



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

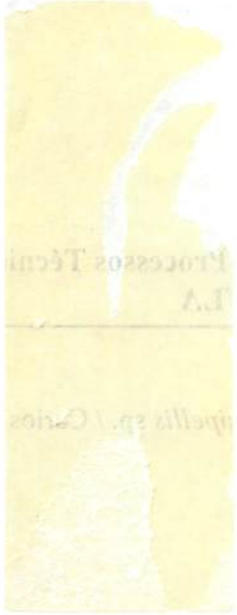
**COMPATIBILIDADE SOMÁTICA E
PATOGENICIDADE DE *Crinipellis* SP.**

CARLOS ALBERTO DA CRUZ VIANA JÚNIOR

2001

CARLOS ALBERTO DA CRUZ VIANA JÚNIOR

**COMPATIBILIDADE SOMÁTICA E PATOGENICIDADE DE *Crinipellis*
SP.**



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Viana Júnior, Carlos Alberto da Cruz

Compatibilidade somática e patogenicidade de *Crinipellis* sp. / Carlos Alberto da Cruz Viana Júnior. -- Lavras : UFLA, 2001.

61 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Rezende.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Compatibilidade somática. 2. Patogenicidade. 3. Cacau. 4. *Crinipellis*. 4.
Vassoura de bruxa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.74932

CARLOS ALBERTO DA CRUZ VIANA JÚNIOR

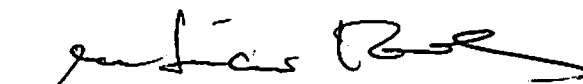
**COMPATIBILIDADE SOMÁTICA E PATOGENICIDADE DE *Crinipellis*
SP.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 01 de março de 2001

Dra. Aparecida das Graças C. de Souza – EMBRAPA Amazônia Ocidental

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu - DFP - UFLA



**Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

A razão primordial de toda a superioridade humana é sem dúvida a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, ele vencerá obstáculos e, se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis.

José de Alencar

AGRADEÇO

A DEUS, eterno, invisível, mas real. Com sua grandeza e bondade infinitas dota de sabedoria pesquisadores e cientistas para ter a primazia de estudar os mistérios de sua criação.

OFEREÇO

Aos meus pais, Carlos e Oneide Viana, pelo amor, segurança e ensinamentos de vida, os quais, em tantas lutas, proporcionaram-me condições para realização de mais esta etapa. Em especial à senhora mãe (*In memoriam*), que mesmo ausente deixou uma semente plantada.

DEDICO

Aos meus familiares, em especial a Fátima e aos meus irmãos Renata Cláudia e Allan William, pela felicidade de sermos também amigos. Ao meu grande amor, Rosineide Viana, que sempre ao meu lado proporcionou segurança, carinho e compreensão. E às demais pessoas que confiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio e suporte na forma de uma bolsa de estudo.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e colaboração efetiva para a realização do curso e desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende pela orientação, apoio, estímulo, conhecimento e sugestões apresentadas.

Ao professor Mário Sobral de Abreu pela contribuição e participação durante a banca examinadora.

À pesquisadora Dra. Aparecida das Graças Claret de Souza, EMBRAPA/Amazônia Ocidental, por sua colaboração quanto ao fornecimento de sementes, isolados e durante sua participação na banca examinadora.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, profissionais comprometidos com a pesquisa, ensino e formação de cidadãos, e que tanto têm colaborado para o crescimento da Fitopatologia Brasileira.

Aos amigos da CEPLAC/ERJOH, em especial a um grande amigo e incentivador, Dr. Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque, e também, pelo apoio no fornecimento de isolados e sementes.

Ao pesquisador Givaldo Rocha Niella, CEPLAC/CEPEC, por sua colaboração quanto ao fornecimento de sementes e isolados.

A todos os colegas do curso que nos acompanharam, sempre confiantes durante toda esta caminhada.

À amiga Jane Oliveira Perez pela colaboração com sugestões, análises estatísticas e participação durante todo preparo deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade, companheirismo, colaboração e sugestões durante as diversas etapas desse trabalho: Heloísa Leite, Hudson Teixeira, Gutemberg Barone, Luís Henrique e ao amigo Augusto Carlos dos Santos Pinto pela colaboração na análise estatística.

Aos técnicos e funcionários administrativos do DFP/UFLA que sempre dedicaram um pouco da sua atenção no intuito de colaborar quando preciso, em especial a Angela, Marcos, Nair e Terezinha.

Às secretárias do DFP/UFLA, Leisa Mara Silva e Maria de Lurdes Oliveira, por suas efetivas colaborações sempre que solicitadas.

A toda a equipe de trabalho sob a orientação do Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, em especial aos alunos de Iniciação Científica e estagiários, que colaboraram para execução dos experimentos, Gabriela, Carla, Patrícia, Silvia, Lando, Hernani, Renato e, em especial, a Aparecida Gomes. E a todos aqueles que, anonimamente, de alguma forma contribuíram para o êxito desta obra. **Meus sinceros agradecimentos.**

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Etiologia de <i>Crinipellis</i> sp.	03
2.2 Variabilidade de hospedeiros para <i>Crinipellis</i> sp.....	05
2.3 Estudos de variabilidade em <i>Crinipellis</i> sp..	08
2.4 Variabilidade patogênica de <i>Crinipellis</i> sp.	11
3. Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2: Compatibilidade somática entre isolados de <i>Crinipellis</i> sp. provenientes de diferentes regiões e hospedeiros.....	19
1 Resumo.....	20
2 Abstract.....	21
3 Introdução.....	22
4 Material e Métodos.....	24
4.1 Origem dos isolados.....	24
4.2 Obtenção e manutenção de culturas polispóricas.....	25
4.3 Teste de compatibilidade somática (SCG) entre isolados de <i>Crinipellis</i> sp.....	26
4.4 Determinação de distâncias genéticas.....	26
5 Resultados e Discussão.....	28
6 Conclusões.....	35
7 Referências Bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 3: Patogenicidade de isolados de <i>Crinipellis</i> sp.....	39
1 Resumo.....	40
2 Abstract.....	41
3 Introdução.....	42
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Material genético.....	44
4.2 Produção de inóculo.....	45
4.3 Inoculação.....	45
4.4 Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>Crinipellis</i> sp.....	46
4.4.1 Incidência e severidade de doença.....	46
4.5 Delineamento experimental.....	46

4.6 Análises estatísticas	47
5 Resultados e Discussão.....	48
6 Conclusões.....	55
7 Referências Bibliográficas.....	56
8 Considerações Finais.....	58
APÊNDICE.....	60

RESUMO

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. *Compatibilidade somática e patogenicidade de Crinipellis sp.* Lavras: UFLA, 2001. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia)*

Crinipellis perniciosa é o agente causal da doença vassoura-de-bruxa no Brasil e em países da América do Sul e Panamá, onde o cacauero está sendo cultivado. Estudos sobre a variabilidade de *C. perniciosa* são recentes e iniciaram-se a partir da necessidade de se buscar informações para subsidiar programas de melhoramento genético do cacauero. A recente quebra da resistência em materiais genéticos distribuídos aos produtores chamou a atenção para estudos mais específicos sobre a variabilidade do patógeno. O objetivo proposto neste trabalho foi averiguar a existência de variabilidade fisiológica e patogênica entre isolados de *C. perniciosa*. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação e no Laboratório de Resistência de Plantas a Patógeno do DFP/UFLA, MG, Brasil. O estudo da diversidade genética utilizando o teste de compatibilidade somática (SCG) entre 7 isolados polispóricos de *C. perniciosa* provenientes de diferentes Estados brasileiros (AM, PA, MG, BA) e diferentes hospedeiros (*Theobroma cacao* L., *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Herrania* sp., *Solanum lycocarpum* e *Heteropterys acutifolia*), através das reações de compatibilidade e/ou incompatibilidade possibilitou agrupar os isolados em dois grupos: i) grupo formado pelos isolados da Bahia e Amazônia e ii) grupo formado pelos isolados de Minas Gerais. O estudo mostrou a similaridade genética entre o isolado de cacau de Santo Amaro (BA) e de cupuaçu (AM), sendo observado uma grande diversidade genética de *C. perniciosa* proveniente dos diferentes Estados e hospedeiros. A existência de possíveis *formae speciales* do fungo foi estudada através de testes de patogenicidade em cacau comum e Catongo, *Theobroma bicolor* e *T. grandiflorum*. Noventa dias após a inoculação, foi avaliada a incidência da vassoura-de-bruxa. Os isolados de cacau comum e de cupuaçu foram semelhantes na capacidade de infectar todos os genótipos. O isolado de cipó foi patogênico apenas a cupuaçu e Catongo. O isolado de lobeira foi patogênico somente em cupuaçu. Os genótipos de cacau comum e Catongo foram os mais suscetíveis aos isolados testados.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

ABSTRACT

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. **Somatic compatibility and pathogenicity of *Crinipellis* sp.** Lavras: UFLA, 2000. 61 p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)

Crinipellis pernicioso is the causal agent of witches' broom disease in Brazil and in countries of South America where the cocoa tree is being cultivated. Studies about the variability of *C. pernicioso* are recent and they started from the need of information to subsidize programs of genetic improvement of cocoa. The recent break down of the resistance of genetic materials distributed to the producers lead to the attention for more specific studies of variability of the pathogen. The objective proposed in this work was to investigate the existence of physiological and pathogenic variability among *C. pernicioso* isolates. The experiments were accomplished in greenhouse and in the Laboratory of Plant Disease Resistance of DFP/UFLA, MG, Brazil. Study of the genetic diversity using the test of somatic compatibility (SCG) among 7 multispore isolates of *C. pernicioso* from different Brazilian States (AM, PA, MG, BA) and different hosts (*Theobroma cacao* L., *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Herrania* sp., *Solanum lycocarpum* and *Heteropterys acutifolia*), through the reactions of compatibility or incompatibility made it possible to group the isolates as follow: i) group formed by the isolates from Bahia and the Amazonian region and ii) group formed by the isolates from Minas Gerais state. The study showed the genetic similarity between the isolate of cocoa from Santo Amaro (BA) and of cupuaçu (AM), being observed a great genetic diversity of *C. pernicioso* from different States and hosts. The existence of possible *formae speciales* was studied through pathogenicity tests on cocoa Cv. Comum and Catongo, *Theobroma bicolor* and *T. grandiflorum*. Ninety days after inoculation, it was evaluated to the witch's broom disease incidence. Cocoa and cupuaçu isolates were similar in the capacity to infect all genotypes tested. *Heteropterys acutifolia* isolate was pathogenic only to cupuaçu and cocoa cv. Catongo. Cocoa common and Catongo genotypes were the most susceptible to the tested isolates.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O parasitismo é uma estratégia de vida que conecta os mais diversos organismos. Esta estratégia permite estabelecer íntimas relações, no âmbito genético, entre parasitas e hospedeiro, de tal modo que modificações genéticas na população de um dos componentes do patossistema são acompanhadas geralmente por modificações genéticas na população do outro. Este mecanismo de equilíbrio também é conhecido como coevolução. Parasitas e hospedeiros estão em uma guerra evolutiva contínua, cujos elementos característicos são o aparecimento de um mecanismo inédito de defesa em uma determinada linhagem do hospedeiro e a subsequente evolução de um mecanismo complementar de ataque em uma linhagem do patógeno ou vice-versa. Uma das condições essenciais para que a evolução trilhe seus rumos é a existência da variabilidade genética, tanto em hospedeiros quanto em patógenos (Camargo, 1995).

O uso indiscriminado de defensivos agrícolas, o estreitamento da base genética na cultura do cacau, a modificação do ambiente pelo homem e a pressão de seleção exercida no patossistema *Crinipellis pernicioso* x cacauzeiro têm provocado o surgimento de novos biótipos do patógeno, mais agressivos, capazes de burlar os programas de melhoramento genético desenvolvidos nas mais diversas instituições de pesquisa do Brasil, quebrando inclusive a resistência de genótipos considerados resistentes, aumentando as perdas quantitativas e qualitativas na produção (Andebrhan *et al.*, 1998).

