

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Avaliação da variabilidade de biotipos de *Moniliophthora perniciosa*

Lia Matelli Garcia

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Lia Matelli Garcia
Bióloga

Avaliação da variabilidade de biotipos de *Moniliophthora perniciosa*

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

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

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

Garcia, Lia Matelli

Avaliação da variabilidade de biotipos de *Moniliophthora perniciosa* / Lia Matelli Garcia . - -
Piracicaba, 2009.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Fungos Fitopatogênicos 2. Meio de Cultura 3. Pigmentos 4. Proteínas 5. Sequenciamento genético 6. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDD 633.74
G216 a

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

DEDICATÓRIA

*À minha mãe **Luciana** , por ser meu porto seguro, minha melhor amiga e
por sempre estar presente em minha vida;*

*Ao meu pai **José Augusto** (in memoriam), por estar vivo em meu coração;*

*Aos meus irmãos **Alessandra** e **Ricardo**, por serem mais um motivo de
alegria em minha vida;*

Por vocês tudo vale a pena...

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por iluminar a minha vida;

A minha mãe, aos meus irmãos, minha avó e minhas tias pelos momentos felizes que sempre que possível, passamos juntos;

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

Ao Dr. Gildemberg Amorin Leal Junior, pela paciência, apoio e ensinamentos que jamais esquecerei e sempre estarão comigo por toda a minha vida;

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes, pelo apoio, amizade e paciência;

As minhas queridas amigas Marina e Elisa, por sempre estarem ao meu lado nos momentos alegres e difíceis;

Ao meu amigo Vinicius (Grave) por ter me ajudado com a análise estatística, e principalmente pelo apoio e sua amizade;

Aos amigos que adquiri nesta caminhada, Ana Maria, Marcos Gorga, Thiago Gumiere, Felipe Andrino, Ana Carolina, Juninho, Edson, Marcus Venícius;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À Coordenação do PPG- Microbiologia Agrícola e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade da realização deste projeto;

Aos colegas do PPG-Microbiologia Agrícola, principalmente, Giovana, Cris, Julia, Laura, Carlão, Bruna;

A todos os amigos cujos nomes não foram citados, gostaria de agradecer o carinho e o incentivo;

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão de Literatura	19
2.1.1 Aspectos gerais da doença vassoura-de-bruxa.....	19
2.1.1.1 Sintomas e ciclo da doença.....	20
2.1.1.2 Controle	22
2.1.2 Variabilidade genética dentro da população de <i>M. perniciosa</i>	24
2.2 Material e Métodos	31
2.2.1 Isolados estudados.....	31
2.2.2 Análise Molecular através da região 28S rDNA.....	33
2.2.2.1 Extração do DNA dos isolados	33
2.2.2.2 Amplificação do DNA via a reação em cadeia da polimerase (PCR)	34
2.2.2.3 Purificação e quantificação do produto de PCR para Reação de Sequenciamento.....	34
2.2.2.4 Sequenciamento e Análise das Sequências.....	35
2.2.3 Avaliação de padrões protéicos através de SDS-PAGE.....	35
2.2.4 Teste de Incompatibilidade Somática.....	36
2.2.5 Avaliação da taxa de crescimento	37
2.2.6 Avaliação de auxotrofia para aminoácidos.....	37
2.2.7 Avaliação do efeito de aminoácidos sobre o desenvolvimento de <i>M. perniciosa</i>	38
2.2.8 Avaliação do efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento de <i>M. perniciosa</i>	38
2.2.9 Avaliação da taxa de crescimento e produção de pigmentação.....	39
2.2.10 Análise estatística.....	39
2.3 Resultados e Discussão	41
2.3.1 Avaliação de seqüências parciais da região 28S rDNA	41
2.3.2 Perfis protéicos por SDS-PAGE	43
2.3.3 Teste de Incompatibilidade somática entre isolados de <i>M. perniciosa</i>	46

2.3.4 Crescimento dos isolados de <i>M.perniciosa</i> em meio rico (TDA).....	49
2.3.5 Efeito da ausência de aminoácidos no desenvolvimento dos isolados de <i>M. perniciosa</i>	52
2.3.6 Efeito de aminoácidos no desenvolvimento de <i>M. perniciosa</i>	56
2.3.7 Efeito de diferentes fungicidas no desenvolvimento de <i>M. perniciosa</i>	59
2.3.8 Efeito de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio e dois regimes de luz em <i>M. perniciosa</i>	65
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Avaliação da variabilidade de biótipos de *Moniliophthora perniciosa*

O basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é conhecido por causar a doença vassoura-de-bruxa no cacau (*Theobroma cacao*), responsável por grandes perdas de produção nessa cultura. A população de *M. perniciosa* apresenta variabilidade devido à sua capacidade de colonização de outras espécies de plantas, o que permite a identificação de biótipos e conseqüente agrupamento de isolados com base no hospedeiro. A caracterização de biótipos do fungo contribui para melhor conhecimento da estrutura populacional e sua dispersão, o que é importante para utilização em programas de melhoramento. Com esse objetivo foi avaliada a variabilidade genética e fisiológica de isolados do fungo correspondentes a três biótipos considerando a análise de taxas de crescimento pelo desenvolvimento micelial em diferentes meios e ambientes de cultivo *in vitro*, como a incorporação de cisteína, metionina e lisina e das fontes de nitrogênio tartarato de amônio e nitrato de potássio, iluminação, suscetibilidade a fungicidas, compatibilidade somática (SCG – Grupo de Compatibilidade Somática), análise de perfis protéicos por SDS-PAGE e seqüenciamento parcial do 28S rDNA. A história evolutiva do patógeno não está registrada em seqüências de genes ribossomais e proteínas totais. Além disso, crescimento e produção de pigmentos são características compartilhadas pelos biótipos, não sendo fatores primários para adaptação do patógeno, porém com provável papel na colonização do hospedeiro.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, Compatibilidade somática, Perfis protéicos, 28S rDNA

ABSTRACT

Evaluation of *Moniliophthora perniciosa* biotypes variability

The Basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is known as the pathogen for witches' broom disease in cocoa (*Theobroma cacao*), responsible for large yield losses. Population of *M. perniciosa* presents variability due to its ability to colonize other plant species, which allows biotype identification and strains grouping, based upon the host species. Fungi biotype characterization contributes to the knowledge of population and its dispersion and epidemiological methods, important for breeding programs. To aim the genetic and physiological variability of three strains, characteristics as growing rates, measured by the mycelia spreading at different culture media and different culture conditions *in vitro*, cysteine, methionine, lysine, nitrogen sources ammonium tartrate and potassium nitrate incorporation, light, fungicide susceptibility, somatic compatibility (SCG), protein patterns by SDS-PAGE and partial sequencing of rRNA 28S region were done. The evolutionary history of it is pathogen is not printed into ribosomal genes sequences and total proteins. Besides that, growing and dye production are characteristics shared by the biotypes and can not be a primary adaptation factor but it can play a role in the host colonization process.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*, Somatic compatibility, protein patterns, 28S rDNA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Árvore filogenética baseada na seqüência parcial da subunidade grande do rDNA (28S) dos 21 isolados de *Moniliophthora perniciosa* estudados, mostrando a proximidade/distância entre eles. A árvore consenso foi criada por critério de parcimônia e valores de *bootstraps* (1000) aparecem nos nós da árvore.....42
- Figura 2 – Padrões protéicos em gel de SDS-PAGE corado com prata. P: padrão.....43
- Figura 3 – Dendograma dos isolados baseado nos perfis protéicos dos isolados de *M. perniciosa* (valores de similaridade).....45
- Figura 4 – Fotos representativas das reações de compatibilidade (A) e incompatibilidade somática (B) consideradas para determinação da reação cruzada entre 21 isolados avaliados dos 3 biotipos *M. perniciosa*.....47
- Figura 5 – Dendograma baseado em teste de compatibilidade somática entre isolados de *M. perniciosa* (valores de similaridade).....48
- Figura 6 - Fotos representativas da produção de pigmentos pelos isolados C-AM-1 (A e B) e C-AM-3 (C e D), comparando TDA (A e C esquerda) com meio mínimo (B e D).....55
- Figura 7 – Fotos representativas da produção de pigmentos por isolados de *M. perniciosa* em meio mínimo acrescido de lisina (A), metionina (B) e cisteína (C).....58
- Figura 8 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosa* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de.....60

- Figura 9 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. pernicioso* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de Fungiscan.....61
- Figura 10 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. pernicioso* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 100 mg. L⁻¹ de Bim.....62
- Figura 11 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. pernicioso* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de Persist.....63
- Figura 12 – Produção de pigmentos por isolados de *M. pernicioso* em cultivos de TDA na presença do Fungicida Benlate (A, 1000 mg.L⁻¹), Fungiscan (B,1000 mg.L⁻¹) e Persist (C,1000 mg.L⁻¹).....65
- Figura 13 – Produção de pigmentos dos isolados de *M. pernicioso* em meio yeast carbon base acrescidos de 4 mM Nitrato de potássio (A e C) e 2 mM de Tartarato de amônio (B e D) mantidos no escuro (A e B) e sob fotoperíodo (C e D).....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Lista de isolados de *Moniliophthora perniciosa* utilizados no trabalho com a especificação do código do estoque de origem, referência de biotipo, hospedeiro, estado brasileiro onde foi feita a coleta e o código recebido neste trabalho (A letra C refere-se aos isolados do biotipo Cacau, a S aos isolados do biotipo Solanaceae e a letra L ao de Liana. As letras em maiúscula que segue a designação de Biotipo referem-se ao estado de origem).....32
- Tabela 2 – Valores médios do crescimento micelial (cm) e avaliação morfológica das hifas após 10 dias de cultivo em meio TDA.....52
- Tabela 3 – Crescimento micelial (cm) e morfologia da colônia dos 21 isolados com 10 dias de cultivo em meio TDA e MM.....53
- Tabela 4 – Crescimento micelial (cm) após 10 dias de cultivo dos isolados do biotipo Liana (L), Cacau (C) e Solanácea (S) de *M. perniciosa* em meio mínimo (MM) e meio mínimo (MM) acrescido dos aminoácidos lisina (Lis), metionina (Met) e cisteína (Cist).....57
- Tabela 5 - Valores de inibição em porcentagem transformados em arc sen $\sqrt{0}$64
- Tabela 6 – Notação da produção e tonalidade de pigmentos dos isolados do biotipo liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosa* em meio Yeast Carbon Base acrescidos de 2mM Nitrato de potássio e 2 mM de Tartarato de amônio mantidos no escuro e sob fotoperíodo (12h).....68
- Tabela 7 – Comparação da produção de pigmentos pelos isolados de *M. perniciosa* nos tratamentos onde esta foi observada.....71

1 INTRODUÇÃO

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora é o agente causal da doença vassoura-de-bruxa do cacau, uma das três principais doenças que causam maiores perdas de produção nesta cultura. A doença é restrita à América Latina, assim como a monilíase ou *frosty pod*, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, não estando presente na Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões, a maior região produtora de cacau do mundo. O fungo é endêmico da região amazônica e foi descrito há anos temendo-se sua ocorrência nas plantações comerciais da Bahia, onde foi identificada pela primeira vez, em 1989, e em dez anos causou uma queda de 75% na produção de cacau. Há esforços para evitar que *Moniliophthora perniciosa* seja disseminado para regiões produtoras onde ainda é ausente, o que pode afetar um total de 3,2 milhões de toneladas de cacau que é produzido por todo trópico úmido, especialmente nos países produtores africanos responsáveis atualmente por cerca de 65 a 70% da produção mundial (HEBBAR, 2007).

O controle da doença é difícil e atualmente são combinadas diferentes práticas de manejo, como a poda fitossanitária, aplicação de fungicidas, controle biológico e uso de variedades tolerantes e resistentes. Na Bahia, a maior região produtora de cacau do Brasil, a distribuição uniforme de chuva ao longo do ano favorece a constante formação de basidiomas pelo patógeno e re-infecções sucessivas, o que eleva os custos das práticas de controle, principalmente da poda fitossanitária e das aplicações de fungicidas. O controle da doença em cultivos comerciais é ainda mais difícil pela inexistência de plantas geneticamente resistentes aos isolados de *Moniliophthora perniciosa*, o que adicionalmente dificulta o melhoramento visando à obtenção de cacau geneticamente resistentes aos vários isolados do biotipo-C do fungo.

Devido à capacidade de colonizar várias plantas hospedeiras há alta diversidade genética em *M. perniciosa*, que pode ser identificada nos biotipo B, que afeta *Bixa orellana*, biotipo L, que afeta trepadeiras lianas, biotipo S, que afeta a família Solanaceae, e biotipo C, que afeta a família Malvaceae, incluindo o cacau. Dentro de cada biotipo há variabilidade, cuja base genética e fisiológica ainda requer melhor entendimento da estrutura da população e identificação de marcadores genéticos importantes na relação patógeno-hospedeiro com vistas ao melhoramento.

Tendo em vista que a maioria dos estudos realizados sobre a diversidade de *M. perniciosa* não reúnem resultados que relacionem morfologia, fisiologia e genética deste fungo, o presente

trabalho teve por objetivo avaliar a variabilidade entre diferentes isolados dos biotipos C, S e L de *M. pernicioso* por meio de seqüenciamento de parte da subunidade 28S rDNA para comparação filogenética, de análise dos padrões protéicos totais (SDS-PAGE), de teste de compatibilidade somática, da utilização diferentes meios de cultura, estudo de auxotrofia e efeitos de aminoácidos no desenvolvimento dos isolados, além de respostas a diferentes fungicidas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 Aspectos gerais da doença vassoura-de-bruxa

Moniliophthora perniciosa (Stabel) Aime e Phillips-Mora, formalmente *Crinipellis perniciosa* (Basidiomycota, Agaricales, Tricholomataceae) é um fungo patogênico hemibiotrófico causador da Vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao*), doença que acarreta drástica queda na produção desta cultura, fonte de amêndoas usadas na indústria de chocolate (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; HEBBAR, 2007; KILARU; HASENSTEIN, 2005; SHAW; VANDENBON, 2007).

A vassoura-de-bruxa é a doença mais destrutiva do cacau, causando danos que afetam diretamente a produção, sendo o ataque, em alguns casos, tão severo que chega a dizimar totalmente as plantações (ALBUQUERQUE et al., 2005).

A princípio acreditava-se que esta doença havia se originado no Suriname, porém expedições indicaram que ela surgiu no Vale do Amazonas, onde *Moniliophthora perniciosa* parece ter co-evoluído com *Theobroma cacao* (ALBUQUERQUE et al., 2005; PLOETZ et al., 2005). Estudos indicam que o patógeno foi introduzido nas plantações da Bahia a partir da região amazônica (ANDEBRHAN et al., 1999; RINCONES et al., 2006).

Além do Brasil, a vassoura-de-bruxa ocorre em todos os países produtores de cacau da América do Sul, e nas ilhas do Caribe e no Panamá (ALBUQUERQUE et al., 2005). Apesar de hoje limitada a esta região, a doença é uma ameaça potencial às outras regiões produtoras, onde o cultivo é feito tipicamente por pequenos produtores, com tecnologia limitada, o que faz deles particularmente suscetíveis a esta doença (PLOETZ, 2007; RINCONES et al., 2006).

A vassoura-de-bruxa prejudicou a produção no Brasil primeiramente em Rondônia nos anos 70 e então na Bahia, onde foi identificada pela primeira vez em 1989 (PEREIRA et al., 1989; PLOETZ, 2007). Devido a esta doença, o Brasil, de grande exportador de amêndoas de cacau, passou a importador, para suprir as necessidades das indústrias de moagem aqui instaladas, sendo hoje o quinto produtor mundial, tendo ocupado a primeira e segunda posição durante a maior parte do século XX (PLOETZ, 2007; RESENDE et al., 2007).

O enorme declínio da produção de cacau no Brasil foi um alerta para a necessidade de a indústria esforçar-se no controle da doença, além de ser uma indicação clara de que medidas

devem ser tomadas para que esta ou outras doenças exóticas não cheguem até o oeste da África, maior região produtora hoje de cacau do mundo, ou sudeste da Ásia, região que vem tendo crescente importância (HEBBAR, 2007).

2.1.1.1 Sintomas e ciclo da doença

A vassoura-de-bruxa afeta principalmente tecidos meristemáticos em desenvolvimento, tais como gemas vegetativas, almofadas florais e frutos jovens, provocando sintomas característicos que se manifestam em forma de hipertrofias e outras anomalias como superbrotamento, com proliferação de gemas laterais e engrossamento de tecidos infectados, formando as chamadas vassouras (ALBUQUERQUE et al., 2005; LUZ et al., 2006).

Frutos infectados exibem uma variedade de sintomas, dependendo do tipo de infecção e idade, podendo apresentar forma de “morango”, “cenoura”, ou simplesmente tornarem-se inchados e deformados, com amadurecimento precoce. O fungo coloniza primeiramente os tecidos internos do fruto e, quando os sintomas externos aparecem, as sementes já estão impróprias para o consumo, pois se apresentam invadidas pelo micélio e fortemente aderidas entre si (ALBUQUERQUE et al., 2005).

A entrada de esporos do patógeno na planta se dá de maneira direta ou através de aberturas estomatais. Nenhuma estrutura especializada, comumente utilizada por outros fungos para infecção, como apressório ou haustório, é conhecida para *Moniliophthora perniciosa* (KILARU; HASENSTEIN, 2005; MUSE et al., 1996; SILVA; MATSUOKA, 1999; SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989).

O patógeno apresenta duas fases distintas durante a colonização da planta. Na primeira, chamada de fase biotrófica, o fungo apresenta hifa primária (micélio biotrófico), relativamente larga (5 a 20 μm), sem grampos de conexão, que cresce intercelularmente sem causar a morte do tecido, formando a chamada vassoura-verde. Após dois a três meses o micélio passa por uma fase de transição (dicarionização), passando para a fase necrotrófica/saprofítica, com hifa secundária (micélio saprofítico) mais fina (1,5 a 3,0 μm), hialina, dicariótica, com grampos de conexão, que coloniza o tecido da planta intra e intercelularmente causando necrose e morte de tecidos infectados distante do local original de infecção, formando assim a vassoura-seca (ALBUQUERQUE et al., 2005; CALLE; COOK; FERNANDO, 1982; EVANS; BASTOS, 1979;

FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991; KILARU; HASENSTEIN, 2005; MEINHARDT et al., 2006; SCARPARI et al., 2005; SHAW; VANDENBON, 2007; SILVA; MATSUOKA, 1999).

Os mecanismos envolvidos na mudança das fases do fungo ainda não são conhecidos, mas esta mudança coincide com o fim do desenvolvimento da vassoura-verde e subsequente senescência da mesma. Inúmeros metabólitos do cacau, como carboidratos específicos, parecem influenciar na manutenção ou mudança da fase biotrófica de *M. pernicioso* (MEINHARDT et al., 2006; SCARPARI et al., 2005). Meinhardt et al. (2006) desenvolveram um meio de cultura definido que previne a dicarionização do micélio, onde o glicerol, que é encontrado em grande quantidade nas vassouras-verdes, contudo perdido nas vassouras-secas, parece ser o composto chave para a manutenção do fungo na fase biotrófica. Adicionalmente, Kilaru e Hasenstein (2005), estudando a interação de *M. pernicioso* com folhas de cacau, concluíram que esta transição está correlacionada com o acúmulo de nutrientes.

O ciclo de vida de *M. pernicioso* é completado inteiramente no hospedeiro durante alternância de seca e chuva quando a hifa saprofítica eventualmente produz uma coloração rósea e basidiocarpos largamente lamelados, com diâmetro variando de 5 a 25 mm, nos tecidos da vassoura morta. (ALBUQUERQUE et al., 2005, ROCHA; WHEELER, 1985). Esporos hialinos e elipsóides liberados têm a habilidade de infectar qualquer tecido meristemático de cacau e são os únicos propágulos infectivos deste patógeno (PURDY; SCHMIDT, 1996).

A frequência e duração das chuvas são fatores importantes na produção de basidiomas, sendo ideal precipitação anual de 1500 a 2000 mm, temperatura de 24 a 26°C e umidade relativa do ar de 80 a 90%. A liberação e a disseminação dos basidiósporos ocorrem frequentemente durante a noite e estes só germinam na presença da água, 1 hora após a deposição, pois em superfícies secas perdem rapidamente a viabilidade (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Na Amazônia brasileira, as infecções ocorrem durante o período chuvoso que vai de novembro a junho, enquanto nos meses de julho a setembro não ocorrem novas infecções, impedindo a formação de novos basidiomas. Na região cacauzeira do sul da Bahia, devido à distribuição uniforme das chuvas durante o ano, as infecções não são interrompidas, o que contribui para uma maior intensidade da doença quando comparada com a Amazônia (ALBUQUERQUE et al., 2005).

