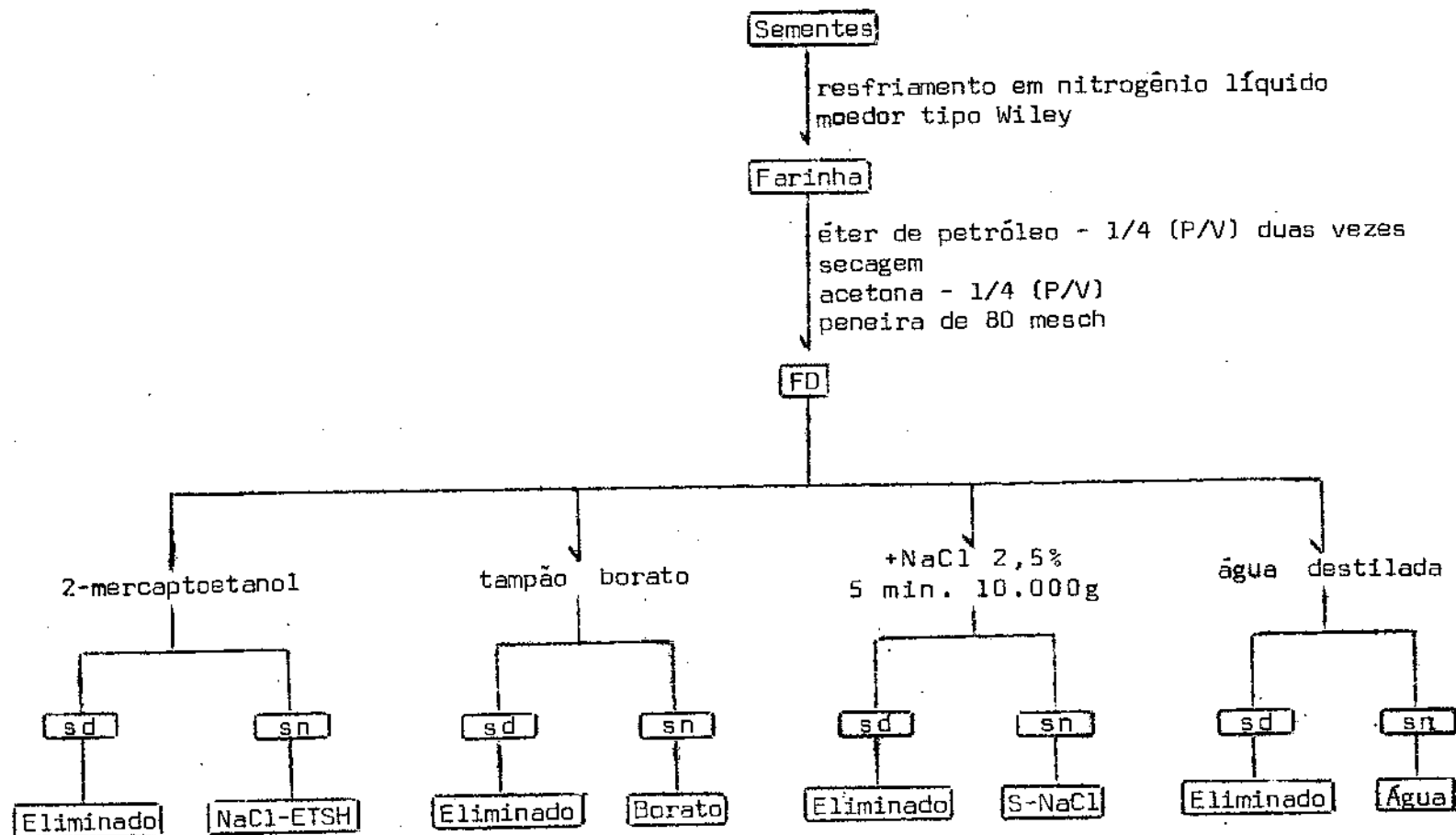
A metodologia empregada na extração das substâncias solúveis de sementes de café, baseou-se naquela utilizada por PAYNE et al. (1973), com modificações introduzidas por HÖFLING (1975).

Sementes foram resfriadas em nitrogênio líquido, trituradas em moinho tipo Wiley e transformadas em farinha. Esta foi delipidificada duas vezes com éter de petróleo (1:4 P/V) durante 30 minutos a 4°C e leve agitação (Esquema 1). Em seguida, a feri-

QUADRO 1 - Relação das espécies, variedades e cultivares do gênero Coffea utilizadas nos experimentos.

Material	Abreviação	Código da Seção de Genética do IAC
<u>Coffea arabica</u> L cv. Arabica (mistura de plantas)	C.a.A.Mix	-
<u>Coffea canephora</u> cv. Kouillou Pierre ex Froehner	C.ca.	C 70-1
<u>Coffea congensis</u> cv. Bangelan Froehner	C.co.	n.Col.6
<u>Coffea dewevrei</u> De Wild et Durand	C.dew.	C 63
<u>Coffea eugenioides</u> Moore	C.eug.	n.Col.20
<u>Coffea liberica</u> Hiern	C.lib.	-

ESQUEMA 1 - Preparo dos antígenos de sementes



nha delipidificada foi secada (distribuída uniformemente em papel de filtro à temperatura ambiente). Posteriormente esse material foi colocado em acetona (1:4 P/V) durante 12-20 horas a 4°C e leve agitação. Após nova secagem à temperatura ambiente, a farinha delipidificada (FD) foi transformada em pó após a passagem em peneira de 80 mesh. Este material foi utilizado como antígeno.

Parte do pó foi suspenso em NaCl 2,5% (0,10g/ml) e mantido a 4°C (durante 60 minutos) em agitação constante. Após esse procedimento, o material foi submetido a centrifugação (10.000g - 4°C) e o sobrenadante foi usado como antígeno (S-NaCl) na obtenção de anti-soros.

No preparo dos extratos solúveis utilizados nos testes serológicos (antígenos) de dupla difusão em gel de ágar, foram usados quatro tipos de extratores: 1) água destilada; 2) tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 + 0,2% NaCl (Borato); 3) cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) e 4) cloreto de sódio 2,5% + 2-mercaptoetanol 0,25M (NaCl-EtSH). A cada 0,10 g/ml de FD, foi adicionado, respectivamente, os extratores acima descritos e mantidos no refrigerador (4°C durante 60 minutos) em agitação constante. Posteriormente os materiais foram centrifugados (10.000 g - 4°C) e os sobrenadantes utilizados como antígenos nos testes sorológicos (Esquema 1).

3.2.2. Preparo de anti-soros para C.arabica e C.canephora (FD e S-NaCl)

O esquema de imunização utilizado para a obtenção dos anti-soros específicos para C.arabica e C.canephora, foi a injeção de antígenos na região próxima ao linfonóculo (OLIVEIRA, 1975). Coelhos pesando em média 2,5 kg, foram inoculados com os antíge-

nos FD e S-NaCl. As injeções em dois coelhos foram feitas com os antígenos S-NaCl emulsionados em Adjuvante de Freund incompleto (15% Lanolina + 75% Nujol) em partes iguais (V/V). Outros dois coelhos foram injetados com o antígeno FD, emulsionado em Adjuvante de Freund incompleto (0,10 g/ml de Adjuvante) (Quadro 2).

3.2.3. Sangria, preparo e conservação dos anti-soros

Preliminarmente à injeção de antígenos, fez-se uma sangria e o soro normal obtido (SN) foi conservado no congelador para testes posteriores como controle nas reações serológicas. Após a primeira inoculação de antígenos, iniciaram-se as sangrias a intervalos de tempos variados e preparou-se o anti-soro (AS). Nas sangrias, fez-se um pequeno corte longitudinal na veia marginal da orelha do coelho e recolheu-se o sangue (10 a 20 ml) em um frasco de vidro. O sangue foi deixado de uma a duas horas em temperatura ambiente, após o que permaneceu no refrigerador durante 24 horas. Em seguida separou-se o soro centrifugando-se durante 5 minutos a 10.000 g (centrífuga 3.200-Eppendorf). Distribuiu-se o material em ampolas de plástico (2 a 3 ml por ampola) e adicionou-se Mertiolato numa concentração final de 1:10.000.

3.2.4. Testes serológicos

Nos testes serológicos, foi utilizada a técnica de dupla difusão em gel de ágar a 1% (OUCHTERLONY 1949, 1958 e 1962) em tampão PBS 0,01M pH 7,0 (HÖFLING, 1975) em lâminas de microscópio (3,5 ml de ágar/lâminas de 75x25 mm). Foram feitos testes com os anti-soros AS-C.a.A.Mix (S-NaCl)-160 e AS-C.a.A.Mix(FD)-161; AS-C.ca.(S-NaCl)-176 e AS-C.ca.(FD)-175 em reação com os antí-

QUADRO 2 - Esquema de imunização dos anti-soros obtidos pela injeção no linfonóculo de coelho, de antígenos de sementes de C.arabica e C.canephora.

Antígeno	Coelho nº	nº de injeções do antígeno	Sigla dos Anti-soros
Ca.A.Mix(S-NaCl)	160	2	AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)-160
C.a.A.Mix(FD)	161	2	AS-C.a.A.Mix(FD)-161
C.ca.(FD)	175	2	AS-C.ca.(FD)-175
C.ca.(S-NaCl)	176	2	AS-C.ca.(S-NaCl)-176

genos obtidos pela extração em água; S-NaCl; borato e NaCl-EtSH das espécies C.arabica; C.canephora; C.congensis; C.dewevrei; C.eugenioides e C.liberica.

Foram efetuadas as reações serológicas com cada antígeno individualmente e depois em conjunto, sendo ambos os procedimentos realizados com todas as sangrias obtidas para cada anti-soro em particular.

3.2.5. Determinação do título dos anti-soros

Foram utilizados testes serológicos de dupla difusão em ágar na determinação do título dos anti-soros obtidos. Os anti-soros foram diluídos em NaCl 0,85%, seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2.

4. RESULTADOS

4.1. Título dos anti-soros

Os testes serológicos de dupla difusão (Ouchterlony) em combinações homólogas utilizados para a determinação do título de anti-soros obtidos pela injeção de S-NaCl e FD de sementes de C.a.A.Mix e C.ca. permitiram verificar diferenças no título de anticorpos tal como ilustra o quadro 3. Os títulos máximos obtidos para C.a.A.Mix revelaram valores de 16 na injeção com S-NaCl e 8 para coelhos injetados com FD. Os resultados obtidos para C.ca. quando comparados, mostraram valores de 4 na injeção com S-NaCl e 8 para a injeção com FD. O soro normal (SN) usado como controle, não apresentou reação.

4.2. Testes serológicos

Serão analisados os resultados obtidos em reações serológicas de dupla difusão com os AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)-160, AS-C.a.A.Mix (FD)-161, AS-C.ca.(FD)-175 e AS-C.ca.(S-NaCl)-176 em reação com antígenos (extratos solúveis de sementes) obtidos por tratamentos diversos de C.arabica; C.canephora; C.congensis; C.dewevrei; C.eugenioides e C.liberica.

QUADRO 3 - Título máximo dos anti-soros obtidos pelo esquema de imunização no linfonódulo.

Coelho nº	Antígeno	Código do anti-soro	Título* dos anti- soros nos testes de dupla difusão	SN
160	C.a.A.Mix	AS.C.a.A.Mix(S-NaCl)160	16	-
161	C.a.A.Mix	AS.C.a.A.Mix(FD)161	8	-
175	C.ca.	AS.C.ca.(FD)175	8	-
176	C.ca.	AS.C.ca.(S-NaCl)176	4	-

* título do anti-soro representado pelo inverso da diluição

SN soro normal

- não apresentou reação

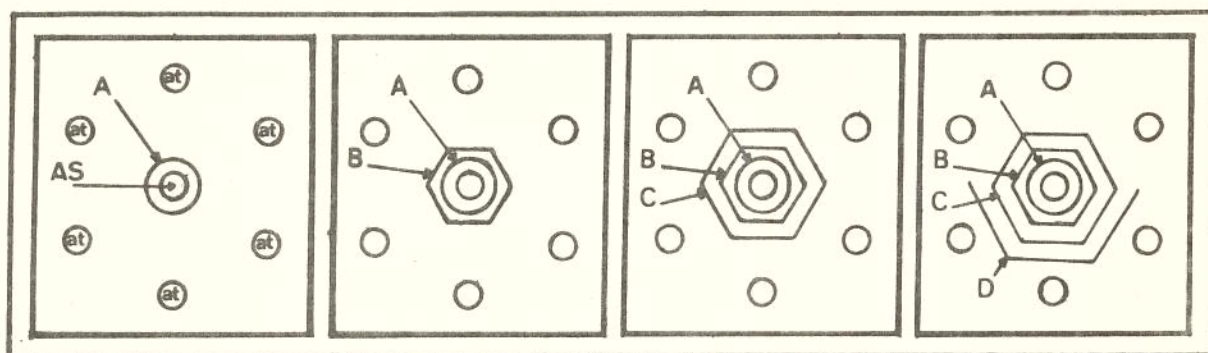
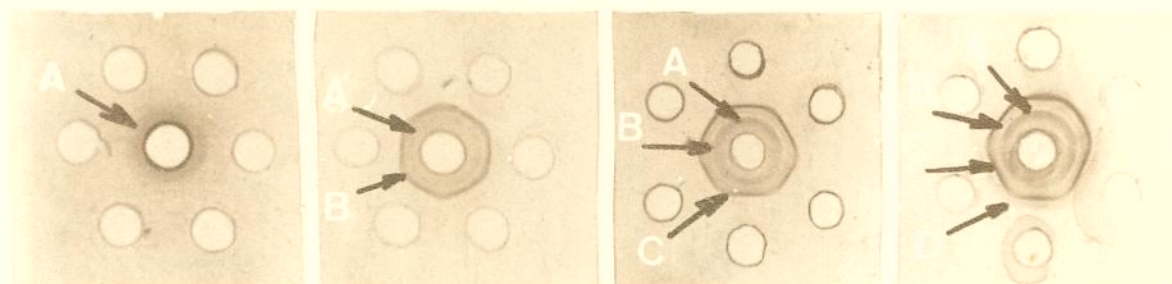
A média das distâncias entre as linhas de precipitação (consideradas a partir de uma linha tangente ao poço do anti-soro) foram as seguintes: LP-A 1 mm; LP-B 2 mm; LP-C 3 mm e LP-D 4 mm (Esquema 2).

