

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS POLISPÓRICOS DE *Crinipellis  
perniciosa* (Stahel) Singer**

**LUIZ FERNANDO ROMANHOLO FERREIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia e  
Biotecnologia.

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo – Brasil

Junho - 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS POLISPÓRICOS DE *Crinipellis  
perniciosa* (Stahel) Singer**

**LUIZ FERNANDO ROMANHOLO FERREIRA**

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia e  
Biotecnologia.

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo – Brasil

Junho - 2005

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ferreira, Luiz Fernando Romanholo

Diversidade genética de isolados polispóricos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel)

Singer / Luiz Fernando Romanholo Ferreira. - - Piracicaba, 2005.

59 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

Bibliografia.

1. Diversidade genética 2. Fungo fitopatogênico 3. Relação hospedeiro-patogênico  
4. Resistência genética vegetal 5. Vasoura-de-bruxa-de-cacaueiro I. Título

CDD 633.74

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Á Deus, pois sem ele, nada seríamos e  
nada conseguiríamos, tornando-nos  
capazes e fortes para enfrentarmos  
todos os desafios da vida.

### **AGRADEÇO**

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional,  
incentivo e amor em todos os momentos da  
minha vida.

Aos meus amigos(as)

### **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À ESALQ – USP pelo suporte como instituição e todos os apoios fornecidos e, a CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares, pela orientação e oportunidade.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes pelo apoio, incentivo, amizade e, acima de tudo pelos enriquecedores ensinamentos e pelo despertar a pesquisa.

À Dra. Keila Maria Roncato Duarte pelo apoio e auxílio na elaboração deste trabalho, bem como todos os outros pertinentes; pelos ensinamentos e conselhos durante todo o decorrer do mestrado.

Ao Ms Gildemberg Amorim Leal Júnior pelos diversos ensinamentos na colaboração da elaboração desta tese e pelas diversas dicas de trabalho e pela amizade.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação, pelo incentivo e ensinamentos.

À Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopes pelos ensinamentos básicos, pelo incentivo, amizade e modelo de profissionalismo e a todos da UFAL, onde me formei. Aos amigos que conquistei durante a graduação e aos professores pelo incentivo, conhecimento e por acreditarem no potencial dos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho pelas histórias de vida e as diversas dicas de trabalho.

Aos amigos de laboratório de Genética de Leveduras, Simone Bertini Braga, Alessandro Riffel, Marcus Venicius (Polé), Alessandra Rabalho, Carmo A. L. Poloni, e aos estagiários (as) do laboratório, obrigado pelas confraternizações e churrascos e, por compartilharem conhecimento, alegria e o espaço de trabalho, sem esquecer, os conselhos indispensáveis. Em especial Rodrigo S.Carvalho, Daniele T. Del Rio e Ana

Maria B. Giacomelli e Priscila por todo apoio, carinho e paciência durante a elaboração deste trabalho e pelos momentos de amizade.

Aos colegas Funcionários do Departamento de Genética, Fernando, Valdir obrigado pela atenção. E em especial às amigas Sarah e Giovana, que sempre tiveram grande paciência, respeito e companheirismo.

Aos grandes e eternos amigos(as) Renato Nery Soriano, Ana Paula Teixeira, Rosa Elvira, Vânia Teixeira, Carlos Henrique, Lígia, Cícero, Paulo e Daniele, que mesmo estando tão distantes, torceram por mim durante todos os momentos e me apoiaram nos momentos mais difíceis que passei, pela amizade incondicional, companheirismo. Muito obrigado!

Aos amigos queridos conquistados ao longo destes dois anos e meio, em especial, ao Maurício, Karina, Priscila, Fernanda, Leandro, Luana, Pablo pelas festas, companhia e por estarem sempre comigo. E a todos aqueles que não foram nominalmente citados, mas estão presentes de alguma forma neste trabalho, obrigado pelo apoio.

E...

Aos familiares e a todos os momentos que deixei de viver com vocês, ao amor que irrestritamente me dedicam e, as suas orações e a Fé. Por acreditarem no meu potencial e por tudo que não consigo demonstrar através de palavras, mas que com certeza formam-se poemas a partir do coração.

A Aline, que sempre esteve presente do meu lado, a partir do momento que a conheci, que enfrentou muitos obstáculos pela vida e ao qual venho crescendo junto dia após dia, que enfrentou meus momentos de impaciência, mas que sempre esteve junto a mim, agradeço a ti e a tua família por ter me acolhido tão bem, fazendo com que me sentisse parte desta.

Um agradecimento que não pode faltar em nada que faço durante toda a minha vida, que vai sendo galgada pouco a pouco, se Deus quiser, por um futuro melhor. Aos meus irmãos Fabiano Romanholo Ferreira, Gustavo Emílio Romanholo Ferreira e Túlio Henrique Romanholo Ferreira, os quais tenho tanto a seguir como referencial de vida e os quais passamos momentos muito divertidos durante todo o nosso desenvolvimento

juntos e também graças ao apoio moral e também financeiro. Serei eternamente grato por toda a minha vida...e é claro que jamais esqueceria dos meu Pais, Ana Maria Romanholo Ferreira e Manoel Henrique Ferreira Neto, que são exemplos de vida, caráter, humildade, amor, fé, com dignidade e educação. Sei que mesmo não conseguindo dizer o que realmente sinto por vocês, posso aqui expressar todo meu amor a todos vocês. Eu amo muito vocês...

Por toda a minha vida eu sei que vou amá-los...



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4 RESULTADOS.....	21
5 CONCLUSÕES.....	36
ANEXOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Etapas de imunização e sangria dos camundongos.....	19
2 Reações de compatibilidade e incompatibilidade entre diferentes isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> .....	23
3 Análise de agrupamento (dendrograma) de nove isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> de <i>Theobroma cacao</i> L. da região amazônica com base na incompatibilidade somática.....	24
4 Análise de agrupamento (dendrograma) de quatorze isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> de diversos hospedeiros e regiões, com base na incompatibilidade somática.....	25
5 Análise de crescimento de nove isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> em placa de petri contendo farelo de trigo e dextrose.....	29
6 Perfil protéico de 11 amostras de <i>Crinipellis pernicioso</i> de diferentes hospedeiros e regiões.....	30
7 Perfil protéico das bandas produzidas pelo programa Kodak Digital Science 1D.....	31
8 Análise de agrupamento (dendrograma) de onze isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> de diversos hospedeiros e regiões, com base na análise de bandas através do programa NTSYS.....	31
9 Perfil protéico das amostras de <i>Crinipellis pernicioso</i> precipitadas com sulfato de amônio de Ouro Preto D'Oeste (RO) em gel de eletroforese SDS-PAGE a 15%.....	33

10	Análise dos títulos de absorvência dos três camundongos usados para imunização com proteínas extraídas do micélio liofilizado de <i>Crinipellis pernicioso</i> de Ouro Preto D'Oeste – RO (antígeno).....	34
11	Gel de SDS-PAGE 12 % corado com prata, membrana de nitrocelulose com a mesma sequência de amostras do gel SDS-PAGE sem o padrão de peso molecular corada com NBT e BCIP, emembrana corada com 4-Chloro-1-Naphthol.....	36

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Isolados de <i>Crinipellis pernicioso</i> de acordo com o hospedeiro e a região onde foi coletada.....	13

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS POLISPÓRICOS DE *Crinipellis  
perniciosa* (Stahel) Singer**

Autor: Luiz Fernando Romanholo Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

**RESUMO**

A diversidade genética de *Crinipellis perniciosa* foi avaliada quanto à capacidade adaptativa de diferentes genótipos à dispersão geográfica e à associação preferencial ou diferencial com hospedeiros. Isolados polispóricos de *C. perniciosa* provenientes de diferentes Estados brasileiros (AM, RO, MG, BA, SP, MT e PA) e diferentes hospedeiros (*Theobroma cacao* L., *Solanum cernuum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum grandiflorum* L., *Solanum* e lianas), foram analisados pelas técnicas de compatibilidade somática (SCG - Somatic Compatibility Group), através de reações de compatibilidade e/ou incompatibilidade, o uso de gel de eletroforese de proteínas totais, velocidade de crescimento, ELISA e Western Blot. Os diversos isolados foram agrupados com base em conjuntos de dados sobre suas características genéticas, identificando-se agrupamentos de acordo com a dispersão geográfica e hospedeiros de onde foram isolados. Foram construídos dois dendogramas pelo teste de compatibilidade permitindo classificar os isolados em três grupos: i) grupo formado pelos isolados de Rondônia e Pará e ii) grupo formado pelos isolados de Rondônia, Pará e Amazonas e o iii) grupo formado pelo isolado de Mato Grosso; o segundo teste separou os isolados em dois grandes grupos: i) grupo formado pelos isolados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Rondônia e ii) grupo formado pelo isolado do Pará. O dendograma criado pelo perfil

protéico permitiu agrupar os isolados em três grupos, de acordo com o hospedeiro e região de origem: (1) grupo formado pelo isolado de *Theobroma cacao* de Ouro Preto D'Oeste; (2) grupo constituído pelos isolados de *Theobroma cacao* da Bahia e os diversos isolados de Solanaceae do Estado de Minas Gerais, Bahia e São Paulo e grupo (3) formado pelo isolado de Lianas (cipós). De forma geral, conclui-se que há ampla diversidade genética entre os isolados de *C. pernicioso* provenientes das diferentes regiões brasileiras e em relação aos hospedeiros, comprovando-se haver elevada capacidade adaptativa caracterizada pela prevalência em ambientes diversos e pela disseminação a longas distâncias geográficas. Há também indicativos de que a velocidade de crescimento do fungo pode ser um dos fatores importantes para assegurar a colonização, já que é correlacionada com a dispersão geográfica, e também, para a seleção de biótipos patogênicos e para a variabilidade genética do fungo.

**GENETIC DIVERSITY OF POLISPORICS ISOLATES OF *Crinipellis pernicioso*  
(Stahel) Singer**

Autor: Luiz Fernando Romanholo Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

**SUMMARY**

The genetic diversity of *Crinipellis pernicioso* was evaluated how much to the capacity of adaptation of different genotypes to the geographic dispersion and the preferential or distinguishing association with hosts. Polisporics isolated of *C. pernicioso* proceeding from different Brazilian States (AM, RO, MG, BA, SP, MT e PA) and different hosts (*Theobroma cacao* L., *Solanum cernuum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum grandiflorum* L., *Solanum* and lianas), had been analyzed by the techniques of somatic compatibility (SCG - Somatic Compatibility Group), through reactions of compatibility and/or incompatibility, the gel use of proteins electrophoresis, speed of growth, ELISA and Western Blot. Diverse the isolated ones had been grouped on the basis of different data on its genetic characteristics, identifying to groupings in accordance with the geographic dispersion and hosts of where they had been isolated. Two dendrogramas for the compatibility test had been constructed allowing to classify the isolated ones in three groups: i) group formed by isolated of Rondônia and Pará and ii) group formed for the isolated ones of Rondônia, Pará and Amazonas and iii) group formed for the isolated one of Mato Grosso; as the test separated the isolated ones in two great groups: i) group

formed for isolated of the Bahia, the Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso and Rondônia and ii) group formed for the isolated one of Pará. The dendrograma created by the protein profile allowed to group the isolated ones in three groups, in accordance with the host and region of origin: (1) group formed for isolated of *Theobroma cacao* of Ouro Preto D'Oeste; (2) group consisting of isolated of *Theobroma cacao* of the Bahia and diverse the isolated ones of Solanaceae of the State of Minas Gerais, Bahia and São Paulo and group (3) formed by the isolated one of Liana. Of general form, it is concluded that it has ample genetic diversity enters the isolated ones of *C. pernicioso* proceeding from the different Brazilian regions and in relation to the hosts, proving to have high capacity of adaptation characterized by the prevalence in diverse environments and the dissemination the long geographic distances. It has also indicative of that the growth speed can be one of the factors important to assure the correlated settling since with the geographic dispersion, favors new biotypes, important factor for the genetic variability of fungus.



## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer é o agente causal da doença conhecida como vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.) e de outras espécies como solanáceas e de vários tipos de Lianas (cipós). Nestes hospedeiros na floresta da bacia Amazônica são de ocorrência endêmica e têm causado severa redução na produção do cacau em países produtores de cacau da América do Sul (Bolívia, Equador, Peru e Venezuela), e nas ilhas do Caribe (Trinidade, Tobago e Granada). Em maio de 1989, esse fungo foi detectado como patógeno pela primeira vez na região cacauera do sul da Bahia, principal região produtora de cacau no Brasil. As perdas provocadas pela vassoura-de-bruxa podem reduzir a produção em até 90% e no sudeste do Estado da Bahia, a produção já sofreu perdas significativas de até 75% causando a extinção de grandes áreas produtivas e remanescentes da Mata Atlântica, que foram transformadas em pastagens. O aparecimento desta doença, na principal região produtora do Brasil, trouxe para os produtores mais um motivo de preocupação face aos baixos preços do cacau nos mercados interno e externo.

O controle da vassoura-de-bruxa utiliza métodos físicos, químicos e biológicos, e preferencialmente os métodos integrados com ênfase na utilização de variedades resistentes ao patógeno, por ser um método barato, eficiente e acessível aos produtores.

É sabido que os agentes fitopatogênicos apresentam em comum características de alta variabilidade. Como resultados de variação em todos eles, são encontrados em qualquer população de patógenos muitos biótipos que diferem entre si em várias características morfológicas, fisiológicas e genéticas. Para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes demandam-se estudos sobre a taxonomia, variabilidade e especificidade do hospedeiro quanto aos diversos isolados de *Crinipellis perniciosa*.

A multiplicação de *Crinipellis pernicioso* é sexuada e isto favorece o aparecimento de variações genéticas e infecções múltiplas facilitam as trocas genéticas do patógeno dentro dos tecidos infectados do hospedeiro. A colonização de diferentes espécies de hospedeiros deve contribuir para a seleção de genótipos e conseqüente alta variabilidade.