2.1.1.2 Controle

O complexo patossistema da vassoura-de-bruxa, associado com sua epidemiologia, dificultam a obtenção de um padrão de recomendação para controle da doença, devendo-se sempre considerar a região, o nível da plantação e as questões econômicas, que incluem custos e disponibilidade de laboratórios, intensidade de manejo, tamanho da fazenda e preço das amêndoas de cacau (PURDY; SCHMIDT, 1996).

O manejo integrado da vassoura-de-bruxa combina quatro princípios: manejo cultural (poda fitossanitária), controle químico, controle biológico e controle genético (ALBUQUERQUE et al., 2005). Em geral, a poda fitossanitária e o uso de fungicidas caros são as únicas saídas disponíveis (HEBBAR, 2007).

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) tem recomendado para as condições da Bahia quatro remoções anuais e seis aplicações de óxido cuproso, a intervalos mensais (3g/planta) ou três aplicações, a intervalos bimestrais (6g/planta), para proteção de frutos. Entretanto, o alto custo dessas medidas tem desestimulado os agricultores a adotá-las e levado alguns pesquisadores a testar diferentes doses deste fungicida associadas a frequências variadas de remoção (ALMEIDA; ALMEIDA; BEZERRA, 2002; ALMEIDA; COSTA; MENDONÇA, 2003). Além disso, a poda fitossanitária deve ser realizada durante a estação de seca e frequentemente, uma segunda poda é requerida para remover vassouras de infecções latentes e vassouras perdidas na primeira poda. O material podado deve ser removido e queimado a não ser que seja cortado e coberto com restos de folhas (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Apesar de tais recomendações, algumas fazendas não a realizam, ou as realizam de maneira incorreta, e as árvores podem passar de 5 a 10 metros, o que impossibilita a poda e aplicação de fungicidas, mantendo assim uma fonte constante de inóculo. Além disso, muitas vezes os fungicidas químicos são usados tardiamente, são mal aplicados, ou têm sua eficácia limitada pelas altas e frequentes precipitações nos trópicos úmidos (ALBUQUERQUE et al., 2005; HEBBAR, 2007).

O controle biológico constitui uma linha promissora. A descoberta, de um saprófito natural, *Trichoderma stromaticum*, que é agente de controle biológico, tem dado novo ímpeto ao manejo integrado da vassoura-de-bruxa com potencial para a intervenção não química. O fungo tem atividade micoparasítica contra *M. perniciosa*, possivelmente devido à produção de enzimas

hidrolíticas e metabólicos anti-fúngicos (ALBUQUERQUE et al., 2005; De MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004; HEBBAR, 2007). Contudo, apenas poucos estudos publicados avaliaram o potencial de biocontrole contra doenças de frutos do cacau, e poucos microrganismos têm sido inteiramente comercializados. Isolados de *Trichoderma* têm sido avaliados quanto a seus potenciais em produzirem enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases, β -glucanases, amilases e celulasas, assim como estas enzimas vêm sendo purificadas e caracterizadas (De MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2003, 2004; De MARCO et al., 2000).

Os programas de melhoramento do cacauero, visando à obtenção de clones resistentes a vassoura-de-bruxa, tiveram início em Trinidad, em meados do século XX. Nas primeiras seleções, a prioridade foi a obtenção de genótipos com resistência vertical ou completa a *M. pernicioso*, tendo como destaque os germoplasmas SCA6 e SCA12 (Scavina), que se comportaram como resistentes por vários anos em Trinidad. Contudo, quando plantados em larga escala no Equador, país onde a doença é mais agressiva, tiveram a resistência quebrada em curto período de tempo. A resistência tem se provado inadequada ou instável, devido às reações adversas de suscetibilidade e resistência destes acessos em diferentes regiões e da existência de variações genéticas na população de *M. pernicioso*, com diferentes formas patogênicas e patótipos reconhecidos (ALBUQUERQUE et al., 2005; PAIM et al., 2006; PURDY; SCHMIDT, 1996). Shaw e Vandenberg (2007), ao testar a interação de diferentes clones de *T. cacao* contra diferentes isolados de *M. pernicioso*, demonstraram a existência de interações específicas entre clones e isolados.

Mais recentemente, genótipos chamados CAB (Cacao from Brazilian Amazon) foram coletados na Amazônia Brasileira, que abriga grande parte da diversidade genética do cacau. Estes acessos apresentam larga variação em termos de vigor, características morfológicas, produtividade e resistência à doença e são mantidos como parte do germoplasma da CEPLAC (PAIM et al., 2006).

Existem alternativas de controle menos usuais, como a tentativa de escape da doença, onde a polinização manual das flores é calculada de forma que o fruto se desenvolva durante o período de seca, quando o inóculo não é abundante (PURDY; SCHMIDT, 1996) e o uso de extratos vegetais (RESENDE et al., 2007).

2.1.2 Variabilidade genética dentro da população de *M. perniciosa*

O patógeno *Moniliophthora perniciosa* apresenta multiplicação sexuada, o que favorece o aparecimento de novos biotipos do patógeno (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998). Variações dentro de sua população são evidentes pela adaptação a diferentes espécies de plantas (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Quatro biotipos de *Moniliophthora perniciosa* são reconhecidos de acordo com seus hospedeiros. Os biotipos C, B, L e S, respectivamente, afetam a família Malvaceae (incluindo cacau), *Bixa orellana*, trepadeiras lianas e a família Solanaceae (ARRUDA et al., 2003a; GRAMACHO et al., 2007; GRIFFITH; HEDGER, 1994a; PLOETZ et al., 2005; PURDY; SCHMIDT, 1996; RINCONES et al., 2006).

Na natureza o cacau cresce em baixa densidade no meio de florestas tropicais, onde brotos e flores jovens raramente são encontrados, apresentando, portanto, menos tecidos meristemáticos que plantações desta cultura. Desta forma, é difícil conceber como o biotipo C, em sua forma atual, possa ter existido antes do advento do cultivo do cacau. Além disso, a baixa variabilidade geográfica encontrada neste biotipo, comparada com a encontrada no biotipo L, sugere que o biotipo C tenha uma origem recente e que novas pressões de seleção e a monocultura do cacau possam ter levado a sua evolução (GRIFFITH et al., 1994).

Tanto o biotipo C quanto o biotipo S causam sintomas característicos em seus hospedeiros e exibem homotalismo primário enquanto o biotipo L geralmente não causa sintomas e tem uma estratégia de reprodução cruzada (heterotalismo) (RINCONES et al., 2006). Mecanismos de reprodução cruzada são largamente encontrados entre basidiomicetos, e são considerados como característica ancestral dentro deste grupo. O fato do biotipo S se mostrar geneticamente mais similar ao biotipo L que ao biotipo C, sugere que, apesar das similaridades na produção de sintomas, os dois biotipos homotáticos evoluíram separadamente, provavelmente a partir do biotipo L, ou de biotipos ainda não conhecidos similares a este último (GRIFFITH et al., 1994).

Além da variabilidade entre isolados de diferentes hospedeiros, variabilidade entre isolados de diferentes regiões geográficas também vem sendo encontradas (ANDEBRHAN; FURTEK, 1994; ARRUDA et al., 2003b; NIELLA et al., 2000; OLIVEIRA; GRAMACHO; SILVA, 2005; PLOETZ et al., 2005). O estudo de Andebrhan e Furtek (1994), por meio do uso de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), indicou que a proximidade entre as regiões

de origem dos isolados parece ser mais importante que as espécies hospedeiras na determinação das relações genéticas entre os mesmos.

Isolados de *M. pernicioso* mostraram diferenças morfológicas e patológicas quando cultivados em diferentes meios de cultura, regimes de luz e temperaturas (BASTOS; ANDEBRHAN; ALMEIDA, 1988). McGeary e Wheeler (1988) estudaram o comportamento de 87 isolados de *M. pernicioso* e baseados em taxa de crescimento em meios de cultura com diferentes composições e reações de incompatibilidade somática, puderam agrupá-los de acordo com sua origem geográfica. Laker (1989) comparou características do micélio, taxa de crescimento e incompatibilidade somática em meio de cultura, dividindo a maioria dos isolados (todos da ilha de Trinidad) em dois grupos quanto à densidade micelial, diferenças nas taxas de crescimento e compatibilidade entre a maioria dos isolados.

A produção de pigmentos por diferentes isolados de uma espécie, também vem sendo utilizada como critério de avaliação de variabilidade. O fungo *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole de *Eichhornia crassipes*, planta aquática da América do sul tropical, apresenta alta variação em suas características culturais, em especial coloração e intensidade de pigmentos produzidos. Essa variação está relacionada ao grau de agressividade deste patógeno a *Eichhornia crassipes*, sendo que quanto mais escuro o pigmento produzido (roxo), mais agressivo é o isolado. Isolados que produzem pigmentos amarelos são menos agressivos e aqueles que não produzem qualquer pigmento, não são patogênicos (TESSMANN; CHARUDATTAN; PRESTON, 2008).

Estudos sobre requerimento nutricional são outra forma de se caracterizar variações dentro de populações de microrganismos, já que o equilíbrio de fontes de C, N e P, vitaminas e micronutrientes são fatores importantes para o crescimento, esporulação e manifestação ou não de determinadas características (POLONI, 2008).

No artigo de Scully e Bidochka (2006), uma linhagem mutante de *Aspergillus flavus*, fungo que apresenta grande espectro de hospedeiros, incluindo plantas, insetos e mamíferos, foi selecionada por auxotrofia a cisteína e metionina e esta linhagem apresentou produção de conídios apenas em insetos e conseqüente restrição de sua gama de seus hospedeiros. Em outro trabalho, Skoropad e Arny (1957) verificaram que duas linhagens do fungo *Helminthosporium gramineum* respondem diferentemente a todos os aminoácidos utilizados (ácido glutâmico, leucina, valina, arginina, prolina, asparagina, alanina, glicina, lisina, serina, tirosina, histidina,

glutamina, fenilalanina, isoleucina e ácido aspártico), ao ponto de uma delas ter seu crescimento inibido e outra ter seu crescimento estimulado na presença do mesmo aminoácido.

Respostas diferenciais também são observadas quanto à sensibilidade a fungicidas (ARTIGIANI FILHO; BEDENDO, 1996). Edgington e Barron (1967) foram os primeiros a usá-las como uma ferramenta para estudos de taxonomia de fungos. Os autores avaliaram vários compostos oxanhtiínicos contra oomicetos (antigos ficomicetos), basidiomicetos e deuteromicetos, e discriminaram os fungos testados frente a estes compostos, propondo então a possibilidade de usá-los como ferramentas nos estudos taxonômicos.

Laker (1989) testou a sensibilidade de oito isolados do biotipo C de *M. pernicioso* a seis fungicidas, entre eles Benlate, e constatou que as diferenças entre as concentrações necessárias de cada composto para inibição de 50% do crescimento dos isolados não variou entre os isolados. Em contrapartida, McQuilken, Supriadi e Rugar (1988) observaram diferenças na sensibilidade de isolados de cacau a dois fungicidas do grupo dos triazóis (Hexaconazol e Triadimenol), sendo necessária menor concentração dos fungicidas para inibir o crescimento do isolado de Trinidad, quando comparado com o necessário para inibição dos isolados da Colômbia e do Brasil, ressaltando que não houve diferenças significativas entre isolados da Colômbia, mostrando que fungicidas podem ser utilizados para caracterização de biotipos e/ou grupos com mesma origem geográfica.

Incompatibilidade somática vem sendo útil nos estudos de identificação de diversidade intraespecífica em populações de fungos patogênicos às plantas (JIMENEZ; DIAZ; HERRERA, 2000).

A incompatibilidade vegetativa (somática), fenômeno biológico largamente disseminado na natureza, evita a coexistência de núcleos geneticamente diferentes dentro de um citoplasma comum, quando da fusão (anastomose) entre hifas de diferentes linhagens. A anastomose leva à formação de filamentos heterocarióticos com núcleos das duas linhagens num citoplasma comum, que podem permanecer estável (compatível) ou não (incompatível). O controle genético da incompatibilidade vegetativa resulta de diferenças genéticas em um ou mais *loci* específicos chamados *het*. Na maioria dos fungos, um grande número de genes *het* é encontrado, sendo que alguns apresentam alelos múltiplos, e em muitos casos a incompatibilidade é governada por incompatibilidade alélica. Para a compatibilidade ocorrer, os alelos de todo o *loci het* devem ser idênticos. Em sistemas não alélicos, a incompatibilidade ocorre devido à interação de dois genes

que pertencem a *loci* distintos. Para determinar se dois isolados são incompatíveis, é possível, em muitas espécies, observar uma reação de barreira no ponto em que os dois se encontram (BÉGUERET; TURCQ; CLAVÉ, 1994; LOUBRADOU; TURCQ, 2000; SAUPE; CLAVÉ; BÉGUERET, 2000).

Diferentes genótipos dentro da população de espécies de fungos pertencentes ao grupo dos Basidiomicetos podem ser detectados por testes de incompatibilidade somática entre micélios dicarióticos e por diferenças de crescimento em meios sólidos (McGEARY; WHEELER, 1988). Tais testes vêm sendo utilizados na tentativa de caracterização e agrupamento de isolados de *M. pernicioso*, como o trabalho de Andebrhan (1986) que através desta técnica agrupou isolados oriundos de 13 pontos geográficos em quatro grupos. Hedger, Pickering e Aragundi (1987) que detectaram incompatibilidade entre isolados do biotipo C e do biotipo L e Oliveira, Gramacho e Silva (2005) que estabeleceram uma coleção de 629 isolados da região cacaueteira da Bahia e testaram 135 destes definindo três grupos de compatibilidade, com predominância de isolados vindos do Sul no grupo A, do Norte no grupo B e dois isolados do Norte no grupo C.

Estudos de incompatibilidade somática também vêm sendo usados para avaliar diversidade genética em outros fungos, como mostra o trabalho de May (1991) que estudou os efeitos das diferenças tanto do genoma nuclear quanto mitocondrial em *Coprinus cinereus*, onde genomas nucleares exibiram graus de antagonismo variáveis (incompatibilidade somática) quando comparados em culturas, porém genomas mitocondriais diferentes, com genomas nucleares comuns, resultaram em antagonismo em apenas um dos casos.

Outra técnica que vem sendo crescentemente ampliada para estudos de taxonomia, fisiologia e genética de plantas, animais e microrganismos é a eletroforese de proteínas, técnica esta relativamente simples, rápida e de alto valor informativo (ALFENAS et al., 1991).

Sistemas de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio (SDS = “Sodium Dodecyl Sulfate”) (SDS-PAGE) são usados para separação de cadeias polipeptídicas. Nestes sistemas as cadeias adquirem uma carga negativa do SDS e a organização de sua estrutura terciária é deteriorada, em virtude da ação do detergente. As cadeias polipeptídicas, com carga negativa proporcional ao comprimento das mesmas, migram com velocidades definidas apenas por diferenças de tamanhos moleculares (peneiramento molecular). Proteínas marcadoras, de peso molecular conhecido são usadas para se determinar o tamanho das moléculas de proteína da amostra (ALFENAS, 1998; ALFENAS et al., 1991).

Silveira e Alfenas (2002) caracterizaram isolados de *Rhizoctonia solani* AG1 (anastomose group 1) e AG4 (anastomose group 4) e isolados binucleados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*, por meio de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida comparando-os com alguns isolados brasileiros de outros hospedeiros e isolados-padrões de *R. solani* AG1, procedentes do Japão. Observaram diferenças nos padrões gerais de proteínas entre isolados binucleados e multinucleados e entre isolados de diferentes grupos e subgrupos de anastomose. Isolados de *R. solani* AG1, procedentes do Brasil e Japão, apresentaram baixa similaridade nos padrões de proteínas. Isolados brasileiros morfologicamente semelhantes a *R. solani* AG1-IB (microesclerodiais) apresentaram padrões de proteínas similares. Esta tendência foi independente do hospedeiro e da origem geográfica. Variações nos padrões de proteínas foram também observadas dentre isolados brasileiros de *R. solani* AG4.

Figueiredo et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a utilidade de métodos moleculares (SDS-PAGE, RAPD, ARDRA e seqüenciamento de rDNA) para identificar patótipos de *Colletotrichum sublineolum*, fungo causador da antracnose do sorgo, altamente variável do ponto de vista patogênico e com várias raças descritas. Embora o perfil protéico (SDS-PAGE) tenha mostrado baixo grau de polimorfismo, foi possível observar diferenças devido à presença/ausência de alguns polipeptídios, bem como diferenças quanto à intensidade de algumas bandas.

Em Vujanovic et al. (2009), um total de 91 isolados de *Fusarium avenaceum* foram reagrupados em 15 fenótipos e 10 grupos de compatibilidade vegetativa mostrando perfis de proteínas em SDS-PAGE específicos e menos especificidade em perfis obtidos através do ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer). Cada isolado apresentou uma “assinatura” padrão de bandas reproduzíveis. Além disso, análises estatísticas revelaram que os perfis protéicos de cada grupo de isolados se correlacionaram com a virulência do fungo. Os autores concluíram que o uso de SDS-PAGE oferece uma técnica simples e sensível para a diferenciação de rotina entre isolados patogênicos e não patogênicos dentro de populações não conhecidas de *F. avenaceum*.

Tentativas de identificação da variação genética dentro da população de *M. perniciosus* vêm sendo feitas, principalmente através de marcadores moleculares, com destaque para análises de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) (ANDEBRHAN et al., 1999; ANDEBRHAN; FURTEK, 1994; GOMES et al., 2000; NIELLA et al., 2000; YAMADA; ANDEBRHAN; FURTEK, 1998), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

(ARRUDA et al., 2003a), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (PLOETZ et al., 2005) e ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (ARRUDA et al., 2003b).

No campo de estudos de filogenia, alguns trabalhos mostraram que seqüências da subunidade grande do DNA ribossomal fornecem resolução satisfatória para identificação da maioria das linhagens de fungos Agáricos, com bom suporte para cladogramas terminais e muitos ramos (MONCALVO et al., 2000). O seqüenciamento de partes do rDNA é muito útil para determinar desde relações filogenéticas entre grupos de organismos de taxa distantes a diferenças entre isolados da mesma espécie pelo fato deste ser constituído por regiões que evoluem em velocidades diferentes, sendo considerado como um conjunto de cronômetros, cada um oferecendo diferentes perspectivas da história evolucionária de um organismo (LEAL-BERTIOLI, 1998). Mori, Sato e Takamatsu (2000) constataram que em alguns fungos as seqüências nucleotídicas das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) são muito variáveis e o 18S rDNA muito conservada para serem usadas para inferir relações filogenéticas, enquanto as regiões variáveis de 28S rDNA parecem ter um nível apropriado de variação para tal fim.

A subunidade grande do rDNA (28S ou 26S) vem sendo utilizada de diversas maneiras para estabelecimento de relações filogenéticas entre gêneros, espécies e linhagens de fungo. Exemplos disto são os trabalhos de Manici e Bonora (2007) que agruparam 58 isolados de *Rhizoctonia* em dois grupos de compatibilidade somática (AG) através do alinhamento das seqüências da região ITS (Internal Transcribed Spacer), obtendo confirmação de seus resultados por testes de incompatibilidade em placa e por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da subunidade grande do rDNA (28S rDNA), Kurtzman e Robnett (1998) que analisaram aproximadamente 500 espécies de leveduras (ascomycetos), incluindo membros de *Candida* e outros gêneros anamórficos, em relação a divergências no domínio D1/D2 da subunidade grande do DNA ribossomal (26S) e Bunyard, Nicholson, e Royse (1995) que estabeleceram relações filogenéticas entre isolados de *Morchella*, *Verpa* e *Disciotis* (Pezizales: Morchellaceae) através de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da região 28S rDNA, detectando para alguns casos maior variação genética intraespecífica que entre espécies putativas.