4.2.1. Testes serológicos empregando-se AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160

C.arabica cv. Arabica (C.a.A.Mix)

As reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar com antígenos de sementes de C.arabica, revelaram o aparecimento de até quatro linhas de precipitação (LP), a LP-A, B, C e D (Quadro 4). Observou-se que a LP-C esteve presente nas reações com todos os extratores. Dez dias após a primeira injeção de antígeno houve o aparecimento somente da LP-C (primeira sangria) para todos os extratores, e assim se manteve até a quarta sangria. Dois dias após a segunda injeção de antígeno (quinta sangria) as LP-A, B, C e D foram constatadas nas reações com os extratores água, S-NaCl e borato, sendo que para o extrator NaCl-EtSH houve o aparecimento somente das LP-B e C. O mesmo comportamento foi verificado na sexta sangria. Observou-se as LP-AB e CD (sétima e oitava sangrias) para o extrator água, verificando-se para o extrator S-NaCl, as LP-ABCD (sétima sangria) e as LP-ABC (oitava sangria). Nas reações com os extratores borato e NaCl-EtSH, observou-se para borato as LP-CD (sétima e oitava sangrias) e para NaCl-EtSH a LP-C (sétima e oitava sangrias). Nas demais sangrias para este último extrator, verificou-se somente a LP-C. As linhas de precipitação observadas para o extrator água, revelaram as LP-BC (nona sangria), as LP-BCD (décima sangria) e as LP-BC (décima primeira sangria), sendo que nas reações com S-NaCl, observou-se as LP-ABCD (nona e décima sangrias) e a LP-C (décima primeira sangria), verificando-se em

ESQUEMA 2 - Fotografia e gráfico dos tipos de linha de precipitação (LP) observadas nas reações serológicas de dupla difusão em ágar, entre anti-soros e antígenos de Coffea. (homólogos e heterólogos).



AS - anti-soro

at - antígenos (homólogos e heterólogos)

QUADRO 4 - C.arabica contra AS.C.a.A.Mix(S-NaCl)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	C	C	C	C
3/22.1	C	C	C	C
4/29.1	C	C	C	C
5/6.2	ABCD	ABCD	ABCD	BC
6/9.2	ABCD	ABCD	ABCD	BC
7/13.2	ABCD	ABCD	CD	C
8/16.2	ABCD	ABC	CD	C
9/20.2	BC	ABCD	CD	C
10/23.2	BCD	ABCD	CD	C
11/27.2	BC	C	C	C
12/31.2	C	C	C	C
13/34.2	CD	C	C	C
14/41.2	C	C	C	C
15/44.2	BC	C	C	C
16/49.2	BC	C	C	C
17/55.2	BC	C	C	C
18/58.2	BC	C	C	C
19/65.2	BC	C	BC	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

borato as LP-CD (nona e décima sangrias) e LP-C (décima primeira sangria), enquanto que as reações das demais sangrias para este último extrator mostraram somente a LP-C, com exceção da observação das LP-BC (décima nona sangria). Em S-NaCl, constatou-se a LP-C nas sangrias restantes. As reações com água, apresentaram a LP-C (décima segunda e décima quarta sangrias) e LP-CD (décima terceira sangria), sendo observadas as LP-BC nas demais sangrias.

C.canephora cv. Kouillou (C.ca.)

Nas reações com C.canephora houve o aparecimento de no máximo três linhas de precipitação (LP), respectivamente, as LP-A, B, C ou D (Quadro 5). As LP-C estiveram presentes nas reações com todos os extratores usados. As reações revelaram que 10 dias após a primeira injeção de antígeno, a LP-C esteve presente nos extratores S-NaCl, borato e NaCl-EtSH (com exceção de água) que apresentou as LP-BC. O mesmo comportamento foi observado 16 dias após a primeira injeção de antígeno (segunda sangria). Observou-se em água e S-NaCl as LP-BC (terceira e quarta sangrias), sendo que em borato e NaCl-EtSH, verificou-se a LP-C (terceira e quarta sangrias). Em água, todas as demais sangrias apresentaram as LP-BC. As reações com S-NaCl mostraram as LP-AC (quinta sangria) e LP-D (sexta sangria), sendo que observou-se as LP-CD (sétima e oitava sangrias). As reações em borato revelaram as LP-CD (quinta à oitava sangrias). Verificou-se somente a LP-C nas sangrias restantes para NaCl-EtSH, com exceção da quinta sangria, que revelou as LP-BC.

C.congensis cv. Bangelan (C.co.)

As observações decorrentes da análise das reações com C.congen-

QUADRO 5 - C.canephora contra AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores				
	1	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1		BC	C	C	C
2/16.1		BC	C	C	C
3/22.1		BC	BC	C	C
4/29.1		BC	BC	C	C
5/6.2		BC	ACD	CD	BC
6/9.2		BC	ACD	CD	C
7/13.2		BC	CD	CD	C
8/16.2		BC	CD	CD	C
9/20.2		BC	C	C	C
10/23.2		BC	C	C	C
11/27.2		BC	C	C	C
12/31.2		BC	C	C	C
13/34.2		BC	C	C	C
14/41.2		BC	C	C	C
15/44.2		BC	C	C	C
16/49.2		BC	C	C	C
17/55.2		BC	C	C	C
18/58.2		BC	C	C	C
19/65.2		BC	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

sis revelaram o aparecimento de até tres linhas de precipitação (LP), respectivamente as LP-B, C e D (Quadro 6). A LP-C esteve presente em todas as reações com os extratores, não se verificando a LP-A nesses testes. Observou-se que até a quarta sangria, esteve presente a LP-C. Verificaram-se as LP-BC (quinta, sétima, décima terceira e décima quarta sangrias) e as LP-CD (nona sangria) para o extrator água, sendo que as demais sangrias revelaram a LP-C. Observou-se nas reações com S-NaCl as LP-BCD (quinta e sexta sangrias), sendo que em borato verificou-se as LP-BCD (quinta e sexta sangrias), observando-se também as LP-BCD (sétima e oitava sangrias). As reações com S-NaCl revelaram as LP-CD (nona e décima sangrias) e as LP-BC (décima quarta sangria), observando-se nas sangrias restantes somente a LP-C, constatando-se reação negativa (décima sétima e décima oitava sangrias). Em borato, observou-se a LP-C nas sangrias restantes, com exceção da verificação das LP-CD (décima segunda e décima quarta sangrias). Em NaCl-EtSH constatou-se as LP-BC (quinta, sexta, décima primeira, décima segunda e décima terceira sangrias), sendo que as demais sangrias revelaram a LP-C.

C.dewevrei (C.dew.)

Os resultados obtidos nas reações de dupla difusão com essa espécie, demonstraram que a LP-C esteve presente em quase todas as sangrias e para todos os extratores (Quadro 7), observando-se para o extrator água as LP-BC (sétima e oitava sangrias), sendo as mesmas linhas de precipitação constatadas para o extrator S-NaCl nas sangrias de numero 5 e 6. Em borato, as reações demonstraram a LP-B (primeira sangria), observando-se as LP-BC (segunda a sexta, décima primeira, décima segunda, décima sétima e décima oitava sangrias). As reações com NaCl-EtSH revelaram a LP-C na maioria dos testes efetuados, observando-se reação negativa (nona e décima sangrias).

QUADRO 6 - C.congensis contra AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	C	C	C	C
3/22.1	C	C	C	C
4/29.1	C	C	C	C
5/6.2	BC	BCD	BCD	BC
6/9.2	C	BCD	BCD	BC
7/13.2	BC	C	BCD	C
8/16.2	C	C	BCD	C
9/20.2	CD	CD	C	C
10/23.2	C	CD	C	C
11/27.2	C	C	C	BC
12/31.2	C	C	CD	BC
13/34.2	BC	C	C	BC
14/41.2	BC	BC	CD	C
15/44.2	C	C	C	C
16/49.2	C	C	C	C
17/55.2	C	-	C	C
18/58.2	C	-	C	C
19/65.2	C	-	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 7 - C.deweyi contra As-C.a.A.Mix(S-NaCl)180. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	B	C
2/16.1	C	C	BC	C
3/22.1	C	C	BC	C
4/29.1	C	C	BC	C
5/6.2	C	BC	BC	C
6/9.2	C	BC	BC	C
7/13.2	BC	C	C	C
8/16.2	BC	C	C	C
9/20.2	C	C	C	-
10/23.2	C	C	C	-
11/27.2	C	C	BC	C
12/31.2	C	C	BC	C
13/34.2	C	C	C	C
14/41.2	C	C	C	C
15/44.2	C	C	C	C
16/49.2	C	C	C	C
17/55.2	C	C	BC	C
18/58.2	C	C	BC	C
19/65.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

C.eugenoides (C.eug.)

As reações serológicas de dupla difusão feitas com C.eugenoides mostraram o aparecimento de até 4 linhas de precipitação (LP), respectivamente as LP-A, B, C e D (Quadro 8). A LP-C esteve presente em todas as reações com os extratores usados. Após 10 dias da primeira injeção de antígeno (primeira sangria) as reações revelaram a LP-C em todos os extratores. Nas reações com água, S-NaCl e borato, verificou-se a LP-C (segunda e quarta sangrias), sendo que em água (segunda sangria) constatou-se ausência de reação e em NaCl-EtSH, observou-se a LP-D (terceira e quarta sangrias). Nas reações com água, verificou-se a LP-ABCD (quinta sangria) e as LP-BCD (sexta a oitava sangrias), enquanto que as demais sangrias revelaram somente a LP-C. Em S-NaCl, observou-se as LP-ABC (quinta sangria), constatando-se as LP-BC nas demais sangrias. Para o extrator borato, verificou-se as LP-BCD (quinta sangria), as LP-ABC (sétima sangria) e as LP-BC (sexta e oitava sangrias), enquanto que as sangrias restantes mostraram somente a LP-C. As reações com o extrator NaCl-EtSH revelaram a LP-CD (quinta sangria), sendo que nas demais sangrias, observou-se somente a LP-D.

C.liberica (C.lib.)

Os testes com C.liberica (Quadro 9) demonstraram a presença da LP-C em quase todas as reações. Em S-NaCl, observaram-se as LP-BCD (décima terceira a décima sexta sangrias) e as LP-CD (décima sétima sangria, enquanto não se constatou reação positiva em várias sangrias (primeira a quarta; sétima a oitava).

QUADRO 8 - C.eugenioides contra AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	-	C	C	C
3/22.1	C	C	C	D
4/29.1	C	C	C	D
5/6.2	ABCD	ABC	BCD	CD
6/9.2	BCD	BC	BC	D
7/13.2	BCD	BC	BC	D
8/16.2	BCD	BC	BC	D
9/20.2	C	BC	C	D
10/23.2	C	BC	C	D
11/27.2	C	BC	C	D
12/31.2	C	BC	C	D
13/34.2	C	BC	C	D
14/41.2	C	BC	C	D
15/44.2	C	BC	C	D
16/49.2	C	BC	C	D
17/55.2	C	BC	C	D
18/58.2	C	BC	C	D
19/65.2	C	BC	C	D

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 9 - C.liberica contra AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes so lúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	-
2/16.1	C	C	C	-
3/22.1	C	C	C	-
4/29.1	C	C	C	-
5/6.2	C	C	C	C
6/9.2	C	C	C	C
7/13.2	C	C	C	-
8/16.2	C	C	C	-
9/20.2	C	C	C	C
10/23.2	C	C	C	C
11/27.2	C	C	C	C
12/31.2	C	C	C	C
13/34.2	C	BCD	C	C
14/41.2	C	BCD	C	C
15/44.2	C	BCD	C	C
16/49.2	C	BCD	C	C
17/55.2	C	CD	C	C
18/58.2	C	C	C	C
19/65.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

4.2.2. Testes serológicos empregando-se AS-C.a.Mix(FD)-161

C.arabica cv. Arabica (C.a.A.Mix)

As reações de dupla difusão em gel de ágar com antígenos de se mentes de C.arabica revelaram o aparecimento de até 3 linhas de precipitação (LP), respectivamente, as LP-B, C e D (Quadro 10). Pode-se observar que a LP-C esteve presente nas reações com to dos os extratores. Dez dias após a primeira injeção de antígeno, houve o aparecimento da LP-C em todos os extratores, com exceção do extrator água que apresentou as LP-BC. Nas reações com água e borato estiveram presentes respectivamente, as LP-BC (segunda sangria) e as LP-BCD (segunda sangria), sendo que para S-NaCl e NaCl-EtSH observou-se a LP-C (segunda sangria). Em água, verificou-se as LP-BC (décima quarta e décima sexta sangrias) e LP-C (décima sétima sangria), constatando-se nas sangrias restantes as LP-BCD. Observou-se nas reações com S-NaCl as LP-BCD (quinta sangria) e a LP-C (décima sétima, décima oi tava e décima nona sangrias), enquanto que nas demais sangrias constatou-se as LP-CD. As reações com borato, revelaram (da ter ceira sangria em diante) as LP-CD, observando-se a LP-C (décima terceira, décima quinta e décima sétima sangrias). Em to das as reações com NaCl-EtSH houve o aparecimento da LP-C (com exceção da quinta e sexta sangrias, que revelaram as LP-BC).