Embora existam informações sobre a biologia de *Crinipellis pernicioso*, considera-se importante correlacionar capacidade adaptativa dos isolados em função da prevalência de biótipos genéticos ou de hospedeiros preferenciais, um aspecto da questão que vem merecendo atenção principalmente no estudo da resistência ao patógeno. Por outro lado, entendendo que o conhecimento da variabilidade deste fungo é importante para esta e outras aplicações, procurou-se neste trabalho avaliar o grau de diversidade genética entre os isolados polispóricos de *C. pernicioso* procedentes de diferentes regiões brasileiras e associados a vários hospedeiros visando identificar fatores de dispersão, de associação preferencial ou diferencial entre patógenos e hospedeiros.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O fungo *Crinipellis perniciosa* Stahel (Singer), pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomicotina, ordem Agaricales e família Tricholomataceae, que é constituída de espécies com basidiomas pileados, lignícolas, os quais são capazes de reativação após o secamento quando são umedecidos (Viana, 2001).

O fungo *C. perniciosa* é um fungo hemibiotrófico com dois tipos de micélios: em tecidos verdes, o micélio é espesso com 5-8 $\mu$ m, biotrófico ou parasítico e sem a formação de grampo de conexão, crescendo intercelularmente, enquanto que em tecidos secos (vassouras secas), o micélio é saprofítico ou necrotrófico, cresce inter e intracelularmente, sendo menos espesso (1,5-5 $\mu$ m), apresentando grampo de conexão (Niella, 2000a; Viana, 2001). Também Evans & Bastos (1979) e Evans (1980), já haviam observado que este fungo possui dois micélios distintos, que podem ser separados morfológica, fisiológica e geneticamente. O micélio monocariótico é parasítico, sem grampos de conexão e encontrado somente em tecidos vivos infectados. O micélio dicariótico é saprofítico ou necrotrófico, tem grampos de conexão e é encontrado em tecidos mortos e meio de cultura. Baseando-se nestas observações, pode-se concluir que o tubo germinativo ou promicélio, desenvolvido “in vitro” na ausência do hospedeiro, corresponde à fase monocariótica parasítica que induz à infecção e que dá origem, por anastomose, à fase dicariótica, saprofítica (Bastos, 1989). Foi observado *in vitro* por Delgado & Cook (1976) que o micélio monocariótico tem uma vida curta e entra em colapso dentro de 24 horas, enquanto o micélio secundário persiste na fase dicariótica.

Basidiósporos de *C. perniciosa* são conhecidos como os únicos propágulos infectivos deste patógeno e geralmente, a germinação dos basidiósporos se dá

rapidamente após uma hora em atmosfera saturada de umidade e se completa quatro horas depois. A disseminação do fungo *Crinipellis perniciosa* pode ser feita via basidiósporos e pelo micélio saprofítico existente no interior dos tecidos infectados do cacauero. Como os basidiósporos são sensíveis à desidratação, acredita-se ser impossível a sua disseminação a longas distâncias. Por outro lado, o micélio saprofítico do fungo sobrevive muitas vezes por vários anos, no interior de tecidos infectados, como vassouras vegetativas, frutos e folhas, que ao serem transportados indevidamente, e quando expostos aos efeitos alternados de chuva e sol, podem funcionar como disseminadores da vassoura-de-bruxa, por favorecer a frutificação do fungo (Bastos, 1990; Niella et al., 1999).

Os basidiomicetos são caracterizados por produzirem os basidiósporos externamente às estruturas que produzem esporos, as basídias, e são subdivididas em dois grandes grupos: homobasidiomicetos e heterobasidiomicetos. *C. perniciosa* pertence ao grupo dos homobasidiomicetos, por apresentar a produção de basidiósporos em basídias, na superfície de membranas, que se desenvolvem em um basidiocarpo visível. O ciclo de vida de fungos membranosos é relativamente complexo, composto de uma fase inicial da germinação do basidiósporo uninuclear, haplóide, no substrato, e produção de micélio mononuclear haplóide, que constitui a fase vegetativa do ciclo de vida. A fase sexual é marcada pela fusão de hifas (anastomose) de dois isolados compatíveis para formar um dicariótico. Após a plasmogamia, uma reunião de núcleos em uma única célula ocorre e um heterocário é formado pela migração de núcleos, através do micélio monocariótico existente. O dicário ou heterocário pode continuar a produzir aumento do micélio no substrato, antes que o primórdio do esporóforo seja iniciado. Uma vez iniciado, o primórdio do esporóforo cresce rapidamente, para produzir o basidiocarpo normal do cogumelo. O estágio final, no ciclo sexual, ocorre nas camadas superficiais das membranas dispostas na face inferior do píleo. Nas hifas das camadas superficiais das membranas (himênio), desenvolvem-se células terminais especializadas, as basídias (Niella, 2000a).

Preferencialmente o fungo *C. perniciosa* ocorre em tecidos em crescimento do cacauero provocando os mais variados tipos de sintomas. Nos lançamentos foliares

provoca o aparecimento de ramos inchados e brotações excessivas, formando as vassouras vegetativas; nas almofadas florais há o aparecimento de flores hipertrofiadas com pedicelos inchados, a formação de frutos “morangos” e “cenouras”, que logo têm seu crescimento paralisado, além do desenvolvimento de vassouras vegetativas semelhantes às aquelas formadas nos ramos; nos frutos mais desenvolvidos provoca a formação de manchas deprimidas, de cor escura, dura e de forma irregular, onde as sementes encontram-se podres e aderidas entre si, não servindo para comercialização (Almeida, et al., 2001). Face à capacidade infectiva de basidiósporos germinados, isto talvez explique a disseminação da vassoura-de-bruxa para locais muito distantes da fonte de inóculo (Bastos, 1989).

Delgado & Cook (1976) relataram a severidade da vassoura de bruxa no Equador, incluindo infecção de cultivares previamente considerados resistentes, apontando para a necessidade de uma revisão crítica de informações disponíveis a respeito do fungo. Eles mostraram que apenas inoculações com basidiósporos resultaram em doenças em plântulas de cacau sob condições controladas.

A difícil produção de basidiocarpos tem limitado os estudos sobre a biologia do patógeno, incluindo condições para a formação de esporóforo e crescimento e deposição do basidiósporo. Esta situação e a possibilidade de que novas linhagens patogênicas possam existir são os principais fatores questionáveis quanto ao desenvolvimento de resistência a variedades de cacau ou outros métodos de controle de doença (Delgado & Cook, 1976).

Anastomoses entre micélios de diferentes origens de basidiósporos poderiam dar oportunidade ao surgimento de heterocários no micélio saprofítico, com subsequente aumento da variabilidade na próxima geração de basidiósporos. O teste desta hipótese é de fundamental interesse porque o conhecimento sobre o potencial de diversidade deste patógeno, especialmente dentro de uma região produtora de cacau, é importante para o planejamento de programas de manejo integrado da doença, incluindo o uso da resistência induzida (Thomsen & Koch, 1999; Perez, 2002).

Segundo Dahlberg (1995), para se conhecer a diversidade dentro de uma população fúngica, devem ser usadas várias técnicas para caracterizar os isolados, como:

sistemas de cruzamento (incompatibilidade somática) e a análise de isoenzimas, visando identificar de forma mais rápida e precisa os agentes patogênicos, diferenciar raças e biótipos, bem como conhecer a diversidade genética entre e dentro das populações, através do grau de similaridade dos indivíduos.

A reação de incompatibilidade somática ocorre quando há formação de uma zona de delimitação separando isolados incompatíveis, podendo ou não ocorrer uma alteração na pigmentação ou na produção de compostos inibitórios. Este processo é originado devido ao abortamento da fusão celular, ou seja, as hifas de dois indivíduos não são geneticamente idênticas, evitando, desta forma, que os genótipos existam num mesmo citoplasma. Entretanto, se os indivíduos são geneticamente semelhantes, ocorre a fusão celular entre as hifas, desfavorecendo a reação de incompatibilidade (Dahlberg, 1995).

Em animais, plantas e células, a fusão somática é regulada através de anastomose. Em fungos, a regulação somática está em um nível mais íntimo, determinando que esta fusão ou anastomose hifal resulta em uma continuidade citoplasmática e permutação nuclear (Petersen, 1995; Mattjus et al., 2003).

Diversas espécies de fungos já foram estudadas quanto à compatibilidade somática por diversos pesquisadores como forma de auxiliar nos estudos de biologia e diversidade genética de população dentro de uma espécie e entre espécies (May, 1988; Vasiliauskas & Stenlid, 1998; McCabe et al., 1999; Garbelotto et al., 1999; Giovannetti et al., 1999; Swedjemark et al., 1999; Thomsen & Koch, 1999; Glass et al., 2000; Coetzee et al., 2001; Jiménez et al., 2002; Pilotti et al., 2002; Mattjus et al., 2003; Suwandí et al., 2004).

Para estabelecer genótipos diferentes em relação aos seus clones e a partir de recombinação sexual, Thomsen & Koch (1999) estudaram a incompatibilidade somática ou vegetativa entre os fungos *Amylostereum areolatum* e *A. chailletii* observando reação de incompatibilidade entre as duas espécies de *Amylostereum* caracterizando-se as reações de incompatibilidade através da presença de linhas de separação com pigmentação escura na zona de confrontamento entre os micélios. Esta habilidade do fungo de auto-reconhecimento e de rejeição de isolados geneticamente diferentes tem sido amplamente usado em estudos de populações.

A formação de anastomoses e os eventos de citologia em fungos têm sido estudados extensivamente em ascomicetos e basidiomicetos, sendo que testes baseados em compatibilidade vegetativa podem conduzir para a identificação de isolados geneticamente diferentes em estudo de populações patogênicas, saprofíticas e fungos ectomicorrízicos (Giovannetti et al., 1999). O reconhecimento entre células somáticas é um processo universalmente importante entre células eucarióticas e em fungos, a incompatibilidade somática é referida como vegetativa ou incompatibilidade de heterocárions, observando-se que a fusão de hifas pode causar mudanças de citoplasma e núcleo durante a fase assimilativa de crescimento. A incompatibilidade vegetativa reduz os riscos de transmissão de elementos citoplasmáticos infecciosos, tais como vírus de dRNA, e a exploração por genótipos agressivos (Mattjus et al., 2003).

Diferenças na etiologia e epidemiologia das doenças podem ser determinadas não apenas por diferentes espécies hospedeiras e ecossistemas envolvidos, mas também pela diferenciação genética de populações do patógeno encontrado em diferentes espécies hospedeiras e regiões distantes do mundo (Garbelotto et al., 1999).

O fungo *Crinipellis perniciosa* infecta plantas de diversos gêneros, tais como *Theobroma* e *Herrania* da família Sterculiaceae e alguns hospedeiros pertencentes às famílias Solanaceae e Bixaceae (Bastos e Andebrhan, 1986). A variabilidade do patógeno de diferentes hospedeiros foi estudada por vários autores (Bastos e Evans, 1985; Andebrhan, 1986; Bastos et al., 1988; Andebrhan et al., 1998). As primeiras pesquisas realizadas na Amazônia brasileira fazem referência à existência de três biótipos do patógeno: (i) biótipo do cacau (*T. cacao*), cacauí (*T. speciosum*) e cupuí (*T. subcanum*); (ii) biótipo do cupuaçú (*T. grandiflorum*) e (iii) biótipo das solanáceas (Bastos et al., 1988).

A classificação intra-específica de *Crinipellis perniciosa* foi inicialmente baseada em dados de patogenicidade (Hedger et al., 1987; Bastos et al., 1988, Wheeler & Mepsted, 1988). Atualmente, se distinguem quatro classes de *Crinipellis perniciosa*: (1) tipo Sterculiaceae (biótipo C), os quais infectam predominantemente *Thebroma* sp. e *Herrania* sp., representando um grupo que causa perda econômica (Evans, 1978; Bastos et al., 1988); (2) tipo Solanaceae (biótipo S), que infecta espécies da família Solanaceae

(Bastos & Evans, 1985; Bastos et al., 1988); (3) tipo *Bixaceae* (biótipo B), que infecta espécies hospedeiras da família *Bixaceae* (Purdy & Schmidt, 1996); e o (4) biótipo L, o qual é saprofítico em lianas (cipós) colonizando uma variedade de substratos, vivos ou mortos (Evans, 1978; Hedger et al., 1987; Griffith et al., 1994; Arruda et al., 2003a; Arruda et al., 2003b).

Várias espécies hospedeiras naturais (além de *Theobroma cacao*) de *C. pernicioso*, tais como *Solanum* spp. tem sido identificado no Brasil nos estados de Minas Gerais (Evans & Barreto, 1996; Pereira et al., 1998), Amazonas (Bastos & Evans, 1985), Tocantins, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal (Pereira et al., 1997; Resende et al., 1997), Rio de Janeiro e Espírito Santo (Pereira et al., 1997). Dentro da família *Malpighiaceae*, *heteropterys acutifolia* também é um hospedeiro de *C. pernicioso* e é comumente encontrado em Floresta de Galeria no sul de Minas Gerais (Resende et al., 2000). Em 1985 foi encontrado *C. pernicioso* em *Bixa orellana* pertencente à família *Bixaceae*, no estado do Pará (Bastos & Andebrhan, 1986; Arruda et al., 2003a; Arruda et al., 2003b).

No estado da Bahia, são relatadas as seguintes hospedeiras de *C. pernicioso* na família *Sterculiaceae*: *T. cacao*, *Theobroma* cf. *sylvestris* Aubl. Ex Mart e *Herrania* spp.; na família *Solanaceae* destacam-se várias espécies do gênero *Solanum* como *S. paniculatum* Linn. (jurubeba), *S. gilo* Raddi. (jiló), *S. stipulaceum* Wild. Ex Roem & Schutt. (caçara), *S. melongena* Linn. (berinjela) *Solanum* sp., *Solanum cernuum* (braço de Preguiça), *Solanum lycocarpum* (lobeira) além de *Capsicum annuum* Linn. (pimentão), *C. frutescens* Linn., (pimenta malagueta) e *Athenaea* cf. *pogogena* (Moric.) Sendt.. Já a espécie *Stigmaphyllon* sp. A. Juss., um cipó silvestre e *Heteropterys acutifolia* A. Juss. são os únicos hospedeiros do fungo encontrado na família *Malpighiaceae* na Bahia, até então (Silva et al., 1992; Luz et al., 1997; Resende et al., 2000).