Um trabalho interessante foi o de Wang et al. (2003) que identificaram quatro introns do grupo I inseridos em regiões conservadas específicas na subunidade grande do rDNA de isolados de *Beauveria bassiana* e avaliaram 125 isolados quanto a presença, tamanho e distribuição dos

introns, além da seqüência nucleotídica e da estrutura secundária dos mesmos, constatando em poucos isolados ausência destes introns, e em sua maioria a presença de um, ou dois ou três e apenas um isolado com os quatros, além da ocorrência de variações na estrutura secundária e correlação entre o genótipo dos introns e a região geográfica ou a espécie de inseto hospedada pelos isolados, mostrando que a presença de um intron em particular pode ser uma propriedade de cada linhagem, e que, portanto pode ser usada como característica filogenética informativa.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Isolados estudados

Os isolados de *Moniliophthora perniciosa* provenientes do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Melhoramento de Plantas II, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, do Departamento de Produtividade Agroindustrial e Alimentos. Os isolados eram mantidos em cultivos em tubo inclinado contendo meio TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar), cobertos com óleo mineral e armazenados protegidos da luz e a temperatura ambiente. Os isolados foram multiplicados com a transferência de fragmento do meio do estoque para uma placa de Petri que continha o mesmo meio e o cultivo foi realizado no escuro e a 27 °C.

A partir deste cultivo inicial foi realizado um segundo cultivo com as hifas livres do óleo mineral residual, carregado com a retirada do fragmento. Este segundo cultivo serviu de inóculo para os cultivos subsequentes em meio TDA que foi fonte contínua de inóculo para cultivos que objetivavam obtenção de micélio para extração de ácido nucléico (DNA), proteínas totais, e realização dos testes de incompatibilidade, velocidade de crescimento, teste nutricional, assimilação de aminoácidos, avaliação de fontes de nitrogênio na produção de pigmentos e resistência a fungicidas. O inóculo para todos os experimentos de cultivo consistiu de um disco de 0,7cm do meio de cultivo coletado da borda de crescimento da colônia.

Tabela 1 – Lista de isolados de *Moniliophthora perniciosa* utilizados no trabalho com a especificação do código do estoque de origem, referência de biotipo, hospedeiro, estado brasileiro onde foi feita a coleta e o código recebido neste trabalho (A letra C refere-se aos isolados do biotipo Cacau, a S aos isolados do biotipo Solanaceae e a letra L ao de Liana. As letras em maiúscula que segue a designação de Biotipo referem-se ao estado de origem)

Isolados-Código original	Biotipo	Hospedeiro	Origem	Código no trabalho
CP8	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Pará	C-PA-1
CP11	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Pará	C-PA-2
CP44	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Rondônia	C-RO-1
CP45	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Rondônia	C-RO-2
CP21	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Amazonas	C-AM-1
CP24	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Amazonas	C-AM-2
CP-AM lot 10	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Amazonas	C-AM-3
ALF277	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-1
ALF562	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-2
ALF563	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-3
ALF1140	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-4
ALF1145	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-5
ALF1191	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia	C-BA-6
CP-Juçara	Solanácea	<i>Euterpe edulis</i>	Minas Gerais	S-MG-1
CP-Lobeira	Solanácea	<i>Solanum lycocarpum</i>	Minas Gerais	S-MG-2
ALF104	Solanácea	<i>Solanum cernuum</i>	Minas Gerais	S-MG-3
ALF105	Solanácea	<i>Solanum lycocarpum</i>	Minas Gerais	S-MG-4
ALF106	Solanácea	<i>Solanum spp</i>	Minas Gerais	S-MG-5
ALF608	Solanácea	<i>Solanum cernuum</i>	Minas Gerais	S-MG-6
ALF619	Solanácea	<i>Solanum paniculatum</i>	Bahia	S-BA-1
ALF322	Liana *		Desconhecida	L-1

* Por apresentar apenas um isolado, o biotipo liana foi considerado apenas com referência, não permitindo que os resultados obtidos para este isolado fossem extrapolados como características gerais do biotipo. O isolado foi coletado no Equador por Griffith.

2.2.2 Análise Molecular através da região 28S rDNA

2.2.2.1 Extração do DNA dos isolados

A extração de ácido nucléicos das hifas do fungo foi feita segundo o protocolo proposto por Raeder e Broda (1985). A massa micelial foi produzida em 30 ml de meio líquido TD (10% de farelo de trigo e 2% de dextrose) mantido a 27°C, no escuro, sob agitação de 30 rpm por 5 dias, tendo como inóculo cinco discos de 0,7cm de meio TDA (10% de farelo de trigo, 2% de dextrose e 2% de Agar, pH 7,0) contendo hifas do fungo.

O micélio produzido foi separado do meio de cultivo por filtração e lavado com água destilada para retirada de meio residual presente nas hifas. O excesso de líquidos do micélio foi retirado com auxílio de papel filtro. Na extração foi utilizado aproximadamente 0,3 g de micélio fresco que foi macerado com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana. Ao macerado, adicionou-se 1,5 ml de Tampão Tris-EDTA (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 7,2-7,4) e 500 µl da suspensão de macerado e Tampão Tris-EDTA foi transferido para tubos de 1,5 ml.

À suspensão coletada foi adicionada 1 ml de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 0,025 M, NaCl 0,25M, Tris-base 0,2M, pH 8,0). Os tubos foram incubados em banho-maria a 70°C por 20 minutos e posteriormente centrifugou-se a 12000g por 10 minutos para em seguida realizar a coleta de 600µl da fase líquida (sobrenadante) separada do resto celular. A seguir foi realizada a desproteinização do sobrenadante com a adição de 600µl de solução de fenol saturado e as amostras foram então homogeneizadas e Centrifugadas a 12000g por 5 minutos. Após a centrifugação formou-se um sistema bifásico e 400µl da fase aquosa superior foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 ml. Uma nova desproteinização foi realizada na fase aquosa adicionando-se 700µl de clorofórmio gelado, com posterior homogeneização e centrifugação a 12000g por 5 minutos. Após a centrifugação recolheu-se 200µl da fase superior da qual o DNA foi precipitado.

O DNA foi precipitado adicionando-se 120µl de iso-propanol absoluto gelado e mantendo as amostras à temperatura ambiente por 5 minutos. O DNA precipitado foi centrifugado a 12000g por 10 minutos e fase líquida descartada. O precipitado visualizado no fundo do tubo foi lavado com 500µl de etanol 70% gelado. A solução de etanol foi descartada e o DNA foi mantido em condição ambiente para eliminação de etanol residual. O DNA extraído foi então ressuscitado em 50µl de água destilada esterilizada. A integridade do DNA isolado foi verificada após

eletroforese com tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris Base, 89 mM Ácido Bórico, 20mM EDTA, pH 8,0), à 90mV por 1 hora de 1µl da solução de DNA em gel de agarose 1% e o DNA foi visualizado após corar com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml).

2.2.2.2 Amplificação do DNA via a reação em cadeia da polimerase (PCR)

O fragmento da região do gene rDNA 28S de cada isolado foi realizada com o DNA extraído e diluído para 5 ng.µl⁻¹. A reação de PCR para amplificação da região rDNA 28S foi realizada em solução contendo: 5,0 mM de tampão para PCR (100mM Tris HCl, 500mM KCl, 0,8% NonidetP40, pH 8,8), 3,0mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase, 1mM de dntps, 20,0 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores NL-1-A (5' GCCATATCAATAAGCGGAGG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') e volume final da reação adequado para 50µl com água deionizada esterilizada. A reação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguidos de um ciclo que inicia com uma primeira etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto segue para segunda etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e finaliza com terceira etapa de extensão de 72°C durante 1 minuto este ciclo se repete por 35 vezes. Ao final da ciclagem houve uma etapa de extensão final de 72°C durante 7 minutos. As reações foram conduzidas no termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, USA).

O fragmentos produzidos foram visualizados após eletroforese do volume total da reação com tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris Base, 89 mM Ácido Bórico, 20mM EDTA, pH 8,0), à 90mV por 1 hora de em gel de agarose 1%, utilizando Brometo de Etídio (0,5 µg/ml) como revelador.

2.2.2.3 Purificação e quantificação do produto de PCR para Reação de Sequenciamento

Após certificar-se dos fragmentos desejados produzidos pela reação de PCR uma nova reação foi conduzida para obtenção de material para o sequenciamento. Antes de seguir para o sequenciamento o produto de PCR obtido da reação foi purificado para eliminação de nucleotídeos, enzimas e iniciadores que pudessem interferir na reação do sequenciamento. Na reação de PCR de 50µl o fragmento de DNA amplificado foi precipitado adicionando 100µl de

isopropanol a 65%, gelado, com posterior homogeneização. O DNA foi recuperado após centrifugação a 12000g por 3 minutos e a fase alcóolica foi descartada. O fragmento de DNA precipitado foi lavado com 100 µl de etanol a 70%, gelado e recuperado após centrifugação a 12000g por 3 minutos, com posterior descarte do etanol 70%. Após evaporação do etanol residual em condição ambiente, o precipitado foi ressuscitado em 30µl água deionizada esterilizada. O fragmento purificado foi visualizados após eletroforese de 5 µl da solução de DNA purificada com tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris Base, 89 mM Ácido Bórico, 20mM EDTA, pH 8,0), à 90mV por 1 hora de em gel de agarose 1% e utilizando com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml) como revelador. A quantificação do produto de PCR foi determinada por espectrofotometria, segundo Maniatis, Fritsch e Sambrook (1982).

2.2.2.4 Seqüenciamento e Análise das Seqüências

A reação de seqüenciamento de DNA foi realizada com 2µl (aproximadamente 75ng de DNA) dos produtos amplificados e purificados. O oligonucleotídeo iniciador utilizado para a reação foi o NL-1-A. O seqüenciamento foi realizado utilizando o protocolo padrão do Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences). O seqüenciador utilizado foi o ABI Prisma-3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os cromatogramas obtidos foram examinados para a verificação da qualidade utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados público GeneBank do NCBI para a certificação da região amplificada. O alinhamento foi realizado no programa MEGA versão 4 (TAMURA; DUDLEY; NEY; KUMAR, 2007), assim como a construção da árvore filogenética. Esta foi construída pelo método de máxima parcimônia, utilizando 1000 etapas de Bootstrap.

2.2.3 Avaliação de padrões protéicos através de SDS-PAGE

As proteínas foram obtidas de micélio cultivado a partir de cinco discos de micélio de cada isolado em TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar) inoculados em 30ml de meio líquido TD (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose), mantido a temperatura constante de 27°C, no escuro, sob agitação de 30 rpm por 5 dias. O micélio produzido foi separado do meio

de cultivo por filtração e lavado com água destilada para retirada de meio residual presente nas hifas. O excesso de líquidos do micélio foi retirado com auxílio de papel filtro. Posteriormente 2g de micélio fresco de cada isolado que foi pesado, macerado com nitrogênio líquido e ressuspendido em 5 ml de tampão Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA, pH = 7,2-7,4), para obtenção de proteínas totais.

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951). As amostras foram preparadas para eletroforese segundo Laemmli (1970). A eletroforese em poliacrilamida, composto por um gel de empacotamento (3%) seguido por um gel de separação (12,5%), foi conduzida no sistema vertical em condição denaturante. Foram aplicados 5µg de proteína denaturadas de cada isolado na canaleta presente no gel de empacotamento e a eletroforese seguiu a 60mA, por aproximadamente 8 horas.

Após a eletroforese o gel foi separado das placas de vidro e corado com nitrato de prata, segundo Friedman (1982), adaptado por Gomes (2000), técnica que consiste nas etapas de fixação, por 12 horas, incubação, por 15 minutos, impregnação com prata, por 25 minutos e reveladora, até que as bandas apareçam no gel. O padrão de bandas revelado foi convertido em uma matrix binária de presença e ausência (1/0) de bandas (uma média de 30 por amostra) e a partir da matrix foi construído o dendograma de similaridade com método não-ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA) utilizando programa NTSYS versão 1.70.

2.2.4 Teste de Incompatibilidade Somática

O micélio para o teste de incompatibilidade de cada isolado foi obtido de discos de 0,7cm de cultivos do fungo em meio TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar). O teste de incompatibilidade foi realizado em meio TDA distribuídos em placas de Petri (9 cm). Os isolados foram dispostos nas placas de Petri combinados dois a dois, com cada isolado em uma extremidade da placa. Foram utilizadas três repetições para cada combinação, as quais foram mantidas em BOD a 27°C, no escuro. As placas foram avaliadas após 30 dias sendo considerada como reação de incompatibilidade/compatibilidade a formação ou não de barreira e/ou pigmento no local de contato entre os micélios dos isolados combinados. As informações compatibilidade/incompatibilidade para cada pareamento foi convertida em matrix binária de

presença e ausência (1/0) e partir da matrix foi construído o dendograma de similaridade com método não-ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA) utilizando programa NTSYS versão 1.70.

2.2.5 Avaliação da taxa de crescimento

A taxa de crescimento dos isolados foi avaliada em meio TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar). O inóculo foi transferido para o centro da placas de Petri (9cm) contendo o meio especificado e mantido a 27 °C, no escuro. As medidas do diâmetro da colônia em crescimento foram feitas de dois em dois dias até 30 dias ou quando o fungo atingisse o limite da borda da placa de Petri. O crescimento radial foi determinado com o auxílio de um escalímetro calibrado (Trident – Indústria de Precisão) e foi considerado como valor de crescimento a média de duas medidas perpendiculares. O crescimento médio de cada isolado foi estimado considerando a medida de três cultivos realizados em placas diferentes.

2.2.6 Avaliação de auxotrofia para aminoácidos

A avaliação de auxotrofia foi realizada no meio Meio Mínimo Yeast Nitrogen Base (Difco) sem aminoácidos (MM). Na avaliação de auxotrofia o isolado cresceu em meio TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar) e um fragmento do crescimento da borda foi utilizado como inóculo para um pré-cultivo em meio MM. Deste foi obtido o inóculo para a avaliação de auxotrofia num segundo cultivo em meio MM. O procedimento priorizou evitar uma possível contribuição na nutrição inicial do isolado decorrente do pedaço de meio TDA introduzido junto com o inóculo. O inóculo foi transferido para o centro da placas de Petri (9cm) contendo o meio especificado e mantido a 27 °C, no escuro. As medidas do diâmetro da colônia em crescimento foram feitas de dois em dois dias até 30 dias ou quando o fungo atingisse o limite da borda da placa de Petri. O crescimento radial foi determinado com o auxílio de um escalímetro calibrado (Trident – Indústria de Precisão) e foi considerado como valor de crescimento a média de duas medidas perpendiculares. O crescimento médio de cada isolado foi estimado considerando a medida de três cultivos realizados em placas diferentes. Parâmetros secundários

como morfologia do micélio e produção de pigmentos também foram observados e considerados na análise.

2.2.7 Avaliação do efeito de aminoácidos sobre o desenvolvimento de *M. pernicioso*

A avaliação da suplementação de aminoácidos no crescimento do fungo foi realizada no Meio Mínimo Yeast Nitrogen Base (MM) sem aminoácidos. No estudo foram avaliados os efeitos dos aminoácidos cisteína, metionina e lisina que foram adicionados separadamente ao meio base. A concentração final de cada aminoácido foi de 60mg/L, 20mg/L e 30mg/L, que em mols representam $4,9 \cdot 10^{-4}$, $1,34 \cdot 10^{-4}$ e $1,64 \cdot 10^{-4}$, respectivamente. Foram utilizadas três repetições para cada isolado, as quais foram mantidas a 27°C, no escuro. As medidas do diâmetro da colônia em crescimento foram feitas de dois em dois dias, utilizando-se da média de duas medidas perpendiculares por placa, com o auxílio de um escalímetro calibrado (Trident – Indústria de Precisão), durante 30 dias. Avaliou-se também a produção de pigmentos por alguns isolados.

2.2.8 Avaliação do efeito de fungicidas sobre o crescimento de *M. pernicioso*

Inicialmente a avaliação do efeito inibitório de fungicidas no crescimento micelial do fungo constituiu em ensaios prévios contendo nove fungicidas: Benlate 500 (Du Pont do Brasil S.A.), Fungiscan 700WP (Dow AgroSciences), Bim 750 Br (Dow AgroSciences), Persist SC (Dow AgroSciences), Daconil (Iharabras), Folicur (Bayer CropScience), Bayfidan (Bayer CropScience), Systhane (Dow AgroSciences) e Pulsor (Dow AgroSciences). A avaliação precisa foi conduzida com três isolados representantes de cada biotipo e foram avaliadas quatro concentrações diferentes dos fungicidas (1, 10, 100 e 1000 mg.L⁻¹). Os fungicidas que evidenciaram resposta diferencial para os três isolados foram utilizados para o teste com os 21 isolados, sendo escolhida a menor dose com efeito diferencial. Um inóculo de cada isolado foi transferido para meio TDA (10% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar) contendo o princípio ativo testado. Foram utilizadas três repetições para cada isolado, as quais foram mantidas em BOD a 27°C, no escuro. As medidas do diâmetro da colônia em crescimento foram feitas de dois em dois dias, utilizando-se da média de duas medidas perpendiculares por placa, com o auxílio de um escalímetro. O efeito dos fungicidas no crescimento foram convertidos em

índice de inibição determinado pela fórmula PIC (Porcentagem de Inibição de Crescimento) = $100 \times (100 - \text{crescimento em fungicida}) / \text{crescimento no meio controle}$, e para análise estatística os dados foram transformados utilizando a fórmula $\arcsin \sqrt{\%}$.

2.2.9 Avaliação da taxa de crescimento e produção de pigmentação

A produção de pigmento foi avaliada com crescimento dos isolados sob duas fontes de nitrogênio e na condição de cultivo no escuro e em fotoperíodo de 12h. O estudo teve como objetivo verificar a variabilidade entre os isolados do fungo para produção de pigmento. As diferentes fontes de nitrogênio avaliadas foram nitrogênio administrada nas formas de nitrato de potássio (composto reduzido) e a tartarato de amônio (composto oxidado).

O meio base para adição das duas fontes de nitrogênio foi o Meio Yeast Carbon Base (Difco) que foi acrescido de Tartarato de Amônia (2mM) ou Nitrato de Potássio (4mM). Os cultivos para a duas fontes foram mantidas no escuro e em fotoperíodo de 12 h. O inóculo foi transferido para o centro da nova placa de Petri (9 cm) contendo os meios especificados. As medidas de crescimento do diâmetro da colônia foram feitas de dois em dois dias até 30 dias ou quando o fungo atingisse o limite da borda da placa de Petri. O crescimento radial foi determinado com o auxílio de um escalímetro calibrado (Trident – Indústria de Precisão) e foi considerado como valor de crescimento a média de duas medidas perpendiculares. O crescimento médio de cada isolado foi estimado considerando a medida de três cultivos realizados em placas diferentes.

2.2.10 Análise estatística

A análise estatística dos resultados de taxa de crescimento foi realizada no programa R versão 2.3.2.2. (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2009). O delineamento experimental inteiramente aleatorizado foi adotado em todos os experimentos, sendo utilizada análise fatorial quando dados de diferentes meios de cultura foram confrontados. Foi realizada análise da variância (ANOVA) e Teste Tukey ao nível de 5% de significância.

2.3 Resultados e Discussão

*M. pernicios*a apresenta isolados distribuídos em três biotipos que provavelmente contam a história evolutiva do patógeno. Os isolados do biotipo-L apresentam as características do provável ancestral em comum que gerou os biotipos por ser heterotático e saprofítico. Os biotipos-C e L evoluíram a partir deste grupo e foram selecionados para o homotalismo e patogênese. Existem duas explicações para a formação dos novos biotipos: surgimento do biotipo-S e a partir da diversidade presente neste grupo surgimento do biotipo-C; ou derivação separada destes dois biotipos a partir de uma população com características similares ao biotipo-L.

O trabalho objetivou verificar a história evolutiva dos isolados de *M. pernicios*a registrada nas seqüências do gene ribossomal 28S e avaliar a diversidade genética observada no padrão de proteínas totais e teste de incompatibilidade, e relacionar com as características fisiológicas de crescimento, produção de pigmento e resistência a fungicidas. Também foi observado um aspecto morfológico relativo à densidade do micélio. Com os resultados obtidos foi realizada uma tentativa de relacionar os dados genéticos com os morfológicos e fisiológicos com objetivo de encontrar características específicas dos biotipos S e C que pudessem diferenciá-los.

2.3.1 Avaliação de seqüências parciais da região 28S rDNA

Estudos da estrutura secundária do rDNA têm mostrado que o rRNA da subunidade grande de eucariotos é composta por um “core” (cerne) conservado que tem estrutura secundária similar ao rRNA de procariotos, e domínios divergentes intercalados que parecem não ter homólogo em procariotos e podem ser úteis para determinar filogenia de organismos proximamente relacionados (TAKAMATSU, 1998). Com base nesta afirmação, parte da subunidade grande do rDNA (28S) dos 21 isolados foi seqüenciada (560pb), comparada com seqüências presentes no GenBank e utilizadas para construção de árvore filogenética.