C.canephora cv. Kouillou (C.ca.)

As reações com essa espécie demonstraram que somente a LP-C esteve presente em todas as reações com todos os extratores, com exceção da quinta sangria para água e borato que revelando as LP-BC (Quadro 11).

QUADRO 10 - C.arabica contra AS-C.a.A.Mix(FD)161. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	BC	C	C	C
2/16.1	BC	C	BCD	C
3/22.1	BCD	CD	CD	C
4/29.1	BCD	CD	CD	C
5/6.2	BCD	BCD	CD	C
6/9.2	BCD	BC	CD	BC
7/13.2	BCD	CD	CD	BC
8/16.2	BCD	CD	CD	C
9/20.2	BCD	CD	CD	C
10/23.2	BCD	CD	CD	C
11/27.2	BCD	CD	CD	C
12/31.2	BCD	CD	CD	C
13/34.2	BCD	CD	C	C
14/41.2	BC	CD	CD	C
15/44.2	ABC	CD	C	C
16/49.2	BC	CD	CD	C
17/55.2	C	C	C	C
18/58.2	BC	C	CD	C
19/65.2	BC	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - Cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 11 - C.canephora contra AS-C.a.A.Mix(FD)161. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	C	C	C	C
3/22.1	C	C	C	C
4/29.1	C	C	C	C
5/6.2	BC	C	BC	C
6/9.2	C	C	C	C
7/13.2	C	C	C	C
8/16.2	C	C	C	C
9/20.2	C	C	C	C
10/23.2	C	C	C	C
11/27.2	C	C	C	C
12/31.2	C	C	C	C
13/34.2	C	C	C	C
14/41.2	C	C	C	C
15/44.2	C	C	C	C
16/49.2	C	C	C	C
17/55.2	C	C	C	C
18/58.2	C	C	C	C
19/55.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%
 Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl
 NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M
 Numerador - ordem de sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

C.congensis cv. Bangelan (C.co.)

As reações com C.congensis revelaram o aparecimento de até 3 linhas de precipitação, respectivamente as LP-A ou B, C e D (Quadro 12). A LP-C esteve presente em todas as reações com os extratores. As reações demonstraram que 10 dias após a primeira injeção de antígeno, houve o aparecimento da LP-C para todos os extratores. Em água e S-NaCl, observou-se a LP-C (segunda sangria), enquanto que para borato e NaCl-EtSH, verificou-se as LP-CD (segunda sangria), sendo que as reações com água e S-NaCl revelaram as LP-CD (terceira e quarta sangrias). Em borato, observou-se as LP-BC (terceira sangria) e as LP-AC (quarta sangria), enquanto que para NaCl-EtSH, constatou-se a presença das LP-CD (terceira sangria) e a LP-C (quarta sangria). As reações com o extrator água (após a segunda injeção de antígeno) revelaram as LP-BCD (quinta, sétima e oitava sangrias) e as LP-CD (sexta sangria), enquanto que para S-NaCl verificou-se a LP-C (quinta e sexta sangrias) e as LP-CD (sétima e oitava sangrias). Em borato (da quinta sangria em diante) as reações mostraram as LP-CD, observando-se a LP-C (décima terceira, décima sétima, décima oitava e décima nona sangrias). Nas reações com NaCl-EtSH, houve o aparecimento da LP-C (em quase todas as sangrias), sendo que constatou-se a presença das LP-CD (segunda, terceira, oitava à décima segunda, décima sétima à décima nona sangrias).

C.dewevrei (C.dew.)

Nesta espécie a LP-C esteve presente em quase todos os testes realizados (Quadro 13). Para o extrator S-NaCl, observou-se a LP-B (terceira e quarta sangrias) e as LP-BC (quinta sangria), sendo que nas demais reações (com exceção da quarta e quinta sangrias, onde não se observou reação positiva) verificou-se a

QUADRO 12 - C.congensis contra AS-C.a.A.Mix(FD)160. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	C	C	CD	CD
3/22.1	CD	CD	BC	CD
4/29.1	CD	CD	BC	C
5/6.2	BCD	C	CD	C
6/9.2	CD	C	CD	C
7/13.2	BCD	CD	CD	C
8/16.2	BCD	CD	CD	CD
9/20.2	CD	CD	CD	CD
10/23.2	C	CD	CD	CD
11/27.2	CD	CD	CD	CD
12/31.2	CD	CD	CD	CD
13/34.2	C	CD	CD	C
14/41.2	-	CD	CD	C
15/44.2	CD	CD	CD	C
16/49.2	CD	CD	CD	C
17/55.2	C	C	C	CD
18/58.2	C	C	C	CD
19/65.2	C	C	C	CD

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 13 - C.deweyrei contra AS-C.a.A.Mix(FD)161. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	BC	C
2/16.1	C	C	BC	-
3/22.1	C	B	C	-
4/29.1	C	-	C	C
5/6.2	C	BC	BC	C
6/9.2	C	C	C	C
7/13.2	C	C	C	C
8/16.2	C	C	C	C
9/20.2	C	C	C	C
10/23.2	C	C	C	C
11/27.2	C	C	C	C
12/31.2	C	C	C	-
13/34.2	C	B	C	-
14/41.2	C	-	C	-
15/44.2	C	C	C	-
16/49.2	C	C	C	-
17/55.2	C	C	C	-
18/58.2	C	C	C	-
19/65.2	C	C	C	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

LP-C. Em borato, 10 dias após a primeira injeção de antígeno, constatou-se a presença das LP-BC (primeira sangria) observando-se também as LP-BC (segunda e quinta sangrias). As reações com o extrator S-NaCl revelaram a LP-C (primeira sangria) e também, observou-se a LP-C (da quarta à décima primeira sangrias) enquanto que as demais sangrias mostraram ausência de reação.

C.eugenioides (C.eug.)

As reações de dupla difusão com C.eugenioides revelaram que 10 dias após a primeira injeção de antígeno, o extrator água apresentou as LP-BCD (primeira sangria) verificando-se as mesmas linhas de precipitação na segunda sangria (Quadro 14). Para o mesmo extrator, constatou-se as LP-CD (terceira, quarta, décima quinta e décima sexta sangrias) e a LP-C (décima primeira sangria), sendo que as demais reações apresentaram as LP-BCD. Em S-NaCl, verificou-se a LP-C (primeira e segunda sangrias) e as LP-CD (terceira, quarta, nona à décima quarta, décima sétima à décima nona sangrias), sendo que nas sangrias restantes constatou-se as LP-BCD. Observou-se a LP-C (primeira, segunda, terceira à oitava, décima quarta e décima nona sangrias) para o extrator borato, sendo que nas demais sangrias (com exceção da nona sangria que apresentou a LP-BCD) constatou-se as LP-CD. Para NaCl-EtSH, as reações mostraram a presença da LP-C em todas as sangrias, observando-se a LP-D (nona e décima sangrias).

C.liberica (C.lib.)

Os resultados obtidos nas reações de dupla difusão com essa espécie revelaram a LP-C em quase todas as sangrias, com exceção do extrator água, onde se constatou a presença das LP-BC na quinta sangria (Quadro 15).

QUADRO 14 - C.eugenioides contra AS-C.a.A.Mix(FD)161. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	BCD	C	C	C
2/16.1	BCD	C	C	C
3/22.1	CD	CD	CD	C
4/29.1	CD	CD	CD	C
5/6.2	BCD	BCD	C	C
6/9.2	BCD	BCD	C	C
7/13.2	BCD	BCD	C	C
8/16.2	BCD	BCD	C	C
9/20.2	-	CD	BCD	D
10/23.2	-	CD	CD	D
11/27.2	C	CD	CD	C
12/31.2	BCD	CD	CD	C
13/34.2	BCD	CD	CD	C
14/41.2	BCD	CD	C	C
15/44.2	CD	-	CD	C
16/49.2	CD	BCD	CD	C
17/55.2	BCD	CD	CD	C
18/58.2	BCD	CD	CD	C
19/65.2	BCD	CD	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 15 - C.liberica contra AS-C.a.A.Mix(FD)161. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidos com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/10.1	C	C	C	C
2/16.1	C	C	C	C
3/22.1	C	C	C	C
4/29.1	C	C	C	C
5/6.2	SC	C	C	C
6/9.2	C	C	C	C
7/13.2	C	C	C	C
8/16.2	C	C	C	C
9/20.2	C	C	C	C
10/23.2	C	C	C	C
11/27.2	C	C	C	C
12/31.2	C	C	C	C
13/34.2	C	C	C	C
14/41.2	C	C	C	C
15/44.2	C	C	C	C
16/49.2	C	C	C	C
17/55.2	C	C	C	C
18/58.2	C	C	C	C
19/65.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

4.2.3. Testes serológicos empregando-se AS-C.ca.(FD) 175

C.arabica cv. arabica (C.a.A)

As observações decorrentes da análise dos resultados obtidos nas reações com C.arabica revelaram que a LP-C esteve presente em todas as reações com os extratores usados. Os resultados obtidos para os extratores água, borato e NaCl-EtSH não demonstraram reações positivas (primeira sangria) com exceção do extrator S-NaCl que apresentou a LP-C (Quadro 16). Observou-se a LP-C (segunda a sexta sangrias) para todos os extratores utilizados, verificando-se ausência de reação (segunda, terceira e sexta sangrias) com o extrator NaCl-EtSH. Para o extrator água, constatou-se as LP-CD nas sangrias restantes (com exceção da última). O mesmo comportamento se verificou para o extrator borato. Em S-NaCl, constatou-se as LP-CD (sétima a nona sangrias) e a LP-C (décima a décima segunda sangrias). A LP-C esteve presente em quase todas as reações com o extrator NaCl-EtSH, verificando-se ausência de reação (segunda a quarta e sexta sangrias).

C.canephora cv. Kouillou (C.ca.)

Os resultados obtidos nas reações de dupla difusão com essa espécie revelaram a presença da LP-C em quase todas as reações, com exceção de borato que apresentou as LP-BC (sexta e sétima sangrias) (Quadro 17). Em NaCl-EtSH, as reações mostraram a LP-C em quase todas as sangrias, constatando-se ausência de reação (nona, décima primeira e décima segunda sangrias).

QUADRO 16 - C.arabica contra AS-C.ca.(FD)175. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidos com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	-	C	-	-
2/8.1	C	C	C	-
3/11.1	C	C	C	-
4/13.1	C	C	C	C
5/17.1	C	C	C	C
6/19.1	C	C	C	-
7/4.2	CD	CD	CD	C
8/7.2	CD	CD	CD	C
9/11.2	CD	CD	CD	C
10/13.2	CD	C	CD	C
11/17.2	CD	C	CD	C
12/24.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 17 - C.canephora contra AS-C.ca.(FD)175. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidos com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	-	C	C
2/8.1	C	C	C	C
3/11.1	C	C	C	C
4/13.1	C	C	C	C
5/17.1	C	C	C	C
6/19.1	C	C	BC	C
7/4.2	C	C	BC	C
8/7.2	C	C	C	C
9/11.2	C	C	C	-
10/13.2	C	C	C	C
11/17.2	C	C	C	-
12/24.2	C	C	C	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de séries das injeções (2º dígito)

C.congensis cv. Bangelan (C.co.)

Nas reações com C.congensis, pode-se constatar a presença da LP-C (primeira sangria) 5 dias após a primeira injeção de antígeno em todos os extratores usados, constatando-se ausência de reação em todas as sangrias para o extrator NaCl-EtSH (Quadro 18). Observou-se a LP-C (segunda a sexta sangrias) para os extratores água, S-NaCl e borato, verificando-se a LP-C (nas demais sangrias) para o extrator água, constatando-se ausência de reação (sétima e décima segunda sangrias), enquanto que para o extrator S-NaCl, observou-se as LP-CD (sétima, décima e décima primeira sangrias), verificando-se a LP-C (oitava e décima segunda sangrias) e as LP-CD (nona sangria).

C.dewevrei (C.dew.)

Os resultados dos testes serológicos com essa espécie revelaram que a LP-C esteve presente em todas as reações efetuadas com os extratores (Quadro 19).

C.eugenioides (C.eug.)