Na Amazônia, centro de origem do cacauero, existe outras plantas hospedeiras de *C. pernicioso*, como *Theobroma grandiflorum* (Spr.) K. Schum (cupuaçu), *T. bicolor* Huml. & Bompl., *Herrania* spp. Gaudot, *Bixa orellana* Linn. e alguns cipós da família *Bignoniaceae*, além de várias espécies de solanáceas. Recentemente foi relatado mais um cipó da família *Malpighiaceae*, *Mascagnia* cf. *sepium* Vell. (“cipó malandro”), como



hospedeiro de *C. pernicioso* na Amazônia (Bastos et al., 1998; Luz et al., 1997; Resende et al., 2000).

Diferenças genéticas entre isolados de *C. pernicioso* e de acessos de *T. cacao* têm sido detectadas por marcadores do DNA e por avaliações fenotípicas de patogenicidade e resistência, respectivamente (Wheeler & Mepsted, 1988; Gomes et al., 2000 (a); Niella, 2000b; Pires et al., 2001; Arruda et al., 2003a; Arruda et al., 2003b).

O estudo da variabilidade de *Crinipellis pernicioso* tem sido baseado em características morfológicas e bioquímicas, compatibilidade somática (SCG), análises moleculares e reações bioquímicas em *Theobroma cacao* e outros *Theobroma* spp. (Arruda et al., 2003a; Arruda et al., 2003b; McGreary & Wheeler, 1988; Griffity & Hedger, 1994; Hedger et al., 1987; Andebrhan, 1988; Bastos et al., 1988; Wheeler e Mepsted, 1988). Os dados relativos à variabilidade do patógeno podem ser importantes para a seleção de genótipos de plantas resistentes ou tolerantes em programas de melhoramento para obter resistência mais efetiva e durável para a doença vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao* (Van Der Plank, 1968; Andebrhan, 1986; Andebrhan & Furtek, 1999). Da mesma forma, Faleiro (2004) opina que o conhecimento da variabilidade genética do patógeno tem grande importância em estudos de patogenicidade e relacionados ao melhoramento genético do cacau visando a sua resistência à doença.

Variantes saprofíticas têm sido observadas em *C. pernicioso* e estudos de agrupamentos de compatibilidade somática e de caracteres morfológicos estão sendo usados para auxiliar na detecção dessa variabilidade (Viana-Júnior, 2002). Anteriormente, Andebrhan (1986) já havia observado diferenças entre isolados obtidos de vassouras secas coletadas em plantações comerciais de 13 diferentes pontos geográficos da Amazônia, mediante avaliação da taxa de crescimento do micélio, das reações bioquímicas, estudos de compatibilidade somática e testes de patogenicidade, sendo os isolados classificados em 4 grupos, conforme a região de coleta. Os isolados provenientes de hospedeiros alternativos mostraram reações diferentes quando comparados com os isolados de cacau, com exceção de isolados de lianas.

Em estudos prévios, foi demonstrado que isolados da região Amazônica em hospedeiros de solanáceas e isolados de cacau não apresentavam infecção cruzada e que são somaticamente incompatíveis (Bastos & Evans, 1985, Bastos et al., 1988). Para isolados de cacau e outros hospedeiros da região de Uruçuca (Bahia) Bastos (1990) estudou a patogenicidade através de testes bioquímicos e de compatibilidade, detectando diferenças entre o isolado de *Crinipellis perniciosa* procedente de Uruçuca e isolados de cacau e de outros hospedeiros de diferentes localidades da Amazônia.

É sabido que fitopatógenos apresentam em comum características de alta variabilidade, encontrando-se em populações de patógenos muitos biótipos que diferem entre si em várias características morfológicas, fisiológicas, inclusive na patogenicidade. No caso especial do *C. perniciosa* essa variação parece ser alta, como evidenciada pela existência de vassouras em cacau produzindo basidiocarpos amarelos (Bastos et al., 1988) e dados que evidenciam diferenças morfológicas e patológicas, sugerindo que a variabilidade patogênica verificada esteja relacionada com as alterações fisiológicas ao passar por hospedeiro diferente.

As primeiras evidências experimentais da variação genética de *C. perniciosa* de diferentes países foram demonstradas por Wheeler e Mepsted (1988), que determinaram a existência de dois grupos de biótipos em cacau: o grupo de isolados do Equador, Colômbia e Bolívia e o grupo do Brasil, Venezuela e Trinidad-Tobago. A susceptibilidade de fontes de resistência dos clones Scavina no Equador e mais recentemente em algumas partes do Brasil, como Pará, Amazonas e Rondônia, também foi um fato atribuído às variações genéticas nas populações do patógeno desses Estados (Andebrhan et al., 1998).

Com o desenvolvimento da Taxonomia Numérica, que utiliza o máximo possível de características independentes, com o mesmo valor para diferenciação, pode-se comparar números grandes de populações ao mesmo tempo. A análise fenética na taxonomia numérica é baseada nos níveis de similaridade ou divergência, sem considerar a possível linha de evolução. O nível de similaridade entre populações é calculado pelo do número de características em comum dividido pelo número total de características; ou seja, duas populações iguais têm nível 1 (ou 100%) de similaridade. A

análise fenética dá origem a um fenograma, que expressa os níveis de similaridade entre os taxa (Leal-Bertioli, 1998).

Em diferentes fungos Clare et al. (1968) utilizaram o método de eletroforese em gel, por ser um método disponível para separação de enzimas e outras proteínas de extratos celulares e para comparação qualitativa e quantitativa.

Vários trabalhos relataram o uso de gel de eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) para estudos de classificação de fungos (Clare et al., 1968; Höfling, J. F. et al., 2001; Park, C. S. et al., 2000; Jernejc, K. & Cimerman, A, 2001; Guarro, J. et al., 1999; Avio, L & Giovannetti, M., 1998; Silveira, S. F. & Alfenas, A. C., 2002).

Se gêneros, espécies ou grupos intra-específicos podem ser diferenciados com base na comparação de proteínas de maior e menor peso, tem-se a necessidade de classificar também uma grande quantidade de amostras de isolados e realizar comparações imunológicas entre estas proteínas (Novak & Kohn, 1988). O uso de técnicas eletroforéticas como SDS-PAGE pode ser mais um recurso no estudo de taxonomia de fungos, especialmente quando combinado com outras características, tais como interação micelial (Novak & Kohn, 1988). A análise molecular por diversos pesquisadores demonstra sua adequação para a identificação e caracterização de espécies fúngicas (Jahnke & Bahnweg, 1986; Jahnke et al., 1987; Jahnke et al., 1988).

Foram Yamada & Lopes (1999) que usaram pela primeira vez isoenzimas como marcadores moleculares em cacau para inferir sobre a origem da fonte de resistência em cacauzeiros.

Outros autores utilizaram o método sorológico aplicado ao estudo dos fungos fitopatogênicos, bactérias e vírus para caracterização e diferenciação intra-específica (Figueredo, M. B. et al., 1977; Lin, M. T. et al., 1980; Vasconcelos, M. F. R. & Lima, J. A. A., 1981; Geraldi, M. A. P. & Kimati, H., 1982; Alba, A. P. C. & DeVay, J. E., 1984; Ghini, R. & Kimati, H., 1985; Maringoni, A. C. & Kimati, H., 1987; Paiva, E. et al., 1990; Leal Júnior, 2002).

Devido à alta complexidade de organização físico-química e ultraestrutural dos fungos, o número e combinações dos antígenos de uma espécie ou até de uma simples raça nunca é constante (Werres & Steffens, 1994).

As técnicas para análise do DNA também têm possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos, em complemento à análise morfológica (Teixeira et al., 2004) e na tentativa de elucidar a existência de raças e confirmar a diferenciação dos isolados em biótipos (Andebrhan & Furtek, 1994; Andebrhan et al., 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste trabalho utilizaram-se isolados de *Crinipellis perniciosa* obtidos de diferentes hospedeiros como cacau (*Theobroma cacao*), braço de preguiça (*Solanum cernuum*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), *Solanum* e liana. Dos isolados de *Theobroma cacao*, nove são provenientes da região Amazônica incluindo os Estados de Rondônia, Amazonas, Pará e Mato Grosso e os demais da Bahia. Os isolados da família Solanaceae, pertencem ao Estado de Minas Gerais e São Paulo (Tabela 1). As linhagens foram obtidas de culturas polispóricas da coleção de *Crinipellis perniciosa* CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) e mantidas por repicagem de discos de 7mm das margens das colônias em incubadora à temperatura de 26°C. O meio utilizado continha agar, farelo de trigo e dextrose com óleo mineral cobrindo a superfície do micélio.

A partir do isolamento das culturas polispóricas, discos (7mm) de cada isolado foram confrontados em placas de petri (9cm) contendo o meio de farelo de trigo, dextrose e ágar, distantes 2cm entre si, invertidas e incubadas a 26°C por quatro semanas. Para cada pareamento, utilizaram-se três repetições. Após o crescimento micelial (4 a 8 semanas), foi realizada a avaliação das colônias quanto à incompatibilidade ou compatibilidade, de acordo com a formação ou não da linha de precipitação na zona de transição. Os resultados foram analisados pela formação de um dendrograma originado de uma matriz de valores binários, composta de coeficientes correspondentes aos vários resultados do teste de compatibilidade somática.

A análise dos dados obtidos a partir do teste de compatibilidade foi feita através do “software” NTSYS, usando UPGMA (método não-ponderado de agrupamento aos

pares utilizando médias aritméticas), para a construção de um dendrograma para comparação de isolados de diferentes regiões e hospedeiros.

Supondo que os dados de incompatibilidade somática poderiam não ser representativo, procurou-se avaliar outras metodologias para fins de comparação e análise crítica. Desta forma, foram feitas análises do perfil protéico de proteína totais em géis de SDS-PAGE.

Tabela 1. Isolados de *Crinipellis pernicioso* de acordo com o hospedeiro e a região onde foi coletada

Isolados	Hospedeiro	Origem
Ariquemes	<i>T. cacao</i>	Rondônia
Ouro Preto D'Oeste	<i>T. cacao</i>	Rondônia
Ji-Paraná	<i>T. cacao</i>	Rondônia
Alta Floresta	<i>T. cacao</i>	Mato Grosso
Marituba	<i>T. cacao</i>	Pará
Altamira	<i>T. cacao</i>	Pará
Belém	<i>T. cacao</i>	Pará
Medicelândia	<i>T. cacao</i>	Pará
Manaus	<i>T. caca</i>	Amazonas
Braço de Preguiça	<i>Solanum cernuum</i>	Minas Gerais
Lobeira	<i>Solanum lycocarpum</i>	Viçosa-MG
Minas Gerais	Solanaceae	Viçosa-MG
Cipó	Liana (Harry Evans)	Bignoniaceae
Bahia	<i>T. cacao</i>	BA
Cipó	Liana (Gareth Griffith)	Bignoniaceae
Lobeira	<i>Solanum lycocarpum</i>	Coimbra-MG
Braço de Preguiça	<i>Solanum cernuum</i>	Rio Pomba-MG
São Paulo	<i>Solanum</i>	SP
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>	Gandú-BA
Bahia	<i>T. cacao</i>	BA

Os géis foram padronizados segundo a metodologia descrita em Laemmli (1970) e corados com prata, com modificações feitas por Gomes et al. (2000b) em sistema de minigel GIBCO (12% de acrilamida) e gel de 18cm (15% de acrilamida). A concentração protéica de todas as amostras foi determinada previamente através de microplacas com o teste de Bradford (1976) com todas as amostras obtidas de *C. pernicioso*, sendo utilizado cerca de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em cada canaleta.

As análises de bandas protéicas que foram realizadas em SDS-PAGE e produzidas pelo programa Kodak Digital Science 1D foi feita através do “software” NTSYS para a construção de um dendrograma para comparação de isolados de diferentes regiões e hospedeiros com todas as amostras protéicas, a fim de determinar a composição antigênica e comparar as proteínas em cada antígeno.

As amostras foram adicionadas nas canaletas e cobertas com tampão de corrida, o qual também foi adicionado nas partes superior e inferior da cuba. Uma canaleta ficou sempre reservada para a adição do padrão de peso molecular (Pharmacia – LMW – COD. 17-0446-01) e a corrida foi conduzida a 20 mA e 80 mV no gel empilhador e 50 mA e 200 mV no gel separador. Proporções previamente definidas para dois géis de 1 mm.

Para a coloração de prata, após a corrida, o gel foi transferido para uma bandeja plástica com tampa contendo 250 mL de solução fixadora e deixado a temperatura ambiente durante a noite (aproximadamente 15 horas). A solução fixadora foi substituída por 250 mL da solução incubadora.

Após 15 minutos a solução incubadora foi retirada lavando-se o gel três vezes em água deionizada. Cada lavagem foi feita por 10 minutos e sob agitação constante. Adiciona-se ao gel a solução de prata por 20 minutos, após o que, esta é substituída por 250 mL de solução reveladora até o aparecimento das bandas. A solução reveladora foi descartada e adicionada a solução “stop” por 10 minutos, seguindo-se a lavagem do gel em água corrente por 2 horas. As soluções utilizadas para preparação e coloração do gel estão inseridas no anexo 1 do presente trabalho e os meios de cultura e tampões no anexo 3.

Adicionalmente aos testes de compatibilidade e proteínas totais foram realizados estudos de velocidade de crescimento dos isolados de *Theobroma cacao* da região Amazônica como mais um método comparativo para análise dos resultados. Os testes de crescimento produzem os dados que permitem calcular a velocidade de crescimento dos diferentes isolados, cuja comparação permitiria identificar grupos distintos.

Os isolados de *Theobroma cacao* L. de diferentes regiões Amazônicas (Ariquemes, Ouro Preto D'Oeste, Ji-Paraná, Altamira, Belém, Marituba, Medicelândia, Manaus e Alta Floresta) foram analisados quanto as suas velocidades de crescimento. A velocidade de crescimento foi estimada de acordo com os seus respectivos coeficientes angulares e foi correlacionada com os dados de compatibilidade somática dos mesmos isolados através de análise estatística, pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

Juntamente com estas análises foi feito uma extração protéica e precipitação com sulfato de amônio com a finalidade de se obter um perfil protéico mais detalhado da amostra de *Crinipellis pernicioso* para comparação com as amostras sem precipitação.

A extração foi realizada com micélios crescidos em meio MYE + G (extrato de malte 0,17%, extrato de levedura 0,5% e glicerol 5%), utilizando-se um tampão na seguinte proporção: 1,5% de triton, Tris-HCl 1M em pH 6,8 (0,5mL),  $\beta$ -Mercaptoetanol 1% (100 $\mu$ L) adicionado na hora do uso, PVP a 0,2% (20mg) e 10mL de H<sub>2</sub>O deionizada.