Atualmente os programas de melhoramento genético do cacauzeiro em desenvolvimento buscam genótipos resistentes, que reúnam atributos como alta produtividade, resistência a pragas e doenças e alta qualidade do produto, dentre

outros. Esses programas, aliados a formas alternativas de manejo, como a indução de resistência, constituem atualmente o caminho mais seguro para o incremento de produção da lavoura. Programas de melhoramento genético visando resistência, em uma espécie perene agredida por um patógeno de ampla variabilidade, devem fundamentar-se em fatores estáveis, e para a manipulação desses fatores é necessária a compreensão global dos elementos do inter-relacionamento hospedeiro-patógeno. O conhecimento da etiologia e da variabilidade de *Crinipellis* sp. é importante para explicar o comportamento da doença e para que se estabeleçam medidas adequadas de controle, além de subsidiar outros estudos, como da patogênese, seleção de material genético resistente e epidemiologia.

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

Os objetivos propostos neste trabalho são: estudar a diversidade genética entre os isolados polispóricos de *C. pernicioso* procedentes de diferentes regiões e hospedeiros através da técnica de compatibilidade somática; verificar a variabilidade patogênica de *C. pernicioso*, através de estudos de patogenicidade, observando a possível existência de *formae speciales* do fungo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Etiologia de *Crinipellis* sp.

O fungo *Crinipellis pernicioso* Stahel (Singer), o agente causal da vassoura-de-bruxa, vem gerando sérios problemas fitopatológicos para a cultura do cacau no Brasil. Pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, ordem agaricales e família Tricholomataceae. A família Tricholomataceae é constituída de espécies com basidiomas pileados, estipitados, lignícolas, os quais são capazes de reativação após o secamento quando são umedecidos (Luz *et al.*, 1997). *C. pernicioso* é um fungo hemibiotrófico com dois tipos de micélio: em tecidos ainda verdes, o micélio é espesso com 5-8 μm , biotrófico ou parasítico e sem a formação de grampo de conexão, crescendo intercelularmente. Quando as vassouras secam, o micélio torna-se saprofítico ou necrotrófico, cresce inter e intracelularmente, sendo menos espesso (1,5-5 μm) e apresentando grampo de conexão (Evans, 1980). A formação do grampo de conexão em hifas de cultura monospóricas, a dicarionização de hifas monocarióticas derivadas de um único basídio uninucleado e a produção de basidiocarpos a partir de culturas monospóricas indicam que *C. pernicioso* é um fungo primariamente homotálico (Purdy *et al.*, 1983; Griffith e Hedger, 1994).

A temperatura ótima para a germinação e desenvolvimento de *C. pernicioso* varia em torno de 25°C, com os limite mínimo e máximo entre 15 e 30°C (Baker e Holliday, 1957). A germinação dos esporos é uma das fases mais delicadas para a sobrevivência do patógeno e, portanto, para a continuidade do ciclo de vida. É controlada por uma série de fatores, tanto genéticos quanto ambientais (Bastos, 1989). Como regra geral, após a germinação dos basidiósporos formam-se apressórios, hifas infectivas que penetram no hospedeiro via abertura estomatal ou através de penetração direta (Baker e Holliday, 1957). Após a penetração dos basidiósporos nos tecidos

meristemáticos, ocorre a formação dos sintomas característicos da doença, como hiperplasia e hipertrofia, que resultam do desequilíbrio hormonal durante a interação patógeno-hospedeiro, com formação anormal de frutos, almofadas florais e brotos vegetativos (Evans, 1978). Com a morte destes tecidos, o fungo persiste como saprófita, muitas vezes por vários anos, produzindo periodicamente os corpos de frutificação, os basidiocarpos (Bastos, 1989). A produção de basidiocarpos é favorecida pela ocorrência de dias chuvosos, seguidos por dias secos ou vice-versa, e o período de produção é dependente das condições climáticas de cada região (Dalla Pria e Camargo, 1997).

O ciclo de vida do fungo compreende uma fase parasítica alternada com uma fase saprofítica. Pegus (1972), citado por Bastos (1989), postulou a teoria dual e micelial para explicar como o fungo existe em diferentes estados miceliais, e que o micélio primário, monocariótico (ou homocáριο), representa a fase biotrófica, enquanto a fase necrotrófica é induzida pelo micélio secundário, dicariótico (ou heterocáριο). O monocáριο se desenvolve da germinação de um esporo sexual simples. O dicáριο predomina na natureza e é o micélio a partir do qual desenvolvem-se os corpos de frutificação.

O micélio monocariótico da fase parasítica depende do tecido vivo do hospedeiro, no qual o fungo cresce com a planta e obtém nutrientes das células vivas para sustentar seu crescimento e desenvolvimento (Bastos, 1990). Entretanto, quando os nutrientes solúveis tendem a se tornar limitantes, o crescimento torna-se inibido, e o fungo invade, coloniza e mata os tecidos, obtendo seus nutrientes necrotroficamente, usando seu arsenal enzimático através de enzimas degradativas típicas de um parasita facultativo (Evans, 1981; Nakayama, 1995). O micélio do fungo não é infectivo, somente os esporos são aptos a induzir doenças.

2.2 Variabilidade de hospedeiros para *Crinipellis* sp.

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

Com base na grande variedade de hospedeiros citada pela literatura, quatro classes de *C. pernicioso* têm sido distinguidas: o tipo Sterculiaceae (biótipo C), que infecta predominantemente os gêneros *Theobroma* sp. e *Herrania* sp. (Evans, 1978; Bastos *et al.*, 1988); o tipo Solanaceae (biótipo S) (Bastos e Evans, 1985; Bastos *et al.*, 1988); o biótipo L ou liana saprofítico (cipó), que coloniza substratos vivos ou mortos (Evans, 1978; Hedger *et al.*, 1987); e o biótipo B, atacando os hospedeiros de Bixaceae (Hedger, 1993).

No Estado da Bahia, segundo Luz *et al.* (1997), além de *T. cacao*, *T. sylvestris* e *Herrania* sp. destacam-se os seguintes hospedeiros: *S. paniculatum* Linn. (jurubeba), *S. gilo* Raddi. (jiló), *S. stipulaceum* Wild. Ex Roem & Schutt. (caiçara), *S. melongena* Linn. (berinjela), *Solanum* sp. (sem nome vulgar), além de *Capsicum annuum* Linn. (pimentão), *C. frutescens* Linn. (pimenta malagueta) e *Athenaea aff. pogogena* (Moric.) Sendt. (sem nome vulgar). Já a espécie *Stigmaphyllon* sp. A. Juss., um cipó silvestre, é o único hospedeiro do fungo encontrado na família Malpighiaceae na Bahia até então.

Na Amazônia, centro de origem do cacauero, ocorrem outras plantas hospedeiras de *C. pernicioso*, como as do gênero *Theobroma* (*T. grandiflorum* (Willd ex Spreng.) Schum.) (cupuaçu), *Theobroma bicolor* Humbl. & Bonpl.

(cacau-do-peru), *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. subincanum*, *T. speciosum* e *Herrania* (*H. albiflora*, *H. nitida* e *H. purpurea*), *Bixa orellana* Linn. (urucum) e alguns cipós da família Bignoniaceae, além de várias espécies de solanáceas, entre elas *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Capsicum annuum* cv. *grossum* (pimentão) (Bastos e Evans, 1985; Bezerra, 1994). Recentemente foi relatado mais um cipó da família Malpighiaceae, *Mascagnia* cf. *sepium* Vell., conhecido vulgarmente como “cipó malandro”, porém testes de patogenicidade com isolados provenientes deste cipó, quando inoculados em plântulas de cacauzeiro, não mostraram patogenicidade (Bastos *et al.*, 1998).

Nos Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, mais precisamente na Zona da mata e Sul do Estado, as espécies *Solanum cernuum* (braço-de-preguiça) e *S. lycocarpum* (lobeira) foram detectadas infectadas por espécies de *Crinipellis* muito semelhantes a *C. perniciosa* (Evans e Barreto, 1996; Resende *et al.*, 2000). Além destas solanáceas, um cipó da família Malpighiaceae, *Heteropterys acutifolia* A. Juss., foi encontrado com sintomas típicos de vassoura-de-bruxa em matas de galeria nos municípios de Itumirim e Lavras, Sul de Minas Gerais. Este cipó apresenta um número considerável de ramos inchados e com brotamentos laterais, que secam posteriormente, e quando submetidos a condições de temperatura e umidade alternados produzem basidiocarpos (Resende *et al.*, 2000).

Após um levantamento (1996-1998) realizado por Pereira *et al.* (1999), nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Distrito Federal, visando à detecção de plantas de *Solanum lycocarpum* e *S. grandiflorum* var. *setosum* afetadas por *C. perniciosa*, foi encontrada a associação planta-fungo nos Estados de MG, RJ, GO, MS, MT, TO, RO e no DF. No Estado da Bahia (Regiões Sul, Extremo Sul e Recôncavo), PA e AM, não foram encontradas plantas desses gêneros afetadas. Essa ampla distribuição da associação mostra a grande variabilidade do fungo, presente em genótipos distintos, em diferentes

localidades. Quanto à ampla variabilidade do fungo a estes hospedeiros alternativos, pode-se observar que, geograficamente, as espécies das famílias Solanaceae e Malpighiaceae estão distribuídas nas áreas de cerrados e matas de galerias desde o Estado do Tocantins até Minas Gerais.

Investigações feitas por Evans e Barreto (1996) sobre a variabilidade patogênica de *Crinipellis* sp. no Estado de Minas Gerais detectaram quantidades abundantes de vassoura-de-bruxa com basidiocarpos típicos de *C. perniciosa*, encontradas em árvores nativas da espécie, *Solanum cernuum* Vell. (sem nome vulgar), numa floresta nas proximidades do município de Viçosa, a 900 Km do Estado da Bahia, fora do ecossistema da floresta Amazônica, que está separada a cerca de 3000 quilômetros. Os autores puderam concluir que esta espécie de solanaceae é hospedeira natural e que o fungo é silvestre para a região mineira, possivelmente devido a sua insignificância econômica nesse Estado.

Griffith *et al.* (1994) e Evans e Barreto (1996) sugerem que *C. perniciosa* proveniente de hospedeiro(s) alternativo(s) poderia(m) ter sido o(s) ancestral(is) do biótipo que se especializou em atacar o cacaueteiro, uma vez que estes biótipos parecem ser de origem recente. Os autores defendem que estes ancestrais certamente estariam no mesmo nicho ecológico do cacaueteiro, ou seja, a floresta tropical úmida.

É possível que novos trabalhos reforcem a hipótese de que estes hospedeiros naturais passaram a servir de “pontes” para a entrada do fungo na região cacaueira da Bahia, contrariando a hipótese de introdução feita por agentes naturais, assunto examinado por Aragundi *et al.* (1988), ou pelo homem, via introdução de materiais vegetais contaminados (Pereira *et al.*, 1989), que é a hipótese mais citada, todavia não comprovada cientificamente.

2.3 Estudos de variabilidade em *Crinipellis* sp.

De acordo com Allard (1971), a primeira demonstração clara da existência de diferentes estirpes, com relação à patogenicidade, mesmo quando impossível diferenciá-las morfológicamente, foi feita por Eriksson, em 1894, ao observar que o fungo da ferrugem da haste do trigo não produzia infecção em aveia, no centeio e em outras gramíneas. Posteriormente, o autor estabeleceu que cada uma das coleções de inóculos obtidos relacionava-se a uma série de características de hospedeiros, atacando centenas de espécies, mas outras não. Com base nessa verificação, definiu *formae speciales* de *Puccinia graminis* por suas diferentes propriedades fisiológicas, expressas nas propriedades patogênicas específicas, segundo os diferentes hospedeiros ou espécies.