As reações de dupla difusão feitas com C.eugenioides mostraram que 5 dias após a primeira injeção de antígeno, os extratores água e borato apresentaram a LP-C (sétima sangria), enquanto que em NaCl não se observou reação positiva até a quarta sangria (Quadro 20). Para o extrator água, as reações revelaram as LP-BC (sétima sangria), observando-se a LP-C nas demais sangrias. Constatou-se ausência de reação (segunda e décima primeira sangrias). As reações com o extrator S-NaCl, demonstraram a presença da LP-C (quinta, sexta, nona e décima primeira sangrias) verificando-se ausência de reação (sétima, oitava e décima se-

QUADRO 18 - C.congensis contra AS-C.ca.(FD)175. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	C	C	-
2/8.1	C	C	C	-
3/11.1	C	C	C	-
4/13.1	C	C	C	-
5/17.1	C	C	C	-
6/19.1	C	C	C	-
7/4.2	-	CD	CD	-
8/7.2	C	C	CD	-
9/11.2	C	C	CD	-
10/13.2	C	CD	CD	-
11/17.2	C	CD	CD	-
12/24.2	-	C	CD	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 19 - C.deweyrei contra AS-C.ca.(FD)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	Borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	C	C	C
2/8.1	C	C	C	C
3/11.1	C	C	C	C
4/13.1	C	C	C	C
5/17.1	C	C	C	C
6/19.1	C	C	C	C
7/4.2	C	C	C	C
8/7.2	C	C	C	C
9/11.2	C	C	C	C
10/13.2	C	C	C	C
11/17.2	C	C	C	C
12/24.2	C	C	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígenos (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 20 - C.eugenioides contra AS-C.ca.(FD)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	-	C	-
2/8.1	-	-	-	-
3/11.1	C	-	C	-
4/13.1	C	-	C	-
5/17.1	C	C	C	-
6/19.1	C	C	C	-
7/4.2	BC	-	C	-
8/7.2	C	-	C	-
9/11.2	C	C	C	-
10/13.2	C	C	C	-
11/17.2	-	C	C	-
12/24.2	C	-	-	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%
 Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl
 NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M
 Numerador - ordem de sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

gunda sangrias). Os resultados obtidos com o extrator borato revelaram a presença da LP-C em quase todas as reações, constatando-se ausência de reação (segunda e décima segunda sangrias). Em NaCl-EtSH não se constatou reação positiva em todos os testes efetuados.

C.liberica (C.lib.)

Os resultados obtidos nas reações com essa espécie revelaram a LP-C em quase todas as reações, observando-se para os extratores S-NaCl e borato as LP-CD (primeira sangria) (Quadro 21). A mesma linha de precipitação foi constatada (sexta, nona e décima segunda sangrias) para o extrator S-NaCl. Para NaCl-EtSH, observou-se ausência de reação (segunda e sexta sangrias) enquanto que as demais sangrias revelaram a LP-C.

4.2.4. Testes serológicos empregando-se As-C.ca.(S-NaCl) 176

C.arabica cv. Arabica (C.a.A.Mix)

As reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar com antígenos de sementes de C.arabica revelaram o aparecimento de até 4 linhas de precipitação (LP), respectivamente, as LP-A, B, C e D. Pode-se observar que 10 dias após a primeira injeção de antígeno, houve o aparecimento da LP-C (primeira sangria) somente para o extrator S-NaCl, sendo que os demais extratos não apresentaram reação positiva (Quadro 22). Nas reações com os extratores borato e NaCl-EtSH, observou-se a LP-C (segunda e sexta sangrias), verificando-se para o extrator água, as LP-CD (segunda à quinta sangrias) e a LP-C (sexta sangria), sendo que o extrator S-NaCl revelou a LP-C (segunda sangria) as LP-

QUADRO 21 - C.liberica contra AS-C.ca.(FD)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	CD	CD	C
2/8.1	C	C	C	-
3/11.1	C	C	C	C
4/13.1	C	C	C	C
5/17.1	C	C	C	C
6/19.1	C	CD	C	-
7/4.2	C	C	C	C
8/7.2	C	C	C	C
9/11.2	C	CD	C	C
10/13.2	C	CD	C	C
11/17.2	C	CD	C	C
12/24.2	C	CD	C	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 22 - C.arabica contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	-	C	-	-
2/8.1	CD	C	C	C
3/11.1	C	CD	C	C
4/13.1	CD	BC	C	C
5/17.1	CD	BC	C	C
6/19.1	C	CD	C	C
7/4.2	BCD	ABCD	BCD	D
8/7.2	ABCD	ABCD	BC	D
9/11.2	ABCD	BCD	BC	D
10/13.2	ABC	BC	BC	D
11/17.2	BC	BC	BC	D
12/24.2	BC	BC	BC	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

CD (terceira e sexta sangrias) e as LP-BC (quarta e quinta sangrias). Nas reações com o extrator água, constatou-se as LP-BCD (sétima sangria), as LP-ABCD (oitava sangria), as LP-ABCD (nona sangria), as LP-ABC (décima sangria) e as LP-BC (décima primeira e décima segunda sangrias) e em S-NaCl, verificou-se as LP-ABCD (sétima e oitava sangrias), as LP-BCD (nona sangria) e as LP-BC (décima a décima segunda sangrias). Os resultados obtidos para o extrator borato mostraram as LP-BCD (sétima sangria) observando-se nas demais sangrias as LP-BC. Para o extrator NaCl-EtSH, verificou-se a LP-D (sétima a décima primeira sangrias) com exceção da última sangria, onde não se constatou reação positiva.

C.canephora cv. Kouillou (C.ca.)

Os resultados obtidos nas reações com essa espécie revelaram que 5 dias após a primeira injeção de antígeno (primeira sangria) não houve reação positiva para os extratores usados (Quadro 23). A LP-C esteve presente em todos os testes com os extratores. Observou-se a LP-C (segunda a sexta sangrias) nas reações com os extratores água e S-NaCl, verificando-se a LP-C (segunda sangria) para o extrator borato, sendo constatada (para esse mesmo extrator) ausência de reação (terceira a sexta sangrias). Em NaCl-EtSH (segunda sangria) não se observou reação positiva, sendo que as reações (com esse mesmo extrator) revelaram a LP-B (terceira e sexta sangrias) e a LP-C (quarta e quinta sangrias). Para o extrator água, verificou-se as LP-BC (oitava a decima e décima segunda sangrias), enquanto que as reações mostraram a LP-C (sétima e décima primeira sangrias), para esse mesmo extrator. O mesmo comportamento foi observado para S-NaCl, apresentando, porém, as LP-BC (sétima sangria). Em borato, constatou-se as LP-CD (sétima e oitava sangrias), a LP-C (nona, décima e décima segunda sangrias) e as LP-BC (déci-

T352

QUADRO 23 - C.canephora contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	-	-	-	-
2/8.1	C	C	C	-
3/11.1	C	C	-	B
4/13.1	C	C	-	C
5/17.1	C	C	-	C
6/19.1	C	C	-	B
7/4.2	C	BC	CD	C
8/7.2	BC	BC	CD	B
9/11.2	BC	BC	C	C
10/13.2	BC	BC	C	B
11/17.2	C	C	BC	C
12/24.2	BC	BC	C	B

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%
 Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl
 NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M
 Numerador - ordem de sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

ma primeira sangria) enquanto que as reações para o extrator NaCl-EtSH revelaram a LP-B (terceira, sexta, oitava, décima e décima segunda sangrias) e LP-C nas sangrias restantes.

C.congensis cv. Bangelan

As reações serológicas de dupla difusão com essa espécie mostraram que a LP-C esteve presente nos testes efetuados até a sexta sangria para os extratores água, S-NaCl e borato (Quadro 24). Observou-se em S-NaCl, ausência de reação (primeira, quinta e sexta sangrias). Reações negativas foram também observadas para o extrator borato (primeira e quinta sangrias). Nas reações com o extrator água, constatou-se a presença das LP-BCD (sétima à nona sangrias) e as LP-BC (décima a décima segunda sangrias), enquanto que as LP-BC (sétima à décima segunda sangrias) foram observadas para o extrator S-NaCl. O mesmo comportamento foi observado para o extrator borato, verificando-se, porém, as LP-BCD (sétima sangria). Os resultados obtidos para NaCl-EtSH não apresentaram reação positiva.

C.dewevrei (C.dew.)

As LP-C e BC estiveram presentes em quase todas as reações (Quadro 25). Para o extrator água, observou-se a LP-B (primeira sangria). As LP-BC foram observadas em todas as reações com esse mesmo extrator, com exceção da segunda sangria que revelou a LP-C. O mesmo comportamento foi verificado em S-NaCl, constando-se, porém, a LP-C (primeira e terceira sangrias). Nas reações com borato, observou-se a LP-C (primeira a sexta sangrias) e as LP-BC (sétima a décima segunda sangrias). Os resultados obtidos nas reações com NaCl-EtSH revelaram a LP-C em todas as sangrias.

QUADRO 24 - C.congensis contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	C	-	-	-
2/8.1	C	C	C	-
3/11.1	C	C	C	-
4/13.1	C	C	C	-
5/17.1	C	-	-	-
6/19.1	C	-	C	-
7/4.2	BCD	BC	ABCD	-
8/7.2	BCD	BC	BC	-
9/11.2	BCD	BC	BC	-
10/13.2	BC	BC	BC	-
11/17.2	BC	BC	BC	-
12/24.2	BC	BC	BC	-

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 25 - C.deweyi contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	B	C	C	C
2/8.1	C	BC	C	C
3/11.1	BC	BC	C	C
4/13.1	BC	C	C	C
5/17.1	BC	BC	C	C
6/19.1	BC	BC	C	C
7/4.2	BC	BC	BC	C
8/7.2	BC	BC	BC	C
9/11.2	BC	BC	BC	C
10/13.2	BC	BC	BC	C
11/17.2	BC	BC	BC	C
12/24.2	BC	BC	BC	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

N-Cl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

C.eugenioides (C.eug.)

As reações serológicas efetuadas com C.eugenioides mostraram que 5 dias após a primeira injeção de antígeno, somente se observou reação positiva com o extrator NaCl-EtSH (Quadro 26). Em água, houve ausência de reação (segunda a quarta sangrias). O mesmo comportamento se observou para o extrator S-NaCl com relação a segunda sangria. Nesse mesmo extrator, constatou-se as LP-BC (quinta e sexta sangrias) em todas as sangrias para o extrator S-NaCl, verificando-se porém, a LP-C (décima sangria), para esse mesmo extrator. Nas reações com o extrator borato observou-se as LP-BC (segunda à décima segunda sangrias). As reações com NaCl-EtSH mostraram o aparecimento da LP-B (segunda sangria) observando-se nas demais sangrias a LP-C.

C.liberica (C.lib.)

As observações decorrentes da análise das reações com essa espécie revelaram até 3 linhas de precipitação (LP), respectivamente, a LP-B, C e D (Quadro 27). Pode-se observar que o extrator água revelou as LP-BCD (sétima à décima sangrias). Os resultados obtidos demonstraram que não houve reação positiva 5 dias após a primeira injeção de antígeno (primeira sangria) para todos os extratores usados. Dois dias após a primeira injeção de antígeno, os extratores S-NaCl e borato mostraram o aparecimento das LP-BC (segunda sangria), o extrator S-NaCl revelou as LP-CD e o extrator NaCl-EtSH a LP-C para a mesma sangria. Observou-se as LP-C (terceira e quarta sangrias) e LP-BC (quinta sangria), respectivamente para os extratores água, S-NaCl e borato, constatando-se ausência de reação (para essas mesmas sangrias) para o extrator NaCl-EtSH. Em água observou-se a presença das LP-BC (sexta, décima primeira e décima segunda sangrias) sendo que para o extrator S-NaCl verificou-se as

QUADRO 26 - C.eugenioides contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	-	-	-	B
2/8.1	-	-	BC	B
3/11.1	-	BC	BC	C
4/13.1	-	BC	BC	C
5/17.1	BC	BC	BC	C
6/19.1	BC	BC	BC	C
7/4.2	C	BC	BC	C
8/7.2	C	BC	BC	C
9/11.2	C	BC	BC	C
10/13.2	C	C	BC	C
11/17.2	C	BC	BC	C
12/24.2	C	BC	BC	C

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 27 - C.liberica contra AS-C.ca.(S-NaCl)176. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar, com antígenos de sementes solúveis em quatro tipos de extratores.

Ordem e data da sangria	Linhas de precipitação obtidas com os diversos extratores			
	H ₂ O	S-NaCl	borato	NaCl-EtSH
1/5.1	-	-	-	-
2/8.1	BC	CD	BC	C
3/11.1	C	C	BC	-
4/13.1	C	C	BC	-
5/17.1	C	C	BC	-
6/19.1	BC	C	C	C
7/4.2	BCD	BC	C	B
8/7.2	BCD	BC	C	-
9/11.2	BCD	BC	-	C
10/13.2	BCD	BC	-	C
11/17.2	BC	BC	C	B
12/24.2	BC	CD	C	B

S-NaCl - antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

Borato - tampão borato de sódio 0,05M pH 8,0 - 0,25% NaCl

NaCl-EtSH - cloreto de sódio 2,5% - mercaptoetanol 0,025M

Numerador - ordem de sangria obtida

Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

LP-BC (sétima à décima primeira sangrias), observando-se, (para esse mesmo extrator) porém, a LP-D (sexta sangria) e as LP-CD (décima segunda sangria). As reações com o extrator borato, mostraram a LP-C (sexta sangria em diante), constatando-se ausência de reação (nona e décima sangrias) para esse mesmo extrator. Em NaCl-EtSH, observou-se a LP-C (sexta, nona e décima sangrias) e a LP-B (sétima, décima primeira e décima segunda sangrias) verificando-se reação negativa (oitava sangria) para esse mesmo extrator.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes serológicos para determinação do título dos anti-soros para C.arabica e C.canephora, não apresentaram diferenças significativas quando os títulos máximos obtidos foram analisados. Os anti-soros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:4, 1:8 e 1:16 quando determinados pelo teste de Duchterlony. Esses resultados confirmaram observações feitas anteriormente por HÖFLING (1975), cujos anti-soros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:8, 1:16 e 1:64 quando analisados, sugerindo que anti-soros com tais títulos, permitiram a obtenção de resultados satisfatórios para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica. Esses títulos não foram, pois, um fator limitante na interpretação das reações serológicas de dupla difusão, ao contrário do encontrado por KAPALA et al. (1975) para cevada, cujos resultados demonstraram que a comparação dos antígenos em estudos serológicos foi grandemente dificultada quando se utilizaram anti-soros de alto título, sendo a complexidade dos sistemas imunoprecipitantes um fator limitante na identificação das linhas de precipitação.