A comparação das seqüências com as existentes no GenBank, usando BLAST, mostrou que as seqüências mais próximas, fora as seqüências do próprio fungo que estão depositadas nesta base de dados, são da região 28S rDNA de *Moniliophthora roreri*. Isto já era esperado visto à grande proximidade entre estas duas espécies (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). A partir da

análise da árvore filogenética (Figura 1), não observamos a formação de grupos segundo biotipos e os ramos apresentam valores de bootstrap inferior a 50%, quando ramos bem estabelecidos devem ter valores de bootstraps superior a 70%, indicando que o polimorfismo na composição das seqüências avaliadas não discrimina grupos de isolados e, portanto, as alterações na composição de nucleotídeos desta região genômica não conta a história evolutiva dos biotipos.

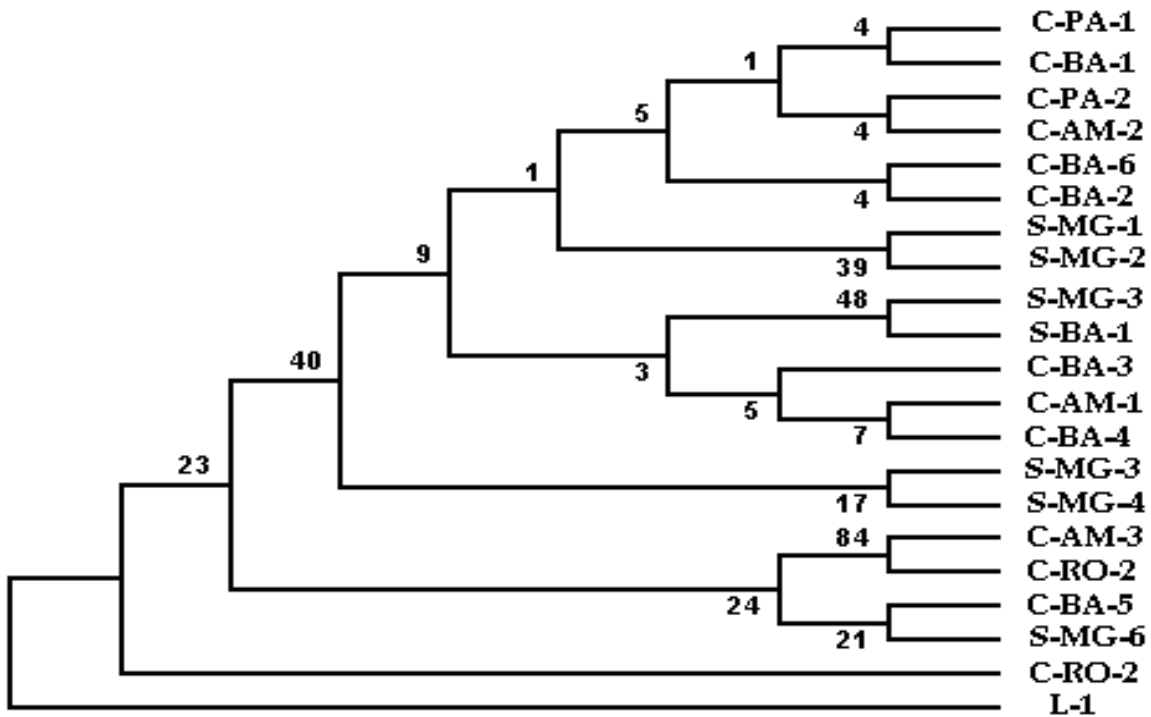


Figura 1 - Árvore filogenética baseada na seqüência parcial da subunidade grande do rDNA (28S) dos 21 isolados de *Moniliophthora perniciosa* estudados mostrando a proximidade/distância entre eles. A árvore consenso foi criada por critério de parcimônia e valores de *bootstraps* (1000) aparecem nos nós da árvore

Com base no resultado obtido, concluímos que estudos filogenéticos baseados na região 28S rDNA parece não ser útil para inferir proximidade entre isolados dentro da população de *M. perniciosa* da mesma forma que a região ITS (LEAL, 2006). No entanto na região espaçadora IGS existe registro de alterações de bases que possibilitam a diferenciação de biotipos (ARRUDA et al., 2003a). O polimorfismo presente em regiões de ITS possibilitou diferenciar as espécies *M. perniciosa* e *M. rorei* isoladas de diferentes hospedeiros (*T. cacao* e *T. gileri*). Contudo em *M. perniciosa* esta região não permitiu diferenciar isolados de diferentes hospedeiros (EVANS;

HOLMES; REID, 2003). Tendo em visto a dificuldade em estabelecer uma relação filogenética entre isolados é possível que esta relação nem mesmo exista e que o processo de especiação ainda seja recente (LEAL, 2002) sendo apenas identificada por marcadores moleculares do tipo RAPD (YAMADA; ANDEBRHAN; FURTEK, 1998).

2.3.2 Perfis protéicos por SDS-PAGE

Os perfis protéicos revelados pela coloração com prata após a eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas totais extraídas de micélio dos isolados cultivados em meio TD por cinco dias, evidenciou poucas diferenças entre os biotipos e isolados dentro do mesmo biotipo.

O perfil protéico é representado por uma média de 30 proteínas por amostra. Na comparação dos perfis de todos os isolados, a presença de proteínas em comum entre eles foi transferida para uma matriz numérica como valor 1 e a ausência de determinada proteína presente nos demais foi convertido em 0. A figura 2 mostra alguns perfis observados para o biotipo L, S e C.

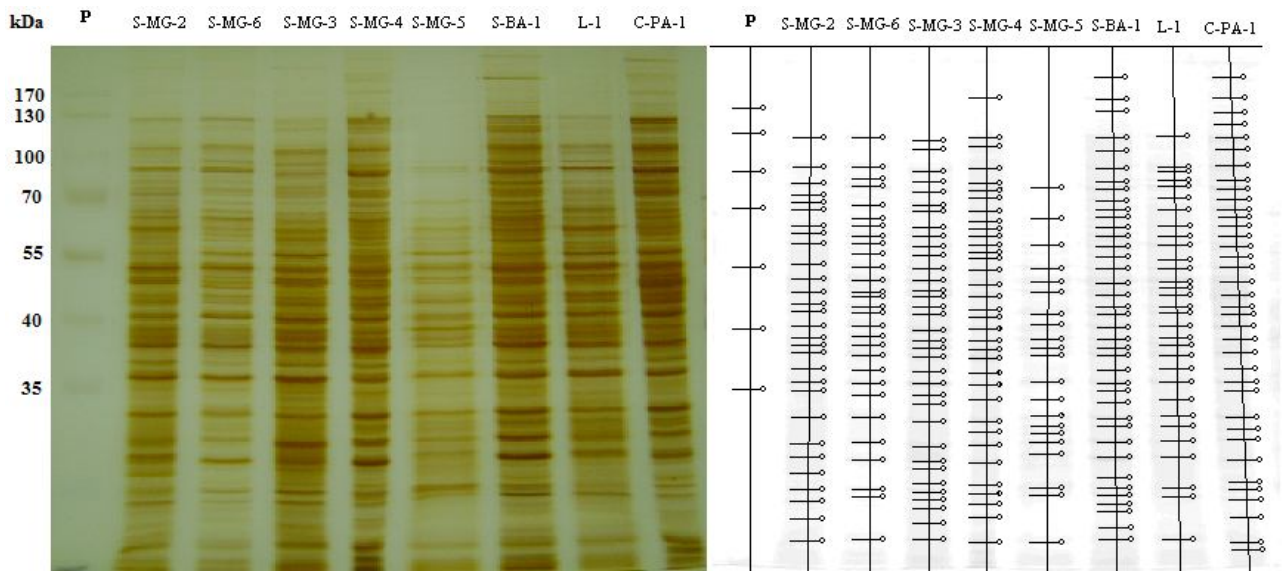


Figura 2 – Padrões protéicos em gel de SDS-PAGE corado com prata. P: padrão

A matriz de similaridade gerada permitiu construir o dendograma que agrupa os isolados de acordo com o compartilhamento de características em comum, no caso, as mesmas proteínas (Figura 3). O maior grau de similaridade foi 0,8571 (C-BA-6 e C-BA-5) e o menor foi 0,3896 (C-AM-2 e C-PA-1), mostrando a grande variabilidade existente entre os isolados estudados. No dendograma observa-se a formação de dois grupos que apresentam aproximadamente 50% de similaridade e ambos apresentam isolados do biotipo-C e S. Os grupos se diferenciam pela representatividade de isolado, com um grupo menor, compreendendo seis isolados sendo quatro do biotipo-S e um isolado do biotipo-C e outro do biotipo-L. O grupo maior compreende 15 isolados sendo 3 isolados do biotipo-S e 12 isolados do biotipo-C (Figura 3). Neste grupo observa-se subgrupos com isolados que compartilham 80% de similaridade que totalizam sete subgrupos. Em um temos os isolados do Amazonas, no segundo isolados do Pará e Rondônia, um terceiro grupo com isolados do Amazonas, quarto e quinto grupos com isolados da Bahia, um sexto grupo com isolados da Bahia e Minas Gerais e outro com apenas isolados de Minas Gerais.

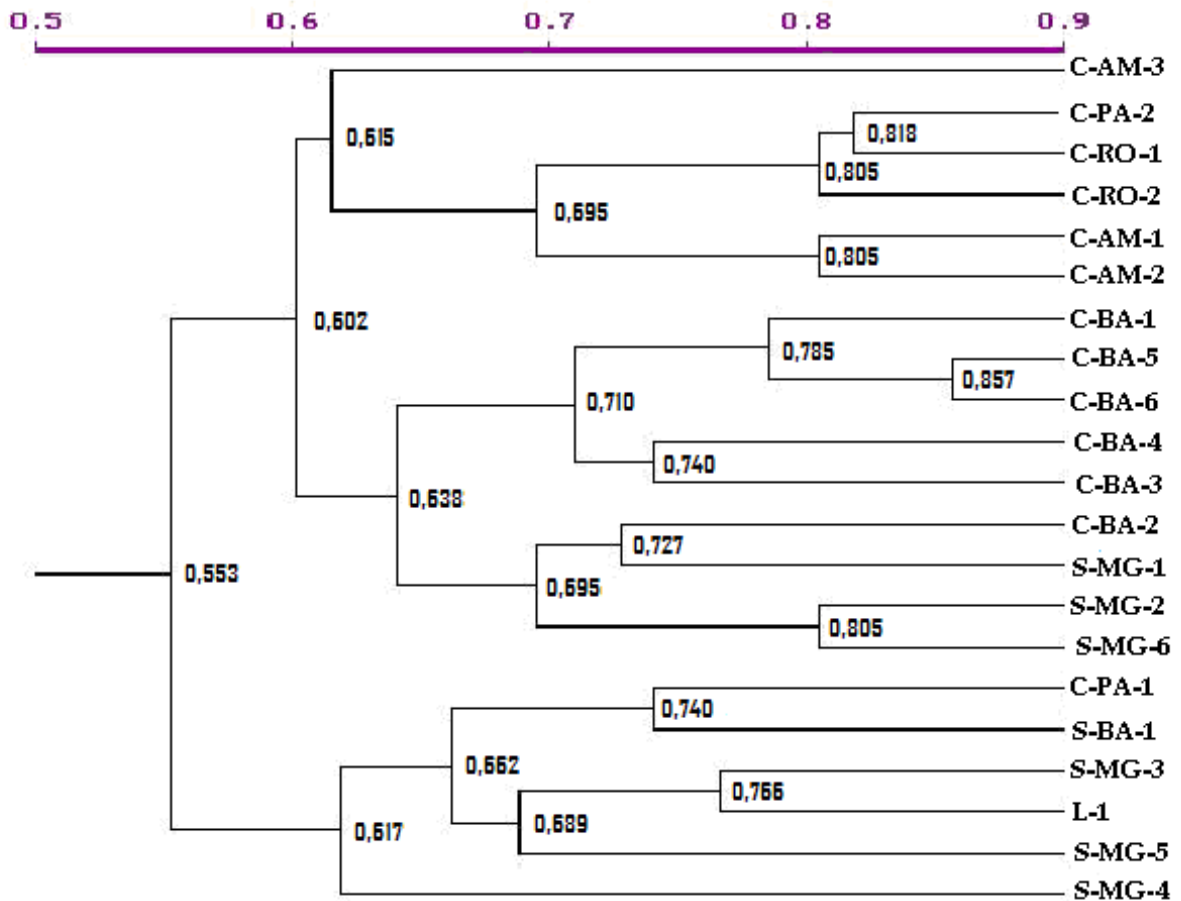


Figura 3 - Dendrograma dos isolados baseado nos perfis protéicos dos isolados de *M. pernicioso* (valores de similaridade)

Esta técnica permitiu verificar que isolados da região norte apresentam maior diversidade por estarem em grupos com apenas 50% de similaridade. Observou-se no grupo totalmente formado por isolados do biotipo-C a formação de um grupo com isolados da região norte e outro com isolados da Bahia. Os isolados do biotipo S também apresentam um alto grau de diversidade, sendo que isolados de um único estado estão em grupos que compartilha apenas 50% das proteínas, porém esta diversidade é balanceada, sendo que 57,14% dos isolados do biotipo S está no grupo com menor número de isolados e 42,86% no maior grupo.

O uso de SDS-PAGE pode ser útil em taxonomia, especialmente quando combinado com outras características, tais como interações miceliais e taxas de crescimento das colônias (NOVAK, KOHN, 1988). Reynolds, Weinhold e Morris (1983) compararam por eletroforese de

proteínas dezesseis isolados de diferentes hospedeiros e localizações geográficas representando cinco grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* e os padrões protéicos produzidos pelos cinco grupos foram marcadamente diferentes, tendo cada grupo um padrão distintivo.

A técnica de SDS-PAGE também foi aplicada no estudo de variabilidade intraespecífica de isolados de *Fusarium avenaceum*, e cada um deles apresentou um perfil de proteínas específico, perfis estes que confirmaram os resultados obtidos pelos estudos de patogenicidade, com cada grupo constituído de isolados com graus semelhantes de virulência, porém sem qualquer relação com hospedeiro ou local de origem dos isolados. Este estudo foi o primeiro onde se mostrou que SDS-PAGE pode ser um método útil na taxonomia e diagnóstico para microfungos e ascomicetos (VUJANOVIC et al., 2009).

Além disso, os autores discutem o fato desta técnica apresentar resultados mais consistentes para estudos evolucionários que os obtidos pela análise do rDNA, já que este evolui mais lentamente que os genes codificadores de proteínas (VUJANOVIC et al., 2009). No entanto este fato não foi observado no estudo. A evolução dos biotipos de *M. perniciosa* pode ser mais recente do que se supõe, o que também ainda não foi confirmado, podendo ser a adaptação específica a hospedeiros regulada por segregação de alelos provavelmente decorrente da transição do heterotalismo para homotalismo ou pela segregação de cromossomos (RINCONES et al., 2006).

2.3.3 Teste de incompatibilidade somática entre isolados de *M. perniciosa*

O teste de compatibilidade foi realizado em meio TDA e as reações de incompatibilidade foram caracterizadas pela formação de uma barreira entre os dois micélios pareados, com produção de pigmento na região de encontro das hifas (Figura 4). Não foi observada especificidade de cruzamento apenas para isolados do mesmo biotipo sendo possível observar reação cruzada entre isolados dos três biotipos analisados.

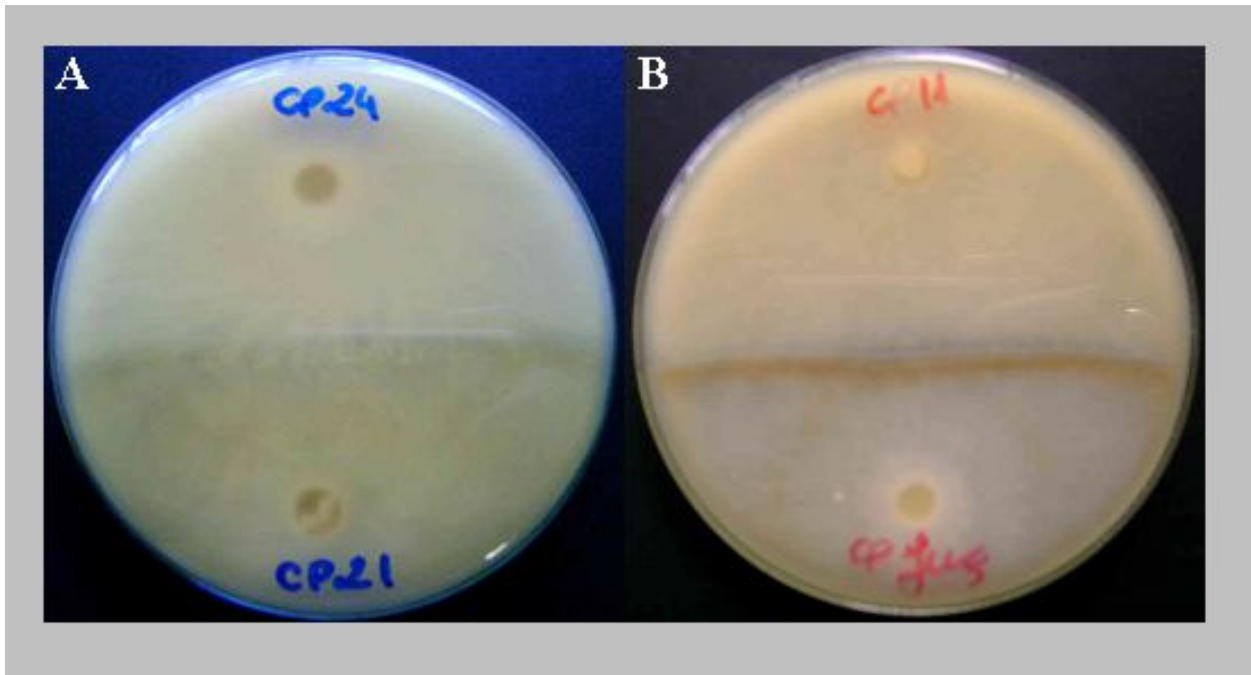


Figura 4 – Fotos representativas das reações de compatibilidade (A) e incompatibilidade somática (B) consideradas para determinação da reação cruzada entre 21 isolados avaliados dos 3 biotipos *M. perniciosa*

Uma tabela binária de presença ou ausência de reação (1/0) foi construída, com posterior construção de tabela de similaridade e dendograma pelo programa NTSYS. Pela análise do dendograma obtido (Figura 5), dois grupos foram formados: grupo A, com todos os isolados estudados, com exceção de um isolado de cacau, oriundo do Amazonas, que forma sozinho o grupo B. O grupo A pôde ser dividido em dois subgrupos, um com 10 isolados de cacau, oriundos tanto da região amazônica quanto da Bahia, cinco isolados de solanácea, oriundos de Minas Gerais e Bahia, e o único de liana, e outro com dois isolados de cacau, ambos da Bahia e dois de solanácea, sendo um de Minas Gerais.