A extração das proteínas foi feita triturando-se 0,5g do micélio com nitrogênio líquido e então, inserindo 3mL do tampão descrito acima. Logo em seguida, usou-se 20 $\mu$ L de PMSF (inibidor de proteinase), centrifugada a amostra a 10.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi acondicionado a -20°C.

Após a coleta do sobrenadante, foram realizadas precipitações com sulfato de amônio de 0-60%, de 60-80% e 80-100% a 0°C seguindo a tabela do livro "Methods in Enzymology" (vol. 182, pg 291) utilizando o seguinte protocolo:

- 3mL da amostra foram diluídos em 15mL de tampão PBS em Becker de 20mL;
- à fração de 0-60% foi adicionado lentamente 4,49g de sulfato de amônio para precipitação e foi centrifugado a 10.000g por 10min em ultracentrífuga tipo Beckman C7 a 4°C;



- Ressuspendeu-se o precipitado com 200 $\mu$ L de PBS e 4 $\mu$ L de PSMF e ao sobrenadante é novamente adicionado sulfato de amônio em uma nova proporção (1,93g /15 mL) para precipitação de 60-80%; centrifuga-se e ressuspendeu-se o precipitado em 200 $\mu$ L de tampão PBS + 4 $\mu$ L de PSMF;
- e fez-se uma nova coleta do sobrenadante para uma nova precipitação de 80-100% (2,85g /15mL), centrifuga-se e faz-se a coleta do precipitado com 200 $\mu$ L + 4 $\mu$ L de PSMF, descartando agora o sobrenadante.
- As amostras foram dialisadas contra tampão PBS 0,1 M por 12 horas.

Após a precipitação da amostra de *C. pernicioso* coletada da cidade de Ouro Preto D'Oeste (RO) com sulfato de amônio, foi adicionada aos precipitados, a amostra pura do micélio de *Crinipellis pernicioso* e ao padrão protéico um tampão de amostra na proporção 1:1 e colocados em banho fervente por 10 minutos. Foram colocados 30 $\mu$ L do padrão, 30 $\mu$ L dos precipitados de 0-60% e de 80-100% e da amostra pura e 50 $\mu$ L do precipitado de 60-80% na seguinte ordem: padrão / amostra pura / 0-60% / 60-80% / 80-100%. O gel foi corrido a 50 mA e corado com Prata, utilizando o protocolo adaptado por Gomes et al. (2000).

Em complementação aos dados de compatibilidade e proteínas totais foram produzidos anticorpos com o isolado produtor de maior massa micelial, para determinar a composição antigênica e comparar as proteínas em cada amostra de *Crinipellis pernicioso*.

O micélio de *Crinipellis pernicioso* foi fornecido pelo grupo de pesquisa da CEPLAC - Fazenda Experimental Almirante Cacau- BA. O micélio foi macerado com nitrogênio líquido onde posteriormente foi adicionado um tampão segundo metodologia descrita por Alfenas (1998) para coleta de extrato protéico fúngico utilizado na produção de anticorpos.

Quatro fêmeas de camundongos BALB/c foram imunizadas segundo metodologia descrita em Duarte et al. (2001) com suspensão de *C. pernicioso*, a intervalos de 20 dias, iniciando-se em outubro, sendo a primeira imunização com

Adjuvante Completo de Freund (1:1), nos membros inferiores; a segunda com Adjuvante Incompleto de Freund (1:1), também nos membros inferiores, ambas subcutâneas e as subseqüentes em Tampão PBS via intramuscular, em uma das coxas.

Antes de cada imunização (Figura 1), uma alíquota de sangue foi retirada do plexo ocular dos camundongos, centrifugada e o soro coletado para titulação em ELISA.

A evolução do título dos antissoros obtidos de quatro camundongos foi realizada através de sangrias e análise dos soros ao longo das imunizações através de ELISA do tipo “Plate Trapped Antigen”, descrito em Crowther (1995). O ELISA foi otimizado quanto à quantidade de antígeno adsorvido nas placas e o sistema enzimático escolhido foi o de Fosfatase Alcalina, revelado com nitrophenyl phosphate, disodium salt hexahydrate (PNPP) e as leituras realizadas a 420nm em leitor de microplacas Packard Spectra Count<sup>TM</sup>.

Os ELISAs foram otimizados conforme protocolos descritos anteriormente (Crowther, 1995; Duarte et al., 2002). Nestes ensaios foram avaliados, primeiramente: diluição dos antissoros, sistema de bloqueio do ensaio (BSA ou leite Mólico), concentração dos reagentes de coloração; melhor tipo de ELISA a ser utilizado. Foram otimizados os tempos para cada passo do ensaio, de modo a permitir uma melhor visualização das proteínas marcadas.

Foi realizado o seguinte protocolo para avaliação da resposta imunológica dos camundongos Balb/c com inoculação de extrato protéico de *Crinipellis pernicioso* (cada passo teve 1h de duração): (A) sensibilização com antígeno; (B) bloqueio com BSA; (C) adição do anticorpo, sendo lavada a placa com PBS-Tween 0,1%-gelatina; (D) conjugado, lavando 1x novamente com PBS-T-G e 1x com PNPP 1x; e finalmente a (E) revelação com 2mg de PNPP com 1mL de PNPP.

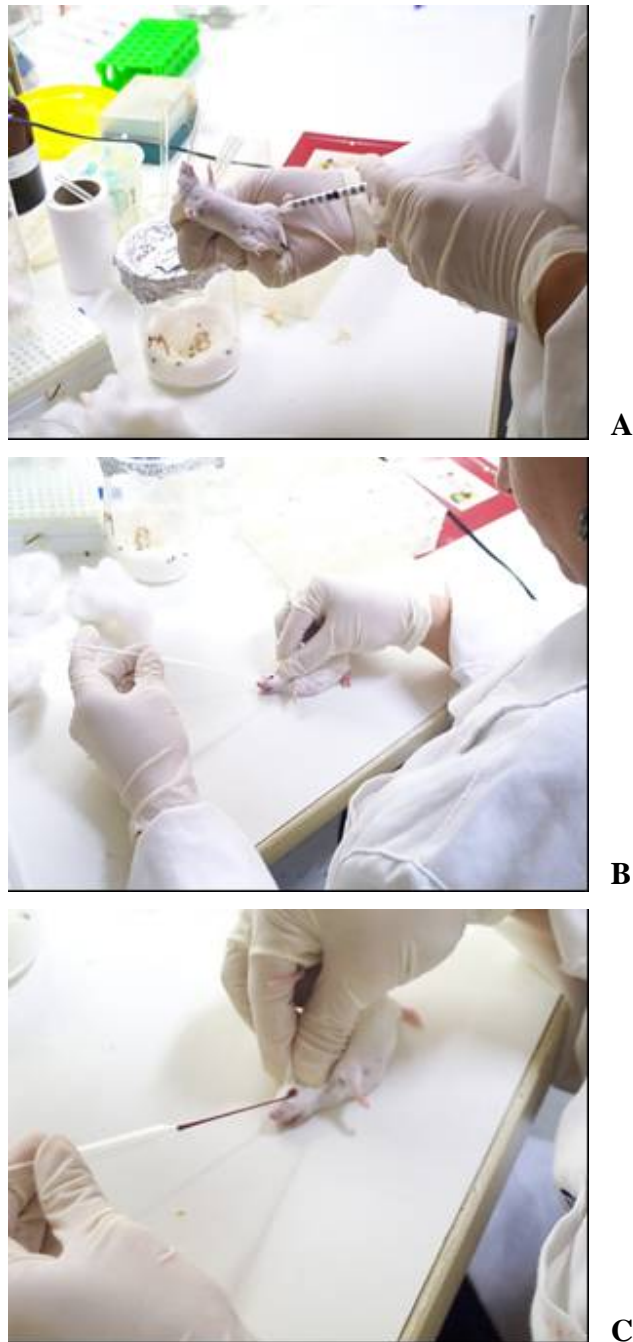


Figura 1 - As três figuras acima mostram as etapas de imunização (A) e sangria dos camundongos (B e C), conforme protocolo acima descrito

As amostras protéicas de *Crinipellis pernicioso* na concentração de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  juntamente com tampão de amostra foram colocadas para correr em dois géis de eletroforese descontínua SDS-page para a separação de proteínas desnaturadas segundo o peso molecular. Um gel foi utilizado para que se pudessem observar os padrões protéicos das amostras e um segundo gel foi usado para a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose para futuro reconhecimento por anticorpos policlonais e determinação da proteína a ser reconhecida. O immunoblotting foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Harlow & Lane (1988) com a marcação direta do anticorpo com o sistema enzimático mais conveniente, de acordo com trabalho descrito em Kennedy et al. (2000). As soluções usadas no Western Blot estão presentes no anexo 2.

Foi utilizado o sistema de transferência “Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System” (Gibco BRL cat. 21078), seguindo o procedimento descrito abaixo para anticorpos policlonais (Duarte, 2000).

Procedimento para immunoblotting com anticorpos policlonais:

- 1- Após a corrida do gel de SDS-PAGE, colocou-se o gel no sistema para transferência em membrana de nitrocelulose, utilizando o Tampão de transferência (24,8 mM tris; 192 mM glicina; 10% metanol; ajustar o pH para 8,3 e manter a  $4^{\circ}\text{C}$ ), por 1:30 h;
- 2- Bloqueou-se por 2 h em tampão de bloqueio (3% BSA; 0,02% azida sódica), sob agitação;
- 3- Lavou-se 5 vezes em solução de PBS e 0,1% tween 20 por 5 minutos cada lavagem;
- 4- Incubou-se com o anticorpo policlonal de coelho na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  adicionado de 1% de NP40 por 1 h;
- 5- Lavou-se com PBS;
- 6- Incubou-se com conjugado anti-coelho marcado com fosfatase alcalina por 1 h;
- 7- Revelou-se com 44  $\mu\text{L}$  de NBT dissolvido em 10 mL de tampão PA (10 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 100 mM Tris). Adicionar 33  $\mu\text{L}$  de BCIP e incubar por 3 h.
- 8- E por fim lavou-se em PBS adicionado de 20 mM de EDTA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como descrito por Jiménez et al. (2002), neste trabalho dois tipos de interações miceliais foram diferenciados, após o pareamento dos isolados de *Crinipellis pernicioso* em meio de farelo de trigo e dextrose por dois meses. Foi observado: (a) interligamento de micélios, segundo o qual duas colônias estabeleceram uma união e a superfície destas tiveram um aspecto uniforme; e (b) uma interação micelial com formação de uma zona de delimitação na região de contato entre as colônias pareadas, o qual foi considerada uma reação de incompatibilidade somática (figura 2). Neste último caso, a intensidade da zona de delimitação variou de fraca para forte, verificando-se que as reações de intensidade fraca foram caracterizadas por linhas estreitas formada na região de contato entre os micélios (May, 1988; McCabe et al., 1999; Pilotti et al., 2002; Suwandi et al., 2004). De modo oposto, reações de intensidade forte foram caracterizadas por linhas mais densa do micélio, que se apresentava inicialmente com pigmentação mais clara e posteriormente mais escuro (marrom escuro) devido ao abortamento da fusão celular, ou seja, as hifas de dois indivíduos não são geneticamente idênticas, evitando, desta forma, que os genótipos existam num mesmo citoplasma (Dahlberg, 1995).

Com base na análise de compatibilidade entre os vários isolados avaliados, foram construídos dois dendrogramas para agrupar os isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e seus respectivos hospedeiros.

A análise de agrupamento nestes dois dendrogramas permitiu classificar os isolados do teste 1 em três grupos: i) grupo formado pelos isolados de Rondônia (Ariquemes, Ouro Preto D'Oeste) e Pará (Altamira, Belém e Marituba) e ii) grupo formado pelos isolados de Rondônia (Jii-Paraná), Pará (Medicelândia) e Amazonas

(Manaus) e o iii) grupo formado pelo isolado de Mato Grosso (Figura 3); e o teste 2 separou os isolados em dois grandes grupos: i) grupo formado pelos isolados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Rondônia e ii) grupo formado pelo isolado do Pará (Figura 4).

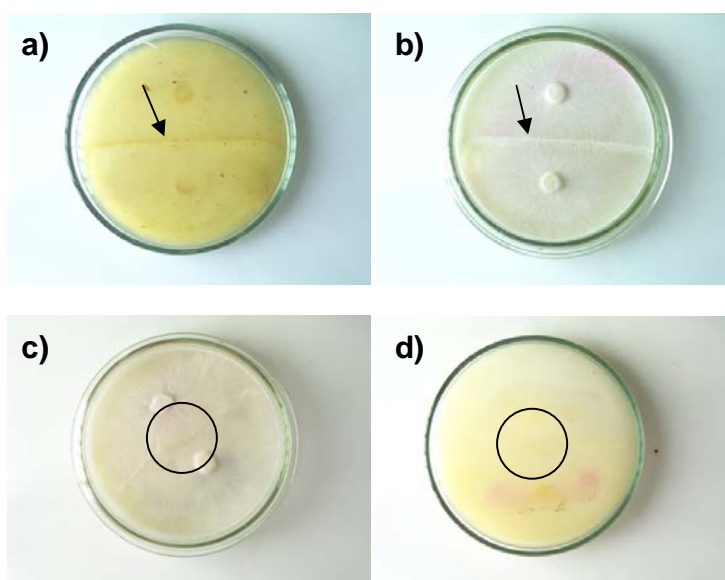


Figura 2 - Reações de compatibilidade e incompatibilidade entre diferentes isolados de *Crinipellis perniciososa* inoculados em placas de Petri contendo meio de farelo de trigo e dextrose, mostrando a reação de incompatibilidade (**a e b**) com formação de zona densa pigmentada entre micélios e interligação de micélios mostrando reação de compatibilidade, não sendo possível observar a zona de pigmentação (**c e d**)

Neste trabalho foi possível agrupar através de análise de compatibilidade somática dois isolados do Estado de Rondônia (Ariquemes e Ouro Preto D'Doeste) e três do Estado do Pará (Altamira, Belém e Marituba) (figura 3). De acordo com os estudos de compatibilidade realizados por Almeida & Andebrhan (1984), os isolados de *C. perniciososa* provenientes do Pará não permitiram determinar diferenças entre os isolados de diferentes regiões e hospedeiros. O autor considera que a proximidade geográfica dos isolados permite que condições de campo contribuam para infecções

múltiplas. Entretanto Andebrhan et al. (1998), observaram variação genética entre isolados de *C. pernicioso* do cacaueteiro em diferentes municípios do Estado de Rondônia, realizando estudos através de testes “*in vitro*” e “*in vivo*”.