A variabilidade genética em fungos pode ocorrer por mutação, o principal mecanismo gerador de novos genes, uma vez que permite a criação de novas seqüências nucleotídicas, por recombinação meiótica, destacando-se como o principal mecanismo amplificador da variabilidade, por recombinação parassexual, a qual pode explicar diversos fenômenos em fitopatologia, incluindo a emergência de novas raças fisiológicas; e por heterocariose, fenômeno observado em alguns fungos fitopatogênicos (Casela e Guimarães, 1996).

Apesar do fungo *C. perniciosa* ser descrito originalmente como um patógeno da espécie *Theobroma*, vários estudos de patogenicidade têm demonstrado a grande variabilidade do fungo em países da América do Sul. Assim, entre os tipos de *C. perniciosa* encontrados sobre *T. cacao* (biótipo C), Wheeler e Mepsted (1981) demonstraram que as populações de *C. perniciosa* originárias do Equador diferem consideravelmente em patogenicidade e taxa de crescimento micelial. Tais diferenças foram acompanhadas pela formação de zona de transição quando dicárions de diferentes áreas foram confrontados com

as outras formas encontradas sobre cacau em Trinidad Tobago e no Brasil (Hedger *et al.*, 1987).

Pesquisas conduzidas por Andebrhan (1986), com isolados obtidos de vassouras secas coletadas em plantações comerciais de 13 diferentes pontos geográficos na Amazônia, foram realizadas através da taxa de crescimento micelial, reações bioquímicas, estudos de compatibilidade somática e testes de patogenicidade. Os isolados utilizados foram classificados em 4 grupos, conforme a região de coleta, a saber: grupo 1, 2, 3 e 4. Os isolados provenientes de hospedeiros alternativos mostraram reações diferentes quando comparados com os isolados de *T. cacao* (cacau), com exceção de liana (cipó). Já os isolados de *T. grandiflorum* (cupuaçu) e *Solanum rugosum* (juçara) foram idênticos. Embora os testes de patogenicidade realizados em mudas, segundo o autor, não tenham sido conclusivos, o isolado de Santarém/PA (grupo 4) demonstrou ser o mais virulento e o de Cametá/PA (grupo 3), o menos virulento.

Diferentes grupamentos geográficos de isolados de *C. perniciosa* têm sido baseados em características morfológicas e culturais, compatibilidade somática (SCG), análises moleculares e reações bioquímicas em *Theobroma cacao* e outros *Theobroma* sp. (Hedger *et al.*, 1987; Andebrhan, 1988; Bastos *et al.*, 1988; Wheeler e Mepsted, 1988). Variantes saprofiticas têm sido observadas em *C. perniciosa* e agrupamentos de compatibilidade somática e caracteres morfológicos estão sendo usados para auxiliar na detecção de variabilidade. Entretanto, Laker e Mota (1990) relataram, num estudo entre isolados de 10 localidades em Trinidad, que não foi possível diferenciá-los com base apenas em características morfológicas, devido à grande semelhança entre os isolados utilizados.

Andebrhan e Furtek (1994) analisaram similaridades genéticas entre oito isolados de *C. perniciosa*, provenientes de vassouras secas, coletados em Belém (PA), a partir de vários gêneros e espécies das famílias Sterculiaceae,

Solanaceae e Bixaceae, usando 177 locos RAPD, dos quais 56 foram polimórficos. Os resultados indicaram que a proximidade genética, para a determinação da relação genética entre isolados, é mais importante que as espécies de plantas hospedeiras. Eles também observaram que padrões de bandas RAPD entre basidiocarpos na mesma vassoura foram similares, entretanto, foram detectadas diferenças entre padrões de bandas de culturas monospóricas do mesmo basidiocarpo, demonstrando que o fungo *C. pernicioso* é muito variável.

O trabalho de Yamada *et al.* (1998), também utilizando a análise de RAPD para sete isolados de solanáceas e oito de cacau de *C. pernicioso*, provenientes de vassouras secas, resultou num total de 264 bandas de 16 primers, sendo 61% destas bandas polimórficas. Com base no coeficiente de similaridade Dice's, formaram-se três grupos de isolados: 1) o isolado da solanaceae proveniente do Amazonas; 2) cinco dos seis isolados de solanáceas da Bahia; 3) todos os isolados de cacau e um isolado de solanácea (*Solanum paniculatum*) da Bahia. A separação do isolado de solanaceae do Amazonas de todos os outros isolados não é surpresa, uma vez que isolados de solanáceas do Amazonas e isolados de cacau não promoveram infecção cruzada e são incompatíveis somaticamente (Bastos e Evans, 1985). Os isolados das solanáceas da Bahia, segundo os autores, originaram-se, presumivelmente dos isolados de cacau do mesmo Estado. Andebrhan e Furtek (1994) também encontraram que os isolados de solanáceas do Amazonas foram apenas relacionados distantemente dos isolados de *Theobroma*, entres eles cacau e cupuaçu, *Herrania* sp. e *Bixa orellana*.

Segundo Andebrhan *et al.* (1998), a variação genética entre isolados de *C. pernicioso* do cacauero de várias regiões da Amazônia brasileira foi também estudada através de testes "in vitro" e "in vivo". Utilizando testes de compatibilidade micelial, foram identificados, em Rondônia, dois grupos do

fungo, o grupo formado pelos isolados dos municípios de Ouro-Preto d'Oeste e Jaru e o grupo formado pelos isolados dos municípios de Cacoal e Ariquemes. No Pará, não foram encontradas diferenças entre os isolados testados (Almeida e Andebrhan, 1984), caracterizando existência de variabilidade entre isolados de uma mesma região geográfica. Embora a metodologia de compatibilidade micelial permita determinar diferenças entre isolados de diferentes regiões e hospedeiros, quando foram analisados alguns isolados do Pará, os testes apresentaram limitações, provavelmente devido à afinidade genética dos isolados, a qual permite que condições de campo contribuam para infecções múltiplas. Para o autor, neste caso, a utilização de testes bioquímicos e moleculares permitiria identificar diferenças entre os isolados de alguns pólos cacauzeiros da Amazônia brasileira (Andebrhan *et al.*, 1998).

2.4 Variabilidade patogênica de *Crinipellis* sp

No patossistema *Theobroma cacao* x *C. perniciosa*, o hospedeiro é uma planta perene e o patógeno é de multiplicação sexuada, o que favorece o aparecimento de novos biótipos do patógeno. Embora uma das características da resistência horizontal seja a ausência de interações entre o hospedeiro e os biótipos do patógeno, a variabilidade do patógeno é pouco conhecida e a falta de controle dessa variabilidade genética tem sido relatada como a principal causa da inconsistência dos resultados de pesquisas obtidos nas avaliações da resistência. Por esta razão, nos testes de seleção para melhoramento genético é sugerida a utilização de misturas representativas das populações do patógeno de diferentes regiões e hospedeiros (Andebrhan *et al.*, 1998).

Segundo Wheeler (1976), a variabilidade dos patógenos é uma grande limitação em programas de melhoramento de plantas para resistência às doenças. As alterações em variedades tidas como resistentes, passando a susceptíveis, não são devidas a mudanças em si mesmas, mas às modificações

genéticas no agente causador da doença. A melhor maneira de avaliar a resistência de plantas às doenças é através das reações do hospedeiro, quando em contato direto com o patógeno, ou indiretamente pelo contato com seus metabólitos (toxinas). Embora os sintomas de vassoura-de-bruxa estejam relacionados com um desbalanço hormonal, até o presente momento não há evidências de que *C. pernicioso* produza alguma toxina específica; portanto, são necessárias inoculações para indução de sintomas (Andebrhan *et al.*, 1998).

Wheeler e Mepsted (1988) encontraram dois grandes grupos de *C. pernicioso* sobre cacau cultivado com base em testes de patogenicidade usando SCA 6 (resistente). O Grupo A induziu sintomas severos sobre SCA 6 e incluiu isolados do oeste das montanhas andinas Bolívia, Equador e Colômbia, enquanto o Grupo B induziu sintomas moderados em SCA 6 e incluiu isolados do leste andino Brasil, Venezuela e Trinidad. Os autores classificaram 64 isolados de 10 localidades na América do Sul e ilhas do Caribe, dentro de seis grupos de compatibilidade somática.

Em trabalhos anteriores realizados no Equador por Bartley (1977), foi possível induzir infecções no clone SCA 6 e SCA 12 (resistentes), fato este atribuído às diferenças genéticas da população do patógeno daquele país. Na Amazônia brasileira, estes clones comportaram-se de forma semelhante à do Equador. Nas condições de Manaus (AM), Belém (PA) e Ouro Preto d'Oeste (RO), as primeiras infecções naturais foram constatadas após seis anos de campo, indicando claramente o potencial do patógeno na região (Fonseca *et al.*, 1996).

No Brasil, Bastos e Evans (1985) foram os primeiros a descrever a formação de vassouras em membros da família das Solanáceas, encontrando ramos com vassouras em espécies de *Solanum* no Estado do Amazonas. Os basidiósporos produzidos pelos basidiocarpos não foram capazes de infectar mudas de cacau, mas causaram sintomas típicos de vassouras em uma variedade

de espécies de *Solanum*, entre elas o tomate e o pimentão. Os resultados apresentados pelos autores sugerem a co-existência de variabilidade genética em populações do fungo, que podem ser separadas por barreiras ecológica e genética.

Silva *et al.* (1992) foram os primeiros a realizar com sucesso infecção de cacau usando um isolado de solanaceae. Eles inocularam mudas de cacau com basidiósporos de *S. paniculatum* e de *Athanaea aff. pogogena* (Moric.) Sendt., coletados no município de Aureliano Leal, Bahia. Esta é, particularmente uma observação preocupante para fazendeiros de cacau da região, devido a esta solanácea ser uma espécie daninha muito generalizada em pastagens, sendo encontrada comumente próxima às plantações naquele Estado. Entretanto, tais isolados poderiam ter vindo do cacauzeiro, uma vez que estes relatos são posteriores à ocorrência da vassoura-de-bruxa em cacauzeiro no estado da Bahia (Pereira *et al.*, 1999).

Os plantios realizados em áreas de escape são usados como uma das alternativas em patossistemas em que a virulência e variabilidade do patógeno não são totalmente esclarecidos. Entretanto, esses plantios, em alguns casos, podem ser comprometidos pela falta de conhecimento efetivo sobre a patogenicidade de *C. pernicioso*, em relação aos hospedeiros alternativos, como fonte de inóculo para este fungo. Os resultados mostrados pela literatura sobre a patogenicidade de *C. pernicioso* (Silva *et al.*, 1992; Evans e Barreto, 1996; Luz *et al.*, 1997) reforçam a hipótese proposta por Barreto e Evans (1996), de que hospedeiro(s) alternativo(s) do fungo poderiam ter sido responsáveis pelo ingresso da vassoura-de-bruxa em cacauzeiros no estado da Bahia. Contudo, ainda não se sabe qual(is) seria(m) este(s) hospedeiro(s). Com o auxílio de inoculações cruzadas entre diferentes espécies, talvez seja possível esclarecer a origem das populações que passaram a infectar o cacauzeiro no sul da Bahia a partir do final da década de 80: se foi via introdução de material vegetal

infectado proveniente da Amazônia ou através de hospedeiros silvestres presentes na vizinhança (Resende *et al.*, 2000).