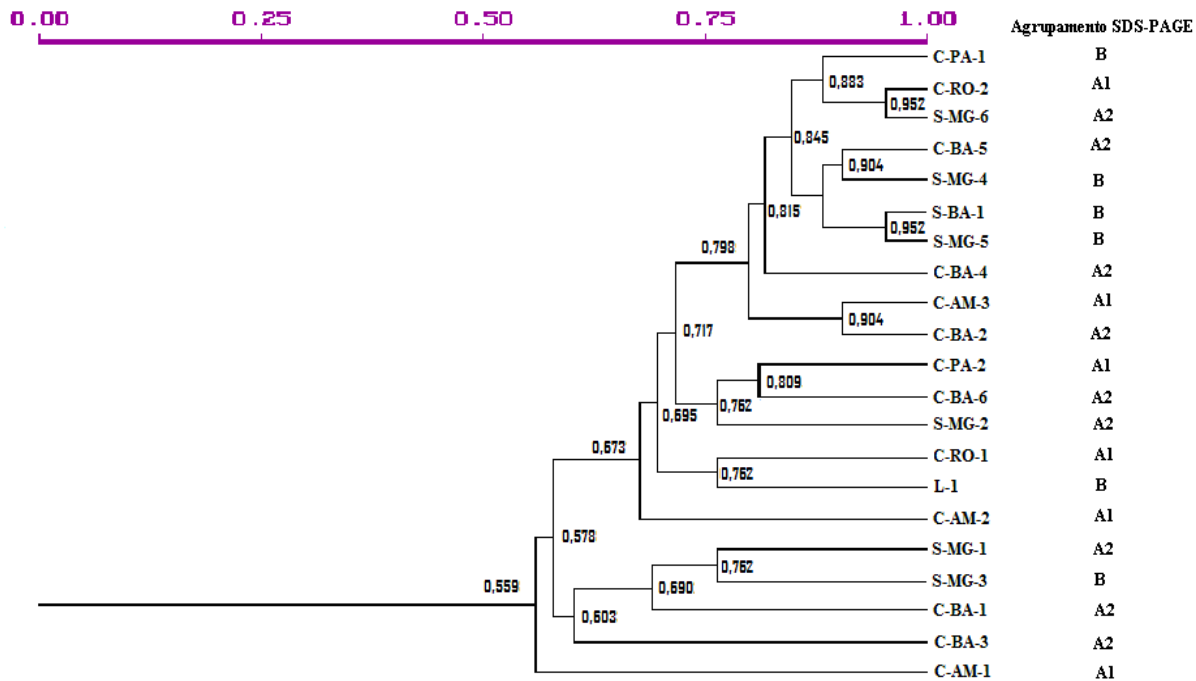


Figura 5 - Dendrograma baseado em teste de incompatibilidade somática entre isolados de *M. perniciosa* (valores de similaridade)

Os grupos formados não definem biotipos, nem reúnem isolados de uma mesma região geográfica. Esse resultado discorda da maioria dos obtidos por outros autores que utilizaram a mesma técnica para a caracterização de isolados de *M. perniciosa*. Mcgeary e Wheeler (1988) formaram seis grupos de compatibilidade somática de acordo com a origem geográfica de 64 isolados de *M. perniciosa* de cacau oriundos de 10 localidades da América do Sul e do Caribe. Outros autores encontraram resultados semelhantes, como Oliveira, Gramacho e Silva (2005), que formaram três grupos de isolados de acordo com a região da Bahia de onde vieram; um grupo com isolados predominantes do Sul, outro com isolados predominantes do Norte e um terceiro com dois isolados do norte.

Os resultados obtidos revelam a possibilidade de trocas de genes entre os três biotipos e de indivíduos de diferentes locais. O fungo apesar de homotálico, sistema que reduz variabilidade, apresenta um comportamento não restritivo de incompatibilidade entre biotipos e isolados geográficos. Esta conclusão deve ser cautelosa já que existe uma ausência de correlação com os dados já publicados, podendo-se supor que esta divergência seja resultado da falta de um

treinamento para identificação com precisão das reações de compatibilidade, pois é possível que a sobreposição de hifas não indique fusão destas.

A observação de muitas reações de compatibilidade entre os isolados estudados pode ser reflexo do meio de cultura utilizado para tal experimento (TDA) que talvez não seja adequado para visualização das reações de incompatibilidade, como observado por Griffith e Hedger (1994b), que ao utilizar o meio V8 para tal fim, concluíram que neste meio de cultura a reação de incompatibilidade fica mais nítida. Com a finalidade de confirmar os resultados obtidos por estes autores e melhorar a visualização das reações, o teste foi repetido em meio V8, porém nenhum dos pares de isolados apresentou a pigmentação típica de reação de incompatibilidade (dados não apresentados).

Poloni (2008), estudando variabilidade fisiológica e genética de isolados de *Bipolaris sorokiniana*, fungo fitopatogênico de cereais, comparou reações de incompatibilidade entre os isolados em diferentes meios de cultura e observou que as reações variavam de acordo com o meio de cultura utilizado, sugerindo que a incompatibilidade ou não pode ser influenciada pela composição do meio de cultura, já que o equilíbrio de fontes de C, N e P, vitaminas e micronutrientes são fatores importantes para o crescimento, esporulação e manifestação ou não de determinadas características, além de que ambientes estressantes (meios pobres em nutrientes) levariam a competição entre os fungos por nutrientes, que por mecanismos de proteção, evitariam trocas genéticas, favorecendo as reações de incompatibilidade.

Se de fato a composição do meio de cultura influencia as reações de compatibilidade ou incompatibilidade, a utilidade deste tipo de análise se torna discutível, já que um par de isolados pode ser compatível e incompatível ao mesmo tempo, dependendo do meio de cultura utilizado. Desta forma, o ideal seria padronizar a utilização de um meio de cultura especificamente para este tipo de teste, tornando a análise da variabilidade entre isolados possível.

2.3.4 Crescimento dos isolados de *M. perniciosa* em meio rico (TDA)

O crescimento dos diferentes isolados em meio TDA foi avaliado por 30 dias e verificou-se que os isolados atingiram o crescimento máximo (borda da placa) a partir do décimo dia. Os isolados com maior taxa de crescimento foram os isolados L-1 e S-BA-1 que atingiram crescimento máximo de 7,5 cm com 10 dias, porém 28,6% dos isolados atingiram este

crescimento apenas no último dia de avaliação (trigésimo). A comparação do crescimento foi realizada com dados coletados após 10 dias de cultivo, quando os isolados S-BA-1 e L-1, dos biotipos-S e L, atingiram o crescimento máximo na placa de Petri. O tempo para avaliação de crescimento aos 10 dias e o padrão de crescimento no meio TDA foi utilizado com referência para avaliação de crescimento nos demais meios.

A análise das taxas de crescimento com 10 dias mostram que o diâmetro micelial dos isolados variou de 1,0 a 7,5 cm, com a formação de dois grupos, um apresentando taxa de crescimento menor (C-PA-1, C-BA-1, C-BA-4, C-BA-5 e S-MG-3) e outro com taxa de crescimento maior, formado pelos demais isolados. No grupo com maior representatividade de isolados, observa-se grande amplitude do diâmetro micelial dos isolados, variando de 2,8 a 7,5 cm (Tabela 2) e a análise estatística não permitiu separar os isolados de acordo com crescimento aferido com 10 dias.

Contudo, de maneira geral, o isolado do biotipo-L e os isolados do biotipo-S apresentaram taxa de crescimento mais alta que os isolados de cacau, com exceção do isolado S-MG-3 que apresentou taxa de crescimento relativamente alta. Bastos, Anderbrhan e Almeida (1988), testando quatro meios de cultura diferentes, também constataram que o isolado de liana apresenta crescimento rápido e os isolados de cacau apresentam as velocidades mais baixas, comportamento este que concorda com o hábito de sobrevivência apresentado pelos biotipos na natureza, onde os isolados de liana mostram-se mais saprofíticos apresentando grande dependência da fase dicariótica para ter vida mais longa (GRIFFITH et al., 1994), além de apresentar atividade de enzimas lignocelulolíticas (HEDGER; PICKERING; ARAGUNDI, 1987), enquanto os isolados de cacau apresentam a fase biotrófica mais longa, seguida por fase saprofítica curta e disseminação rápida para novos tecidos (GRIFFITH et al., 1994).

Na análise de crescimento também foi possível avaliar a morfologia da colônia. Geralmente, isolados de *M. pernicioso* apresentam poucas características discriminatórias, com o micélio apresentando coloração branca e aspecto cotonoso ou não (rasteiro), fato observado no presente trabalho. Devido a esta característica é muito comum em coleções de *M. pernicioso* alguns isolados serem reclassificados em outras espécies após aplicação de marcadores moleculares (LEAL, 2002). Quanto à morfologia da colônia apenas seis isolados apresentaram micélio cotonoso ou semi-cotonoso, todos eles do biotipo-C, enquanto os demais apresentaram micélio rasteiro. Os dois grupos formados a partir da análise do crescimento apresentam isolados

com densidades miceliais diferentes, não mostrando relação entre os dois parâmetros avaliados. Portanto, a taxa de crescimento e morfologia da colônia em meio rico TDA não se constitui como parâmetros para caracterização de biotipos dentro da população de *M. pernicioso* estudada, quando avaliados de maneira isolada. Também não foi observada a produção de pigmento na condição avaliada.

A observação das mesmas taxas de crescimento para os isolados do biotipo-S e C não invalidam este parâmetro como fator secundário de patogenicidade. A velocidade de crescimento pode ser fundamental na fase saprofítica, permitindo uma colonização rápida dos tecidos mortos tanto para os biotipos-S quanto C. Na fase biotrófica, quando o fungo coloniza os tecidos vivos, ele restringe-se a base da vassoura que pode ter tamanho superior a 30 cm, portanto nestes tecidos a taxa de crescimento não seria o diferencial.

O fungo *M. pernicioso* comparado a outros fungos saprofíticos não é competitivo, porém por ter uma fase saprofítica, uma maior taxa de crescimento seria decisiva para uma colonização pioneira dos ramos mortos antes que competidores eficientes os dominem (ex. *Tridoderma sp.*, controle biológico) e para manter uma esporulação abundante. Assim, uma característica ancestral dos grupos saprofíticos (taxa de crescimento), seria relevante para o sucesso dos biotipos patogênicos, porém não discriminatórios dos mesmos, mas ainda fundamental para classificação de isolados dentro de biotipos. Contudo, esta característica deve ser estudada associada à inoculação de plantas e determinação de colonização da vassoura.

Tabela 2 – Valores médios do crescimento micelial (cm) e avaliação morfológica da hifas após 10 dias de cultivo em meio TDA

Isolados	Média do diâmetro da colônia (cm)	Densidade do micélio
S-BA-1	7,5 ^a	Rasteiro
L-1	6,7 ^a	Rasteiro
C-BA-3	6,7 ^a	Rasteiro
S-MG-2	6,5 ^a	Rasteiro
S-MG-6	6,4 ^a	Rasteiro
C-RO-2	6,1 ^a	Rasteiro
S-MG-1	6,1 ^a	Rasteiro
S-MG-4	5,8 ^a	Rasteiro
C-BA-2	5,7 ^a	Rasteiro
S-MG-5	5,7 ^a	Rasteiro
C-PA-2	5,2 ^a	Rasteiro
C-RO-1	5,2 ^a	Rasteiro
C-BA-6	4,9 ^a	Semi-cotonoso
C-AM-3	4,2 ^a	Cotonoso
C-AM-1	3,5 ^a	Semi-cotonoso
C-AM-2	2,8 ^a	Cotonoso
C-PA-1	1,8 ^b	Semi-cotonoso
C-BA-4	1,7 ^b	Rasteiro
S-MG-3	1,4 ^b	Rasteiro
C-BA-5	1,0 ^b	Semi-cotonoso
C-BA-1	1,0 ^b	Rasteiro

Valores das médias obtidas a partir de três repetições por isolado. Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes baseado em Teste Tukey 5%.

2.3.5 Efeito da ausência de aminoácidos no desenvolvimento dos isolados de *M. perniciosa*

Na avaliação dos 21 isolados com 10 dias de cultivo, foi observado o mesmo crescimento em relação ao meio rico (Tabela 3). No entanto, a avaliação até 30 dias de cultivo demonstrou que 52% dos isolados não havia atingido crescimento máximo da placa de Petri, paralisando o crescimento entre o décimo sexto e vigésimo dia. Destes 11 isolados, nove são do biotipo-C (C-PA-1, C-PA-2, C-AM-1, C-AM-2, C-AM-3, C-BA-1, C-BA-4, C-BA-5 e C-BA-6) e dois de Solanácea (S-MG-3 e S-MG-6) que representam 70% e 30% dos indivíduos amostrados de cada biotipo. Apesar dos fungos apresentarem um crescimento inicial similar ao apresentado no meio

TDA, algo se esgotou no meio mínimo fazendo o fungo paralisar seu crescimento. As prováveis classes de compostos limitantes podem ser micronutrientes ou vitaminas, já que a fonte de carbono (0,5%) e nitrogênio (0,5%) está compatível a meios sintéticos para fungos. A possibilidade de o fungo utilizar a reserva do pedaço de meio introduzido como inóculo não existe, pois isto foi evitado pela realização de dois cultivos sucessivos em meio MM, sendo avaliado apenas o segundo.

Tabela 3 – Crescimento micelial (cm) e morfologia da colônia dos 21 isolados com 10 dias de cultivo em meio TDA e MM

Isolados	Crescimento micelial		Densidade do micélio	
	TDA	MM	TDA	MM
S-BA-1	7,5 ^a	7,9 ^a	Rasteiro	Rasteiro
L-1	6,8 ^a	7,4 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-BA-3	6,7 ^a	6,5 ^a	Rasteiro	Semi-cotonoso
S-MG-2	6,5 ^a	4,6 ^a	Rasteiro	Rasteiro
S-MG-6	6,4 ^a	4,5 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-RO-2	6,1 ^a	5,3 ^a	Rasteiro	Rasteiro
S-MG-1	6,1 ^a	5,6 ^a	Rasteiro	Rasteiro
S-MG-4	5,8 ^a	6,6 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-BA-1	5,7 ^a	5,2 ^a	Rasteiro	Semi-cotonoso
S-MG-5	5,7 ^a	4,2 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-PA-2	5,2 ^a	4,3 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-RO-1	5,2 ^a	6,9 ^a	Rasteiro	Rasteiro
C-AM-1	4,9 ^a	3,2 ^a	Semi-cotonoso	Semi-cotonoso
C-AM-3	4,2 ^a	4,7 ^a	Cotonoso	Rasteiro
C-AM-1	3,5 ^a	2,2 ^a	Semi-cotonoso	Rasteiro
C-AM-2	2,8 ^a	1,8 ^a	Cotonoso	Semi-cotonoso
C-PA-1	1,8 ^a	1,4 ^a	Semi-cotonoso	Cotonoso
C-BA-4	1,7 ^a	2,6 ^a	Rasteiro	Semi-cotonoso
S-MG-3	1,4 ^a	0,9 ^a	Rasteiro	Semi-cotonoso
C-BA-5	1,0 ^a	1,5 ^a	Semi-cotonoso	Semi-cotonoso
C-BA-1	1,0 ^a	2,2 ^a	Rasteiro	Semi-cotonoso

Valores das médias obtidas a partir de três repetições por isolado. Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes são significantemente diferentes baseado em Teste Tukey 5%.

Outra manifestação no desenvolvimento dos isolados que revela a falta de algum nutriente necessário para o desenvolvimento foi a produção de pigmento de coloração vermelha por sete dos 21 isolados (Figura 6). A produção de pigmentos foi observada tanto para o biotipo-S (S-

MG-2 e S-MG-6) quanto para o biotipo-C (C-PA-2, C-AM-1, C-AM-2, C-BA-1 e C-BA-5). Os isolados do biotipo-S foram avaliados com crescimento de 4 cm com 10 dias e destes, o S-MG-6 teve o crescimento paralisado entre o décimo sexto e o vigésimo dia de cultivo.

No biotipo-C os isolados produtores de pigmento tiveram menor crescimento no meio MM com 10 dias e o isolado C-PA-2 teve crescimento similar ao no meio TDA com 30 dias, não atingindo o diâmetro total da placa de Petri. A correlação destes dados com a análise de similaridade, baseada nas proteínas totais, revelam que estes materiais pertencem ao grupo A. Desta forma, no grupo A estão os isolados produtores de pigmento com menor crescimento no meio TDA e no meio mínimo, o qual carece de alguma vitamina ou micronutrientes, ou apresenta doses reduzidas destes. A produção de pigmentos em *M. perniciosus* já foi relatada em reação de incompatibilidade, degradação de ligninas, ou indução por luz (HEDGER; PICKERING, 1987; BASTOS; ANDEBRHAN; ALMEIDA, 1988) sendo sempre associada a uma condição relacionada com reprodução (reação a incompatibilidade e exposição à luz) ou condições nutricionais limitantes (degradação de ligninas).

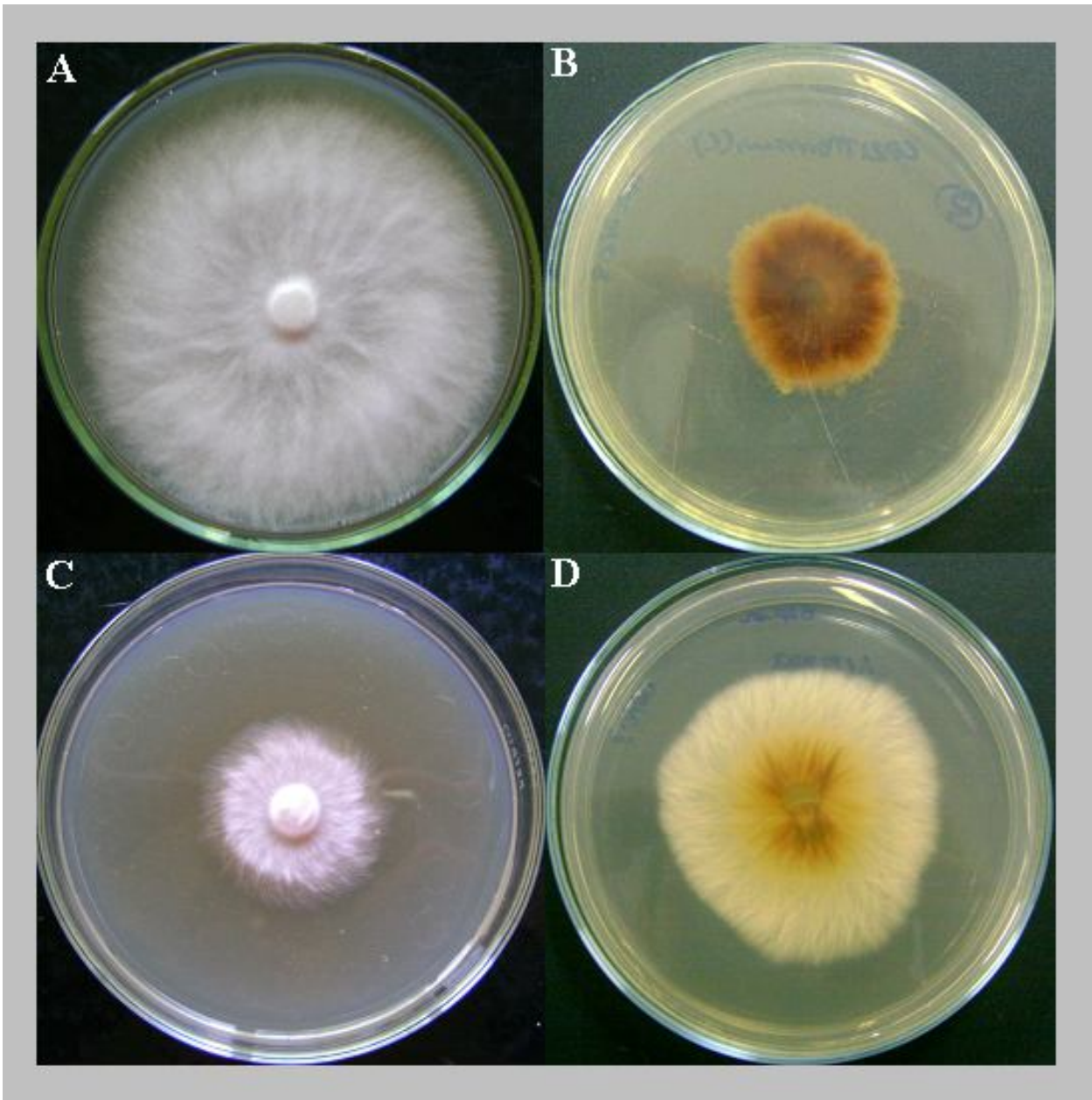


Figura 6 – Fotos representativas da produção de pigmentos pelos isolados C-AM-1 (A e B) e C-AM-3 (C e D), comparando TDA (A e C esquerda) com meio mínimo (B e D)

Também foi verificada alteração no aspecto do micélio. Isolados que em meio TDA apresentaram aspecto rasteiro (C-BA-3, C-BA-1, C-BA-4, C-BA-4, S-MG-3) tornaram-se semi-cotonosos, os que eram cotonosos (C-AM-3, C-AM-2) tornaram-se rasteiros e os semi-cotonosos (C-AM-1, C-PA-1) ou tornaram-se rasteiros ou cotonosos. Os isolados do biotipo C apresentaram maiores modificações quando comparados em meio rico e meio pobre, haja vista que enquanto 61,54% dos isolados de cacau apresentaram diferenças de densidade micelial nos dois meios de cultura, apenas 14,3% dos isolados de solanácea se comportaram desta forma. O isolado de liana

não apresentou qualquer mudança. Além disso, apenas isolados do biotipo C apresentaram produção de pigmento de tonalidades do vermelho em meio mínimo. Os dados de crescimento, produção de pigmento e alteração da morfologia no cultivo mínimo revelam que isolados do biotipo-C são mais exigentes nutricionalmente, pois foram estes que apresentaram maiores alterações.