Os resultados obtidos nas reações serológicas com os anti-soros

para C.arabica e C.canephora, demonstraram que após uma única injeção de antígeno nos coelhos é possível detectar reações específicas. Tal fato indica que a injeção no linfonóculo se mostrou bastante adequada para aplicação em estudos taxonômicos como já foi descrita por OLIVEIRA (1975) cujos anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo apresentaram em geral, após uma única injeção de antígeno, valores altamente significativos, em muitos casos suficientes para se iniciarem estudos de relações de afinidade serológica.

Estudos para se determinarem os prováveis ancestrais de C.arabica, tem sido realizados do ponto de vista da genética (CARVALHO & MÔNACO, 1968), citogenético (MEDINA, 1972) e fitoquímico (LONGO, 1972). A aplicação da serologia como disciplina complementar em estudos taxonômicos do gênero Coffea foi efetuada com o mesmo material utilizado nos trabalhos acima citos, com o propósito de contribuir nos estudos das prováveis - gens da espécie C.arabica, levando-se em conta que para se determinarem os prováveis ancestrais dessa espécie, há que se analisarem todos os dados coligidos de observações no campo da morfologia, genética, citologia, anatomia, bioquímica, serologia, etc.

Sendo C.arabica espécie tetraplóide com $2n=44$ cromossomos e considerada como um alotetraplóide, tem sido feitos estudos no sentido de se determinarem que espécies diplóides teriam participado de sua formação. Em virtude de ser C.canephora uma das espécies mais constantemente indicadas como tendo contribuído na origem à C.arabica, foi a mesma utilizada nos estudos serológicos comparativos aqui apresentados.

Estudos das reações serológicas com antígenos presentes em sementes de C.arabica (HÜFLING, 1975) efetuados diretamente com a farinha delipidificada ultrafina (FD), paralelamente ao emprego de extratos solúveis de sementes como antígenos, demonstraram que as linhas de precipitação observadas apresentam iden

tidade quando submetidas ao mesmo teste. Tal fato parece indicar que os anticorpos obtidos como resposta aos determinantes antigênicos inicialmente seriam os mesmos, sugerindo que há vantagens em se utilizar FD, sendo que o emprego de extratos solúveis de sementes na obtenção de antígenos seria um processo seletivo para os determinantes antigênicos, estando na dependência do tipo de solução que se utiliza para a extração.

Os estudos serológicos efetuados com os anti-soros obtidos em reação com os antígenos solúveis em água, S-NaCl, borato e NaCl-EtSH, indicaram que há diferenças qualitativas nas reações em relação às linhas de precipitação obtidas. Foi possível verificar, inicialmente, a presença da linha de precipitação (LP-C) nas reações de modo geral, sendo que em muitos casos houve uma predominância total dessa linha de precipitação. Observou-se que a LP-C é comum em todos os testes efetuados nas reações com os extratores usados. Esses resultados, confirmam as observações feitas anteriormente, quanto à identidade existente entre os anti-soros obtidos inicialmente durante o processo de imunização (HÖFLING, 1975).

Os resultados obtidos nos testes serológicos, demonstraram que há diferenças significativas nas reações entre os extratores. Observa-se que, quando se comparam as reações efetuadas entre os extratores água, S-NaCl, borato e NaCl-EtSH, este último se mostra muito pouco adequado na extração de antígenos para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica. É possível, que ocorra alguma forma de interação de NaCl-EtSH com grupos SH proteicos, dificultando assim o processo de extração desses antígenos. Pode-se constatar também que o extrator S-NaCl parece ser mais adequado, embora, em alguns casos, não se verifique variações qualitativas entre os extratores água, S-NaCl e borato. PAYNE et al. (1973) através da investigação das proteínas de sementes de C.arabica e C.canephora do ponto de vista da

eletroforese de disco, demonstraram que houve diferenças significativas entre os resultados, quando se empregaram diversos tipos de extratores. Dos sistemas utilizados para a extração de proteínas, verificou-se que, para folhas cotiledonares o tampão borato 0,05M pH 8,0 contendo NaCl 2,5%, permitiu a obtenção de padrões eletroforéticos constantes. No caso presente, usando-se a mesma técnica para sementes observou-se que NaCl 2,5% é o melhor sistema.

As relações serológicas obtidas nos estudos efetuados com AS-C.a.A.Mix(S-NaCl)160 em reação com antígenos obtidos sob tratamentos diversos das espécies C.arabica, C.canephora, C.congensis, C.dewevrei, C.eugenioides e C.liberica com base na análise da linha de precipitação LP-A, obtida nas reações com os extratores utilizados e atribuindo-se valores de porcentagem à incidência dessa linha de precipitação para cada espécie individualmente, indicaram que do ponto de vista do extrator água, pode-se agrupar as espécies C.arabica e C.eugenioides em relação às demais espécies estudadas. Com relação à LP-B, podemos observar que ela é comum às espécies C.arabica, C.canephora, C.congensis, C.eugenioides e C.dewevrei e não existe em C.liberica. Se analisarmos as espécies com base na LP-C, verificamos que essa linha é comum para todas as espécies estudadas. Pela LP-D as espécies C.arabica, C.eugenioides e C.congensis podem ser agrupadas separando-as das demais espécies. Do ponto de vista do extrator S-NaCl, os resultados demonstraram que, com base na LP-A, as espécies C.arabica, C.canephora e C.eugenioides se diferenciam de C.congensis, C.liberica e C.dewevrei. Com relação à LP-B, podemos verificar que todas as espécies analisadas podem ser agrupadas. A análise dessas espécies com relação à LP-C mostrou que essa linha é comum para todas as espécies estudadas. As espécies C.congensis, C.arabica, C.liberica e C.canephora com base na LP-D podem ser agrupadas em relação às espécies C.dewevrei e C.eugenioides. A análise das reações com o

extrator borato, quando comparadas, sugerem que com base na LP-A, pode-se separar a espécie C.arabica em relação às demais espécies estudadas. Com relação à LP-B, podemos observar que C.arabica, C.congensis, C.dewevrei e C.eugenioides são comuns para essa linha de precipitação, com exceção de C.liberica e C.canephora. Se analisarmos as espécies com base na LP-C, observamos que essa linha de precipitação é comum para todas as espécies estudadas. Pela LP-D, todas as espécies podem ser agrupadas (com exceção de C.dewevrei e C.liberica). Os resultados obtidos com o extrator NaCl-EtSH, indicaram que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. De acordo com a LP-B, as espécies C.arabica, C.canephora e C.congensis podem ser agrupadas em relação às demais espécies estudadas. Com relação à LP-C, essa linha de precipitação somente não é comum à C.eugenioides. Pela análise da LP-D, essa mesma espécie, se distingue das demais, pela presença dessa linha de precipitação.

De modo geral, as relações serológicas observadas entre os antígenos de sementes das espécies C.arabica, C.canephora, C.congensis, C.dewevrei, C.eugenioides e C.liberica, sugerem que do ponto de vista do extrator água, atribuindo-se valores de porcentagem às linhas de precipitação observadas, há uma maior aproximação de C.eugenioides com C.arabica. Observou-se que as demais espécies estudadas, quando analisadas, são menos relacionadas serologicamente.

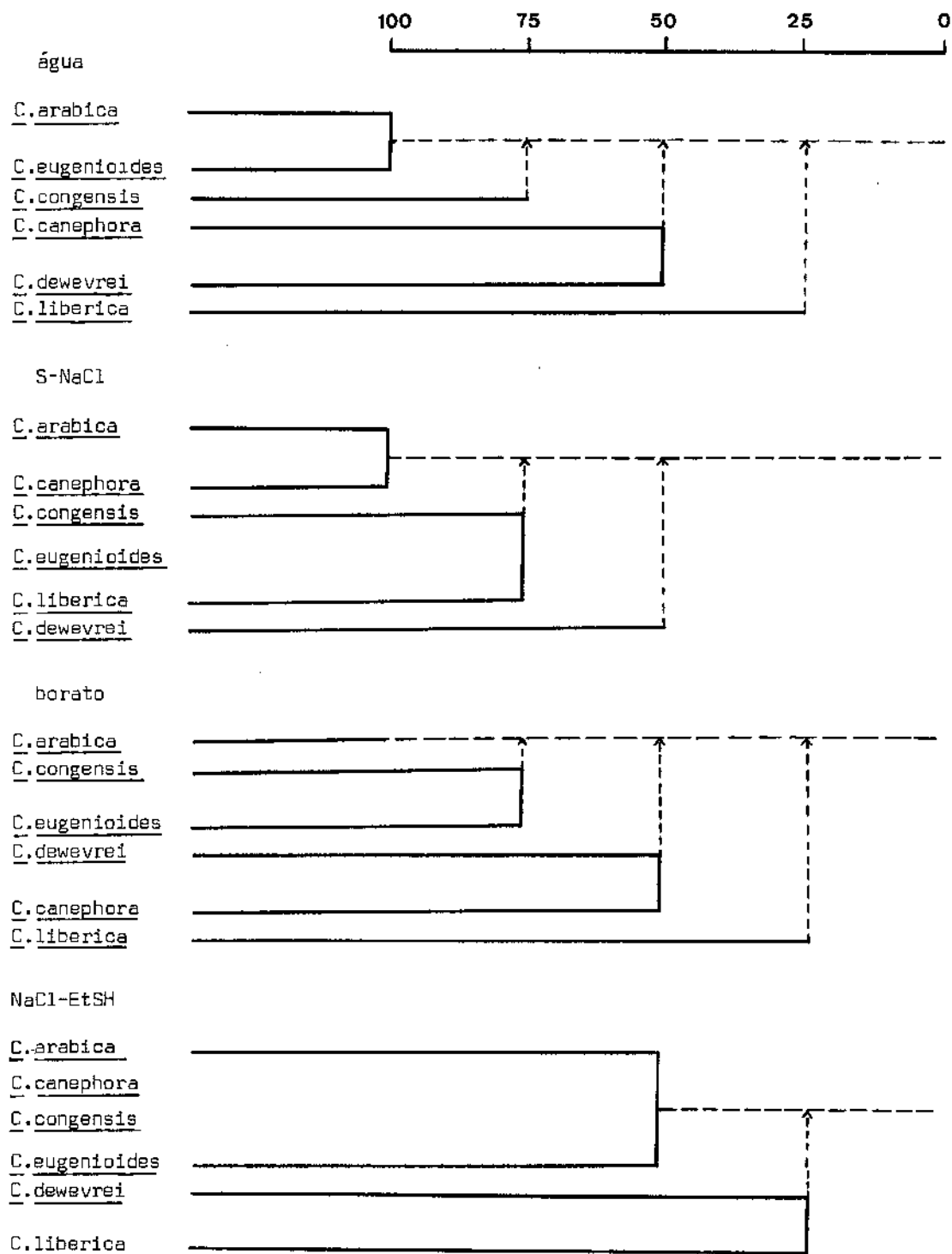
Quando se analisa o extrator S-NaCl, os resultados mostram que não se verifica diferenças significativas entre C.congensis, C.eugenioides e C.liberica, sendo que C.dewevrei parece estar mais próxima de C.arabica. Observou-se que C.canephora se mostra bastante relacionada a esta espécie.

Do ponto de vista do extrator borato, os resultados sugerem que

C.congensis e C.eugenioides, são mais próximas a C.arabica, sendo em seguida as espécies C.canephora e C.dewevrei as mais relacionadas a essa espécie. Observou-se que a espécie C.liberica é menos relacionada serologicamente com a C.arabica quando comparada às demais espécies.

Os dados obtidos nas reações com o extrator NaCl-EtSH, demonstraram que as espécies C.canephora, C.congensis e C.eugenioides se mostraram mais próximas de C.arabica, verificando-se serem mais distantes dessa espécie, quando comparadas às espécies C.dewevrei e C.liberica.

Os dados obtidos nas reações com AS-C.a.A.Mix(FD)161 mostraram que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Com base na LP-B, os resultados obtidos com o extrator água indicam que todas as espécies estudadas (com exceção de C.dewevrei) podem ser agrupadas. Pela análise da LP-C, pode-se verificar que essa linha é comum à todas as espécies estudadas. As espécies C.arabica, C.congensis e C.eugenioides, com base na LP-D, apresentam identidade, quando comparadas, em relação às outras espécies, C.dewevrei, C.canephora e C.liberica. Do ponto de vista do extrator S-NaCl, os resultados demonstraram que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Com base na LP-B as espécies C.arabica, C.dewevrei e C.eugenioides podem ser agrupadas em relação às demais espécies. Com relação à LP-C, podemos verificar que todas as espécies analisadas apresentaram identidade comum em relação à essa linha de precipitação. Pela presença da LP-D em C.arabica, C.congensis e C.eugenioides, essas espécies se diferenciam das demais estudadas. Com relação ao extrator borato, os dados obtidos indicam que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Com base na LP-B, pode-se agrupar as espécies C.arabica, C.canephora, C.dewevrei, C.eugenioides e C.con



Dendrograma indicando grupos de porcentagem de similaridade para dados de antígenos de sementes de 6 "taxa" de *Coffea* com os diversos extratores usados.

gensis de C.liberica. Pela análise da LP-C, todas as espécies estudadas, quando comparadas apresentam identidade. Em relação à LP-D, as espécies C.arabica, C.congensis e C.eugenioi-des, são comuns para essa linha de precipitação, quando comparadas às demais espécies estudadas. Do ponto de vista do extrator NaCl-EtSH, observou-se que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Verificou-se a LP-B, somente em C.congensis. Com base na LP-C, todas as espécies estudadas, quando comparadas, apresentam identidade. Em relação a LP-D as espécies C.congenis e C.eugenioides podem ser agrupadas em relação às demais espécies.