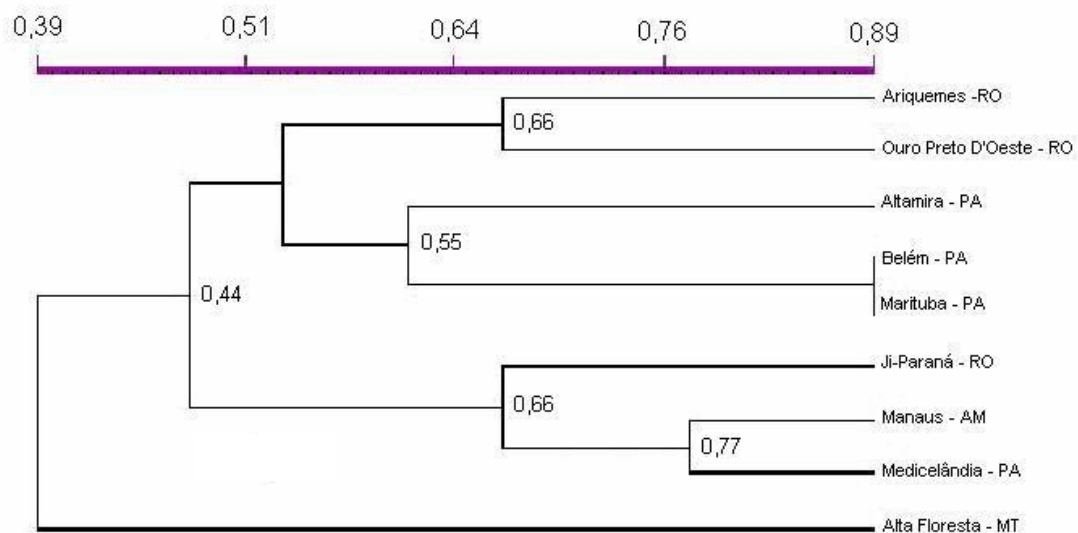


Figura 3 - Análise de agrupamento de nove isolados de *Crinipellis pernicioso* de *Theobroma cacao* L. da região amazônica com base no teste de incompatibilidade somática

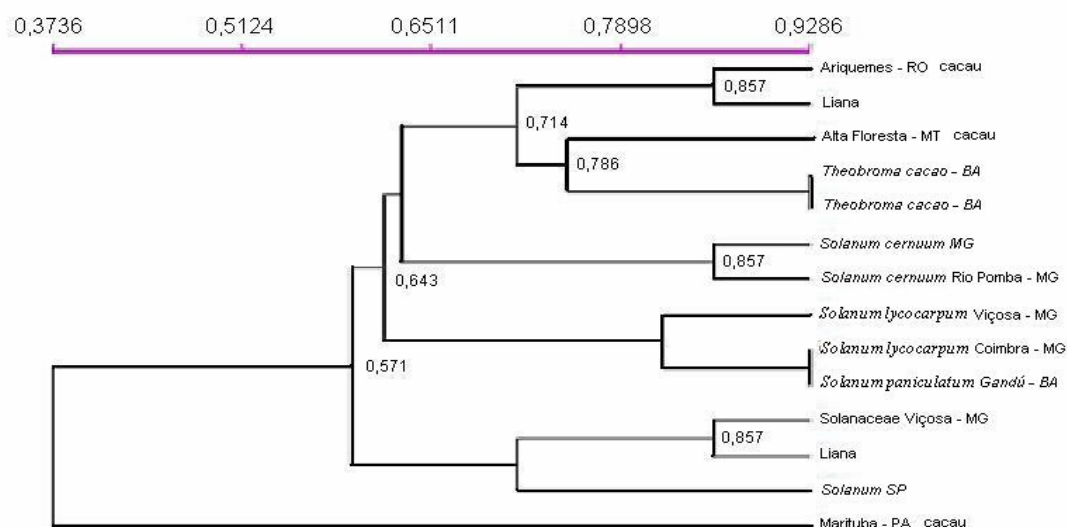


Figura 4 - Análise de agrupamento de quatorze isolados de *Crinipellis perniciosae* de *Theobroma cacao* L. provenientes de diversos hospedeiros e regiões com base no teste de incompatibilidade somática

De acordo com Liberato et al. (1995), o procedimento básico de todos os métodos aglomerativos é similar, iniciando com o cálculo de uma matriz de similaridade ou dissimilaridade entre as populações e finalizando com um dendrograma que representa graficamente a síntese dos resultados.

Ao analisar o dendrograma obtido a partir do teste de compatibilidade somática, observa-se que entre os isolados estudados a maioria apresentou alta divergência genética, que significa a heterogeneidade entre os isolados e seus hospedeiros. Em relação à similaridade genética, pode-se observar que a variação foi de 0,143 a 0,929 (porcentagem de similaridade genética). Uma grande variação de similaridade genética entre os isolados de uma mesma região e entre regiões indica que os biótipos possuem alta capacidade adaptativa, retratando a habilidade de dispersão do fungo.

A maior similaridade genética foi de 0,929, observada pelos isolados de *Theobroma cacao* da Bahia e entre os isolados de *Solanum lycocarpum* de Coimbra (Minas Gerais) e *Solanum paniculatum* de Gandú (Bahia) (Figura 4) indicando que estes isolados apresentam características genótípicas semelhantes, podendo indicar que os



isolados de Minas Gerais tenham tido origem entre os isolados da Bahia. Os isolados de *Theobroma cacao* do Estado de Rondônia (Ariquemes e Ouro Preto D'Oeste) e do Pará (Altamira, Belém e Marituba) foram agrupados em subgrupos indicando que a proximidade da região de origem apresenta pressões seletivas da mesma ordem. (Figura 3). Estes resultados concordam com estudos anteriores feitos por Yamada et al. (1998) e Gomes et al. (2000a) que observaram nos seus trabalhos que os isolados de uma mesma região geográfica tendem a ser geneticamente próximos. Entretanto, a baixa similaridade genética entre isolados de *C. pernicioso* de uma mesma região foi observada nos estudos conduzidos por Andebrhan e Furtek (1994), com diferentes isolados de cacau da Amazônia brasileira, coletados a menos de 2 Km um do outro, e por Viana-Júnior (2001), encontrando similaridade genética baixa de 0,1429 entre isolados de *Herrania* e *T. bicolor* do Pará, indicando a existência de condições para a coexistência de diferentes variantes produzidos por mutação ou recombinação genética e ausência de pressão de seleção favorecendo este ou aquele biótipo.

Os resultados mostrados por Andebrhan e Furtek (1994), através de estudos moleculares do tipo RAPD entre isolados de *C. pernicioso* em diferentes hospedeiros da região amazônica, indicam que a proximidade geográfica é mais importante que as espécies hospedeiras para se determinar a similaridade genética entre os diversos isolados de *Crinipellis pernicioso*, agrupando os isolados em três grupos distintos: i) grupo formado pelos isolados do Pará, composto por *Herrania* sp., *T. grandiflorum*, *T. cacao*, *T. obovatum* e *T. subicanum*; ii) grupo formado pelos isolados de *T. cacao* e *Bixa orellana*; iii) grupo formado pelo único isolado de Solanaceae (*Solanum rugosum*) do Amazonas. Estes resultados são semelhantes aos dois testes de compatibilidade realizadas no presente trabalho, agrupando os isolados devido a sua proximidade geográfica (Figuras 3 e 4).

A distância geográfica dos isolados pôde determinar a variação genética do patógeno, visto que isolados de regiões diferentes foram incompatíveis quando confrontados através de teste de compatibilidade somática, assim como observado no trabalho de Hedger et al. (1987) que demonstraram a estrutura da população de *C. pernicioso* (biótipo L; e biótipo C) em populações do Equador (Pichilingue) e do Brasil

(Pará), mostrando incompatibilidade entre si quando confrontados em placas de petri (SCG), o mesmo acontecendo entre os biótipos C do Equador e do Brasil.

Andebrhan et al. (1998), utilizaram grupos de compatibilidade somática (SCG) e identificaram dois grupos do fungo: o grupo formado pelos isolados dos municípios de Ouro-Preto d'Oeste e Jaru e o grupo formado pelos isolados dos municípios de Cacoal e Ariquemes, caracterizando a existência de variabilidade entre grupos de isolados de *Crinipellis pernicioso* dentro de uma mesma região geográfica. Isto pode ser observado neste trabalho, onde foram observadas variações genéticas entre isolados de Solanaceae de diferentes regiões de Minas gerais através de *Solanum lycocarpum* (Viçosa), *Solanum lycocarpum* (Coimbra) com isolados de *Solanum cernuum* (Rio Pomba e MG) (figura 4).

Griffith & Hedger (1994) sugeriram que o biótipo C, não existiu antes do advento da produção de *T. cacao* na região amazônica, e que o baixo nível de variabilidade entre linhagens deste biótipo quando comparados com o biótipo L, encontrado somente na Amazônia, pode indicar uma origem recente e que novas pressões de seleção associada com monoculturas de *T. cacao* pode ter precipitado a evolução. Tais relações foram observadas por dados de compatibilidade somática, tão bem como polimorfismos de DNA mitocondrial (Griffith & Hedger, 1994).

Juntamente com o teste de compatibilidade foram realizados estudos de velocidade de crescimento dos isolados de *Theobroma cacao* da região Amazônica a fim de se determinar uma possível correlação entre fisiologia do patógeno e sua capacidade de adaptabilidade e dispersão.

Os coeficientes angulares dos isolados foram calculados pela análise de regressão linear realizada no programa "Excel Office for XP". Esse coeficiente representa a inclinação da reta, portanto, fornece a velocidade de crescimento das diferentes linhagens. Uma linhagem de inclinação mais acentuada apresenta maior crescimento em menor tempo.

Baseando-se nessa informação, os coeficientes angulares médios de cada isolado, que apresentava três repetições, foram utilizados para o teste de comparação de médias. Foi feito o teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) no programa SAS. Dessa maneira, foi possível a observação que os isolados cresceram em taxas significativamente diferentes (Figura 5).

Houve a separação de diferentes grupos, mas dois grupos maiores podem ser fortemente observados. Os isolados de Altamira, de Belém e de Medicelândia, todos do Pará, possuem uma menor taxa de crescimento quando comparados com os outros isolados (Figura 5). Portanto, o grupo caracterizado por menor taxa de crescimento corresponde aos isolados da região do Estado do Pará.

Interessante notar que, no Pará, os isolados são menos patogênicos quando comparados com os isolados da região de Rondônia. O experimento realizado para a análise de taxa de crescimento não foi executado em diferentes meios, nem tampouco, avaliou diferentes condições de temperatura. Dessa forma, não se pode afirmar que os isolados mais patogênicos são assim devido ao fato de se desenvolverem mais rapidamente. No entanto, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que os isolados mais patogênicos, nesse caso, os de Rondônia, poderiam apresentar a velocidade de crescimento como uma característica fisiológica que explicariam sua maior patogenicidade.

Notou-se a distinção clara de pelo menos dois grupos quanto à velocidade de crescimento (coeficiente angular), onde os isolados do Pará (D, DE, E) crescem, significativamente, mais lentamente. O grupo maior (A, AB, B, BC, C) formado pelos isolados de Rondônia, Mato Grosso, Amazonas e por um isolado do Pará (Marituba) cresceram com maior vigor, o que pode indicar um potencial para dispersão e infecção (Figura 5). É importante notar que há necessidade de se realizar testes de patogenicidade para correlação dos resultados.

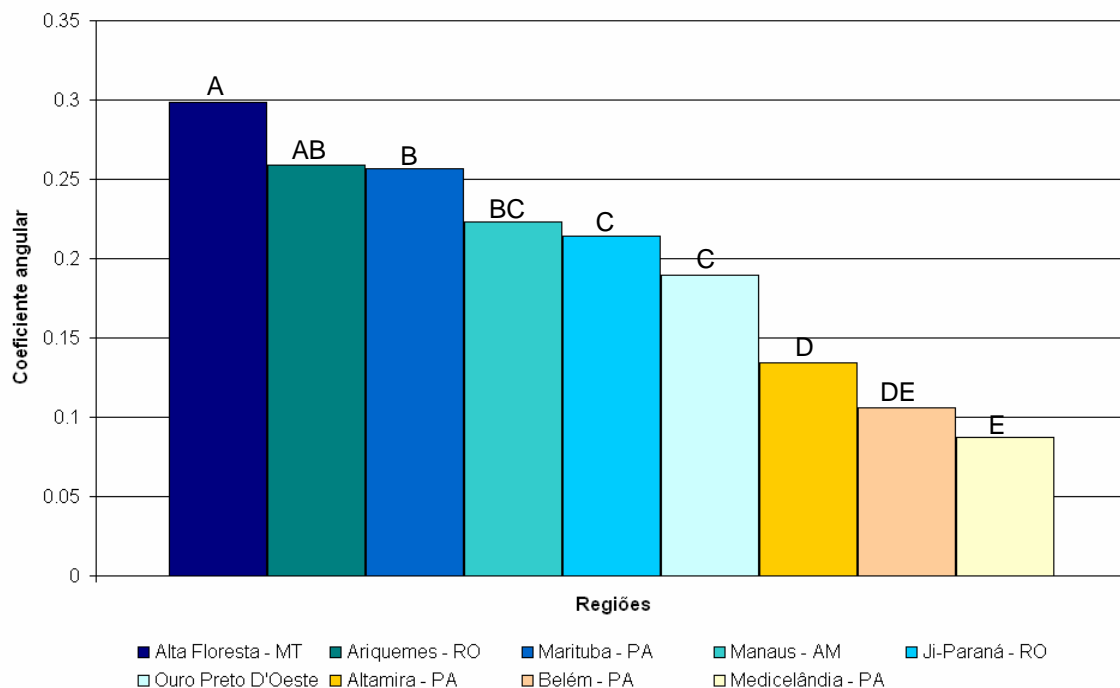


Figura 5 – Análise da velocidade de crescimento de nove isolados de *Crinipellis pernicioso* em placa de Petri contendo farelo de trigo e dextrose. Representação dos valores dos coeficientes angulares da regressão. Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

Os dados obtidos quanto ao perfil protéico de *Crinipellis pernicioso*, mostraram-se semelhantes para os diversos isolados de diferentes regiões e hospedeiros, como mostrado através dos testes de compatibilidade deste trabalho, podendo-se também observar a presença de bandas distintas entre os diversos isolados testados (Figura 6 e 7).