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo, **Edgard Blucher**, 381 p. 1971.
- ALMEIDA, L.C.; ANDEBRHAN, T. Reação de clones de cacau à *C. pernicioso*. In: CEPLAC/DEPEA. **Informe de Pesquisas**, Belém/PA, p.73-146, 1984.
- ANDEBRHAN, T. Características culturais e reações bioquímicas dos isolados de *C. pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, Brasília, p. 286, Jun, 1986.
- ANDEBRHAN, T. Cultural and biochemical reactions of isolates of *Crinipellis pernicioso*, causative agent of witches' broom disease cocoa. In: **Proceedings of the 10 th International Cocoa Research Conference**, Santo Domingo, Dominican Republic, p.363-8, 1988.
- ANDEBRHAN T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia brasileira. **Agrotropica**, Ilhéus, 10(2): 49-60, maio/ago, 1998.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Oxford, n.6, v. 43, p.1020-1027, Dec., 1994.
- ARAGUNDI, J.; FRIAS, G.; SOLORZANO, G.; SCHMIDT, R.; PURDY, L. H. Estudios sobre gradiente de infeccion y dispersion de la escoba de bruja del cacao en el Ecuador. In: **Conferencia Internacional de Investigación del Cacao**, 10ª, Santo Domingo, República Dominicana. Actas, Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance, p. 375-380, 1988.
- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao. **Phytopathology**. St. Paul, n.2, 42 p., 1957.
- BARTLEY, B. G. D. Conservação do germoplasma do cacau na região Amazônica. Ilhéus, BA, Brasil, **IIICA/CEPLAC**. 13 p. 1977.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on Solanaceous host. **Plant Pathology**, Oxford, n.2, 34, p.306-312, June, 1985.

- BASTOS, C. N.; ANBEHRHAN, T. Urucum (*Bixa Orellana*): Nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, n.1, v.11, Brasília, p.963-965, Fev., 1986.
- BASTOS, C. N.; ANBEHRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Comparação morfológica e fisiológica de *C. pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 2, v.13, Brasília, p. 202-206. Junho, 1988.
- BASTOS, C. N. Efeito da radiação solar e do período pós-germinativo sobre a viabilidade de basidiósporo de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia brasileira**, n.2, v.14, Brasília, p. 261-3. 1989.
- BASTOS, C. N. Patogenicidade e característica do isolado de *Crinipellis pernicioso* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia brasileira**, n.3 v.15, Brasília, p. 344-6, Set., 1990.
- BASTOS, C.N., FONSECA, S.E.A.; MELO, W.F. *Mascaganio* cf. *sepium*, cipó nativo da Amazônia Brasileira, hospedeiro de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, n.4, v. 23, Brasília, p. 504. Dez., 1998.
- BEZERRA, J. L. Novos hospedeiros de *C. pernicioso* na região cacauera da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, n.3, v. 19, Brasília, p. 341. Set., 1994.
- CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. *In: Manual de fitopatologia – princípios e conceitos*, Ed. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L., 3º ed., São Paulo, Agronômica Ceres, cap. 24: 470-491, 1995.
- CASELA, R. C.; GUIMARÃES, F. B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Passo Fundo RG, v.4, p.75-93. 1996.
- DALLA PRIA, M. D.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do Cacauero. *In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L., (Ed.). Manual de Fitopatologia - Doenças de plantas cultivadas. 3ª ed., São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, p.176-183. 1997.*
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Equador: 1. The fungus. **Annals of Applied Biology** 89, London, n.2, p.185-192, July, 1978.

- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, n.3, 74, 515-523. June, 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease - a case study. **Cocoa Growers Bulletin**, 32, Bournville, p. 5-18, 1981.
- EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. *Crinipellis pernicioso*: A much investigated but little understood fungus. **Plant Pathology**, v.10. p. 58-61, 1996.
- GRIFFITH, G. W.; WILSON, J. F.; HEDGER, J. N. Populations structure, breeding biology and evolutionary relationships in the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis pernicioso*. **11th International Cocoa Research Conference**. p. 48-51, 1994.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, Essex, v. 72, p. 278-289, 1994.
- 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** 88, Cambridge, n.4, p. 533-46, June, 1987.
- HEDGER, J. N. Litter trapping by fungi in moist tropical forest. In: FRANKLAND, I. S.; WATLING, J. C. R; WHALEY, A. J. S. (Ed.) **Aspects of Tropical Mycology**. British Mycological Society Symposium. Cambridge University Press, p.15-36, 1993.
- LAKER, H. A.; MOTA, J. W. S. Witches' broom disease of cocoa in the State of Rondonia, Brazil: Historical perspectives and present situation. **Cocoa Grower's Bulletin** 43. Bournville, 45-49, 1990.
- LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. Doenças do cacauero. In: VALE, F.X.R e ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de Doenças de Plantas**. v.2, Viçosa: UFV, p. 611-656, 1997.
- NAKAYAMA, L. H. I. Influencia da nutrição mineral na manifestação dos sintomas da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer) em cacauero. Piracicaba: ESALQ, 1995. 76 p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Revista Agrotrópica*, Ilhéus, n.1, v.1, p.79-81, Jan/Abril, 1989.
- PEREIRA, J. G.; BARRETO, R. W.; BEZERRA, J. L.; ALMEIDA, A. T. de.; SANTOS FILHO, E. J. dos. Distribuição de *Crinipellis pernicioso* em solanáceas nativas. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, Brasília, p. 423, Ago., 1999. (Resumos).
- PURDY, L. H.; TRESE, A. T.; ARAGUNDI, J. A. Proof of pathogenicity of *Crinipellis pernicioso* to *Thebroma cacao* by using basidiospores produced in vitro cultures. *Thebroma*, Ilhéus, n.3, v. 13, p. 157-163, Jul/Set.,1983.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia* A. Juss., é patogênico ao cacauero. *Fitopatologia Brasileira*, n.1, v. 24, Brasília, p. 88-91, Março, 2000.
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. *Solanum paniculatum*, hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. *Agrotrópica*, Ilhéus, 4:17-20. Maio/Ago., 1992.
- YAMADA, M. M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous host and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. *Agrotrópica* 10 (2): 123-126. Maio/Ago., 1998.
- WHEELER, B. E. J. *An Introduction to Plant Disease*. London: J. Wiley, 1976. 374 p.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic races of *Crinipellis pernicioso*. *Proceedings of the 8th International Cocoa Conference*, Cartagena, Colômbia, p. 365-70, 1981.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathology*, Oxford, n.4, 37. p. 475-88, Dec., 1988.

CAPÍTULO 2

COMPATIBILIDADE SOMÁTICA ENTRE ISOLADOS DE *Crinipellis* sp. PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES E HOSPEDEIROS

1 RESUMO

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis* sp. provenientes de diferentes regiões e hospedeiros. Lavras: UFLA, 2001. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).*

Crinipellis perniciosa é o fungo causador da doença vassoura-de-bruxa do cacauero, mas ataca também várias espécies das famílias: Sterculiaceae, Bixaceae, Solanaceae e Malphigiaceae, distribuídas ao longo da América do Sul. Objetivando estudar a diversidade genética entre 7 isolados polispóricos de *C. perniciosa* provenientes de diferentes hospedeiros (*Theobroma grandiflorum*; *Theobroma cacao* L.; *Herrania* sp.; *Theobroma bicolor*; *Heteropterys acutifolia* e *Solanum lycocarpum*) coletados em diferentes Estados do Brasil (AM, PA, BA, MG) utilizou-se a técnica de compatibilidade somática (SCG). Utilizando um dendograma construído pelo método WPGMA (método ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas), os isolados foram agrupados em dois grupos: i) grupo formado pelos isolados de *Herrania* sp. (PA), cacau (BA), cupuaçu (AM), cacau (PA) e bicolor (PA) e ii) grupo formado pelos isolados de cipó e lobeira provenientes de MG. As similaridades genéticas variaram de 0,1429 a 0,5714. O isolado de cupuaçu (AM) mostrou uma relativa similaridade com o isolado de cacau de Santo Amaro (BA). Os isolados de cipó e lobeira (MG) foram incompatíveis com todos os isolados testados. Estes resultados demonstraram a grande diversidade genética entre isolados da Amazônia e Bahia e entre os provenientes de MG. Esta diversidade pode influir em testes de seleção de genótipos resistentes visando o controle da vassoura-de-bruxa.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

2 ABSTRACT

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. Somatic compatibility among isolates of *Crinipellis* sp. originated from different regions and hosts. Lavras: UFLA, 2001. 61p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology).

Crinipellis perniciosa is the causal agent of witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao*), but it also attacks several species of the families: Sterculiaceae, Bixaceae, Solanaceae and Malphigiaceae, distributed along South America. Aiming at studying the genetic diversity among 7 multisporic isolates of *C. perniciosa* from different hosts (*Theobroma grandiflorum*; *Theobroma cacao* L.; *Herrania* sp.; *Theobroma bicolor*; *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*) collected at different Brazilian States (AM, PA, BA, MG), the technique of somatic compatibility was used (SCG). Using a phenogram built by the method WPGMA (considered a weighted method of grouping to the pairs using arithmetic averages), the isolates were included in two groups: i) group formed by the isolates from *Herrania* sp. (PA), cocoa (BA), cupuaçu (AM), cocoa (PA) and bicolor (PA) and ii) group with cipó and lobeira isolates from MG State. The genetic similarity varied from 0.1429 to 0.5714. Cupuaçu isolate (AM) showed a relative similarity with cocoa isolate from Santo Amaro (BA). *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum* isolates (MG) were incompatible with all tested isolates. These results demonstrated a great genetic diversity among isolates from the Amazonian region and Bahia and between isolates coming from MG. This diversity can influence tests of selection of resistant genotypes, seeking witches' broom control.

* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

3 INTRODUÇÃO

Embora no passado vários estudos de compatibilidade somática tivessem sido realizados em diferentes patossistemas, caracterizando linha de demarcação ou zona de transição, quando diferentes isolados de algumas espécies foram pareados, Irene Mounce, em 1929, foi a primeira pesquisadora a estudar o fenômeno em detalhes e estabelecer conceitos até hoje vigentes. Usando 47 isolados de *Fomitopsis pinicola*, ela observou que o surgimento de zonas de inibição era invariavelmente formado entre os isolados estudados na chamada linha de transição. A referida autora caracterizou que, em alguns casos, as bordas dos micélios aéreos em um ou em ambos os lados da linha era acompanhada pelo seu adensamento (Worral, 1997).

A compatibilidade somática é uma técnica que vem sendo utilizada a bastante tempo e está disseminada entre vários ramos da biologia. Em animais, plantas e células, a fusão somática é regulada através de anastomose. Em fungos, a regulação somática está em um nível mais íntimo, determinando que esta fusão ou anastomose hifal resulta em uma continuidade citoplasmática e permutação nuclear (Petersen, 1995). A diversidade genética é geralmente grande entre e dentro dos grupos de incompatibilidade somática, ocasionando uma variação genética substancial, com a presença de raças patogênicas, por exemplo, existindo dentro dos grupos em alguns casos (Jacobson e Gordon, 1991).

Na América do Sul, os primeiros estudos usando a técnica de compatibilidade somática para agrupar diferentes isolados de *C. pernicioso* foram realizados por Wheeler e Mepsted, em 1988. Desde então, com a entrada do fungo na região produtora de cacau no Sul da Bahia em 1989, um firme progresso nos estudos de variabilidade vem sendo alcançado com o intuito de desvendar o relacionamento filogenético em variantes do fungo.

Embora a metodologia de compatibilidade somática permita determinar diferenças entre isolados de diferentes países e regiões, bem como entre isolados de diferentes hospedeiros (Andebrhan, 1987), quando se utilizam apenas isolados de uma mesma região geográfica, os resultados apresentam limitações, entre elas pouca variação genética entre os isolados devido à proximidade genética em alguns casos (Oliveira, 1995). A utilização de misturas representativas de populações do fungo de diferentes regiões e hospedeiros deve ser utilizada nas avaliações de compatibilidade, de modo a permitir estratégias efetivas e duradouras de resistência, que possam ser empregadas em programas de melhoramento genético. É importante destacar que vários fatores como monocultura, ambiente biótico e abiótico, também devem ser relacionados como fatores para a estabilidade da resistência.