As experiências efetuadas com o anti-soro AS-C.a.A.Mix(FD)161, de modo geral, indicam que do ponto de vista do extrator água, os resultados obtidos nas reações demonstraram que C.congensis e C.eugenioides estão mais próximas de C.arabica, verificando-se serem em seguida C.canephora e C.liberica, as espécies mais relacionadas serologicamente, sendo C.dewevrei, a espécie menos relacionada serologicamente.

Os resultados obtidos com o extrator S-NaCl, sugerem que a afinidade por C.arabica é maior com C.eugenioides, onde as espécies seguintes mais próximas são C.congensis e C.dewevrei, enquanto que C.liberica e C.canephora se mostram bem menos relacionadas, quando comparadas.

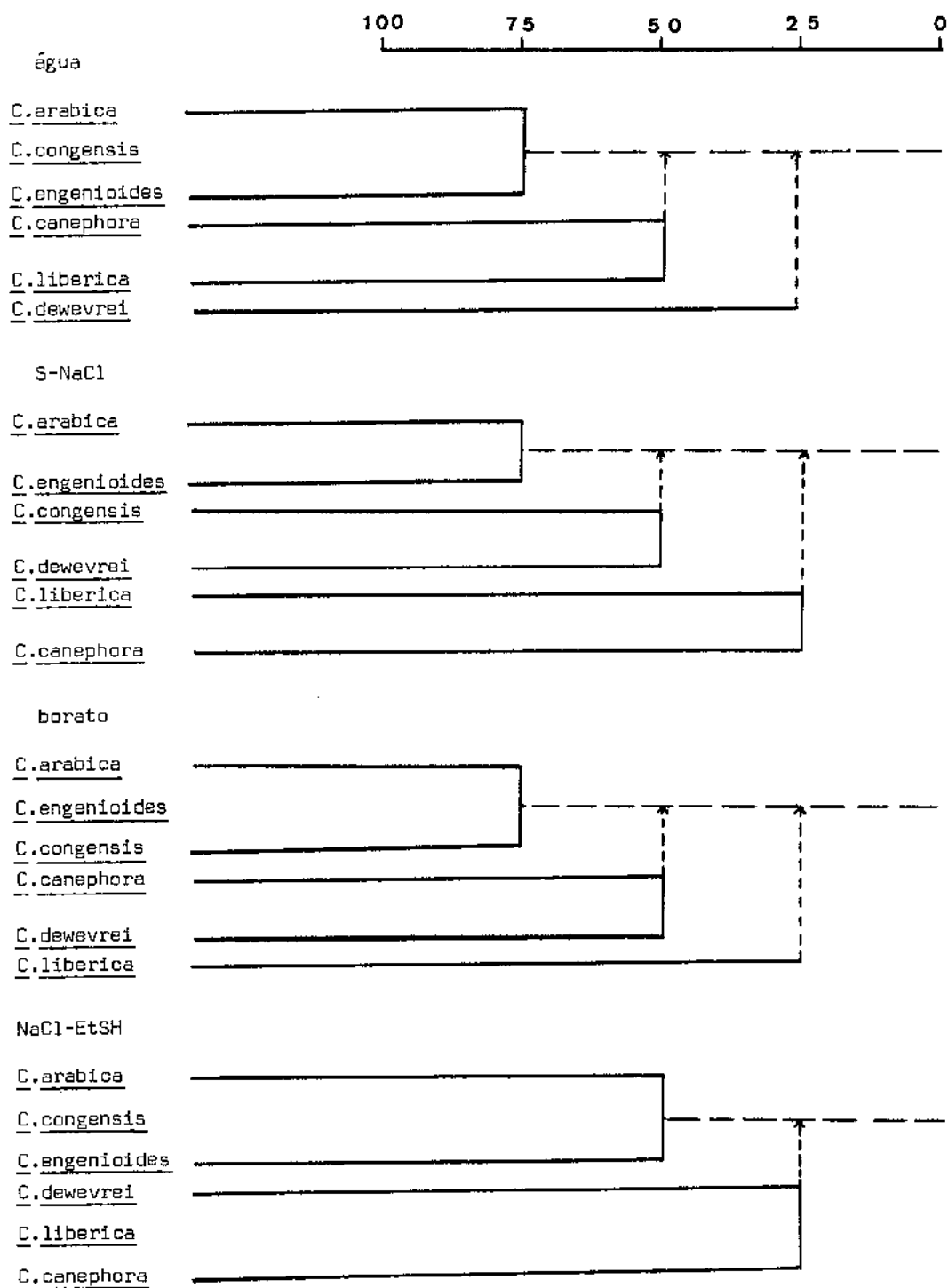
Do ponto de vista do extrator borato, os resultados obtidos demonstram que C.eugenioides e C.congensis possuem maior afinidade por C.arabica, enquanto que as espécies seguintes mais próximas foram C.canephora e C.dewevrei, sendo C.liberica a espécie menos relacionada serologicamente.

Os resultados obtidos com o extrator NaCl-EtSH, sugerem que a afinidade por C.arabica é maior com C.congensis e C.eugenioi-des, enquanto que as demais espécies se mostram bem menos rela-

cionadas. Nas reações serológicas com As-C.ca.(FD)175, verificou-se que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Com base na LP-B do ponto de vista do extrator água, observou-se que C.eugenioides se distingue das demais espécies estudadas. Em relação à LP-C, todas as espécies podem ser agrupadas, pela incidência comum dessa linha de precipitação. Pela análise da LP-D, a espécie C.arabica se diferencia das outras espécies.

Do ponto de vista do Extrator S-NaCl, os dados obtidos indicaram que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Com base na LP-B, esta somente foi verificada em C.congensis. Em relação à LP-C, todas as espécies estudadas podem ser agrupadas. Pela análise da LP-D, as espécies C.arabica, C.congensis e C.liberica apresentam identidade quando comparadas às demais espécies estudadas. Nas reações com o extrator borato, verificou-se que a LP-A não esteve presente nas reações com os extratores usados. Em relação à LP-B, a espécie C.canephora se distingue das outras espécies analisadas. Com base na LP-C esta é comum em todas as espécies. Em relação à LP-D, as espécies C.arabica e C.congensis podem ser agrupadas, em relação a C.eugenioides, C.liberica, C.dewevrei e C.canephora. Do ponto de vista do extrato NaCl-EtSH houve uma predominância total da LP-C, com exceção de C.congensis e C.eugenioides que não apresentaram reação nos testes efetuados.

O estudo das linhas de precipitação presentes nos testes serológicos de dupla difusão efetuados com anti-soros (obtidos pela injeção de FD e S-NaCl) para C.canephora, indicaram que há diferenças significativas no número de linhas de precipitação observadas em relação àsquelas obtidas com os anti-soros para C.arabica. Segundo PICKERING et al. (1966) estudos serológicos e eletroforese de disco efetuados com algumas espécies do gênero Magnolia sugerem a existência da correlação do possível au-



Dendrograma indicando grupos de porcentagem de similaridade para dados de antígenos de sementes de 6 "taxa" de *Coffea* com os diversos extratores usados.

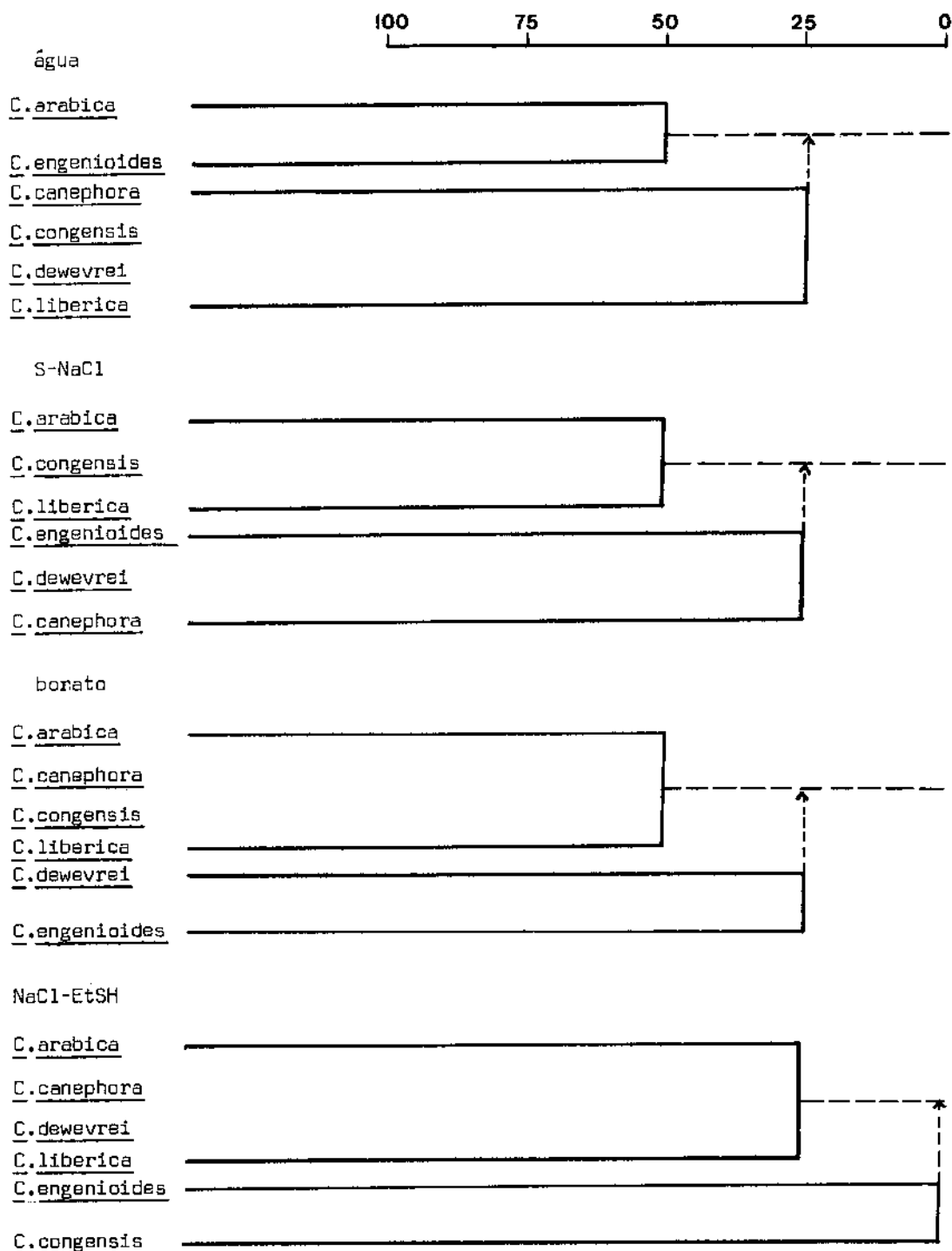
mento da complexidade imunoquímica com o aumento do nível de ploidia. É possível, dessa maneira, que sendo C.canephora diplóide ($2n=22$) e C.arabica tetraplóide ($2n=44$), ocorra um fenômeno semelhante, ou seja, correlação da possível diminuição da complexidade imunoquímica com a diminuição do nível de ploidia. Os resultados obtidos nos testes serológicos com esses anti-soros, em reação com antígenos solúveis de sementes das espécies utilizadas nas reações anteriores, demonstraram, porém, que se pode estabelecer algumas diferenças entre elas.

De modo geral, os resultados obtidos nas reações com AS-C.ca. (FD)175, do ponto de vista do extrator água, sugerem que há uma maior aproximação de C.eugenioides com C.arabica, enquanto que as demais espécies, quando analisadas, se mostraram bem menos relacionadas.

Quando se analisou o extrator S-NaCl, os resultados demonstraram que a espécie C.congensis e C.liberica se apresentam mais próximas de C.arabica, sendo as demais espécies, menos relacionadas serologicamente.

Quando se analisou o extrator borato, observou-se que as espécies C.canephora, C.congensis e C.liberica se apresentam mais próximas de C.arabica enquanto que não se verificou diferenças entre as espécies C.dewevrei e C.eugenioides que se mostraram mais distantes de C.arabica.