2.3.6 Efeito de aminoácidos no desenvolvimento de *M. perniciosus*

Os cultivos em meio MM e os cultivos acrescidos de aminoácidos foram conduzidos concomitantemente e os aminoácidos metionina e cisteína foram escolhidos pelo conhecimento de que estes estão envolvidos com a especialização de linhagens de *Aspergillus flavus* (SCULLY; BIDOCHKA, 2006) a hospedeiros, e o aminoácido lisina foi escolhido de maneira aleatório para servir de parâmetro. Esta abordagem foi adotada já que alguns fungos no meio TDA apresentavam uma velocidade de crescimento lenta e acreditava-se que poderia ser um problema de auxotrofia. Como abordado no tópico anterior os isolados cresceram no meio mínimo e as alterações observadas podem ser decorrentes de outro tipo de nutriente em concentração sub-ótima e não a auxotrofia.

No entanto a presença dos aminoácidos lisina, cisteína e metionina no meio mínimo promoveu alterações na fisiologia de alguns isolados. Como abordado no item anterior, após 10 dias de cultivo, o crescimento dos isolados no meio mínimo acrescido separadamente dos três aminoácidos não foi alterado em relação ao meio mínimo (Tabela 4) e ao final dos 30 dias de avaliação, apenas os isolados L-1 (lisina, metionina, cisteína), S-MG-1 e S-MG-4 (lisina e metionina) apresentaram crescimento até o final da placa de Petri. Ao invés de promover o crescimento, a adição de aminoácidos causou um efeito inibitório não validado pela análise estatística.

As observações confirmam o efeito da inibição pelo fato de que enquanto 52% do isolados no meio mínimo paralisaram o crescimento antes de atingir a borda da placa de Petri, nos meios com os aminoácidos lisina e cisteína, esta porcentagem aumentou para 85 % e no meio com metionina foi para 95%. A falta de validação estatística pode ter ocorrido devido ao fato de alguns isolados terem apresentado variação entre repetições na presença dos aminoácidos o que não ocorreu no meio mínimo, sendo C-AM-2, C-AM-1, C-BA-2, C-BA-3, C-BA-4, C-RO-1, C-

BA-6 e S-MG-2 em lisina, C-AM-2, C-AM-1, C-BA-2, C-PA-1 e C-AM-3, em metionina e C-BA-3, C-BA-4, S-MG-2, S-MG-6 e S-BA-1 em cisteína. A falta de variação nas medidas tomadas no meio mínimo e o fato desta ocorrer na presença dos aminoácidos revelam a interferência da lisina, cisteína e metionina no metabolismo de alguns isolados.

Tabela 4 – Crescimento micelial (cm) após 10 dias de cultivo dos isolados do biotipo Liana (L), Cacau (C) e Solanácea (S) de *M. pernicioso* em meio mínimo (MM) e meio mínimo (MM) acrescido dos aminoácidos lisina (Lis), metionina (Met) e cisteína (Cist)

Isolados	Diâmetro da colônia (cm)			
	Meios de Cultura ¹			
	MM	MM-Lis	MM-Met	MM-Cist
C-PA-1	1,4 ^a	1,7 ^a	1,0 ^a	0,9 ^a
C-PA-2	4,3 ^a	1,0 ^a	1,6 ^a	0,8 ^a
C-RO-1	6,9 ^a	3,7 ^a	2,0 ^a	5,1 ^a
C-RO-2	5,3 ^a	3,2 ^a	4,1 ^a	2,8 ^a
C-AM-1	2,2 ^a	1,2 ^a	1,5 ^a	1,7 ^a
C-AM-2	1,8 ^a	0,3 ^a	1,0 ^a	1,5 ^a
C-AM-3	4,7 ^a	2,6 ^a	2,4 ^a	2,6 ^a
C-BA-1	2,2 ^a	1,4 ^a	1,5 ^a	1,1 ^a
C-BA-2	5,1 ^a	3,2 ^a	2,6 ^a	2,2 ^a
C-BA-3	6,5 ^a	3,9 ^a	3,0 ^a	4,7 ^a
C-BA-4	2,6 ^a	1,4 ^a	0,9 ^a	2,2 ^a
C-BA-5	1,5 ^a	0,2 ^a	0,8 ^a	0,8 ^a
C-BA-6	3,2 ^a	2,6 ^a	2,2 ^a	1,1 ^a
S-MG-1	5,6 ^a	3,8 ^a	5,1 ^a	5,3 ^a
S-MG-2	4,6 ^a	1,0 ^a	0,3 ^a	1,3 ^a
S-MG-3	0,9 ^a	0,9 ^a	0,7 ^a	0,9 ^a
S-MG-4	6,6 ^a	3,8 ^a	3,9 ^a	2,6 ^a
S-MG-5	4,2 ^a	3,6 ^a	3,6 ^a	3,6 ^a
S-MG-6	4,5 ^a	2,2 ^a	3,1 ^a	3,4 ^a
S-BA-1	7,9 ^a	6,0 ^a	4,9 ^a	5,4 ^a
L-1	7,4 ^a	5,7 ^a	6,4 ^a	6,5 ^a

1)MM, meio mínimo; MMLis, meio mínimo acrescido de lisina; MMMet, meio mínimo acrescido de metionina; MMCis, meio mínimo acrescido de cisteína.

2) Valores das médias obtidas a partir de três repetições de cada meio por isolado. Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes são significantemente diferentes baseado em Teste Tukey 5%.

Além da inibição no crescimento, nestes ensaios foi observada a produção de pigmentos de coloração amarelo e vermelho (Figura 7). A produção de pigmentos variou de acordo com o aminoácido adicionado ao meio mínimo e com o isolado avaliado. No meio com lisina a produção de pigmento de tonalidade amarela foi observado no micélio dos isolados C-BA-6 e S-MG-2 e o

pigmento vermelho nos isolados C-PA-2, C-AM-1 e C-AM-3. No meio com metionina o pigmento amarelo foi produzido pelos isolados C-BA-6 e S-MG-2 e pigmento vermelho pelos isolados C-PA-2, C-AM-1, C-AM-2, C-AM-3, C-BA-5 e S-MG-6. No cultivo com cisteína o pigmento amarelo foi observado nos isolados C-BA-4 e S-MG-2 e vermelho nos isolados C-PA-2, C-AM-1, C-AM-2 e C-AM-3. Portanto, quatro isolados apresentaram pigmentação na presença dos três aminoácidos, destes um de solanácea (S-MG-2), na tonalidade do amarelo e três de cacau (C-PA-2, C-AM-1 e C-AM-3), nas tonalidades do amarelo/vermelho. Os aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) induziram a produção de pigmento vermelho em quatro isolados (C-PA-2, C-AM-1, C-AM-2 e C-AM-3).

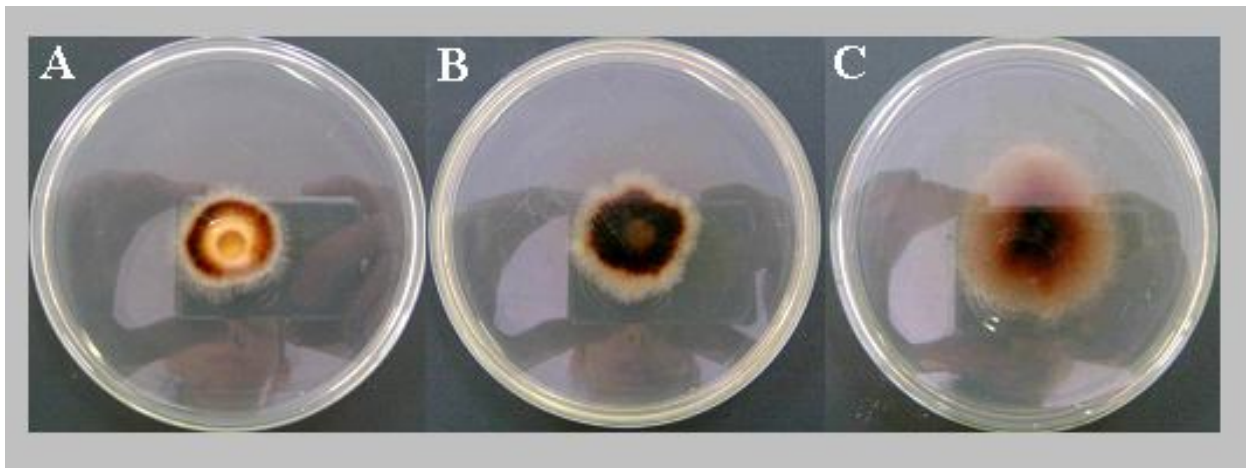


Figura 7 – Fotos representativas da produção de pigmentos por isolados de *M. pernicioso* em meio mínimo acrescido de lisina (A), metionina (B) e cisteína (C)

Efeitos de estímulo ou inibição do crescimento de fungos por aminoácidos dependem da concentração do aminoácido de interesse e da composição do meio de cultura, particularmente no que se refere à presença de outros aminoácidos (VAN ANDEL, 1966). Isso porque em alguns casos um aminoácido pode competir com outro aminoácido que seja essencial para o desenvolvimento do fungo pelo canal de transporte para dentro da célula, e o fungo ter seu crescimento conseqüentemente inibido (GRIFFIN, 1994). Porém, não foi o caso do experimento conduzido no presente trabalho, já que se utilizou meio mínimo (sem aminoácidos), com adição separada dos aminoácidos.

O efeito inibitório ocasionado por aminoácidos, que no presente trabalho foi aparente, vem sendo observado em alguns fungos. Espécies e linhagens diferentes podem responder de forma adversa a aminoácidos (VAN ANDEL, 1966). Chet, Henis e Metcchell (1966) estudaram o

efeito de aminoácidos contendo enxofre sobre as características morfogenéticas do fungo *Sclerotium rolfii* Sacc. e observaram que em baixas concentrações de aminoácidos (10^{-4} a 10^{-5} mols) ocorria a inibição da produção de escleródios, mas não do crescimento micelial e em concentrações mais altas de aminoácidos (superior a 10^{-2} mols) tanto a produção de escleródios quanto o crescimento micelial eram inibidos. Os autores observaram que tanto cisteína quanto metionina inibiram o crescimento do fungo em concentrações altas, enquanto lisina não teve tal efeito nas mesmas concentrações.

Uma explicação possível para a aparente e não real inibição exibida pelos isolados de *M. pernicioso*, está na concentração de aminoácidos utilizada. Baseando-se no trabalho acima citado, calcula-se que as concentrações utilizadas no presente estudo estão entre baixas e intermediárias ($4,9 \cdot 10^{-4}$ mols de cisteína, $1,34 \cdot 10^{-4}$ mols de metionina e $1,64 \cdot 10^{-4}$ mols de lisina), resultando numa inibição não significativa. Em contrapartida, no trabalho de Lowther (1964), cisteína inibiu as três raças de *Cladosporium fulvum* (CKE) estudadas, e a concentração utilizada pelo autor foi duas vezes maior que a utilizada no presente trabalho. Provavelmente essa inibição se relaciona com o metabolismo do fungo em questão, já que este pertence à divisão Deuteromycota enquanto *M. pernicioso* e *Sclerotium rolfii* pertencem à divisão Basidiomycota. O autor também observou produção de pigmentos de coloração diferente entre as raças frente a maioria dos aminoácidos utilizados, fato também observado no presente trabalho. Os resultados encontrados são muito diversos. Por exemplo, os mesmos aminoácidos que estimularam o crescimento de *Cladosporium fulvum* CKE, no caso, ácido aspártico e glutamina, inibiram o crescimento de duas linhagens de *Helminthosporium gramineum* (SKOROPAD; ARNY, 1957).

2.3.7 Efeito de diferentes fungicidas no desenvolvimento de *M. pernicioso*

Os ingredientes ativos dos quatro fungicidas pertencem a três grupos de compostos. O ingrediente ativo do Benlate e Fungiscan é o benomyl e o tiofanato metílico, respectivamente, que estão no grupo dos Benzimidazóis, que age inibindo a biossíntese de tubulinas, prejudicando a divisão celular. O fungicida Bim tem como ingrediente ativo o triciclazol que é do grupo dos Benzotiazóis, que age na inibição da biossíntese de melanina. O ingrediente ativo do Persist é o mancozeb, representante do grupo dos ditiocarbamatos, que levam ao colapso geral nas funções celulares, com vários locais de ação (HEWITT, 1998). Assim temos princípios ativos que afetam

a divisão celular, síntese de melanina e a célula de forma generalizada sem ter o modo de ação elucidado.

A presença do fungicida Benlate no meio TDA causou altas porcentagens de inibição para todos os isolados (Figura 8). O isolado que apresentou menor taxa de inibição foi o de liana (71,9%). Nenhum isolado apresentou qualquer mudança de densidade micelial ou irregularidade no crescimento. Todos os isolados apresentaram pigmentação marrom exceto três isolados de solanácea (S-MG-3, S-MG-4 e S-MG-6).

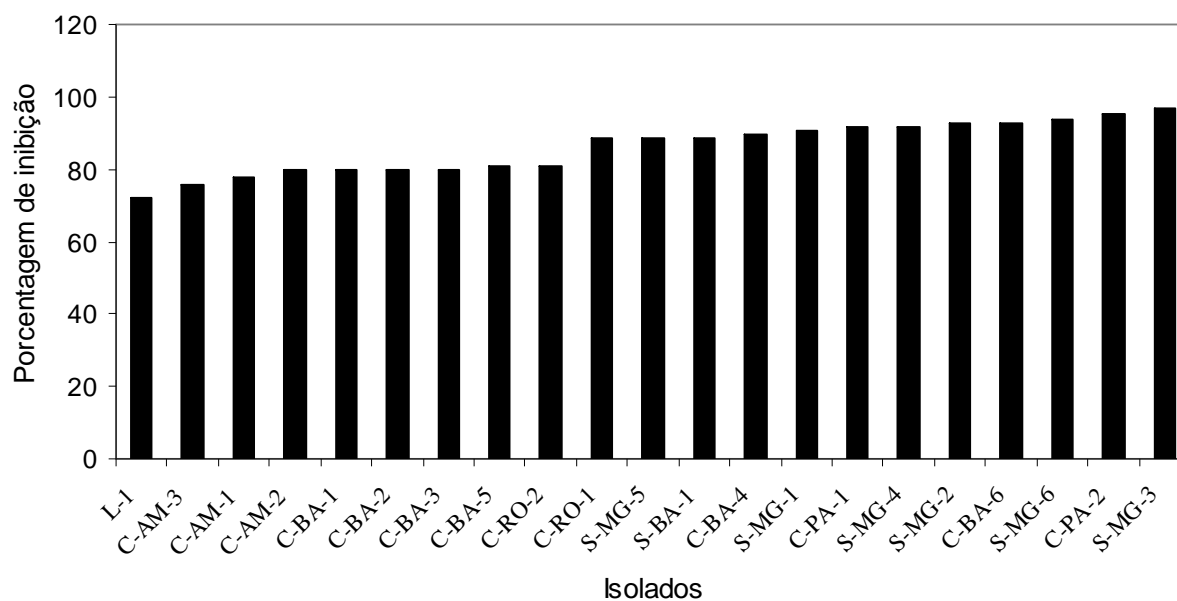


Figura 8 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosa* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de Benlate

No entanto a presença do fungicida Fungiscan resultou numa taxa de inibição variável de 0 a 80% (Figura 9). Apenas um isolado do biotipo-C apresentou mudança na densidade micelial (C-BA-5) e um do biotipo-S apresentou irregularidades no crescimento (S-MG-1). A presença do fungicida induziu a produção de pigmento marrom, vermelho e amarelo. A produção de pigmento marrom não foi comum como observado nos cultivos expostos a Benlate e apenas um isolado do biotipo-C (C-PA-2) apresentou pigmento nesta tonalidade. O pigmento vermelho foi observado no isolado de liana, em todos os isolados de solanácea e no biotipo-C apenas em dois isolados (C-RO-1 e C-BA-3), os quais apresentaram uma leve produção. Também foi observada a produção de pigmento amarelo em sete isolados do biotipo-C (C-PA-1, C-AM-1, C-AM-2, C-BA-1, C-BA-

2, C-BA-4 e C-BA-6). Nenhuma relação entre produção de pigmento e inibição de crescimento foi encontrada.

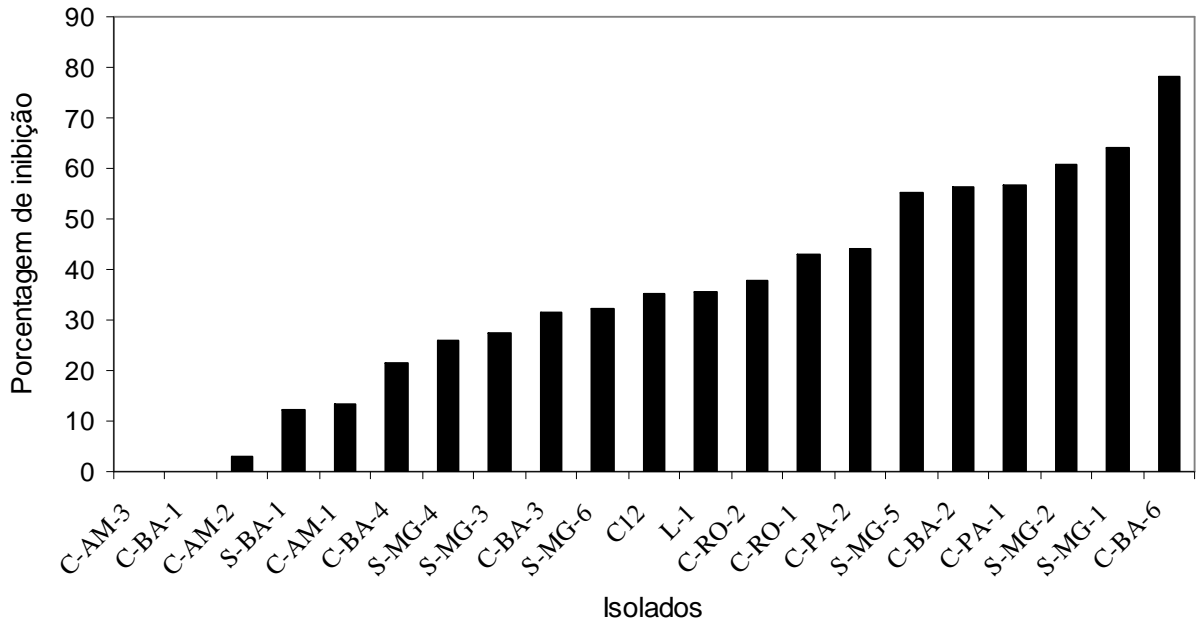


Figura 9 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosa* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de Fungiscan

Esperava-se que os resultados obtidos com a utilização dos fungicidas Benlate e Fungiscan fossem semelhantes já que ambos pertencem ao mesmo grupo de compostos (benzimidazóis), e foram utilizados na mesma concentração (1000 mg.L⁻¹), porém não foi o que ocorreu. Enquanto em Benlate houve grandes taxas de inibição para todos os isolados, em Fungiscan houve grande diferença entre taxas de inibição, com um isolado apresentando 78% de inibição e outros apresentando nenhuma. Mesmo no que diz respeito à produção de pigmentos, os dois apresentaram efeitos diferentes, pois na presença de Benlate os isolados de *M. perniciosa* produziram o pigmento marrom enquanto em contato com Fungiscan o pigmento induzido predominantemente foi o amarelo e/ou vermelho.

Apesar da porcentagem de inibição do fungicida Benlate ter sido alta para todos os isolados, deve-se ressaltar que a concentração de ingrediente ativo utilizado também foi alta (1000 mg.L⁻¹). Bastos (1979), estudando a eficiência de 22 fungicidas sobre a germinação de esporos de *Moniliophthora perniciosa*, comentou a baixa ou nenhuma fungitoxicidade de compostos benzimidazólicos a Basidiomicetos. Apesar disso, constatou que um dos fungicidas

que inibiu 100% da germinação foi o Tiofanato metílico (Fungiscan), que pertence a este grupo de compostos. Porém, no que diz respeito à inibição do crescimento micelial, Bastos e Medeiros (1979) não observaram eficiência destes dois fungicidas. Contudo, estes autores utilizaram apenas um isolado nos testes, não levando em consideração a alta variabilidade deste fungo, e com isso mascarando a possibilidade de eficiência dos mesmos contra grupos específicos de isolados.