A falta de conhecimento desses mecanismos de variabilidade do patógeno, cujo fator está relacionado com o aparecimento de novos biótipos, mais agressivos e destrutivos, influencia na epidemia da vassoura-de-bruxa (Ferraz, 1989), comprometendo a resistência de materiais tidos como tolerantes na região produtora de cacau da Bahia e na Amazônia.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética entre os isolados obtidos de culturas polispóricas de *C. pernicioso* procedentes de diferentes regiões e hospedeiros, através da técnica de compatibilidade somática, buscando fornecer informações para utilização em programas de melhoramento genético do cacauzeiro e cupuaçuzeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de janeiro a dezembro de 2000, no laboratório de Resistência de Plantas a Patógenos da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil.

4.1 Origem dos isolados

Os isolados utilizados foram obtidos a partir de vassouras secas, coletadas em diferentes hospedeiros e Estados do Brasil: Belém (PA), Manaus (AM), Lavras (MG) e Sto. Amaro (BA). Os isolados do Pará foram gentilmente cedidos pela CEPLAC/ERJOH e o isolado de Manaus foi cedido pela EMBRAPA/Amazônia Ocidental. Quanto aos isolados da Bahia, foram cedidos pela CEPLAC/CEPEC. As condições climáticas das regiões de origem dos isolados podem ser observadas na Tabela 1.

TABELA 1 Dados climatológicos dos centros de origem dos isolados de *C. pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Estação	Lat (S)	Long (W.Grw)	T(°C)	PP (Total mm)	UR (%)
Belém	01° 27	48° 28	25,9	2893,1	84,0
Manaus	03° 08	60° 01	26,7	2286,2	83,0
Lavras	21° 14	45° 00	19,4	1529,7	76,2
Salvador ¹	13° 01	38° 31	25,2	2098,7	80,8

FONTE: Depto. Nacional de Meteorologia (M. A.), 1992.

1- Estação climatológica mais próxima ao município de Santo Amaro da Purificação, BA.

4.2 Obtenção e manutenção de culturas polispóricas

Foram utilizados, no teste de compatibilidade somática (SCG), sete isolados, sendo três do Pará, *Herrania* sp., *Theobroma bicolor* (cacau-do-peru) e *Theobroma cacao* L.; um de Manaus, o isolado de *T. grandiflorum* (cupuaçu); dois de Minas Gerais, *Solanum lycocarpum* (lobeira) e *Heteropterys acutifolia* (cipó); e da Bahia foi utilizado o isolado de *Theobroma cacao* L., proveniente do município de Santo Amaro da Purificação (Tabela 2).

As culturas foram obtidas pelo método de liberação dos basidiósporos em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) (Hedger *et al.*, 1987). Vassouras secas foram colocadas em vassoureiros (câmaras úmidas de 70 x 80 x 120 cm) para emissão de basidiocarpos sob condição de alta umidade e seca alternadas (Rocha e Wheeler, 1985). Após a emissão e coleta dos primeiros basidiocarpos, os mesmos foram lavados em água estéril e desinfestados numa solução de estreptomicina a 1%. Os basidiocarpos foram fixados com vaselina em tampas de placas de Petri de 9cm contendo BDA e mantidos à temperatura $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após a obtenção de colônias polispóricas, foi efetuada uma nova repicagem de discos de 7 mm das margens das colônias para o meio BDA, sendo as culturas mantidas em BOD à temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 h. Os isolados foram conservados em geladeira na micoteca do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em Lavras, Minas Gerais.

TABELA 2 Hospedeiros, origem e ano de obtenção dos isolados polispóricos de *Crinipellis* sp. usados no teste de compatibilidade somática (SCG). UFLA, Lavras, MG, 2001.

Isolados	Hospedeiros	Origem	Instituição	Isolamento
Herrania	<i>Herrania</i> sp.	Belém, PA	CEPLAC	1999
Bicolor	<i>T. bicolor</i>	Belém, PA	CEPLAC	1999
Cacau	<i>T. cacao</i>	Belém, PA	CEPLAC	1999
Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Manaus, AM	EMBRAPA	1999
Lobeira	<i>S. lycocarpum</i>	Lavras, MG	UFLA	2000
Cipó	<i>H. acutifolia</i>	Lavras, MG	UFLA	2000
Cacau	<i>T. cacao</i>	Sto. Amaro, BA	CEPLAC	2000

4.3 Teste de compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis* sp.

A partir do isolamento das culturas polispóricas, discos (7 mm Φ) de cada isolado foram confrontados em placas de Petri (9cm) contendo o meio V8 (Hine e Aragabi, 1963; Andebrhan e Furtek, 1994), distantes 2 cm entre si, invertidas e incubadas a 25°C por quatro semanas. Foram utilizadas quatro placas de Petri em cada pareamento. Após o crescimento micelial (3 a 4 semanas), foi realizada a avaliação das colônias quanto à incompatibilidade ou compatibilidade, de acordo com a formação ou não da linha de precipitação na zona de transição.

4.4 Determinação das distâncias genéticas

A determinação das distâncias genéticas entre os isolados de *Crinipellis pernicioso* foi realizada pelo programa STATÍSTICA (1995), versão 5.0, a partir de uma matriz de dados binários. A interpretação dos resultados foi

baseada em variáveis qualitativas binárias (Liberato *et al.*, 1995), considerando presença (1) ou ausência (0) de compatibilidade entre os isolados testados.

A matriz de dados binários possibilitou o cálculo da distância genética com base no método hierárquico aglomerativo de agrupamento WPGMA (método ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas). A matriz de similaridade genética entre os isolados foi determinada em relação ao complemento da divergência genética, que é baseada na composição genética das populações e envolve as diferenças nas frequências alélicas (Liberato *et al.*, 1995; Dias, 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de compatibilidade, foi possível a construção de um dendograma para agrupar os isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Brasil.

A análise de agrupamento permitiu classificar os isolados dentro de dois grupos: i) grupo formado pelos isolados de Herrania (PA), cacau (BA), cupuaçu (AM), cacau (PA) e bicolor (PA); ii) grupo formado pelos isolados de lobeira e cipó, ambos de Minas Gerais (Figura 1). Segundo Liberato *et al.* (1995), o procedimento básico de todos os métodos aglomerativos é similar, iniciando com o cálculo de uma matriz de similaridade ou dissimilaridade entre as populações e finalizando com um dendograma, que representa a síntese dos resultados.

O dendograma foi originado de uma matriz de valores binários, composta de coeficientes correspondentes aos vários resultados do teste de compatibilidade somática. Ao analisar o dendograma, observa-se que entre os isolados estudados a maioria apresentou dissimilaridade genética alta. Em relação à similaridade genética, pode-se observar que a variação foi de 0,1429 a 0,5714. A baixa similaridade genética entre os isolados de uma mesma região, ou seja, próximos geograficamente, indica a relevância da seleção de isolados para utilização em programas de melhoramento genético visando resistência a *C. pernicioso*.

Andebrhan e Furtek (1994), realizando estudos moleculares com marcadores RAPD para a análise e comparação entre isolados monospóricos e polispóricos de *C. pernicioso* em diferentes hospedeiros da Amazônia, verificaram a variabilidade genética através da análise de agrupamento e observaram a formação de três grupos distintos: i) grupo formado pelos isolados do Pará, composto por *Herrania* sp., *T. grandiflorum*, *T. cacao*, *T. obovatum* e

T. subicanum; ii) grupo formado pelos isolados de *T. cacao* e *Bixa orellana*; iii) grupo formado pelo único isolado de solanaceae do Amazonas. Estes resultados são semelhantes ao grupo formado pelos isolados da Amazônia no presente trabalho (cupuaçu, Herrania e cacau, PA), sendo que alguns dos isolados utilizados em ambos os trabalhos foram oriundos da mesma região de origem.

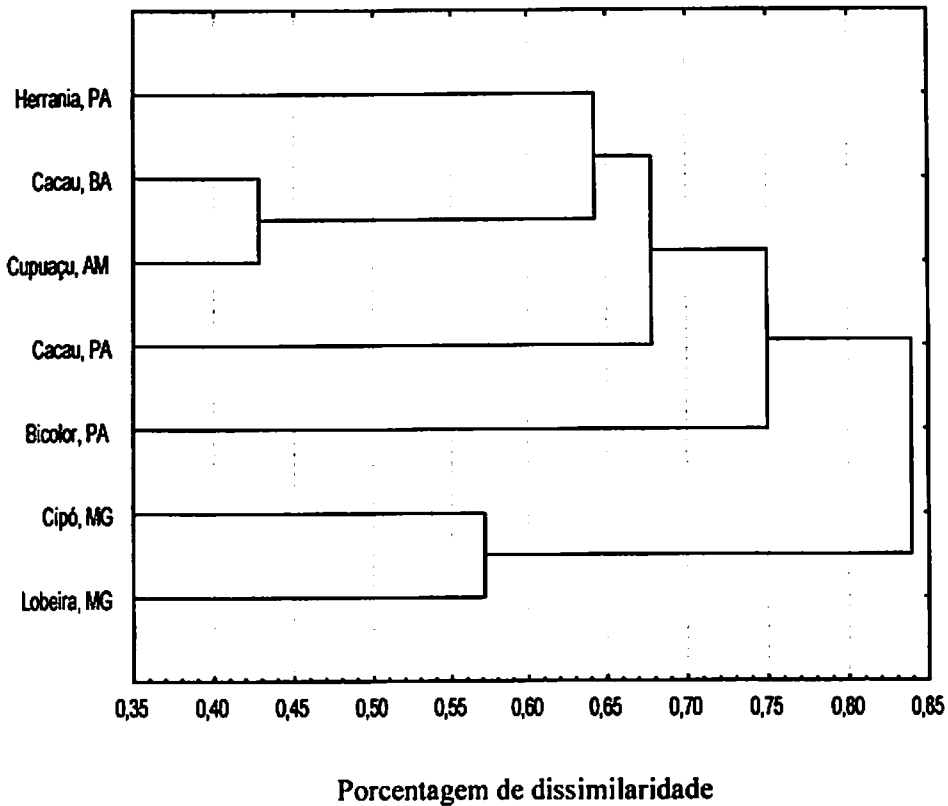


FIGURA 1 Dendrograma com sete isolados de *Crinipellis* sp., agrupados pelo método WPGMA (método ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas). UFLA, Lavras, MG, 2001.

Estudos de compatibilidade realizados por Almeida e Andebrhan (1984) com isolados de *C. pernicioso* provenientes do Pará não permitiram determinar diferenças entre os isolados de diferentes regiões e hospedeiros. O autor considera que a proximidade geográfica dos isolados permite que condições de campo contribuam para infecções múltiplas. Para o autor, neste caso, a utilização de análises moleculares permitiria identificar diferenças entre os isolados de diferentes regiões e hospedeiros da Amazônia brasileira.

Entretanto, Andebrhan *et al.* (1998) observaram variação genética entre isolados de *C. pernicioso* do cacau em Rondônia, realizando estudos através de testes “*in vitro*” e “*in vivo*”. Utilizando SCG, identificou dois grupos do fungo: o grupo formado pelos isolados dos municípios de Ouro-Preto d’Oeste e Jaru e o grupo formado pelos isolados dos municípios de Cacoal e Ariquemes, caracterizando a existência de variabilidade entre grupos de isolados de *C. pernicioso* dentro de uma mesma região geográfica.

Os resultados da similaridade genética apresentados na Tabela 3. mostram que entre os isolados avaliados da Amazônia e da Bahia, houve uma certa afinidade genética, confirmando os resultados observado por Perez *et al.* (2000), que realizando estudos de compatibilidade somática com isolados polispóricos de *C. pernicioso* procedentes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, observaram a formação de quatro grupos, sendo um dos grupo formados com isolados de cacau de Belém (PA) e Santo Amaro (BA).

TABELA 3 Similaridade genética entre isolados de *Crinipellis* sp. de diferentes hospedeiros, com base no complemento da dissimilaridade (Dias, 1998). UFLA, Lavras, MG, 2001.