Do ponto de vista do extrator NaCl-EtSH, os resultados obtidos comprovam que C.dewevrei, C.liberica e C.canephora, possuem maior afinidade por C.arabica em relação às demais espécies. Os resultados obtidos com AS-C.ca.(S-NaCl)176, demonstraram que com base na LP-A, do ponto de vista do extrator água, C.arabica se distingue das demais espécies estudadas. Pela análise da LP-B, todas as espécies apresentam identidade, quando comparadas. Em



Dendrograma indicando grupos de porcentagem de similaridade para dados de antígenos de sementes de 6 "taxa" de *Coffea* com os diversos extratores usados.

relação à LP-C, o mesmo comportamento foi observado com essas espécies. Se analisarmos as espécies com base na LP-D, verificamos que podemos agrupar C.arabica, C.congensis e C.liberica. Nas reações efetuadas com o extrator S-NaCl, através da análise da LP-A, a espécie C.arabica se diferencia das outras espécies analisadas. Com base na LP-B, todas as espécies apresentaram identidade, quando comparadas. Com relação à LP-C, o mesmo comportamento foi observado. Verificando-se a LP-D, consegue-se distinguir a espécie C.arabica e C.liberica das demais espécies estudadas. Para o extrator borato, analisando-se a LP-A, a espécie C.congensis se diferencia das outras espécies. Com base na LP-B, todas as espécies estudadas (com exceção de C.canephora) podem ser agrupadas. Pela análise da LP-C, observa-se que esta predominou em todas as espécies, quando comparadas. Com base na LP-D, as espécies C.arabica, C.canephora e C.congensis podem ser agrupadas em relação às espécies C.dewevrei, C.liberica e C.eugenioides. Do ponto de vista do extrator NaCl-EtSH, houve predominância da LP-C, com exceção de C.congensis que não apresentou reação.

Os resultados obtidos nos testes serológicos com o anti-soro AS.C.ca.(S-NaCl)176, de modo geral, sugerem que as espécies C.congensis e C.liberica possuem uma afinidade maior por C.arabica, quando comparadas em relação às outras espécies, do ponto de vista do extrator água, verificando-se, quando analisadas, que C.canephora, C.dewevrei e C.eugenioides se mostram menos afins serologicamente.

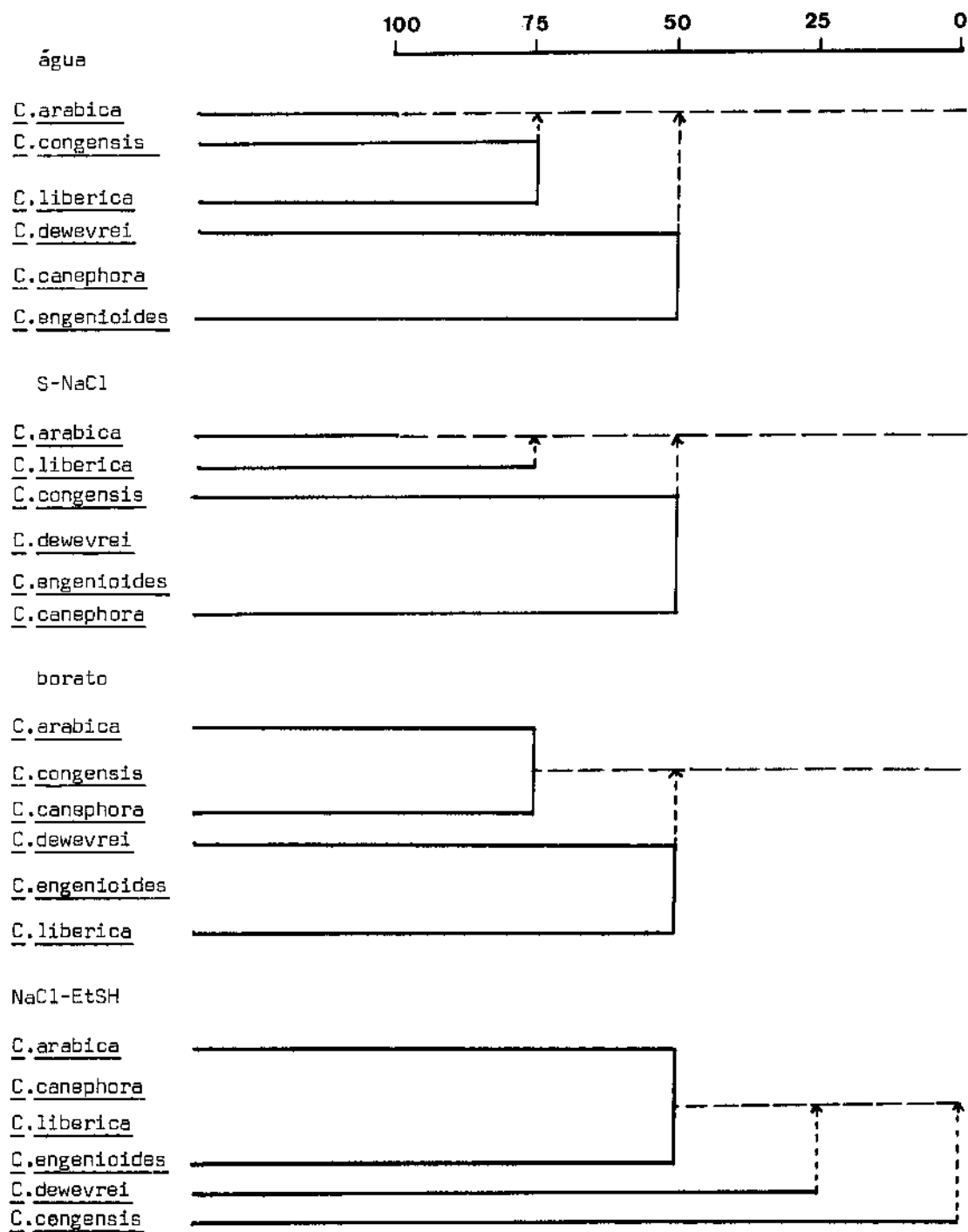
Nas reações com o extrator S-NaCl, pode-se verificar que C.liberica possui maior afinidade por C.arabica, enquanto que as espécies C.canephora, C.congensis, C.dewevrei e C.eugenioides, se mostraram igualmente próximas da espécie C.arabica, porém, menos relacionadas.

Observou-se que, do ponto de vista do extrator borato, a espécie C.congensis e C.canephora se mostram mais próximas serologicamente de C.arabica em relação às demais espécies estudadas verificando-se serem mais distantes dessa espécie, quando comparadas às espécies C.dewevrei, C.eugenioides e C.liberica.

Em relação ao extrator NaCl-EtSH, os resultados obtidos sugerem que as espécies C.canephora, C.eugenioides e C.liberica se mostram mais próximos de C.arabica, enquanto que (em ordem decrescente) as espécies C.dewevrei e C.congensis se apresentam mais distantes. De modo geral, os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão com anti-soros para C.arabica e C.canephora em reação com os antígenos obtidos por tratamentos diversos das espécies consideradas como aquelas que possivelmente teriam dado origem à C.arabica, parecem indicar uma maior aproximação das espécies C.congensis e C.eugenioides e em menor grau C.canephora com C.arabica, quando comparadas. Observa-se que C.liberica e C.dewevrei parecem ser menos relacionadas serologicamente.

Os resultados obtidos nas análises serológicas indicam que a maior afinidade por C.arabica está entre C.eugenioides e C.congensis. Estes resultados, não concordam também com as observações feitas por LONGO, (1972) cujos resultados obtidos mostraram que C.arabica tem maior afinidade por C.liberica. Concordam, porém, em parte, com as observações feitas por essa mesma autora, com relação à grande afinidade de C.arabica também por C.canephora.

Do ponto de vista serológico, os resultados sugerem que C.eugenioides e C.congensis ou C.canephora (secundariamente) possam estar envolvidas na origem de C.arabica. Esses resultados, parecem confirmar, de certo modo as observações feitas por KRUG & CARVALHO (1951) e CRAMER (1957) os quais consideram a pos-



Dendrograma indicando grupos de porcentagem de similaridade para dados de antígenos de sementes de 6 "taxa" de *Coffea* com os diversos extratores usados.

sibilidade de C.canephora e C.eugenioides estarem relacionadas com C.arabica, baseados na distribuição geográfica e em semelhanças morfológicas de algumas variedades de C.eugenioides com alguns mutantes de C.arabica. THOMAS (1944) refere-se à presença dessas duas espécies diplóides numa mesma área, em Uganda, onde poderiam ter-se cruzado e dado origem à C.arabica. Por outro lado, esses mesmos resultados não concordam com os obtidos por LONGO (1972) os quais indicaram que C.congensis não deve ter participado da formação de C.arabica. Parece razoável supor, no entanto, que C.congensis tenha realmente participado na origem de C.arabica. Essa espécie, segundo a maioria dos pesquisadores de café, é nativa da Etiópia, havendo uma concordância geral quanto ao fato de aí existir grande variabilidade de formas dessa espécie. Como as espécies diplóides cujas distribuições geográficas mais se aproximam desse país são C.canephora, C.congensis, C.liberica e C.eugenioides, essas espécies tem sido consideradas como possíveis ancestrais de C.arabica, portanto, indicadas como aquelas que teriam dado origem a C.arabica.

Os estudos realizados no presente trabalho, parecem confirmar plenamente, observações feitas por CRAMER (1957) onde discute que também C.congensis apresenta formas semelhantes à C.arabica e que esta poderia ter-se originado da hibridização natural de C.congensis e C.eugenioides com posterior duplicação dos cromossomos e diferenciação. CARVALHO & MÔNACO (1968), relatam que poderia ter ocorrido cruzamentos de C.eugenioides com as outras duas espécies e através da poliploidia teria sido obtida razoável fertilidade e consequente preservação das novas combinações por introgressão entre tetraplóides e diplóides. Estes mesmos autores relatam também que foi possível a obtenção de híbridos relativamente férteis, resultados das hibridações artificiais entre C.canephora e C.eugenioides.

Os resultados apresentados neste trabalho, sugerem que secundariamente as espécies C.liberica e C.dewevrei estariam relacio-

nadas às origens de C.arabica cuja possibilidade parece não estar descartada, levando-se em conta que FERNIE (1966) reconta que Daughy obteve um híbrido entre C.dewevrei cv. Excelça e C.eugenioides com grande semelhança com C.arabica e CARVALHO & MÔNACO (1968) obtiveram grande êxito nessa hibridação. NARASINHASWANY & WISHVESHWARA (1961), relatam que numa população do híbrido C.liberica X C.eugenioides encontraram uma planta com mixoploidia, na qual o ramo tetraplóide tinha surpreendente semelhança morfológica com C.arabica. Baseados nesse fato, sugerem que essas espécies poderiam ter dado origem a C.arabica. Segundo CARVALHO & MÔNACO (1968), hibridações artificiais entre C.liberica e C.eugenioides deram resultados satisfatórios.

O conjunto de dados aqui apresentados, indica que o emprego de técnicas serológicas pode contribuir para o estudo de relações de afinidades filogenéticas aplicáveis ao gênero Coffea. Os resultados obtidos abrem possibilidades de novas pesquisas através do estudo de um maior número de espécies, variedades e cultivares, no sentido de ampliar um conhecimento mais preciso das relações entre as espécies.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. Testes serológicos comparativos, feitos com anti-soros obtidos pela injeção de antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) e de farinha delipidificada ultrafina (FD) de C.arabica e C.canephora, demonstraram serem sensíveis em detectar diferenças entre as espécies de Coffea analisadas.
2. Os resultados obtidos nas reações serológicas com os anti-soros para C.arabica e C.canephora indicaram que, após uma única injeção de antígeno, é possível detectar reações específicas.
3. Os testes serológicos efetuados com os anti-soros obtidos em reação com os antígenos solúveis em água, S-NaCl, borato e 2-mercaptoetanol, indicaram que há diferenças qualitativas nas reações em relação às linhas de precipitação obtidas.
4. As reações serológicas efetuadas com os antígenos obtidos pela extração em água, S-NaCl, borato e 2-mercaptoetanol, demonstraram que este último se mostra muito pouco adequado pa

ra aplicação em estudos de relações de afinidade serológica enquanto o extrator S-NaCl parece ser mais adequado.

5. De modo geral, os estudos de relações de afinidade serológica efetuados entre as espécies de Coffea analisadas demonstraram que as espécies C.arabica apresentam maior afinidade por C.congensis e C.eugenioides e depois por C.canephora.
6. Os resultados deste trabalho permitem sugerir que as espécies C.eugenioides e C.congensis apresentam maiores possibilidades de ter participado da formação de C.arabica.
7. A determinação das afinidades entre as espécies indicadas pela análise serológica, de modo geral, confirmou observações realizadas do ponto de vista genético, citogenético e fitoquímico.
8. A análise serológica provou ser um método de valor complementar em estudos filogenéticos e taxonômicos em Coffea.

7. RESUMO

Na tentativa de estabelecer relações de afinidade serológica entre espécies de Coffea, anti-soros obtidos para C.arabica e C.canephora, foram utilizados nas reações serológicas em reação com antígenos solúveis de sementes das espécies, variedades e cultivares.

Estudos serológicos comparativos feitos com anti-soros para C.arabica e C.canephora, obtidos pela injeção de substâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) e da farinha delipificada ultrafina (FD) em reação com antígenos solúveis em água, cloreto de sódio 2,5%, tampão borato e 2-mercaptoetanol indicaram que a análise das linhas de precipitação entre as espécies testadas, para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica, dependem do tipo de extrator utilizado na extração das substâncias antigênicas das sementes.

Os testes efetuados com anti-soros obtidos pela injeção de S-NaCl e FD de C.arabica e C.canephora indicaram ser sensíveis em detectar diferenças entre os extratores utilizados. Foi possível estabelecer relações de afinidade serológica entre as espécies estudadas. Anti-soros para C.canephora, em comparação, de

monstraram ser menos adequados para estabelecer diferenças detectáveis nas reações com os antígenos obtidos de sementes das espécies estudadas.