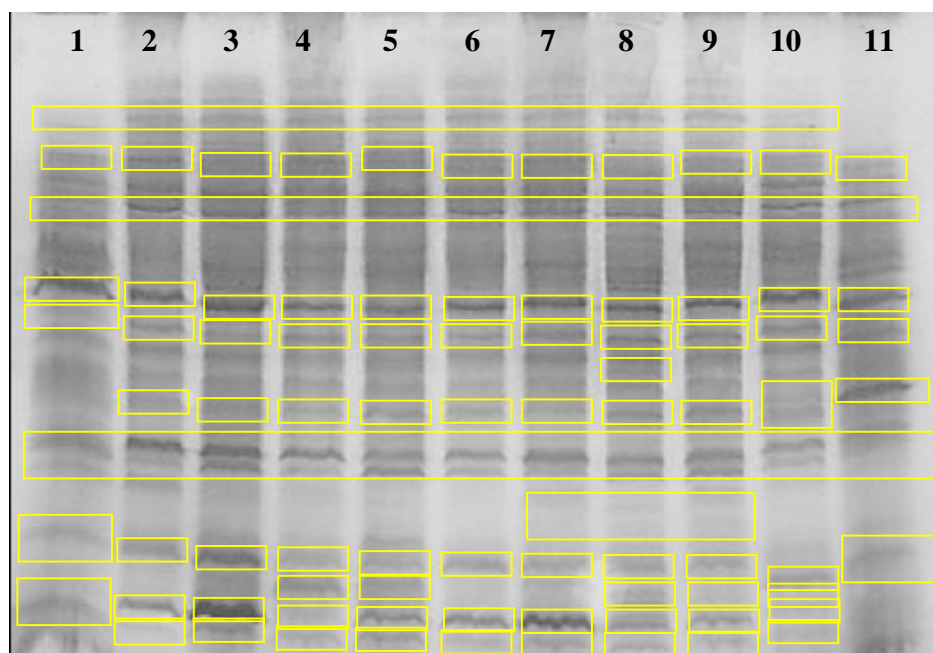


Figura 6 - Perfis protéicos de *Crinipellis perniciosus* de diferentes hospedeiros e regiões. SDS-PAGE, 15 % representado pelos isolados de (1) *Theobroma cacao* (Ouro Preto D'Oeste -RO), (2) *Theobroma cacao* (BA), (3) *Theobroma cacao* (BA), (4) *Solanum cernuum* (Minas Gerais), (5) Solanaceae (Viçosa – MG), (6) *Solanum* (SP), (7) *Solanum paniculatum* (Gandú – BA), (8) *Solanum lycocarpum* (Viçosa – MG), (9) *Solanum lycocarpum* (Coimbra – MG), (10) *Solanum cernuum* (Rio Pomba – MG), (11) Liana (Doação de Harry Evans)

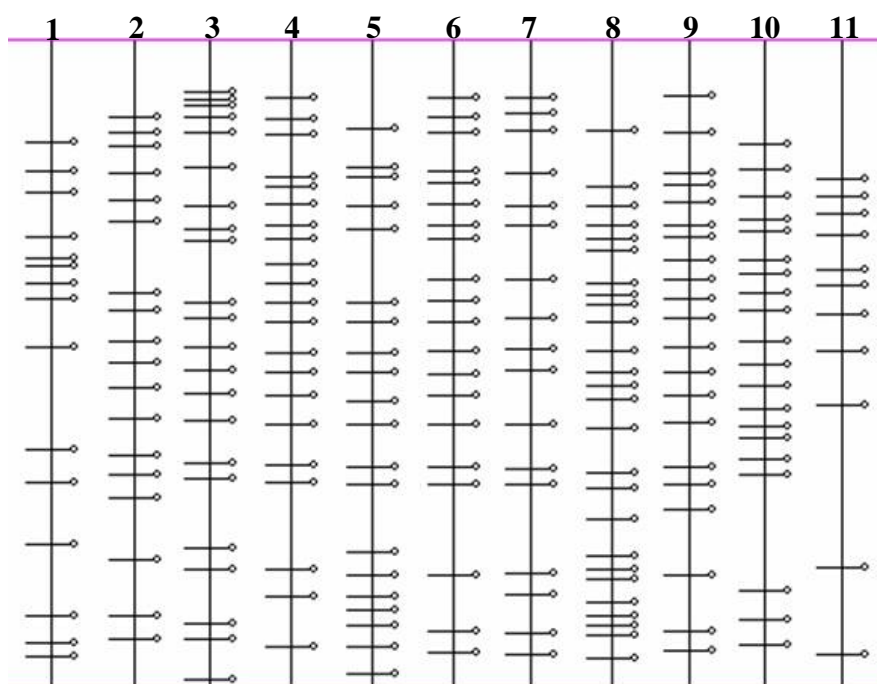


Figura 7 - Perfil protéico das bandas produzidas pelo programa Kodak Digital Science 1D das mesmas onze amostras de *Crinipellis pernicioso* de diversos hospedeiros e regiões mostradas na figura 6

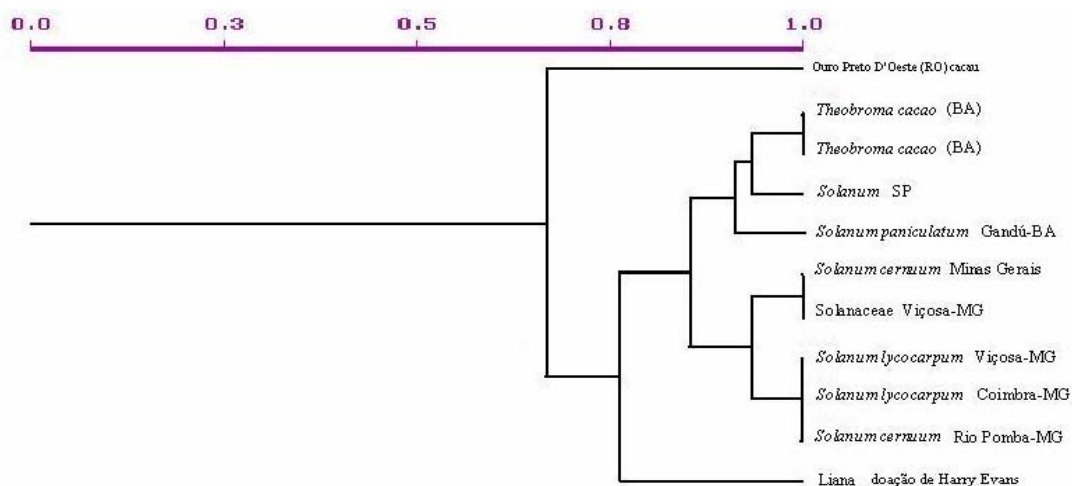


Figura 8 - Análise de agrupamento (dendrograma) de onze isolados de *Crinipellis pernicioso* de diversos hospedeiros e regiões do Brasil, com base na análise de bandas através do programa NTSYS

Pelo perfil protéico dos isolados, foi possível agrupar os isolados em três grupos, de acordo com o hospedeiro e região de origem: (1) grupo formado pelo isolado de *Theobroma cacao* de Ouro Preto D'Oeste; (2) grupo constituído pelos isolados de *Theobroma cacao* da Bahia e os diversos isolados de Solanaceae do Estado de Minas Gerais, Bahia e São Paulo e grupo (3) formado pelo isolado de Liana.

Os resultados mostrados na Figura 8, reunindo os três isolados de Solanácea do estado de Minas Gerais (os três municípios, Viçosa, Coimbra e Rio Pomba, são próximos geograficamente) concordam com estudos anteriores feitos por Yamada et al. (1998), Gomes et al. (2000a) e Hedger et al. (1987) que identificaram que isolados de uma mesma região geográfica tendem a ser geneticamente próximo.

A análise das bandas produzidas feita através do “software” NTSYS (Rohlf, 1992) ao agrupar os isolados de diferentes regiões e hospedeiros, foi semelhante aos resultados encontrados através de testes de compatibilidade somática, reforçando o uso de perfis protéicos (SDS-PAGE) para estudos de variabilidade de diversos patógenos (Novak & Kohn, 1998).

Juntamente com estas análises foi feito uma extração protéica e precipitação com sulfato de amônio com a finalidade de se obter um perfil protéico mais detalhado da amostra de *Crinipellis pernicioso* para comparação com as amostras sem precipitação, como mostrado na Figura 9.

Pode ser observado que a amostra precipitada com 60-80% com sulfato de amônio apresentou uma baixa resolução no gel (Figura 9), ao contrário das amostras com precipitação de 0-60% e 80-100%. No entanto, a amostra com precipitação de 80-100% apresentou melhor definição e separação das bandas protéicas do isolado de *Crinipellis pernicioso* isolado de *Theobroma cacao* de Ouro Preto D'Oeste (RO) em relação às demais amostras precipitadas e a amostra pura de *Crinipellis pernicioso* de Ouro Preto D'Oeste (RO) sem ter passado pelo processo de precipitação, sendo considerada então o melhor faixa de precipitação para separação de proteínas totais, como pode ser observado na Figura 9.

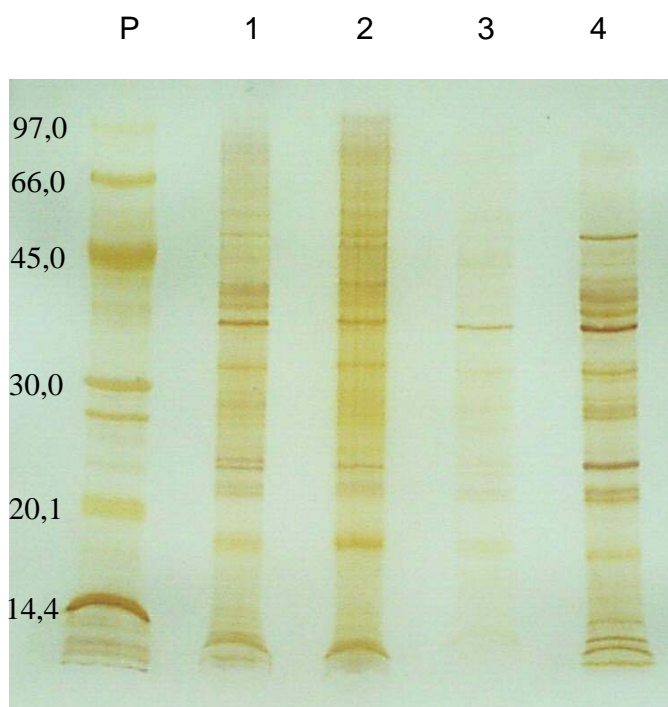


Figura 9 - Perfil protéico em gel de eletroforese SDS-PAGE a 15 % corado com Nitrato de Prata, onde P - padrão de peso molecular; 1- amostra pura (*Crinipellis pernicioso* de Ouro Preto D'Oeste); 2- precipitação de 0-60%; 3 – precipitação de 60-80%; 4 – precipitação de 80-100%.

Em complementação aos dados de compatibilidade e proteínas totais foram produzidos anticorpos com o isolado produtor de maior massa micelial. Vários isolados de *Crinipellis pernicioso* foram colocados em meio de farelo de trigo e dextrose para anotação dos dados de crescimento até que estes tomassem a placa de Petri por inteiro. O isolado de Ouro Preto D'Oeste do Estado de Rondônia, apesar de ter crescido mais lentamente que os isolados de Alta Floresta (PA), Marituba (PA), Ariquemes (RO), Ji-Paraná (RO), Manaus (AM), este apresentou uma massa micelial maior e mais densa que os demais isolados estudados, sendo então selecionado para uso durante as imunizações (Figura 5).

Os quatro camundongos imunizados para a obtenção de células produtoras de anticorpos obtiveram resultados satisfatórios segundo dados realizados em teste de



ELISA indireto, porém o camundongo de número 2 morreu após a tentativa da oitava injeção de antígenos de *Crinipellis pernicioso* (Figura 10).

Até a sexta imunização dos camundongos, o antígeno era injetado via intramuscular, porém ass resposta imunológicas não se mostraram suficientes para a produção de anticorpos pelos linfócitos do camundongo. Por isto, testou-se a inoculação peritoneal considerada via mais adequada para estímulo do sistema imunológico, porém de maior risco ao animal. Na figura 10, são apresentados os resultados obtidos a partir de quantidade maior do imunógeno aplicada e resposta imunológica aumentada devido a maior presença de macrófagos que por sua vez agem como células processadoras e apresentadoras de antígenos (Harlow & Lane, 1988).

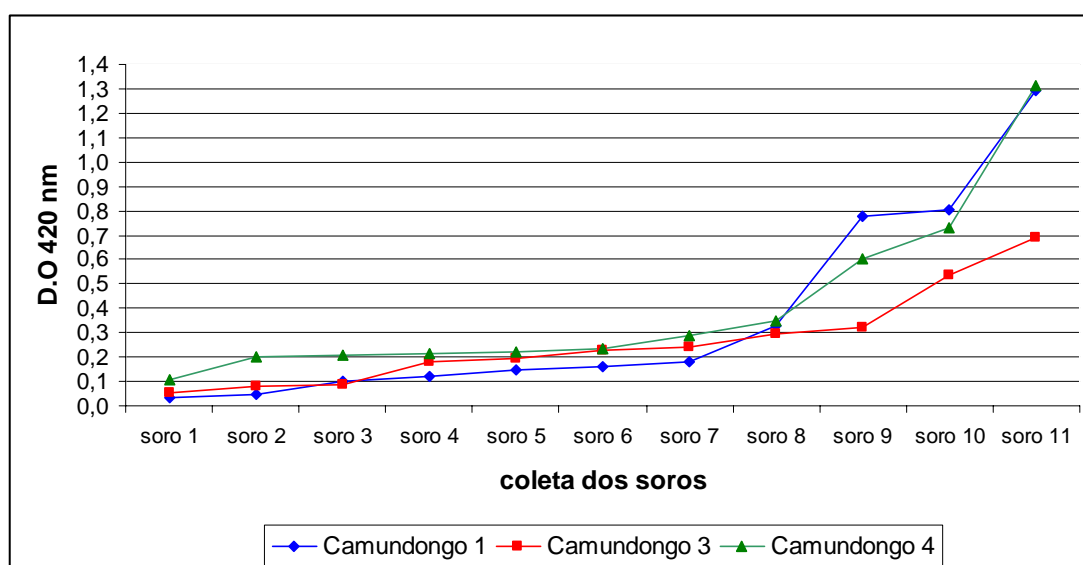


Figura 10 -Titulação dos soros por ELISA, dos três camundongos imunizados com proteínas extraídas do micélio liofilizado de *Crinipellis pernicioso* de Ouro Preto D'Oeste – RO (antígeno), realizado a intervalos de 20 dias. Diluição do soro bruto 1:200.