Isolados	Herrania PA	Bicolor PA	Cacau PA	Cipó MG	Lobeira MG	Cacau BA	Cupuaçu AM
Herrania	1,000	,1429	,2857	,1429	,1429	,4286	,2857
Bicolor		1,000	,2857	,1429	,1429	,4286	,1429
Cacau, PA			1,000	,1429	,1429	,4286	,2857
Cipó				1,000	,4286	,1429	,2857
Lobeira					1,000	,2857	,4286
Cacau, BA						1,000	,5714
Cupuaçu							1,000

Estudo utilizando marcadores moleculares RAPD, realizado por Niella *et al.* (2000) com isolados monospóricos de diferentes regiões, mostrou a formação de um grupo principal com isolados de cacau da Bahia (Ilhéus, Santo Amaro e Camacan) e Pará (Belém), caracterizando a semelhança genética entre alguns isolados dessas duas regiões no presente trabalho.

A menor similaridade genética foi de 0,1429, observada nos isolados de *Herrania* e *T. bicolor* do Pará, entre outros. Estes resultados discordam dos estudos anteriores feitos por Yamada *et al.* (1998) e Gomes *et al.* (2000) por considerarem que isolados de uma mesma região geográfica tendem a ser geneticamente próximos. Entretanto, a baixa similaridade genética entre isolados de *C. pernicioso* de uma mesma região foi também observada nos estudos conduzidos por Andebrhan e Furtek (1994), com diferentes isolados de cacau da Amazônia brasileira, coletados a menos de 2 km um do outro, na estação da CEPLAC/ERJOH, em Marituba, PA. Para os autores, as condições

de campo permitem que vários basidiósporos contribuam para infecção natural, conseqüentemente, basidiocarpos iguais da mesma vassoura poderiam ser originados de micélio geneticamente diferente. Então, entende-se que se os micélios dentro das vassouras são geneticamente polimórficos, este polimorfismo pode ser refletido nos basidiósporos.

A maior similaridade genética foi de 0,5714, observada entre o isolado de cupuaçu (AM) e de cacau (BA), regiões geográficas que estão separadas por aproximadamente 3000 Km de distância. Entretanto, os isolados testados provaram ser compatíveis pelos resultados dos testes de compatibilidade somática (Figura 2). Tal situação implicaria na realização de testes de patogenicidade com diferentes isolados de cupuaçu do Amazonas e cacau da Bahia, em plantas destas espécies com diferentes graus de resistência, para poder inferir o relacionamento entre os isolados e verificar a correlação entre grupos de compatibilidade somática (SCG) e patogenicidade no campo.

No grupo formado pelos isolados de cipó e lobeira de Minas Gerais, observa-se uma pequena similaridade desses isolados e o restante. Esses isolados de Minas Gerais mostraram reações de compatibilidade quando confrontados com os isolados provenientes de outras regiões geográficas. Entretanto, o isolado de lobeira demonstrou certa similaridade (,4286) com o isolado de cupuaçu do Amazonas. Estudos de patogenicidade realizados por Viana Júnior *et al.* (2000), em condições controladas de casa-de-vegetação, com este isolado de lobeira de Minas Gerais, em mudas de cupuaçu do Amazonas submetidas à alta pressão de inóculo e inoculação contínua, demonstraram que 60% das mudas apresentaram sintomas típicos de vassoura-de-bruxa, como hipertrofia e superbrotamento, confirmando a patogenicidade de uma solanácea em cupuaçuzeiro. Estes resultados permitem inferir uma possível correlação entre SCG e patogenicidade no campo.

Os isolados provenientes de solanáceas parecem ter genes que governam a compatibilidade reprodutiva ainda não bem identificados (Wilson *et al.*, 1993), uma vez que trabalhos realizados por vários autores (Bastos e Evans, 1985; Andebrhan e Furtek 1994; Yamada *et al.*, 1998), utilizando isolados de solanáceas, não conseguiram agrupá-los com isolados de *C. pernicioso* provenientes de outros hospedeiros, mostrando reações de incompatibilidade quando confrontados.

Para Wilson *et al.* (1993), a população do tipo S (solanacea) apresenta grupos de compatibilidade somática múltiplos, que podem ser identificados, embora não claramente definidos. Os autores sugerem que esses isolados de solanáceas possuem características intermediárias entre os isolados de cacau e de cipó. É possível hipotetizar que as populações desses isolados de cipó e lobeira poderiam estar separadas por barreiras ecológicas e genéticas, ocorrendo endemicamente nas matas de galeria e no cerrado mineiro, distantes das áreas produtoras de cacau.

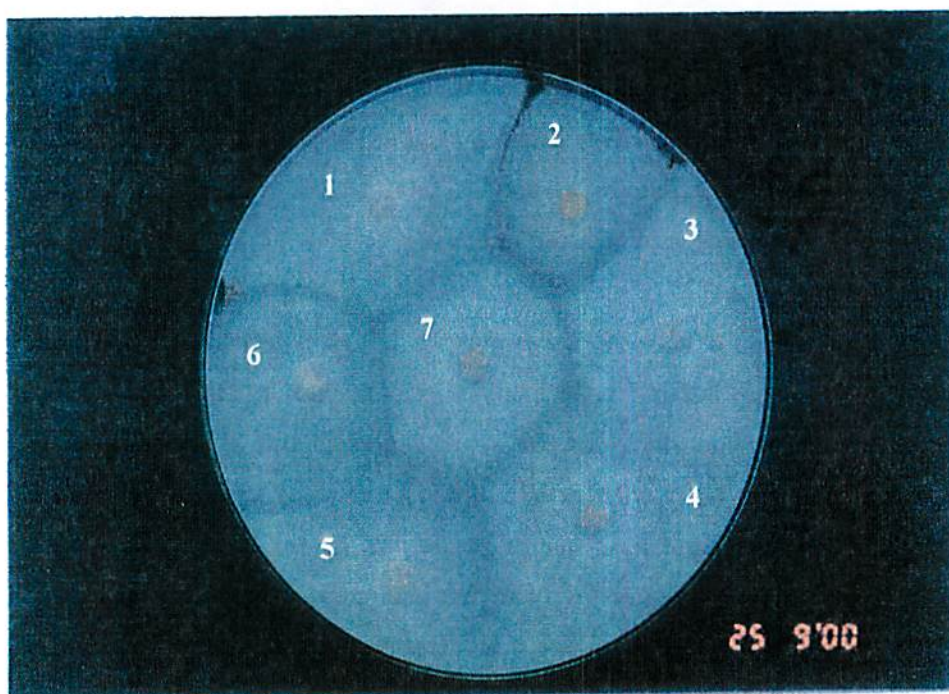


FIGURA 2. Reações de compatibilidade e incompatibilidade entre os isolados de *C. pernicioso* usados no teste SCG (1 Cacau, PA; 2 Bicolor, PA; 3 Cupuaçu, AM; 4 Cacau, BA; 5 Cipó, MG; 6 Lobeira, MG; 7 Herrania, PA). Reação de compatibilidade visível entre os isolados de cupuaçu (AM) e cacau (BA). Os demais cruzamentos da figura apresentaram reações de incompatibilidade.

6 CONCLUSÕES

- 1) Foram detectados dois grupos de compatibilidade somática entre os isolados testados.
- 2) Os Isolados de cipó e lobeira de Minas Gerais não foram compatíveis com isolados das regiões testadas e apresentaram grande divergência genética em relação a estes.
- 3) Isolados de cupuaçu (AM) e cacau (BA) apresentaram a maior similaridade genética quando comparados aos outros isolados.
- 4) Os isolados de Herrania (PA), bicolor (PA), cacau (PA) e cupuaçu (AM) mostraram as menores similaridades genéticas entre si.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.C.; ANDEBRHAN, T. Reação de clones de cacau à *C. pernicioso*. In: CEPLAC/DEPEA. **Informe de Pesquisas**, Belém/PA, p.73-146, 1984.
- ANDEBRHAN, T. Relação entre as idades das vassouras vegetativas e produção de basidiocarpos de *C. pernicioso* e as implicações no controle fitossanitário da doença. **Fitopatologia Brasileira** 12, p.135, 1987.
- ANDEBRHAN T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia brasileira. **Agrotropica** , Ilhéus, 10, n.2 p.49-60, Maio/Ago., 1998.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* from different isolates. **Plant Pathology** 43, Oxford, n.6, 1020-1027, Dec., 1994.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches' broom disease) on Solanaceous host. **Plant Pathology**, 34, Oxford, n.2, p.306-312, June, 1985.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Secretaria Nacional de Irrigação, normas climatológicas (1961-1990), **Ministério da Agricultura**, Brasília, 1992.
- DIAS, L. A. S. **Análises multidimensionais**. In: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. ALFENAS, A. C. (ed.), Viçosa: UFV, 1998, 554 p.
- FERRAZ, E. C. A. **A vassoura-de-bruxa na Bahia: plano integrado de ações**. CEPLAC, Ilhéus, BA, 43 p., 1989.
- GOMES, L. M. C.; MELO, G. R. P.; FALEIRO, F. G.; SILVA, S. D. V. 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 (Resumos).

- HEDGER, J. N.; PICKERING, V. e ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicios*). **Transactions of the British Mycological Society** 88, Cambridge, n.4, p. 533-46, June, 1987.
- HINE, R. B.; ARAGABI, M. Pathogenicity vitamin nutrition and cultural characteristics of isolates of *Phytophthora parasitica* from carnation and other hosts in Hawaii. **Phytopathology**, 53, St. Paul, p. 1197-1207, 1963.
- JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: a case study of diversity within a forma specialis. **Phytopathology** 81, St. Paul, n.10, p. 1064-1067, Oct., 1991.
- LIBERATO, J. R.; CRUZ, C. D.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Técnicas estatísticas de análise multivariada aplicada à fitopatologia: I. Análise de componentes principais, análise canônica e "cluster análise". **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RG, v. 3, p.227-281, 1995.
- 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 pernicios* provenientes de diferentes Estados do Brasil utilizando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p. 400, Ago, 2000. (Resumos).
- OLIVEIRA, M. L. Estudos de compatibilidade entre isolados de *Crinipellis pernicios* proveniente de cacau e de outros hospedeiros. **Informe de pesquisa**, 1992. CEPLAC: Ilhéus, Bahia, Brasil, p. 99-101 (250 p.), 1995.
- PEREZ, J. O.; RESENDE, M. L. V.; CAVALCANTI, L. S.; VILAS BOAS, C. H. Expressão de incompatibilidade somática entre isolados miceliais de *Crinipellis pernicios* proveniente de diferentes hospedeiros. In: **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p. 455. Ago., 2000, (Resumos).
- PETERSEN, R. H. There's more to a mushroom than meets the eye: mating studies in the Agaricales. **Mycologia**, 87, New York, n.1, p. 1-17, Jan/Feb., 1995.
- ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicios*, the causal fungus of witches broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology** 34, Oxford, n.3, p.319-28, Sept., 1985.

STATÍSTICA. Programa de análise estatística, versão 5.0, 1995.

VIANA JÚNIOR, C. A.; RESENDE, M. L.V.; LANDA NETO, L.; PEREZ, J. O. Patogenicidade de *Crinipellis* sp. proveniente de *Solanum lycocarpum* (Lobeira) em *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p. 453, Ago., 2000. (Resumos).

WILSON, F. J.; LEWIS, M. D.; HEDGER, J. H. Use of mitochondrial probes and somatic compatibility groupings to study the populations of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease of cacao) in South America. **BSSP Annual Meeting**, Wooverhampton, p.33, 1993. (abstract).

WORRAL, J. J. Somatic incompatibility in basidiomycetes. **Mycologia**, 89, New York, n.1, p. 24-36, Jan/Feb., 1997.

YAMADA, M. M.; ANBEHRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous host and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica** 10, Ilhéus, n.2, p.123-126. Maio/Ago., 1998.

CAPÍTULO 3

PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Crinipellis* sp.