Procurou-se identificar as linhas de precipitação obtidas nos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar. Foi possível verificar, de modo geral, que as análises das relações de afinidade serológica entre as espécies de Coffea analisadas, mostram que a espécie C.arabica apresenta maior afinidade por C.congensis e C.eugenioides e depois por C.canephora. Estes resultados sugerem que as espécies C.eugenioides e C.congensis apresentam maiores possibilidades de terem participado da formação de C.arabica. Essas observações confirmam resultados obtidos do ponto de vista genético, citogenético e fitoquímico, indicando que estudos serológicos mostram ser de valor complementar em estudos filogenéticos e para auxiliar a resolver problemas taxonômicos do gênero Coffea.

8. SUMMARY

In an attempt to establish serological relationships between Coffea species, antisera obtained for C.arabica and C.canephora were utilized in serological reactions with soluble seed antigens from various species, varieties and cultivars.

Comparative serological studies were made with antisera obtained from rabbits immunized with soluble substances in 2,5% NaCl (S-NaCl) and the delipidified seed meal (FD) obtained from mature seeds of C.arabica and C.canephora in suspension with water, NaCl 2,5%, borate buffer and 2-mercaptoethanol.

The precipitin line analysis between the species tested for the application in serological affinity relationship studies depended on the type of extractor utilized in the extraction of antigenic substances of seeds.

Tests carried out with antisera obtained from the injections of S-NaCl and FD from C.arabica and C.canephora showed that with these antisera it was possible to detect differences in the extractors utilized. Besides, it was possible to establish serological relationships within the species studied. Antiserum obtained for C.canephora in comparison proved to be less

adequate in establishing detectable differences in the reactions with the antigens obtained from seed meal of the species studied.

The results of cross serological reactions observed in agar double diffusion tests allowed the observations of typical precipitations lines. It was possible to determine, in general terms, by the analysis of the relationships of serological affinity between the Coffea species analyzed that C.arabica had more affinity for C.congensis and C.eugenioides and then for C.canephora.

These results suggest that C.eugenioides and C.congensis are more closely related to C.arabica. These observations confirm previous genetic, cytogenetic and phytochemical results.

The serological studies proved to be of complementary value in phytogenetical studies and to help to solve taxonomic problems in the genus Coffea.

9. LITERATURA CITADA

- BOZZINI, A.; P. CANTAGALLI; S.E. PIAZZI and SANDRA SORDI - 1970
An Immunochemical Approach to species Relationship in
Triticum and some relates species. Theoretical and Applied
Genetics, 40:300-304.
- CARVALHO, A. e L.C. MÔNACO - 1967 - Genetic Relationships of
selected Coffea species. Ciên.Cult., 1:151-165.
- CARVALHO, A. & L.C. MÔNACO - 1968 - Relaciones geneticas de es
pecies seleccionadas de Coffea. Cafe (Peru) 9:1-19.
- CHERRY, J.P.; F.R.H. KATTERMAN & J.E. ENDRIZZI - 1969 - Compa-
rative studies of seed proteins of species of Gossypium by
gel electrophoresis. Evolution, 24:431-447.
- CLARKSON, R.B. and D.E. FAIRBROTHERS - 1970 - A serological and
electrophoretic investigation of eastern North American
Abies (Pinaceae). Taxon, 19(5):720-727.
- CRAMER, P.J.S. - 1957 - Review of literature of Coffee research
in Indonesia. Interamerican Institute of Agricultural Sciences.
Turrialba (Costa Rica), 262 p. (Miscellaneous public, nº 15).

- FAIRBROTHERS, D.E. - 1966 - Serological correspondence of genus Corokia with taxa of Cornaceae, Nyssaceae and Garryaceae. (Abstracts) Amer.Jour.Bot., 53:638.
- FAIRBROTHERS, D.E. - 1968 - Chemosystematics with Emphasis on Systematic serology. In: Heywood, V.H. ed. Modern methods in plant taxonomy. London, Academic Press, pp. 141-174.
- FAIRBROTHERS, D.E. - 1968 - Comparisons of proteins obtained from diverse plant organs for chemosystematic research. Bioch., 6:95-103.
- FAIRBROTHERS, D.E. - 1971 - The use of proteins data in evaluating plant relationships and differentiation. In: Factors regulating the immune response. First Romanian Academy of Medical Science. Bucharest, Romania (Abstracts) 121-123.
- FAIRBROTHERS, D.E. and MARION A. JOHNSON - 1964 - Comparative serological studies within the families Cornaceae (Dogwood) and Nyssaceae (Sour. Gum). In: Leone, Charles A. (ed) Taxon. Biochem. and Serol. Ronald Press, New York.
- FERNIE, L.M. - 1966 - Impressions on Coffee in Ethiopia. Kenya Coffee, 31:115-121.
- FUKS, A.M. and EILER F. TOROS - 1966 - Componentes antigênicos de Coffea. Diferenciação serológica entre espécies e variedades de sementes de café. Anais de Microbiologia, 14:149-176.
- GHETIE, V. - 1966a - Evolution of protein characters in ontogenesis of higher plants. In: Z.Landa (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc.Sym. Mutational Process Topic IV, Prague, Czechoslovakia, pp. 489-503.

- GHEITIE, V. - 1966b - A hypothesis on mechanism of reserve protein hydrolysis during seed germination. *Revue Roum. Bioch.*, 3:353-361.
- HILLEBRAND, G.R. and D.E. FAIRBROTHERS - 1966 - Phytoserological systematics studies of selected genera of the Rubiales and Umbellales. (Abstracts) *Amer. Jour. Bot.*, 53:638.
- HILLEBRAND, G.R. and D.E. FAIRBROTHERS - 1969 - A serological investigation of intrageneric relationships in Viburnum (Caprifoliaceae). *Bull. Torrey Bot. Club*, 96:556-567.
- HÖFLING, J.F. - 1975 - Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de C. arabica L. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas. 45 pp.
- JOHNSON, M.A. and D.E. FAIRBROTHERS - 1964 - Comparative phytoserological studies as an aid in evaluating relationships. 10th Internat. Bot. Congr. (Abstracts) pp. 145-146.
- KAPALA, A.; I. WIATROWSZAK and J. PRZBYLSKA - 1975 - Comparative serological studies in Barley Hordeum vulgare L.s.l. *Gen. Polonica*, 16(1):53-60.
- KRUG, C.A. & A. CARVALHO - 1951 - The genetics of Coffea. *Advanc. Genet.*, 4:127-158.
- KLOSOVA, E. - 1966 - Interrelations among several species of the genus Phaseolus. Studied by immunochemical methods. In: Z. Land (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc. Sym. Mutational Process. Topic IV; Evolution of Protein characters. Czechoslovak Acad. Sci. Prague, Czechoslovakia, pp. 485-487.

- KLOZ, J. - 1960 - The quantitative ring (layering) precipitation reaction. Folia Biol., Praha, 6:319-325.
- KLOZ, J.; E. KLOSOVA and V. TURKOVA - 1966a - Chemotaxonomy and genesis of protein characters with special reference to the genus Phaseolus. Preslia, 38:229-236.
- KLOZ, J.; E. KLOSOVA and V. TURKOVA - 1966b - Proteins characters and relationship between Phaseolus vulgaris ssp. Aborigineus. Burk and related taxa of the genus Phaseolus. Biologia, 8:187-196.
- LEE, D.E. and D.E. FAIRBROTHERS - 1967 - A serological and disc electrophoretic study of North American Typha. Amer. Jour.Bot., 54:660.
- LEE, D.E. and D.E. FAIRBROTHERS - 1969 - A serological and disc electrophoretic study of North American Typha. Brittonia, 21(3):227-243.
- LEE, D.E. and D.E. FAIRBROTHERS - 1972 - Taxonomic placement of the Thyphales within the Monocotyledons: Preliminary serological investigation. Taxon, 21(1):39-44.
- LISSITZIN, M.A. und N.S. ALEXANDROWSKAJA - 1935 - Über die chemische Zusammensetzung der Störprotamine. Hoppe Seyler Zsch.F.phy.chemie., 238:54-58.
- LONGO, CATALINA R.L. - 1972 - Estudo dos pigmentos flavonóides e sua contribuição à Filogenia do gênero Coffea. Tese de Doutoramento, ESALQ, USP, Pí acicaba, 91 pp.
- MAGMUS, W. - 1908 - Weitere Ergebnisse der Serodagnostik für di theoretische und angewandte Botanik. Ber.Deutsche Bot.Ges., 26:532-539.

- MEDINA, DIXIER M. - 1972 - Caracterização de híbridos interespecíficos de Coffea. Tese de Doutorado, ESALQ, USP, Piracicaba, 111 pp.
- MEZ, C. - 1922 - Anleitung zu Sero-diagnostischen Untersuchungen für Botaniker. Botanischer Archiv, 1:177-200.
- MEZ, C. - 1926 - Die Bedeutung der Serodiagnostik für die Stammesgeschichtliche Forschung. Botanisches Archiv, 16: 1-23.
- MORITZ, D. - 1966 - Revealing Systematical distribution of protein characters by serological methods. In: Z. Land (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing of Protein characters. Czechoslovak Acad.Sci.Prague, Czechoslovakia, pp. 443-457.
- NARASINHASWANY, R.L. - 1962 - Algunas ideas sobre el origen del Coffea arabica L. Café Servicios Técnicos de café y Cacao. Turrialba (Costa Rica) 4:1-28
- NARASINHASWANY, R.L. and S. VISHVESHWARA - 1961 - Report on hybrids between some diploid species of Coffea L. Indian Coffee, 25:104-109.
- OLIVEIRA, A.R. - 1975 - Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. Summ. Phytopath., 1(1):61-64.
- OLIVEIRA, A.R.; R.G. PAYNE and D.E. FAIRBROTHERS - 1972 - Disc electrophoretic investigation of malate dehydrogenase (MDH) isoenzymes and general protein (GP) extracted from cotyledons of two Coffea species. Brittonia (Abstracts) 24:124.

- OLIVEIRA, A.R.; R.G. PAYNE and D.E. FAIRBROTHERS - 197 - Disc electrophoretic investigation of Coffea arabica and Coffea canephora - general protein (GP) and malate dehydrogenase (MDH) of cotyledonary leaves. Acta.Soc.Bot.Poloniae, 42(2) 301-308.
- OUCHTERLONY, O. - 1949 - Antigen-antibody reactions in gels. Ark.Kemi.Geol., 266:14.
- OUCHTERLONY, O. - 1958 - Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: Progress in Allergy, S. Karger, Basel, New York, 5:1-78.
- OUCHTERLONY, O. - 1962 - Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: Progress in Allergy, S. Karger, Basel, New York, 6:30-154.
- PAYNE, R.C. and D.E. FAIRBROTHERS - 1972 - investigation of pollen proteins from natural populations of Betula populifolia. (Abstracts) Brittonia, 24:117-130.
- PAYNE, R.C.; A.R. OLIVEIRA and D.E. FAIRBROTHERS - 1973 - Disc-electrophoretic investigation of Coffea arabica seed proteins soluble in four extraction systems. Rev.Roum.Biochem., 10 55-59.
- PAYNE, R.C.; A.R. OLIVEIRA and D.E. FAIRBROTHERS - 1973 - Disc-electrophoretic investigation of Coffea arabica and Coffea canephora: general protein and malate dehydrogenase of mature seeds. Biochem.Syst., 1:59-61.
- PETERSEN, R.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1967 - Investigation of the fern genus Osmunda employing serological and disc-electrophoretic techniques. (Abstracts) Amer.Jour.Bot., 54:660.

- PETERSEN, R.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1971 - North American Osmunda species. A serologic and disc-electrophoretic analysis of spore proteins. Am.Midland Naturalist, 85(2): 437-457.
- PICKERING, R.L. - 1972 - Comparative proteins studies of Taenidia and Pseudotaenidia (Umbelliferae). (Abstracts) Brittonia, 24:117-130.
- PICKERING, J.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1966 - Taxonomic investigation of Magnolia denudata, M.liliflora, M x soulangiana e M.soulangiana Lenner using serological and acrylamide gel electrophoretic methods. (Abstracts) Amer.Jour.Bot., 53:636.
- PICKERING, J.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1967 - Taxonomic investigation of selected Umbelliferae using serological and acrylamide gel electrophoretic methods. Amer.Jour. Bot., 54:660.
- PICKERING, J.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1970 - A serological comparison of Umbelliferae subfamilies. Amer.Jour.Bot. 57(8):988-992.
- PICKERING, J.L. and D.E. FAIRBROTHERS - 1971 - The use of serological data in a comparison of tribes in the Apioideae, 64: 315-324.
- SILBERSCHMIDT, K. - 1936 - A importância da espécie no sistema das plantas e a tentativa de sua delimitação por novos métodos. Arch.Inst.Biol., 7(3):33-50.
- STEWART, F.C. and J.T. BARBER - 1964 - The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants. Ann.New York Acad.Sci., 121:525-531.

THOMAS, A.S. - 1944 - The wild coffees of Uganda. Emp.Journ.
Exp.Agric., 12:1-12.

TUCKER, W.G. - 1969 - Serotaxonomy of the Solanaceae: A Preliminary. Survey Ann.Bot., 33:1-23.

TUCKER, A.O. and D.E. FAIRBROTHERS - 1969 - Extractions of leaf proteins of Mentha (Labiataeae) for disc-electrophoresis. Phytoch., 9:1399-1403.