Os três camundongos não apresentaram redução da resposta imunológica induzida, o que demonstra que não houve tolerância imunológica, como foi demonstrado em trabalho realizado por Leal Júnior (2002) e Duarte et al. (2002).

Assim como os resultados obtidos por Dewey & Brasier (1988) que fizeram imunizações iniciais via intraperitoneal com o micélio liofilizado do fungo *Ophiostoma ulmi* ressuscitado em 300 µL de PBS, mostrando que esta via apresenta ótimos resultados, devido a uma boa resposta de produção de antissoros pelos camundongos BALB/c, foi possível também notar no presente trabalho que a partir do uso da via intraperitoneal com micélio liofilizado de *Crinipellis pernicioso* ressuscitado em 200 µL de PBS notou-se uma grande melhora na produção de anticorpos pelos camundongos.

Os camundongos 1 e 4 obtiveram a melhor resposta às imunizações dadas, podendo ser neste caso também utilizado o camundongo 3 para obtenção de anticorpos monoclonais para auxiliar em estudos epidemiológicos de fungos, através de armadilha caça-esporos, como os realizados por alguns pesquisadores (Bowen et al., 1996; Kennedy et al., 1999; Kennedy et al., 2000).

O método de Western blot demonstrou-se ser capaz de auxiliar na escolha de uma banda que seja comum a várias amostras de *Crinipellis pernicioso* a fim de se utilizar a mesma para produção de anticorpos monoclonais que sejam específicos para uma espécie de patógeno de interesse econômico.

Foi utilizado anticorpo policlonal para revelar a presença das bandas protéicas referentes a *Crinipellis pernicioso* em gel de eletroforese de proteínas totais, em cinco isolados do fungo de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil.

Para tanto foram realizados dois métodos para a revelação de membrana de nitrocelulose para visualização das bandas de proteínas reconhecidas pelo anticorpo policlonal: coloração através de fosfatase alcalina e através de peroxidase.

No método de fosfatase alcalina corado com BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato – B6274) e NBT (Nitro blue tetrazolium – Sigma N5514) foi apresentado resultado mais satisfatório, onde o anticorpo policlonal reconheceu bandas de peso molecular na faixa menor que 30 kDa até 94 kDa, ao passo que o método de peroxidase

corado com 4-Chloro-1-Naphthol, não foi possível a visualização de bandas protéicas e sim um arrasto das amostras sem definição de bandas (Figura 11).

O anticorpo policlonal apresentou-se eficiente no reconhecimento de bandas protéicas em amostras de *Crinipellis pernicioso* isolado de *Theobroma cacao* da Bahia e entre isolados de Solanaceae de Minas Gerais, Bahia e lianas, porém a difícil visualização das bandas marcadas torna difícil a caracterização dos mesmos.

A complexa diversidade de antígenos em fungos freqüentemente resulta em baixa especificidade de anticorpos policlonais (Dewey & Brasier, 1988), porém o uso de anticorpos monoclonais (MAbs) tem sido mais usado no diagnóstico de patógeno de planta, pois apresenta maior especificidade (Werres & Steffens, 1994; Bowen et al., 1996).

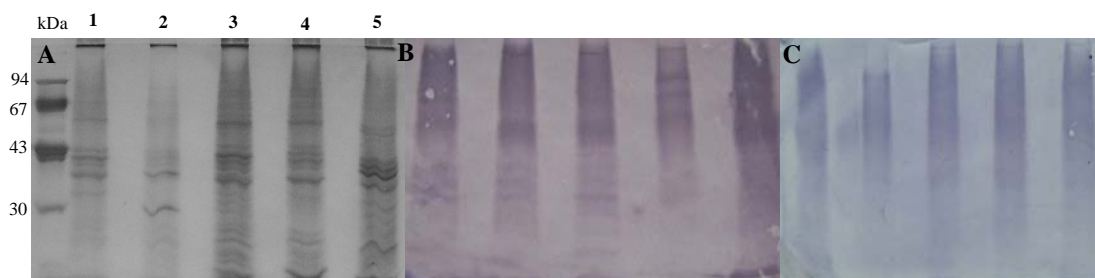


Figura 11 -A) Gel de SDS-PAGE 12 % corado com prata onde temos o padrão de peso molecular em kDa, canaleta 1: isolado de *Theobroma cacao* (BA); 2: isolado de *Solanum paniculatum* (Gandú – BA); 3: isolado de *Solanum lycocarpum* (Coimbra – MG); 4: isolado de Liana (Doação de Harry Evans); 5: isolado de *Solanum cernuum* (Rio Pomba – MG). B) Membrana de nitrocelulose com a mesma sequência de amostras do gel SDS-PAGE sem o padrão de peso molecular corada com NBT e BCIP. C) idem B sendo corada com 4-Chloro-1-Naphthol.

## 5 CONCLUSÕES

Foram detectados três grupos de compatibilidade somática entre os isolados do teste 1 e dois grandes grupos do teste 2, indicando a grande variabilidade do patógeno e sua distribuição correlacionada à região e hospedeiros, podendo ser resultado de co-evolução.

A menor similaridade genética (0,143) foi observada quando se comparou os isolados de *Solanum* (MG) e cacau (Marituba - PA), indicando que a pressão de seleção é diferente nestes locais e foi suficiente para selecionar biótipos muito diferentes.

Notou-se similaridade genética alta entre os isolados de cacau da Bahia, e entre as diversas espécies de Solanaceae dos estados de Minas Gerais e da Bahia, indicando que os isolados de Minas Gerais possam ter origem com os isolados da Bahia, além de mostrar a grande capacidade de dispersão do fungo e sua habilidade em causar infecção em hospedeiros distintos, existindo fatores que contribuem para a dispersão e agressividade do fungo. O vigor de crescimento micelial pode ser um dos fatores, como demonstrado pela velocidade de crescimento e a capacidade de infecção cruzada com diversos hospedeiro.

O uso da técnica de compatibilidade somática apresentou-se eficiente no estudo de diversidade genética de isolados polispóricos de *Crinipellis pernicioso*, demonstrando sua praticidade e seu baixo custo, quando comparados com técnicas moleculares e imunogênicas já usadas para análise de diversidade genética.

Os dados apresentados no presente trabalho evidenciaram a importância das várias técnicas para caracterização dos isolados de *Crinipellis pernicioso*.

**ANEXO**

**A 1 – Soluções utilizadas no preparo e na coloração do gel de eletroforese****Protocolo do gel de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%:**

<b>Lower gel</b> (gel separador) - Acrilamida	9,9 mL
Tampão Lower	10mL
TEMED	20 $\mu$ L
Persulfato de amônio (0,1g e 1mL)	330 $\mu$ L
<b>Upper gel</b> (gel empilhador) -Acrilamida	1mL
Tampão Upper	3,3mL
Água	2mL
TEMED	15 $\mu$ L
Persulfato de amônio (0,1g e 1mL)	200 $\mu$ L

**Solução fixadora para coloração com prata**

40% de Etanol P.A.

10% de Ácido Acético

Preparada em água deionizada.

**Solução incubadora para coloração com prata**

17 g de Acetato de Sódio 3H<sub>2</sub>O

75 mL de etanol 96° GL P.A.

1 g de Tioissulfato de Sódio

1,3 mL de Glutaraldeído a 25% (adicionar somente na hora do uso).

O volume foi completado para 250 mL com água deionizada.

**Solução de prata**

0,25 g de Nitrato de Prata

50 µL de Formaldeído

O volume foi completado para 250 mL com água deionizada.

**Solução Reveladora**

6,25 g de Carbonato de Sódio

25 µL de Formaldeído

O volume foi completado para 250mL com água deionizada.

**Solução “STOP” para coloração com prata**3,65 g de Sódio EDTA 2H<sub>2</sub>O

O volume foi completado para 250 mL com água deionizada.

Obs: é importante manter o volume de 250 mL para gel de 1 mm, pois a redução deste volume interfere na nitidez da coloração.

**Solução estoque para SDS page**

Acrilamida	30,0g
------------	-------

Bis-Acrilamida	0,8g
----------------	------

Água	100mL
------	-------

**Tampão Upper**

Tris-base	30,29g
-----------	--------

SDS	2,0g
-----	------

O volume foi completado para 1000mL e o pH acertado para 6,8.

**Tampão Lower**

Tris-base	90,8g
-----------	-------

SDS	2,0g
-----	------

O volume foi completado para 1000mL e o pH acertado para 8,8.

**Tampão de corrida 4x concentrado**

Tris-base	12,0g
Glicina	57,6g

O volume foi completado para 1000mL e diluído na hora do uso para 1x e acrescentado 1% de SDS.

**Tampão de amostra**

Tampão Upper	25mL
SDS	2,0g
Glicerol	10mL
$\beta$ -Mercaptoetanol	5mL
Solução azul de bromofenol à 0,1%	1mL

O volume foi completado para 100mL de água deionizada.



## A 2 – Soluções utilizadas no preparo do Western Blot

### Tampão de transferência

Tris	2,5g
Glicina	14,4g
Metanol	100mL

O volume foi completado para 1000mL de água deionizada e o pH acertado para 8,3 com NaOH 0,75N e HCl 0,75N.

### Solução de bloqueio

BSA 3%	6,0g
Azida Sódica 0,02%	40mg
PBS 1x	200mL

### Tampão de Bloqueio

PBS 1x  
1% de BSA (Soro Albumina Bovina)

### PBS-T-G

Tween 20 0,05%	0,25mL
Gelatina 0,25%	1,25g
PBS 1x	500mL

**Tampão para PNPP**

Dietanolamina 100mM	10mL
MgCl <sub>2</sub> 5mM	0,1g
NaCl 100mM	5,8g
Água	1000mL

O pH foi acertado para 9,5 com NaOH 0,75N.

**Solução Tris Salina**

NaCl 150mM	0,75g
Tris 50mM	0,6g
Água	1000mL

O pH foi acertado para 7,5 com NaOH 0,75N

**Solução PBS 5x**

NaCl	40,0g
KCl	10,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,75g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g

Completa o volume para 1000mL de água deionizada e ajusta o pH para 7,36 com NaOH 0,75N.

**Solução Reveladora**

NaCl 10mM	0,290g
MgCl <sub>2</sub> 5mM	0,290g
Tris 100mM	6,0g
Água	500mL

Acerta o pH para 9,5 com NaOH 0,75N e estoca à 4°C por até um ano. Utiliza-se 10 mL desta solução em adição com 44µL de NBT e 30 µL de BCIP na hora do uso.

### A 3 – Meios de cultura e tampões

#### Meio de trigo e dextrose

Farelo de Trigo	50,0g
Dextrose	20,0g
Agar	20,0g
Água	1000mL

O farelo de trigo foi cozido em 500mL de água fervente durante 5 min., posteriormente esperou-se esfriar por meia hora e finalmente foi filtrado em gaze e adicionado a dextrose. O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 0,75N.

#### Meio MYE-G

Extrato de Malte	1,7g
Extrato de Levedura	5,0g
Glicerol	50mL
Água	1000mL

#### Meio para produção de basidiocarpos

Agar	20,0g
Água	1000mL

Utilizou-se 8 a 10cm de ramo de cacaueteiro seco e úmido em cada erlenmeyer de 250mL e incubou-se à 22°C. O ramo deve ser colocado próximo ao disco de micélio de *C. pernicioso*.

**Tampão para extração protéica**

Triton	1,5%
Tris-HCl 1M pH 6,8	50mM
$\beta$ -Mercaptoetanol	1%
PVP	0,2%
Água	10mL

O  $\beta$ -Mercaptoetanol deve ser adicionado na hora do uso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 1997. 635p.

ALBA, A. P. C.; DEVAY, J. E. Detecção de antígenos comuns entre *Phthophthora infestans* (Mont.) de Bary e *Solanum* spp. por ELISA indireto. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.375, 1984.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. 20. ed. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALMEIDA, L. C. de; ALMEIDA, C. M. V. C. de; DIAS, L. A. S.; MOTA, J. W. da S. e. Seleção de cultivares clonais superiores de cacauzeiros para Rondônia, Brasil. **Agrotropica**, v.13, p.9-20, 2001.

ALMEIDA, L. C.; ANDEBRHAN, T. **Reação de clones de cacau à *Crinipellis perniciosa***. Belém: CEPLAC/DEPEA, 1984. p.73-146. (Informe de Pesquisas 1984)

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.167-175, 1999.

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer isolates from different hosts. **Plant Pathology**, v.43, p.1020-1027, 1994.

- ANDEBRHAN, T. Características culturais e reações bioquímicas dos isolados de *C. perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.286, 1986.
- ANDEBRHAN, T. Cultural and biochemical reactions of isolates of *Crinipellis perniciosa*, causative agent of witches' broom disease cocoa. In: International Cocoa Research Conference, 10. República de Santo Domingo, 1988. **Proceedings**. Lagos: Cocoa Producers Alliance, 1988. p.363-368.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia brasileira. **Agrotrópica**, v.10, p.49-60, 1998.
- ARRUDA, M. C.C. de; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and Mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, v.107, p.25-37. 2003a.
- ARRUDA, M. C. C. DE; MILLER; R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S.; Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, v.52, p.236–244, 2003b.
- AVIO, L.; GIOVANNETTI, M. The protein pattern of spores of arbuscular mycorrhizal fungi: comparison of species, isolates and physiological stages. **Mycological Research**, v.102, p.985-990, 1998.
- BASTOS, C. N. Efeito da radiação solar e do período pós-germinativo sobre a viabilidade de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.261-263, 1989.