No fungicida Bim, houve grande diferença entre as taxas de inibição apresentadas pelos isolados, entre 3,05 e 71,75% (Figura 10). A densidade do micélio foi alterada em dois isolados, sendo um do biotipo-C, C-AM-2, com aumento da densidade e um do biotipo-S, S-MG-1, com diminuição. Não houve produção de pigmentos por nenhum isolado. Como este fungicida atua na síntese de melanina, pode estar atuando também na síntese do pigmento.

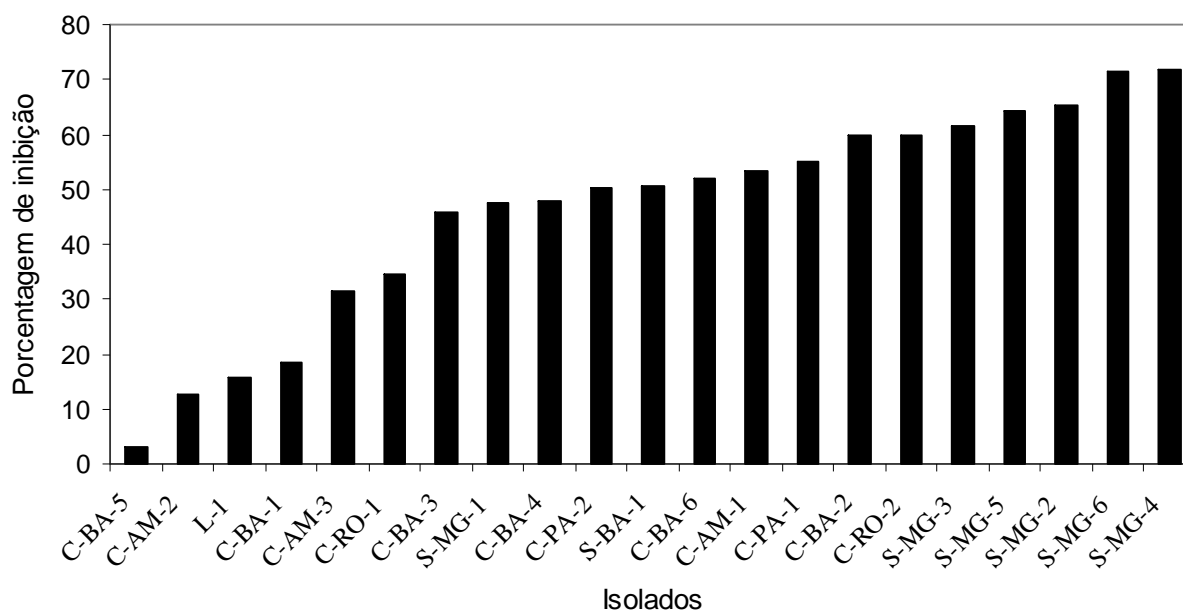


Figura 10 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosos* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 100 mg L⁻¹ de Bim

No fungicida Persist também houve grande variação na porcentagem de inibição entre os isolados (entre 22,68 e 100%) (Figura 11). Quatro isolados foram completamente inibidos, um de solanácea (S-MG-3) e três de cacau (C-PA-2, C-RO-1 e C-BA-6). Nenhum isolado apresentou mudança na densidade micelial. A produção de pigmento foi observada no isolado do biótipo-L, em cinco isolados do biotipo-S (S-MG-1, S-MG-2, S-MG-5, S-MG-6 e S-BA-1) e cinco do

biotipo-C (C-RO-1 e C-BA-3, C-PA-1, C-RO-2 e C-AM-1). O isolado de liana também apresentou leve produção de pigmento vermelho.

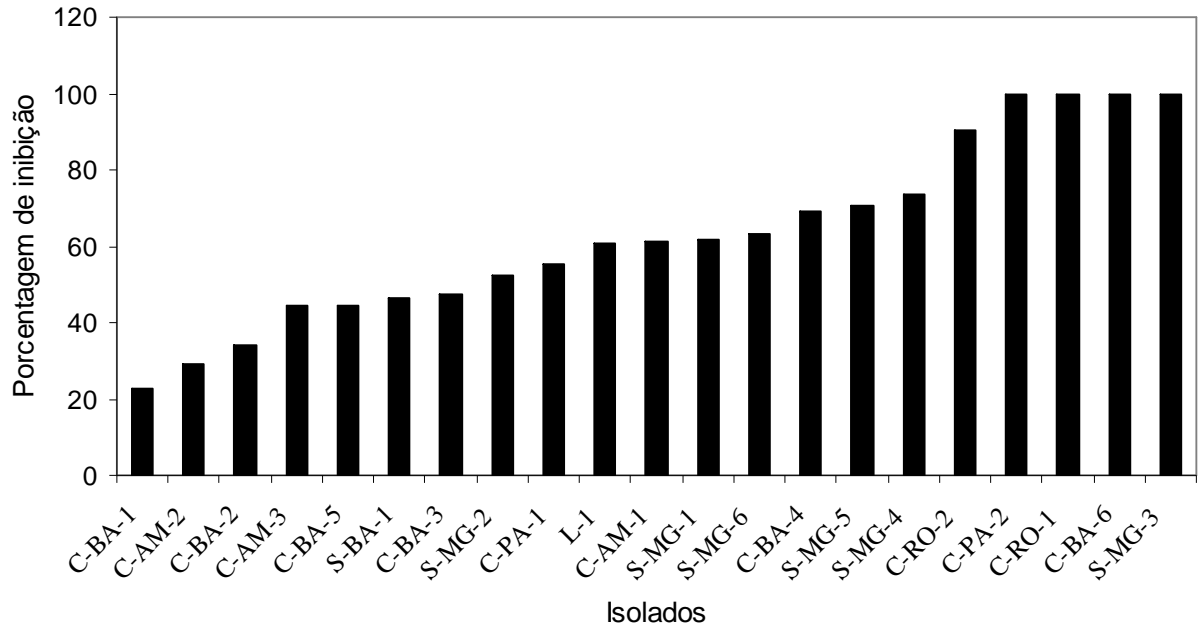


Figura 11 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados dos biotipos liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. perniciosa* após 10 dias de cultivo em meio TDA na presença de 1000 mg.L⁻¹ de Persist

Analisando-se os efeitos dos quatro fungicidas, nas concentrações selecionadas, sobre o desenvolvimento dos 21 isolados de *Moniliophthora perniciosa*, nota-se grande variação na taxa de inibição do crescimento dos isolados causada por cada um deles. Na análise estatística os dados de porcentagem foram transformados para que entrassem em uma distribuição normal e não mostraram efeito diferencial dos compostos utilizados sobre os isolados dos biotipos estudado (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de inibição em porcentagem transformados em arc sen $\sqrt{\%}$

Isolados	Fungicidas			
	Benlate	Fungiscan	Bim	Persist
S-MG-3	79,6 ^a	31,1 ^a	52,6 ^a	90,0 ^a
C-PA-2	77,6 ^a	41,7 ^a	45,1 ^a	90,0 ^a
C-PA-1	75,9 ^a	48,7 ^a	48,0 ^a	47,9 ^a
S-MG-6	75,5 ^a	34,4 ^a	57,8 ^a	52,7 ^a
C-BA-6	75,0 ^a	71,9 ^a	46,2 ^a	90,0 ^a
C-BA-4	74,4 ^a	27,4 ^a	43,9 ^a	61,4 ^a
S-MG-2	74,4 ^a	51,2 ^a	54,0 ^a	46,3 ^a
S-MG-4	73,1 ^a	30,5 ^a	57,9 ^a	60,2 ^a
S-MG-1	72,4 ^a	53,2 ^a	43,6 ^a	52,0 ^a
C-RO-1	70,4 ^a	41,0 ^a	35,9 ^a	90,0 ^a
S-BA-1	70,4 ^a	20,4 ^a	45,3 ^a	42,8 ^a
S-MG-5	70,3 ^a	48,0 ^a	53,4 ^a	62,3 ^a
C-RO-2	64,1 ^a	37,9 ^a	50,7 ^a	79,1 ^a
C-BA-5	64,1 ^a	37,7 ^a	9,2 ^a	44,5 ^a
C-BA-1	63,9 ^a	0 ^a	21,5 ^a	20,6 ^a
C-BA-3	63,4 ^a	34,2 ^a	58,4 ^a	43,5 ^a
C-BA-2	63,4 ^a	48,6 ^a	50,6 ^a	35,3 ^a
C-AM-2	63,3 ^a	9,2 ^a	20,6 ^a	32,3 ^a
C-AM-1	61,6 ^a	21,2 ^a	46,9 ^a	52,1 ^a
C-AM-3	60,4 ^a	6,3 ^a	34,1 ^a	45,4 ^a
L-1	57,9 ^a	36,6 ^a	22,9 ^a	56,7 ^a

Valores das médias obtidas a partir de três repetições por isolado. Valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes baseado em Teste Tukey 5%.

Os resultados obtidos com os fungicidas não puderam ser relacionados com os obtidos pela análise dos perfis protéicos. Também não foi observada qualquer relação entre os resultados de inibição de crescimento, produção de pigmento, densidade micelial e irregularidade apresentada pelos fungicidas e com os apresentados em meio mínimo e na presença dos três aminoácidos. Todos os isolados, em pelo menos um destes tratamentos, apresentou algum tipo de pigmento. A única observação que se pode fazer é que dois isolados sofreram mais com os efeitos dos tratamentos no que diz respeito a mudanças na morfologia da colônia (densidade e irregularidade), sendo um do biotipo-C (C-BA-5) e um do biotipo-S (S-MG-1), e que o isolado do biotipo-L não sofreu qualquer alteração deste tipo.

Novamente observou-se a produção de pigmentos nas tonalidades do amarelo, do marrom e do vermelho (Figura 12). É possível que a produção de pigmento ocorra como forma de aumentar de competitividade do fungo quando este se encontra exposto a determinados compostos desfavoráveis ao seu crescimento, como fungicidas, ou exposto à iluminação, visto

que pigmentos são metabólitos secundários que podem conferir resistência, por exemplo, à luz ultra-violeta (UV) e à dissecação (EAGEN; BRISSON; BREUIL, 1997; BUTLER et al., 2001).

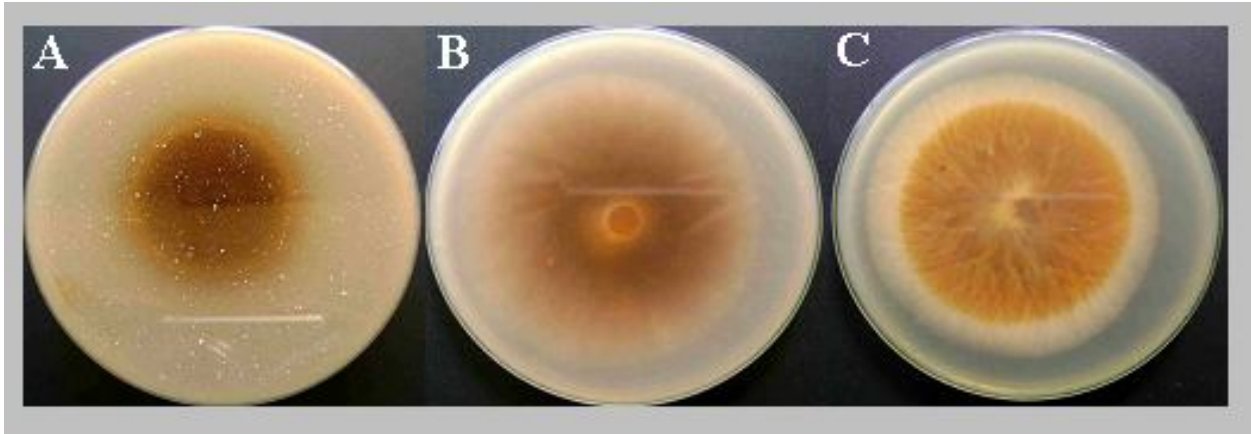


Figura 12 – Produção de pigmentos por isolados de *M. perniciososa* em cultivos de TDA na presença do Fungicida Benlate (A, 1000 mg.L⁻¹), Fungiscan (B, 1000 mg.L⁻¹) e Persist (C, 1000 mg.L⁻¹)

2.3.8 Efeito de diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio e dois regimes de luz em *M. perniciososa*

Especificamente para este teste, foi incluído um isolado do biótipo-C (CP7, código C-BA-7). O isolado CP-7 produz pigmento vermelho quando cultivado sob fotoperíodo de 12 h em meio contendo 2 mM de tartarato de amônio e não em 4 mM de nitrato de potássio (LEAL, 2006). Neste experimento, observou-se que as taxas de crescimento de todos os isolados não diferiram significativamente frente às duas fontes de nitrogênio, portanto tanto 2 mM tartarato de amônio, quanto 4 mM nitrato de potássio foram utilizados para o desenvolvimento dos isolados, mostrando que *M. perniciososa* tem a capacidade de utilizar diretamente tanto uma fonte reduzida de nitrogênio (amônio) quanto uma fonte que ainda necessita passar pelo processo de redução (nitrato). Basidiomicetos geralmente utilizam as duas formas de nitrogênio, porém nitrato de uma forma muito mais lenta, requerendo muito mais tempo e gasto de energia para sua incorporação em metabólitos essenciais (HACSKAYLO; LILLY; BARNETT, 1954).

Observou-se a produção de pigmento por alguns isolados nas quatro condições estudadas neste experimento (Figura 13). Esta é causada pelo efeito combinado da baixa dose de nitrogênio na forma de amônio e exposição à luz (LEAL, 2006). Neste estudo foi apenas considerado a

menor dose de nitrato utilizada por Leal (2006) (sendo a maior 100 mM), escolhida pelo conhecimento prévio de que nitrogênio nesta forma, em doses reduzidas, não promove a produção de pigmento no isolado referência (C-BA-7). Nestas condições verificou-se que a produção de pigmento vermelho estava associada à fonte de nitrogênio disponibilizada e fotoperíodo. Dos 22 isolados avaliados, 10 apresentaram produção de pigmentos vermelho (C-PA-2, C-RO-2, C-AM-1, C-AM-2, C-BA-3, C-BA-7, S-MG-2, S-MG-5, S-MG-6, S-BA-1) na condição de amônio e fotoperíodo.

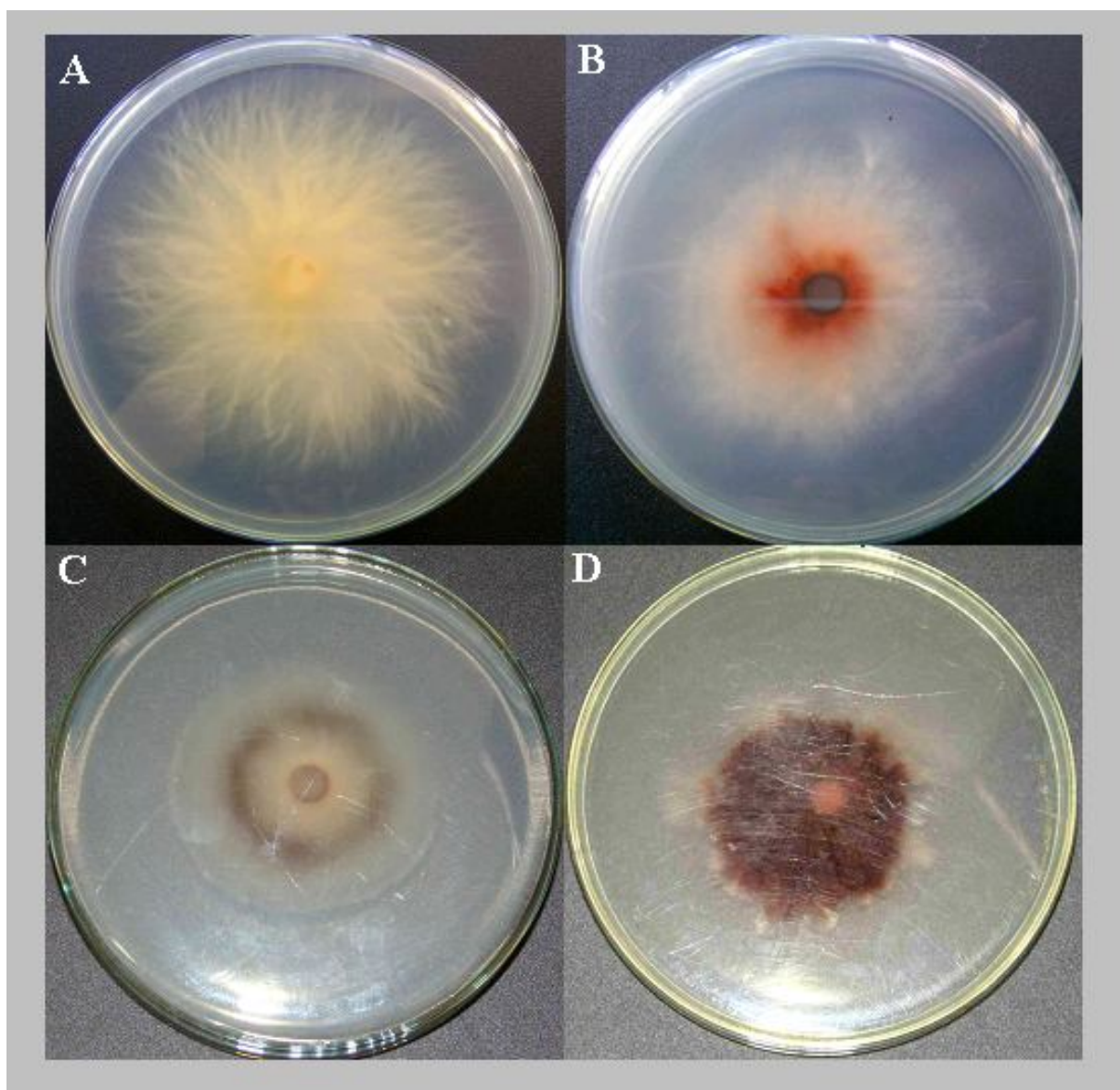


Figura 13 - Produção de pigmentos dos isolados de *M. perniciosus* em meio yeast carbon base acrescidos de 4 mM Nitrato de potássio (A e C) e 2 mM de Tartarato de amônio (B e D) mantidos no escuro (A e B) e sob fotoperíodo (C e D)

Outro pigmento produzido foi o de coloração amarela, observado em todas as condições, mas com maior frequência no cultivo mantido com nitrato e fotoperíodo. A tonalidade destes pigmentos variou de amarelo a vermelho, dependendo do isolado e da condição em que cada um se encontrava. Provavelmente o pigmento amarelo seja o precursor do vermelho.

De maneira geral, observou-se que no meio de cultura contendo tartarato de amônio predominou a produção de pigmentos vermelhos, enquanto no meio contendo nitrato de potássio, predominou a produção de pigmentos amarelos, com uma frequência maior de produção na condição de fotoperíodo. Além disso, enquanto boa parte dos isolados do biotipo-C apresentou pigmentos no escuro, apenas um isolado do biotipo-S apresentou leve pigmentação amarelada nesse mesmo regime de luz (Tabela 6).

Outros autores que citam a produção de pigmentos por *Moniliphthora perniciosa* são Hedger, Pickering e Aragundi (1987), que relataram que tanto isolados de cacau quanto de liana podem produzir pigmentos profundamente vermelhos e que a exposição à luz do dia ou à Ultra-violeta (365nm) aumenta a taxa de pigmentação.