1 RESUMO

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. Patogenicidade de isolados de *Crinipellis* sp. Lavras: UFLA, 2000. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).*

Estudos sobre a variabilidade patogênica de *C. perniciosa* vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de fornecer informações para os programas de melhoramento genético do cacauero visando à obtenção de fontes de resistência mais duradouras e efetivas. Poucas são as informações sobre a durabilidade dessa resistência e o surgimento de novos biótipos do fungo podem afetar a resistência de materiais utilizados em plantios comerciais. Com o objetivo de estudar patogenicidade entre isolados de *C. perniciosa*, isolados provenientes do Estado da Bahia (cacau e cupuaçu) e Minas Gerais (cipó e lobeira) foram inoculados na concentração de $2,5 \times 10^5$ basidiósporos/mL em diferentes espécies de plantas: cacau comum e Catongo, *T. bicolor* e cupuaçu. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial (isolados x cultivares), com quatro blocos de 14 plantas cada. O inóculo foi obtido a partir de basidiósporos coletados de basidiocarpos produzidos em vassouras secas (lobeira e cipó) ou produzidos em meio de cultura (cacau e cupuaçu). Noventa dias após a inoculação foi realizada a avaliação de incidência da doença. A análise estatística foi realizada usando-se o programa SISVAR. Os isolados de cacau e cupuaçu foram os únicos patogênicos a todos os genótipos de plantas. A análise de variância mostrou que esses isolados não diferiram estaticamente na capacidade de causar doenças nas espécies testadas. O isolado de lobeira foi patogênico apenas às plantas de cupuaçu. O isolado de cipó somente causou sintomas em Catongo e cupuaçu, embora menos severos. Os genótipos de cacau comum e Catongo foram os mais suscetíveis aos isolados testados.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

2 ABSTRACT

VIANA JÚNIOR, Carlos Alberto da Cruz. Pathogenicity of *Crinipellis* sp. Isolates. Lavras: UFLA, 2000. 61p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology).*

Studies on the pathogenic variability of *C. pernicioso* have been developed with the purpose of supplying information for the programs of genetic improvement of cocoa (*Theobroma cacao* L.) for obtaining more durable and effective resistance sources. Little are the information on the durability of that resistance and the appearance of new biotypes of the fungus can affect the resistance of materials used in commercial plantings. Aiming at studying the pathogenicity among isolates of *C. pernicioso*, isolates from State of Bahia (cocoa and cupuaçu) and Minas Gerais (*Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*) were inoculated ($2,5 \times 10^5$ basidiospores/mL) at different species (cocoa cv. Comum and Catongo, *T. bicolor* and cupuaçu). A randomized block design in a factorial scheme (isolates x plant genotype) was utilized, with four blocks of 14 plants each. The inoculum was based on basidiospores collected from basidiocarps produced in dry brooms (*H. acutifolia* and *S. lycocarpum*) and from those produced in culture media (cocoa and cupuaçu). Ninety days after the inoculation, the disease incidence was evaluated. Statistical analysis was carried out using the program SISVAR. Cocoa and cupuaçu isolates were the only pathogenic to all genotypes. The variance analysis showed that those isolates did not differ in the capacity to cause disease on the tested plants species. *S. lycocarpum* isolate was pathogenic only to cupuaçu plants. *H. acutifolia* isolate caused symptoms, although less severe, on both, Catongo and cupuaçu. The cocoa genotypes 'Common and Catongo' were the most susceptible to the tested isolates.


* Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor), Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque – CEPLAC/ERJOH.

3 INTRODUÇÃO

Quando uma série de diferentes isolados de um patógeno é inoculada em uma série de diferentes cultivares de um hospedeiro, pode-se ou não obter uma interação diferencial significativa. A classificação do nível de interação apresentado por uma das cultivares ou espécies poderá ser usada para determinação do tipo de resistência e do nível de patogenicidade dos isolados testados (Camargo e Bergamin Filho, 1995). Variedades ou espécies de plantas cultivadas manifestam diferentes graus de resistência ao ataque de patógenos; entretanto, somente a partir de 1900 foi possível determinar graus de resistência a patógenos ou a raças destes, e a interação genética do hospedeiro com o patógeno (Robinson, 1976).

Os isolados podem variar quanto à especificidade do hospedeiro, e esta variação pode ser inter ou intra-específica. Quando o nível de variação ocorre dentro das espécies testadas, e nota-se um alto grau de especialização quanto à espécie hospedeira, então denomina-se que há especialização interespecífica, podendo existir formas especiais que são patogênicas a determinadas espécies, mas a outras não (Agrios, 1997).

Quando o nível de especialização aumenta mais dentro das formas especiais ou *formae speciales*, podendo se destacar a presença de isolados que atacam somente alguns cultivares da espécie hospedeira, então há presença de uma especialização intra-específica, e estes isolados são agrupados em raças fisiológicas. Desta forma, percebe-se que a definição de raça se dá de acordo com as reações fenotípicas dos isolados quando inoculados em uma série de cultivares, denominada de série diferencial (Camargo, 1995). Num esforço de generalização, pode-se afirmar que formas referem-se a especializações patogênicas para espécies hospedeiras, enquanto raças são especializações relativas a variedades de plantas (Ponte, 1980).



Para fungos causadores de doenças em plantios comerciais, a patogenicidade é utilizada como marcador fenotípico nos estudos de variabilidade genética. Até o presente momento não existe uma série diferenciadora para a cultura do cacau que expresse claramente e diferentemente os sintomas da vassoura-de-bruxa, dificultando, assim, a utilização deste marcador fenotípico (Luz *et al.*, 1997). Por outro lado, há indícios de variação na população deste patógeno, em função da adaptação a outras espécies de plantas, como o biótipo S atacando espécies de solanáceas, biótipo B patogênico a hospedeiros da família Bixaceae, além dos biótipos C (cacau) e L (cipós) (Purdy e Schmidt, 1996).

O indicativo do potencial de variabilidade de *C. perniciosa* mostra a possibilidade de estudos de patogenicidade com isolados de diferentes regiões e hospedeiros, inoculados em diferentes espécies de plantas, identificarem o aparecimento de espécies diferenciadoras, ou até mesmo raças fisiológicas do fungo, contribuindo para a busca de genótipos mais tolerantes a serem usados em programas de melhoramento genético na Amazônia e na região cacaueira da Bahia.

O objetivo proposto neste estudo foi averiguar a patogenicidade de isolados de *C. perniciosa* coletados na Bahia e Minas Gerais, em diferentes espécies hospedeiras, verificando a possibilidade de existência de *formae speciales* do fungo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, no período de dezembro de 1999 a dezembro de 2000.

4.1 Material genético

As mudas de diferentes hospedeiros de *C. pernicioso* (Tabela 1) a serem usadas nos testes de patogenicidade foram preparadas no período de dezembro de 1999 a março de 2000. As sementes de cacau, cupuaçu e *T. bicolor* foram obtidas de frutos de polinização livre, pré-germinadas por 72 h em vermiculita umedecida e mantidas sob condição controlada de umidade e temperatura. Em seguida, plantadas em sacos plásticos de polietileno contendo 2 kg de terriço (terra+areia+estercos) na proporção de 3:1:1. Após o preparo, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação antes da inoculação.

TABELA 1 Genótipos de plantas utilizados nos testes de patogenicidade com diferentes isolados de *C. pernicioso*. UFPA, Lavras, MG, 2001.

Genótipo	Nome científico	Origem	Instituição doadora
Cacau comum	<i>T. cacao</i>	Camacan, BA	CEPLAC
Cacau Catongo	<i>T. cacao</i>	Ilhéus, BA	CEPLAC
Bicolor	<i>T. bicolor</i>	Belém, PA	CEPLAC
Cupuaçu	<i>T. grandiflorum</i>	Manaus, AM	EMBRAPA

4.2 Produção de inóculo

Os isolados de *C. pernicioso* proveniente da Bahia utilizados nos testes de patogenicidade foram gentilmente cedidos pela CEPLAC/CEPEC, Ilhéus. Utilizaram-se os isolados de cacau, provenientes do município de Santo Amaro, e de cupuaçu, oriundos da BA. Os isolados de cipó (*Heteropterys acutifolia*) e lobeira (*Solanum lycocarpum*) foram provenientes do município de Lavras, Minas Gerais.

Vassouras secas de plantas de lobeira e cipó foram colocadas sobre condições alternadas de umidade e seca (Rocha e Wheeler, 1985), em vassoureiros, para produção de basidiocarpos, que depois de coletados e desinfetados em solução de estreptomicina a 1% e lavagem em água estéril, foram utilizados para produção de basidiósporos, sendo em seguida quantificados e armazenados em “deep freezer” a -80°C, em solução estoque contendo glicerol a 16%, seguindo-se a metodologia de Frias (1987).

Os isolados de cacau e cupuaçu da Bahia foram repicados para o meio artificial à base de farelo de trigo e vermiculita, adaptado por Niella *et al.* (1999). Os basidiósporos produzidos foram armazenados conforme descrito anteriormente.

4.3 Inoculação

As mudas foram inoculadas com uma suspensão na concentração de 2×10^5 basidiósporos/mL. A suspensão foi quantificada com o uso de hemacitômetro, ajustando-se a concentração com água destilada esterilizada. Pulverizadores manuais foram utilizados para inoculação, aplicando-se aproximadamente 1 mL da suspensão de inóculo por planta. Testes de vazão foram realizados com os pulverizadores para determinação da quantidade de inóculo a ser aplicada por planta, sendo 1 mL da suspensão de inóculo correspondente a aproximadamente 2 ejetadas do pulverizador.

As inoculações foram realizadas em câmara climatizada com controle automático de temperatura e umidade, ajustadas para $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e umidade relativa próxima à saturação (100%). As mudas tiveram suas folhas cortadas em 2/3, um dia antes da inoculação. Após as inoculações, as mudas foram mantidas por um período de 24 horas com umidade relativa próxima ao ponto de saturação (100%), com o objetivo de facilitar a germinação e penetração dos basidiósporos.

Para evitar o efeito de deriva do inóculo, foram usadas cortinas de polietileno durante as pulverizações separando os tratamentos adjacentes. Após as inoculações, alíquotas das suspensões foram retiradas para realização de teste de germinação dos esporos em lâminas escavadas, adicionando-se $60\mu\text{L}$ de inóculo por cavidade. A leitura foi realizada 10 h após as inoculações.

4.4 Avaliação da patogenicidade de isolados de *Crinipellis* sp.

4.4.1 Incidência e severidade de doença

Noventa dias após a inoculação, as mudas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sintomas da vassoura-de-bruxa, estabelecendo-se a porcentagem de mudas infectadas em relação às mudas inoculadas. Algumas variáveis relacionadas à severidade da doença, em relação aos genótipos inoculados, foram mensuradas, a saber: diâmetro das vassouras (DV) e comprimento das vassouras (CV).

4.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial (isolados x material genético), com quatro blocos de 14 plantas cada. Nos tratamentos, foram testados os genótipos (cacau comum e Catongo, *T. bicolor* e cupuaçu) e os isolados (cacau, cupuaçu, lobeira e cipó).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa SISVAR (1999), versão 4.3, utilizando-se o teste Scott-Knott para as comparações múltiplas de médias. Em virtude dos dados não seguirem uma distribuição normal, optou-se por transformá-los através da equação: $Y = \sqrt{x + 0,5}$, onde x é a incidência de doença.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 encontram-se os dados da análise de variância da incidência de doença, tomados noventa dias após as inoculações. Os resultados mostraram que houve diferença significativa nas fontes de variação analisadas. Os dados não transformados da incidência de doença (Figura 1) mostraram que os isolados de cacau e cupuaçu foram capazes de causar doenças em todos os genótipos. O isolado de cipó infectou os genótipos de cacau Catongo e cupuaçu. O isolado de lobeira infectou somente o genótipo de cupuaçu. Entre os genótipos avaliados, cacau comum, Catongo e *T. bicolor* apresentaram-se mais susceptíveis aos isolados testados.