- BASTOS, C. N. Patogenicidade e características do isolado de *Crinipellis pernicioso* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.344-346. 1990.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.963-965, 1986.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Comparação morfológica e fisiológica de *C. pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.202-206, 1988.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on Solanaceous host. **Plant Pathology**, v.34, p.306-312, 1985.
- BASTOS, C. N.; FONSECA, S. E. A.; MELO, W. F. *Mascagnia* cf. *sepium*, cipó nativo da Amazônia Brasileira, hospedeiro de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.504. 1998.
- BOWEN, J. K.; PEART, J.; LEWIS, C. C.; MATTHEWS, P. Development of monoclonal antibodies against the fungi of the "Ascochyta complex". **Plant Pathology**, v.45, p.393-406, 1996.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CLARE, B. G.; FLENTJE, N. T.; ATKINSON, M. R. Electrophoretic Patterns of Oxidoreductases and Other Proteins as Criteria in Fungal Taxonomy. **Australian Journal Biological Science**, v.21, p.275-295, 1968.



- COETZEE, M. P. A.; WINGFIELD, B. D.; HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. **Molecular Ecology**, v.10, p.387-396, 2001.
- CROWTHER, J.R. **ELISA** - theory and practice. **Methods in Molecular Biology**, v.42, 1995, 223 p.
- DAHLBERG, A. Somatic Incompatibility in Ectomycorrhizas. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza**: structure, function, molecular and biotechnology. New York: Springer – Verlag, 1995. p.115-136.
- DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal Botanic**, v.54, p.66-72, 1976.
- DEWEY, F. M.; BRASIER, C. M. 1988. Development of an ELISA for *Ophiostoma ulmi* using antigen-coated wells. **Plant Pathology**, v.37, p.28-35, 1988.
- DUARTE, K. M. R. Anticorpos monoclonais e policlonais para identificação do tobamovírus do mosaico do tomateiro (ToMV) em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Piracicaba, 2000. 87p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DUARTE, K. M. R.; GESZTESI, J. L.; GOMES, L. H.; LOPES, J. D.; TAVARES, F. C. A. Monoclonal antibodies to identify tomato and tobacco mosaic viruses (ToMV and TMV) isolated in Brazil. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.32, p.240-242, 2001.

- DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; ANDRINO, F.G.; LEAL JÚNIOR, G.A.; SILVA, F.H.B.; PASCHOAL, J.A.R.; GIACOMELLI, A.M.B.; TAVARES, F.C.A. Identificação do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) tobamovirus, por meio de anticorpos monoclonais. **Scientia Agricola**, v.59, p.107-112, 2002.
- EVANS, H. C. & BARRETO, R. W. *Crinipellis perniciosa*: a much investigated but little understood fungus. **Mycologist**, v.10, p.58-61, 1996.
- EVANS, H. C. & BASTOS, C. N. Uma reavaliação do ciclo da vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.104, 1979.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.515-523, 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador: I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, v.89, p.185-192, 1978.
- FALEIRO, F.G.; NIELLA, G.R.; CERQUEIRA, A.R.R.N.; DAMACENO, V.O.; GOMES, L.M.C.; FALEIRO, A.S.G. Produção de micélio de *Crinipellis perniciosa* em quatro diferentes meios de cultura, visando extração de DNA. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.312-315, 2004.
- FIGUEREDO, M. B.; ALBA, A. P. C.; OLIVEIRA, A. R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatológicos. **Summa Phytopathologica**, v.3, p.233-259, 1977.
- FILHO, L. P. DOS S.; FREIRE, E. S.; CARZOLA, I. M. Estimativas de perdas de produção de cacau causadas por vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer) na Bahia. **Agrotrópica**, v.10, p.127-130, 1998.

- GARBELOTTO, M.; COBB, F. W.; BRUNS, T. D.; OTROSINA, W. J.; POPENUCK, T.; SLAUGHTER, G. Genetic Structure of *Heterobasidion annosum* in White Fir Mortality Centers in California. **Phytopathology**, v.89, p.546-554, 1999.
- GERALDI, M. A. P.; KIMATI, H. Caracterização patogênica e serológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957) do trigo (*Triticum aestivum* L.). **Summa Phytopathologica**, v.8, p.16-28, 1982.
- GHINI, R.; KIMATI, H. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura da cebola (*Allium cepa* L.). **Summa Phytopathologica**, v.11, p.127-139, 1985.
- GIOVANNETTI, M.; AZZOLINI, D.; CITERNESI, A. S. Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5571-5575, 1999.
- GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P. K. T. The Genetics of Hyphal Fusion and Vegetative Incompatibility in Filamentous Ascomycete Fungi. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.165-186, 2000.
- GOMES, L. M. C.; MELO, G. R. P.; FALEIRO, F. G.; SILVA, S.D.M.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C.; MORAES, M. G.; AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região Sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.377, 2000a. Suplemento
- GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; ARGUESO, J. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F. C. A. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, v.17, n.2, p.217-223, 2000b.
- GRIFFITH, G. W. & HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, v.71, p.278-289, 1994.

- GRIFFITH, G. W.; WILSON, J. F.; HEDGER, J. N. Populations structure, breeding biology and evolutionary relationships in the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis pernicioso*. **International Cocoa Research Conference**, v.11, 1994, p.48-51.
- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.454–500, 1999.
- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.533-546, 1987.
- HÖFLING, J. F.; ROSA, E. A. R.; PEREIRA, C. V.; BORIOLLO, M. F. G.; RODRIGUES, J. A. O. Differentiation and Numerical Analysis of Oral Yeasts Based on SDS-PAGE Profiles. Influence of the Culture Media on the Whole-Cell Protein Extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v.61, p.507-516, 2001.
- JAHNKE, K. D.; BAHNWEG, G. Assessing Natural Relationships in the Basidiomycetes by DNA Analysis. **Transactions of the British Mycological Society**, v.87, p.175-191, 1986.
- JAHNKE, K. D.; BAHNWEG, G.; WORRALL, J. J. Species Delimitation in the *Armillaria mellea* complex by Analysis of Nuclear and Mitochondrial DNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.572-577, 1987.
- JAHNKE, K. D.; HOFFMANN, P.; PACIONI, G. A New Species of *Stropharia* from Southern Italy: *Stropharia halophila* sp. Nov., Characterized by DNA Analysis and Mating Experiments. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.577-580, 1988.

- JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Morphological Characteristics, Extracellular and Intracellular Protein and Enzyme Patterns of Five *Aspergillus* Species. **Food Technology Biotechnology**, v.39, p.333–340, 2001.
- JIMÉNEZ, R. M. P.; DÍAZ, R. M. J.; HERRERA, C. J. L. Somatic incompatibility of *Rosellinia necatrix* on avocado plants in southern Spain. **Mycological Research**, v.106, p.239-244, 2002.
- KENNEDY, R; WAKEHAM, A.J.; BYRNE, K.G.; MEYER, U.M.; DEWEY, F.M. A new method to monitor airborne inoculum of the fungal plant pathogens *Mycosphaerella brassicicola* and *Botrytis cineria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2996-3000, 2000.
- KENNEDY, R; WAKEHAM, A.J.; CULLINGTON, J.E. Production and immunodetection of ascospores of *Mycosphaerella brassicicola*: ringspot of vegetable crucifers. **Plant Pathology**, v.48, p.297-307, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEAL JÚNIOR, G. A. Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso* em tecidos infectados de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros. Piracicaba, 2002. 136p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. DE M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.197-230, 1998.
- LIBERATO, J. R.; CRUZ, C. D.; VALE, F. X. R. DO; ZAMBOLIM, L. Técnicas estatísticas de análise multivariada aplicada à fitopatologia. I. Análise de componentes principais, análise canônica e “Cluster Análise”. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.227-310, 1995.

- LIN, M. T.; ANJOS, J. R.; RIOS, G. P. Agrupamento serológico de 14 isolados de “Cowpea Mosaic Virus – Arkansas Serogroup” obtidos no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, p.418-419, 1980.
- LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Cacao (*Theobroma cacao*) Controle de doenças. In: Vale, F. X. R.; Zambolim, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. p.611-656.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H. Diferenciação sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* de pimentão e de Tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.322-324, 1987.
- MATTJUS, P.; TURCQ, B.; PIKE, H. M.; MOLOTKOVSKY, J. G.; BROWN, R. E. Glycolipid intermembrane transfer is accelerated by HET-C2, a filamentous fungus gene product involved in the cell-cell incompatibility response. **Biochemistry**, v.42, p.535-542, 2003.
- MAY, G. Somatic incompatibility and individualism in the coprophilous basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.443-451, 1988.
- McCABE, P. N.; GALLACHER, M. P.; DEACON, J. W. Evidence for segregation of somatic incompatibility during hyphal tip subculture of *Rhizoctonia solani* AG 4. **Mycological Research**, v.103, p.1323-1331, 1999.
- McGEARY, F. M.; WHEELER, E. J. Growth rates of, and micelial interactions between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. **Plant Pathology**, v.37, p.489-498, 1988.
- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V. de; CASTRO, H. A. de; CARVALHO, G. A. de; SILVA, L. H. C. P. da. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.523-527, 1999.

- NIELLA, G. R. Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L. Lavras, 2000. 75p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2000a.
- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A. de; FIGUEIRA, A. R.; SILVA, S. D. M.; ARAÚJO, I. S.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, F. G. Diversidade genética de isolados monospóricos de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes estados do Brasil utilizando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.25 (Suplemento), p.400, 2000b.
- NOVAK, L. A.; KOHN, L. M. Electrophoresis of major proteins in stromata of members of the sclerotiniaceae. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.639-647, 1998.
- PAIVA, E.; PEIXOTO, M. J. V. DE V. D.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Diferenciação imunológica de raças fisiológicas de *Colletotrichum graminicola* do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.299-302, 1990.
- PARK, C. S. SAKAGUSHI, K.; KAKINUMA, M.; AMANO, H. Comparison of electrophoretic patterns of soluble proteins and isozymes of the red rot disease fungus *Pythium* sp. isolated from *Porphyra yezoensis* from Korea and Japan. **Fisheries Science**, v.66, p.1158-1162, 2000.
- PEREIRA, J. L.; BARRETO, R. W.; BEZERRA, J. L. Distribuição de *Crinipellis pernicioso* em solanáceas selvagens no Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.295, 1997.
- PEREIRA, J. L.; BARRETO, R. W.; BEZERRA, J. L. Ocorrência de *Crinipellis* sp. em *Solanum mauritianum*. **Fitopatologia Brasileira**. v.23, p.268, 1998.

- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J. M. DE; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau. **Agrotropica**, v.1, p.79-81, 1989.
- PEREZ, J. O. Caracterização de isolados de *Crinipellis pernicioso*, indução de resistência à vassoura-de-bruxa no cacau e análise de peroxidase na interação planta-patógeno. Lavras, 2002. 81p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.
- PETERSEN, R. H. There's more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the Agaricales. **Mycologia**, v. 87, p. 1-17, 1995.
- PILOTTI, C. A.; SANDERSON, F. R.; AITKEN, E. A. B. Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense*. **Mycological Research**, v.106, p.1315-1322, 2002.
- PIRES, J. L.; FALEIRO, F. G.; YAMADA, M. M.; LOPES, U. V.; BAHIA, R. C. S.; FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, R. C. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.347, 2001. Suplemento
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.573-594, 1996.
- RESENDE, M. L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V.; DIANESE, J. L. *Crinipellis pernicioso* causando vassoura-de-bruxa em lobeira (*Solanum lycocarpum*) no Distrito Federal e no estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.301. 1997.



- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.88-91. 2000.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software. 1992. 223p.
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região Sul da Bahia. **Agrotrópica**, v.4, p.17-20, 1992.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. Seleção de variáveis na avaliação de progênies de cacauero (*Theobroma cacao*) quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, v.10, p.87-94, 1998.
- SILVEIRA, S. F. & ALFENAS, A. C. Análise de Proteínas e Isoenzimas de Isolados de *Rhizoctonia* spp. Patogênicos a *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.33-41, 2002.
- SUWANDI; HAMIDSON, H.; NAITO, S. Distribution of *Rigidoporus lignosus* genotypes in a rubber plantation, as revealed by somatic compatibility. **Mycoscience**, v.45, p.72-75, 2004.
- SWEDJEMARK, G.; JOHANNESSON, H.; STENLID, J. Intraspecific variation in *Heterobasidion annosum* for growth in sapwood of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. **European Journal of Forest Research**, v.29, p.249-258, 1999.
- THOMSEN, I. M.; KOCH, J. Somatic compatibility in *Amylostereum areolatum* and *A. chailletii* as a consequence of symbiosis with siricid woodwasps. **Mycological Research**, v.103, p.817-823, 1999.

- VAN DER PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 349 p.
- VASCONCELOS, M. F. R.; LIMA, J. A. A. Purificação e sorologia de raças de “Cowpea Severe Mosaic Vírus” isoladas de 4 espécies de leguminosas. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.534-535, 1981.
- VASILIAUSKAS, R. & STENLID, J. Population structure and genetic variation in *Cylindrobasidium evolvens*. **Mycological Research**, v.102, p.1453-1458, 1998.
- VIANA JÚNIOR, C. A.; RESENDE, M. L. V. de; PEREZ, J. O.; ARAÚJO, A. G. de. Compatibilidade somática e patogenicidade de *Crinipellis* sp. **Agrotrópica**, v.14, p.141-150, 2002.
- VIANA JÚNIOR, C. A. da Cruz. Compatibilidade somática e patogenicidade de *Crinipellis* sp. Lavras, 2001. 61p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Lavras, 2001.
- WERRES, S.; STEFFENS, C. Immunological techniques used with fungal plant pathogens: aspects of antigens, antibodies and assays for diagnosis. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.615-643, 1994.
- WHEELER, B. E. J. **An introduction to plant disease**. London: John Wiley, 1976. 374p.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao* L.) **Plant Pathology**, v.37, p.475-488, 1988.
- YAMADA, M. M.; LOPES, U. V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches’ broom in plantations of Bahia, Brazil. **Agrotrópica**, v.11, p.83-88, 1999.

YAMADA, M. M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, v.10, p.123-126, 1998.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)