Tabela 6 – Notação da produção e tonalidade de pigmentos dos isolados do biotipo liana (L), cacau (C) e solanácea (S) de *M. pernicioso* em meio Yeast Carbon Base acrescidos de 4mM Nitrato de potássio e 2 mM de Tartarato de amônio mantidos no escuro e sob fotoperíodo (12h)

Isolados	Hospedeiro	Escuro		Fotoperíodo	
		Tartarato de amônio	Nitrato de Potássio	Tartarato de amônio	Nitrato de Potássio
C-PA-1	Cacau	Amarelo vermelho +		Amarelo vermelho ++	
C-PA-2	Cacau	Amarelo vermelho++		Vermelho +++	Vermelho +
C-RO-1	Cacau	Amarelo +		Amarelo +++	Amarelo +
C-RO-2	Cacau			Vermelho +++	
C-AM-1	Cacau	Vermelho ++		Vermelho ++	Amarelo +
C-AM-2	Cacau	Amarelo vermelho +	Amarelo +++	Amarelo vermelho++ (no plug)	
C-AM-3	Cacau		Amarelo +++	Amarelo ++	
C-BA-1	Cacau	Amarelo vermelho ++	Amarelo/vermelho+ ++ (no plug)		
C-BA-2	Cacau	Amarelo vermelho ++		Amarelo vermelho+	Amarelo +
C-BA-3	Cacau			Amarelo/vermelho++	
C-BA-4	Cacau		Amarelo ++	Amarelo vermelho ++	Amarelo ++
C-BA-5	Cacau				
C-BA-6	Cacau				
S-MG-1	Solanácea			Amarelo +++	Amarelo +
S-MG-2	Solanácea			Amarelo vermelho ++	Amarelo +++
S-MG-3	Solanácea				
S-MG-4	Solanácea				
S-MG-5	Solanácea		Amarelo +	Vermelho +	Amarelo +++
S-MG-6	Solanácea			Vermelho +	Amarelo ++
S-BA-1	Solanácea			Vermelho +++	
L-1	Liana				Amarelo ++ (no plug)
C-BA-7	Cacau	Amarelo +	Amarelo +++	Vermelho +++	Amarelo vermelho + (no plug)

+ pigmentação fraca; ++ pigmentação intermediária; +++ pigmentação intensa

A produção de compostos de coloração amarela e vermelha já foi anteriormente observada no gênero *Crinipellis*, onde a espécie *C. stipitaria*, saprofítica, produz o diterpenóide Crinipelina (coloração amarela) (KUPKA et al., 1979). Singer (1986) relata que fungos do mesmo gênero, que colonizam tecidos vivos de planta, produzem o pigmento

vermelho. A pigmentação pode estar relacionada com a agressividade de isolados, como em *Cercospora piaropi*, onde isolados que apresentam maior produção de pigmentos roxos são altamente agressivos, enquanto os produtores de pigmento amarelo são fracos ou moderadamente agressivos, e os não produtores não são patogênicos (TESSMANN; CHARUDATTAN; PRESTON, 2008).

Inicialmente para *M. perniciosa* foram relatados três variantes morfológicas classificados segundo a coloração do píleo. O primeiro identificado foi o variante *perniciosa* que apresenta o píleo de coloração vermelho escuro; o segundo foi *ecuadorensis* que desenvolve basidiocarpo grande e de coloração vermelho claro e por fim *citriniceps* com píleo de coloração amarela, sendo os dois últimos observados no Equador (PEGLER, 1978). As diferenças morfológicas não interferem na patogenicidade do fungo e nenhuma relação foi estabelecida entre estes variantes e os biotipos. Neste trabalho observou-se que isolados do biotipo-C produzem pigmentos na tonalidade do vermelho com maior frequência que os isolados do biotipo-S, que apresentam mais pigmentos nos tons do amarelo.

Variações experimentais, como o uso de diferentes meios de cultura e condições de iluminação, influenciam fortemente no desenvolvimento dos fungos, podendo ocorrer respostas diversas a estas diferentes situações, como, por exemplo, produção de pigmentos em alguns meios (ROSA; MENEZES, 2001).

Considerando as diferentes condições que favoreceram a produção de pigmentos, foi elaborada uma tabela (Tabela 7) contendo os isolados com especificação dos grupos determinados pela composição de proteínas totais. Nesta tabela foi constatado que os cultivos com amônio e fotoperíodo e meio TDA com os fungicidas Fungiscan e Persist foram as condições onde um maior número de isolados produziram pigmentos. Na combinação amônio e fotoperíodo, as condições se aproximam das observadas na indução de esporulação, ou seja, meio pobre e iluminação, situação onde a produção do pigmento vermelho ocorre. No meio com fungicidas a produção do pigmento esta associada à tentativa de sobrevivência do fungo em presença de compostos tóxicos. Em condições naturais, estaria associada a presença de competidores pelo substrato e à resposta de defesa da planta. Em meio mínimo nota-se que isolados do biotipo-C, pertencentes ao grupo A, definido pelos padrões de proteínas totais, produzem pigmentos vermelhos com maior

freqüência, revelando que outros estímulos, como ausência de nutriente, são indutores deste metabolismo secundário. A ativação do metabolismo secundário resultaria em compostos tóxicos que causaria a morte de competidores ou do próprio hospedeiro disponibilizando a fonte nutricional em escassez.

Em suma, verifica-se que a produção do pigmento está presente em todos os biotipos, porém os isolados do biotipo-L e S ativam esta produção em condições similares à esporulação (fonte fácil e escassa e fotoperíodo) e quando a vida esta em perigo (presença de fungicidas). Já isolados do biotipo-C, também produzem pigmentos em condições onde apenas faltam nutrientes (sem associação com outros fatores como fotoperíodo), podendo, desta forma, ser mais sensíveis a escassez de nutrientes dentro da planta.

Percebe-se que a associação do pigmento com a patogenicidade esta relacionada com os mecanismos regulatórios que ativam a produção, e que a evolução do biotipo L ao S e C pode ter ocorrido segundo estes mecanismos. Possivelmente, uma via metabólica de esporulação foi adaptada como fator de patogenicidade devido à maior sensibilidade dos isolados do biotipo-C a escassez nutricional e reposta ao ataque da planta.

Tabela 7 – Comparação da produção de pigmentos pelos isolados de *M. pernicioso* nos tratamentos onde esta foi observada

Isolados	SDS-PAGE	Meio Mínimo	MM + lisina	MM + cisteína	MM + metionina	TA (escuro)	NP (escuro)	TA (foto)	NP (foto)	Fungicida Fungiscan	Fungicida Persist
C-AM-3	A1		V	V	V		A	A			
C-PA-2	A1	V	V	V	V	V/A		V	V	V/A	
C-RO-1	A1					A		V	A	V	V
C-RO-2	A1							V			V
C-AM-1	A1	V	V	V	V			V	A	A	V
C-AM-2	A1	V		V	V	V/A	A	V/A		A	
C-BA-1	A2	V				V/A	V/A			A	
C-BA-5	A2	V			V						
C-BA-6	A2		A		A					A	
C-BA-4	A2			A			A	V/A	A	A	
C-BA-3	A2							V/A		V	V
C-BA-2	A2					A/V		V/A	A	A	
S-MG-1	A2							A	A	V	V
S-MG-2	A2	A	A	A	A			V/A	A	V	V
S-MG-6	A2	A			V			V	A	V	V
C-PA-1	B					V/A		V/A		A	V
S-BA-1	B							V		V	V
S-MG-3	B									V	
L-1	B								A	V	V
S-MG-5	B						A	V	A	V	V
S-MG-4	B									V	V
C-BA-7						A	A	V	A/V		

V = Vermelho; A = Amarelo; V/A = Amarelo/Vermelho

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

M. perniciosus apresenta isolados distribuídos em três biotipos que provavelmente contam a história evolutiva do patógeno que não está registrada em sequências de genes ribossomais e proteínas totais. Os biotipos compartilham as características de crescimento e produção de pigmentos como fatores potenciais de patogenicidade, porém não sendo fatores primários para adaptação do patógeno, no entanto com provável papel na colonização do hospedeiro.

No processo de transição do biotipo-L para o -S e -C, a produção de pigmento provavelmente foi direcionada para um ajuste mais fino da regulação de sua produção. No biotipo-L a produção do pigmento é requerida na fase crítica do ciclo de vida, a reprodução, e nos biotipos patogênicos foi ajustada para resposta a condições adversas como escassez de nutrientes e resposta a toxinas e antibióticos.

No biotipo- C verificou-se ainda uma variabilidade na produção de pigmento decorrente da resposta à escassez de fatores nutricionais indicando que dentro deste grupo acontece uma evolução mais especificada. A variabilidade de taxas de crescimento e produção de pigmento revela uma evolução paralela dos biotipos-C e S, resultado da segregação dos mesmos alelos durante a mudança da estratégia de reprodução de heterotálico para homotálico ou ainda, pela segregação de cromossomos. Neste processo também ocorreu a segregação de alelos responsáveis pela especiação que ainda são desconhecidos e que cujo fenótipo é representado pela especificidade ao hospedeiro e nenhuma outra manifestação fisiológica.

REFERÊNCIAS

- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (Chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, Sept./Oct. 2005.
- ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacauero. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN, A.F.;; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 18, p. 151-163.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de enzimas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ALMEIDA, O.C.; ALMEIDA, L.C.C.; BEZERRA, J.L. Estudo de fungicidas de cobre no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero no sudeste da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 14, n. 3, p. 97-100, 2002.
- ALMEIDA, L.C.C.; COSTA, A.Z.M.; MENDONÇA, R.C.S. Efeito do número de remoções de partes doentes do cacauero e número de aplicações de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 15, n. 2, p. 79-84, 2003.
- ANDEBRHAN, T. Características culturais e reações bioquímicas dos isolados de *Crinipellis perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 286, jun. 1986.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D.B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Malden, v. 43, n. 6, p. 1020-1027, Dec. 1994.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C.; NAKAYAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer: a experiência da amazônia brasileira. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 10, n. 2, p. 49-60, 1998.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.
- ARRUDA, M.C.C.; 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**, Malden, v. 52, n. 2, p. 236-244, Apr. 2003b.

ARRUDA, M.C.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; MILLER R.N.G.; RESENDE, M.L.V.; FELIPE, M.S.S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Oxford, v. 107, p. 25-37, Jan. 2003a.

ARTIGIANI FILHO, V.H.; BEDENDO, I.P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22., n. 3/4, p. 217-221, 1996.

BASTOS, C.N. Efeito de alguns fungicidas na germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 313-316, 1979.

BASTOS, C.N.; MEDEIROS, A.G. Seleção “in vitro” de fungicidas a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da “vassoura-de-bruxa” do cacauero. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v. 9, p. 129-135, 1979.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. Comparações morfológica e patológica de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 202-206, out. 1988.

BÉGUERET, J.; TURCQ, B.; CLAVÉ, C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. **Trends in Genetics**, London, v. 10, n. 12, p. 441-446, Dec. 1994.

BUNYARD, B.A.; NICHOLSON, M.S.; ROYSE, D.J. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa* and *Disciotis* [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene. **Experimental Mycology**, New York, v. 19, p. 223-233, 1995.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W.; HENSON, J.M.; MONEY, N.P. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, Lawrence, v. 93, n. 1, p. 1-8, Jan./Feb. 2001.

CALLE, H.; COOK, A.A.; FERNANDO, S.Y. Histology of Witches’-Broom caused in Cacao by *Crinipellis pernicioso*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 11, p. 1479-1481, 1982.

CHET, I.; HENIS, Y.; MITCHELL, R. The morphogenetic effect of sulphur-containing amino acids, glutathione and iodoacetic acid on *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Journal of General Microbiology**, London, v. 45, p. 541-546, 1966.

De MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches’ broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 33-38, Jan. /Mar. 2003.

_____. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 64, n. 1, p. 70-75, Mar. 2004.

De MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C.; De SOUSA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 383-386, June 2000.

EAGEN, R.; BRISSON, A.; BREUIL, C. The sap-staining fungus *Ophiostoma piceae* synthesizes different types of melanin in different growth media. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 592-595, 1997.

EDGINGTON, L.V.; BARRON, G.L. Fungitoxic Spectrum of Oxathiin Compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 1256-1257, Nov. 1967.

EVANS, H.C.; BASTOS, C.N. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 104, fev. 1979.

EVANS, H.C.; HOLMES, K.A.; REID, A.P. Phylogeny of frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, Malden, v. 52, p. 476-485, 2003.

FIGUEIREDO, J.E.F.; DEPAOLI, H.C.; COELHO, V.T.S.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; GUIMARÃES, C.T.; GOMES, E.A.; BRESSAN, W. Genetic diversity among *Colletotrichum sublineolum* pathotypes isolated from sorghum (*Sorghum bicolor*). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 2, p. 304-318, 2006.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHIMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 552-556, June 1991.

FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein-detection in alkaline polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 126, n. 2, p. 346-449, 1982.

GOMES, L.H. **Construção de um vetor com o gene GFP de *Aequorea victoria* para a transformação de *Saccharomyces cerevisiae***. 2000. 73p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 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**, Brasília, v. 25, p. 377, ago. 2000.

GRAMACHO, K.P.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C.; LIMA, L.S.; LOPES, U.V. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 153-155, Jan. 2007.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2th ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, Oxford, v. 71, p. 278-289, Mar. 1994a.

_____. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. **The New Phytologist**, London, v. 127, p. 243-259, 1994b.

GRIFFITH, G.W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F.J.; LEWIS, D.M.; HEDGER, J.N. Autecology and Evolution of the Witches' Broom Pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of Cocoa. In: BLAKEMAN, J.P.; WILLIAMSON, B. (Ed.). **Ecology of Plant Pathogens**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1994. chap 15, p. 245-267.

HACSKAYLO, J.; LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. Growth of fungi on three sources of nitrogen. **Mycologia**, Lawrence, v. 46, n. 6, p. 691-701, Nov./Dez. 1954.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEBBAR, P.K. Cacao Diseases: a global perspective from an industry point of view. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p. 1658-1663, 2007.

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**, Cambridge, v. 88, n. 4, p. 533-546, 1987.

HEWITT, H.G. Fungicide performance. In: _____. **Fungicides in crop protection**. New York: CAB Internacional, 1998. chap. 4, p. 87-154.

JIMENEZ, R.M.P.; DIAZ, R.M.J.; HERRERA, C.J.L. Somatic incompatibility of *Rosellinia necatrix* on avocado plants in southern Spain. **Mycological Research**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 239-244, Feb. 2000.

KILARU, A.; HASENSTEIN, K.H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis pernicioso* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 1, p. 101-107, Jan. 2005.

KUPKA, J.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; SCHRAMM, G.; AND STEGLICH W. Antibiotics from basidiomycetes. VII. Crinipellin, a new antibiotic from the basidiomycetous fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr.). **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 32, p. 130-135, 1979.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 331-371, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227. p. 680-685, Aug. 1970.

LAKER, H.A. Variation in the cultural characteristics of isolates of *Crinipellis pernicioso* in Trinidad. **Turrialba**, San Jose, v. 39, n. 4, p. 501-505, Dec. 1989.

LEAL, G.A.J. **Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso* em tecidos infectados de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros**. 2002. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

_____. **Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. pernicioso* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença vassoura-de-bruxa**. 2006. 124p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p.197-230, 1998.

LOUBRADOU, G.; TURCQ, B. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: a roundabout way of understanding the phenomenon. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 239-245, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LOWTHER, R.L. Further studies on the physiology of *Cladosporium fulvum* CKE. and resistance in tomato. **Canadian Journal of Botany**, Montreal, v. 42, p. 1365-1386, 1964.

LUZ, E.D.M.N.; SOUZA, J.T.; OLIVEIRA, M.L.; BEZERRA, J.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Vassoura-de-bruxa do cacauzeiro: novos enfoques sobre uma velha doença. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 59-111, 2006.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

MANICI, L.M.; BONORA, P. Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, p. 31-42, 2007.

MAY, G. Somatic incompatibility and individualism in the Coprophilous Basidiomycete *Coprinus Cinereus*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 3, p. 443-451, 1991.

McGEARY, F.M.; WHEELER, B.E.J. Growth rates of, and mycelial interactions between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. **Plant Pathology**, Malden, v. 37, n. 4, p. 489-498, Dec. 1988.

McQUILKEN, M.P.; SUPRIADI, RUGARD, S. A. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazole fungicides in vitro and their effect on development of the fungus in cocoa. **Plant Pathology**, Malden, v. 37, p. 499-506, Dec. 1988.

MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.D.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. In vitro Production of biotrophic-Like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 3, p. 191-196, Mar. 2006.

MONCALVO, J.M.; LUTZONI, F.M.; REHNER, S.A.; JOHNSON, J.; VILGALYS, R. Phylogenetic relationships of Agaric Fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Systematic Biology**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 278-305, 2000.

MORI, Y.; SATO, Y.; TAKAMATSU, S. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, n. 1, p. 74-93, 2000.

MUSE, R.B.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effect of fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, Malden, v. 45, p. 145-154, 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 10 Nov. 2009.

NIELLA, G.R.; RESENDE, M.L.V.; De CASTRO, H.A.; 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**, Brasília, v. 25, p. 400, Ago. 2000.

NOVAK, L.A.; KOHN, L.M. Electrophoresis of major proteins in stromata of members of the Sclerotiniaceae. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 91, n. 4, p. 639-647, 1988.

OLIVEIRA, M.L.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, V.R. Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis pernicioso* originários da região cacauera da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 17, p. 53-60, 2005.

PAIM, V.R.L.D.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; SILVA, S.D.V.M.; SOUZA, J.T.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; SANTOS, L.P.F. Sources of Resistance to *Crinipellis pernicioso* in progenies of cacao accessions collected in the Brazilian Amazon. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 572-578, Nov./Dec. 2006.

PEGLER, D. N. *Crinipellis pernicioso* (Agaricales). **Kew Bulletin**, London, v. 32, p. 731-736, 1978.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 1, n. 1, p. 79-81, 1989.

PLOETZ, R.C. Cacao Diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p. 1634-1639, 2007.

PLOETZ, R.C.; SCHNELL, R.J.; YING, Z.T.; ZHENG, Q.; OLANO, C.T.; MOTAMAYOR, J.C.; JOHNSON, E.S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 111, n. 4, p. 317-326, Apr. 2005.

POLONI, A. **Estudo da virulência e variabilidade fisiológica e genética do fungo *Bipolaris sorokiniana***. 2008. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, Sept. 1996.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO, P.M.J.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacauzeiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 213-221, maio/jun. 2007.

REYNOLDS, M.; WEINHOLD, A.R.; MORRIS, T.J. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 6, p. 903-906, 1983.

RINCONES, J.; MAZOTTI, G.D.; GRIFFITH, G.W.; POMELA, A.; FIGUEIRA, A.; LEAL, G.A.; QUEIROZ, M.V.; PEREIRA, J.F.; AZEVEDO, R.A.; PEREIRA, G.A.G.; MEINHARDT, L.W. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South América. **Mycological Research**, Oxford, v. 110, p. 821-832, July 2006.

ROCHA, H.M.; WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and de deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Malden, v. 34, p. 319-328, 1985.

ROSA, R.C.T.; MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 141-147, jun. 2001.

SAUPE, S.J.; CLAVÉ, C.; BÉGUERET, J. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 3, p. 608-612, 2000.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V.; SCHIAVINATO, M.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 865-877, Mar. 2005.

SCULLY, L.R.; BIDOCHKA, M.J. A cysteine/methionine auxotroph of the opportunistic fungus *Aspergillus flavus* is associated with host-range restriction: a model for emerging diseases. **Microbiology**, Ribeirão Preto, v. 152, p. 223-232, Jan. 2006.

SHAW, M.W.; VANDENBON, A.E. A qualitative host-pathogen interaction in the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora pernicioso* pathosystem. **Plant Pathology**, Malden, v. 56, n. 2, p. 277-285, Apr. 2007.

SILVA, S.D.V.M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 54-59, mar. 1999.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 33-41, jan./fev. 2002.

SINGER R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4th ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986. 981p.

SKOROPAD, W.P.; ARNY, D.C. The influence of amino acids on the growth of two strains of *Helminthosporium gramineum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 47, p. 249-252, May 1957.

SREENIVASAN, T.N.; DABYDEEN, S. Mode of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 6, p. 478-481, June 1989.

TAKAMATSU, S. PCR – Applications in Fungal Phylogeny. In: BRIDGE, P.D., ARORA, D.K., REDDY, C.A., ELANDER, R.P. (Ed.). **Applications of PCR in mycology**. New York: CAB Internacional, 1998. chap. 7, p. 125-152.

TAMURA, K; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TESSMANN, D.J; CHARUDATTAN, R.; PRESTON, J.F. Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth. **Plant Pathology**, Malden, v. 57, p. 957-966, 2008.

THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: 10 out. 2009.

VAN ANDEL, O.M. Amino acids and Plant Disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 4, p. 349-368, 1966.

VUJANOVIC, V.; VIDOVIC, S.; FERNANDEZ, M.R.; DAIDA, P.; KORBER, D. Whole-cell protein and ITS rDNA profiles as diagnostic tools to discriminate *Fusarium avenaceum* intraspecific variability and associated virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 117-125, 2009.

WANG, C.; LI, Z.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. **Mycological Research**, Oxford, v. 107, n. 10, p. 1189-1200, Oct. 2003.

WHEELER, B.E.J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicios*a from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Malden, v. 37, p. 475-488, 1988.

YAMADA, M.M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D.B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicios*a from solanaceous hosts and relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 10, n. 2, 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](#)