TABELA 2 Análise de variância dos dados de incidência da vassoura-de-bruxa em genótipos inoculados com diferentes isolados de *C. pernicioso*, avaliados 90 dias após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2001.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Material genético	3	31.758982	10.586327	53.715*
Isolado	3	304.512840	101.504280	515.033*
Mat. Gen. x Isolados	9	146.383424	16.264825	82.528*
Bloco	3	0.313746	0.104582	0.531
Resíduo	45	8.868736		
TOTAL	63	491.837728		

CV: 10,76%

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott. Dados transformados para $Y = \sqrt{(x+0,5)}$.

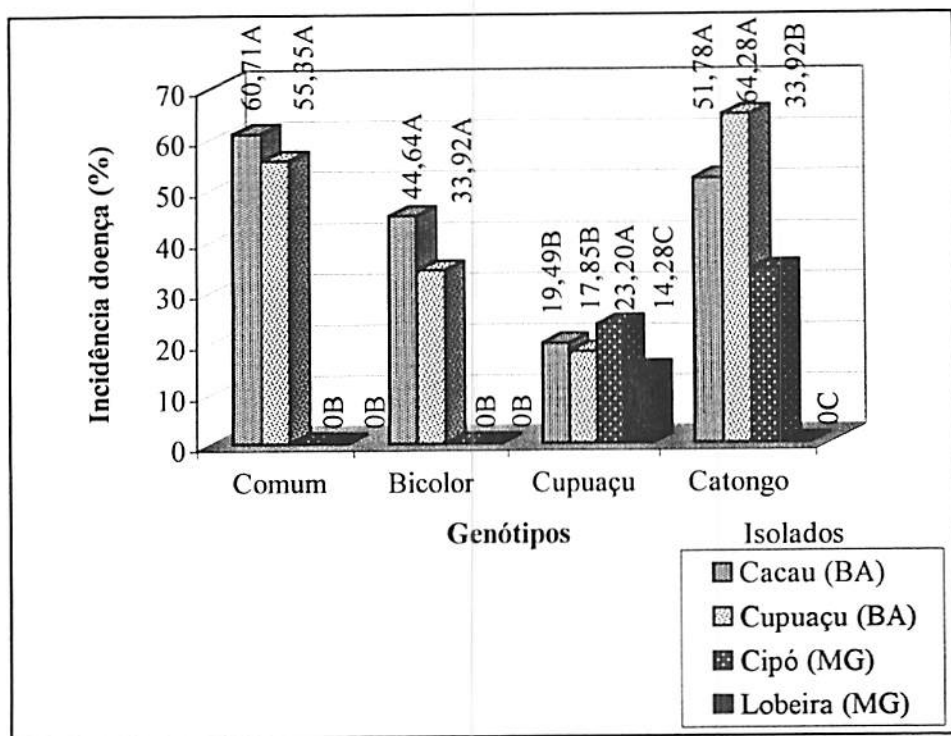


FIGURA 1 Incidência de vassoura-de-bruxa em diferentes genótipos, noventa dias após a inoculação com diferentes isolados de *C. pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001. Médias seguidas pela mesma letra em cada material genético não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O teste de média para a incidência da vassoura-de-bruxa (Tabela 3) mostrou que os isolados de cupuaçu e cacau não diferiram estatisticamente entre si na capacidade de causar infecção nos genótipos, sendo considerados os mais virulentos em geral. A infecção cruzada entre os isolados de cacau e de cupuaçu da Bahia é um fato interessante para disseminação de *C. pernicioso* ao longo do Estado baiano. É possível que plantas de cupuaçu da Bahia tenham sido infectadas por *C. pernicioso* vindo do cacau, sendo o primeiro relato da

doença vassoura-de-bruxa no cacau feito em plantações comerciais na Bahia, no ano de 1989 (Pereira *et al.*, 1989), anteriormente as observações feitas em plantas de cupuaçu infectadas pelo fungo na Bahia. A habilidade em promover infecção cruzada entre isolados de cacau e cupuaçu foi relatada pela literatura primeiramente por Gonçalves (1965); entretanto, Fonseca *et al.* (1984) mostraram também a capacidade desses isolados em promover infecção cruzada.

TABELA 3 Teste de média para incidência da vassoura-de-bruxa incitada por isolados de *C. pernicioso*.UFLA, Lavras, MG, 2001.

Isolados	MOID*	MTID**	Teste 1%***
Cacau	44.1925	6.5074	A
Cupuaçu	42.8518	6.3572	A
Cipó	14.2812	2.6524	B
Lobeira	3.5700	0.9286	C

* Médias Originais de Incidência de Doença

** Médias Transformadas de Incidência de Doença

*** Médias seguidas pela mesma letra não são significativas pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade.

O isolado de lobeira apresentou a menor resposta em patogenicidade, sendo patogênico apenas a cupuaçu. A dificuldade em provocar sintomas destes isolados de solanáceas em diferentes espécies que são infectadas por *C. pernicioso* foi observada desde a primeira constatação, no Brasil, de solanáceas infectadas pelo fungo (Bastos e Evans, 1985). O primeiro relato de infecção de mudas de cacau por um isolado de solanácea foi feito por Silva *et al.* na Bahia, em 1992, utilizando um isolado de *S. paniculatum* (jurubeba). Viana Júnior *et al.* (2000) observaram que mudas de cupuaçu, quando submetidas à alta pressão de inóculo e inoculação contínua, foram capazes de expressar sintomas provocados

pelo isolado de lobeira de Minas Gerais, o que foi confirmado na presente dissertação.

No presente trabalho, o isolado de *C. pernicioso* procedente de cipó foi patogênico ao cacau Catongo e cupuaçu. O isolado deste mesmo cipó, da família Malphigiaceae, foi relatado por Resende *et al.* (2000) causando sintomas de vassoura-de-bruxa em mudas de Catongo, realizando inoculações artificiais em casa-de-vegetação.

Para a incidência da vassoura-de-bruxa nos diferentes genótipos testados (Tabela 4), não houve diferença estatística quando as médias originais ou transformadas dos genótipos de cupuaçu e bicolor foram comparadas entre si, ao nível de 1% de probabilidade. Cacau Catongo apresentou a maior resposta à incidência da doença, sendo bastante suscetível aos isolados testados. Mudas da cv. Catongo são usadas como padrão de suscetibilidade em testes de patogenicidade para avaliação de progênies de cacau quanto à resistência à *C. pernicioso* (Silva *et al.*, 1998), sendo um indicativo usado para demonstrar o potencial desses isolados em avaliações de resistência.

TABELA 4 Teste de médias para incidência da vassoura-de-bruxa em diferentes genótipos inoculados com diferentes isolados de *C. pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

Genótipos	MOID*	MTID**	Teste 1%***
Catongo	37.4962	5.2517	A
Comum	29.0162	4.2686	B
Bicolor	19.6406	3.8044	C
Cupuaçu	18.7425	3.1209	C

* Médias Originais de Incidência de Doença

** Médias Transformadas de Incidência de Doença

*** Médias seguidas pela mesma letra não são significativas pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Os valores observados neste trabalho para incidência de doença em cacau comum e Catongo, provocados pelos isolados de cupuaçu e cacau da Bahia, em torno de 60%, são similares aos obtidos por Rocha e Wheeler (1985) em testes de patogenicidade para avaliação de progênies quanto à resistência a *C. pernicioso*.

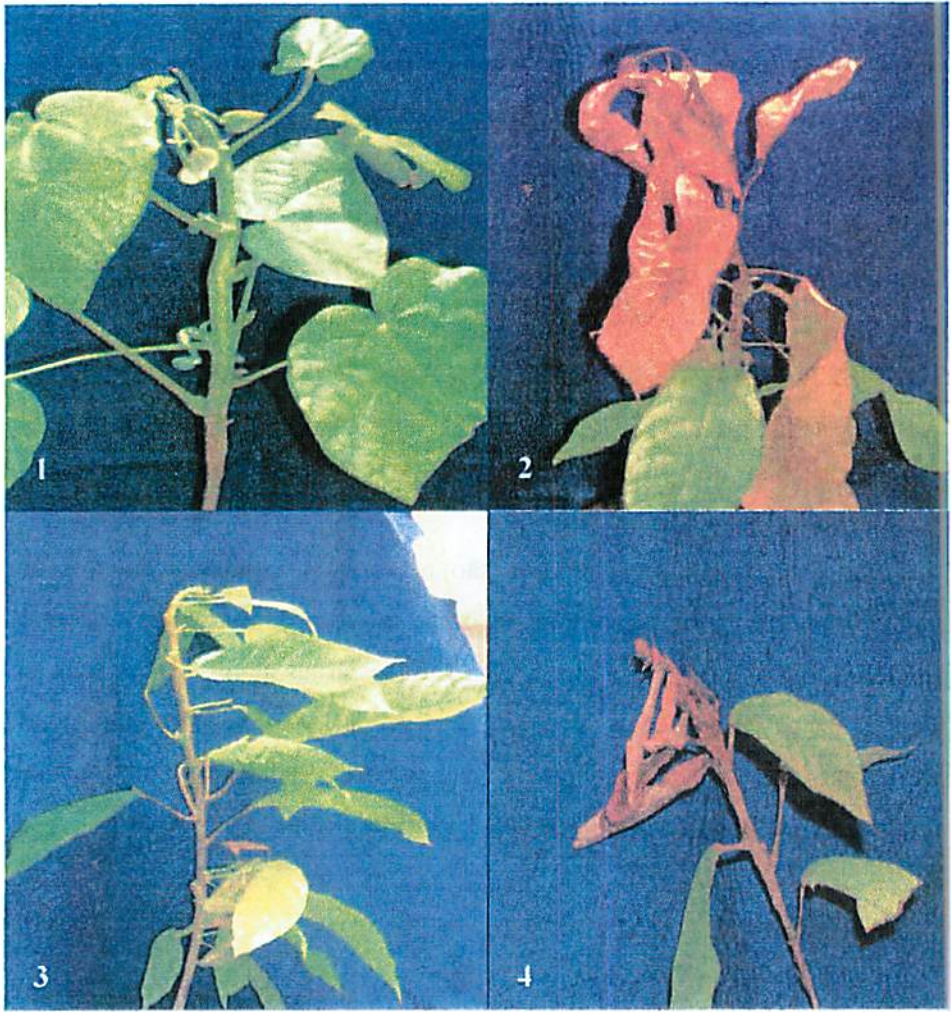
É importante ressaltar que as espécies cupuaçu e Catongo demonstraram ser suscetíveis ao isolado de cipó, embora apresentassem sintomas menos severos para diâmetro e comprimento das vassouras quando comparados aos sintomas provocados pelos isolados de cupuaçu e cacau comum nas mesmas espécies (Tabela 5 - apêndice). Entretanto, os dados foram baseados em médias e, devido a poucas repetições, a avaliação das mudas infectadas não permitiu a análise estatística.

Essa observação corresponde à sintomatologia ocasionada pelos isolados de cipó do Equador, que foram inoculadas em mudas de cacau com diferentes graus de resistência para avaliação de progênies quanto à infecção por *C. pernicioso* (Evans, 1978). A Figura 2 mostra os sintomas de vassoura-de-bruxa nos genótipos avaliados no teste de patogenicidade noventa dias após a inoculação.

No patossistema *T. cacao* x *C. pernicioso*, o hospedeiro é uma planta perene e o patógeno é de multiplicação sexuada, o que favorece o aparecimento de novo biótipos do patógeno. Na verdade, a classificação baseada exclusivamente em detalhes de ordem morfológica não atenderia à conveniência de separar as diversas aptidões patogênicas dos biótipos do fungo. Efetivamente, uma espécie como *C. pernicioso* reúne indivíduos morfológicamente semelhantes, mas, muitas vezes, bastante heterogêneos no tocante às suas qualidades fisiológicas. Por sinal, esta heterogeneidade fisiológica condiciona diferentes comportamentos patogênicos.

Na avaliação de patogenicidade, não ficou caracterizada a existência de *formae speciales* do fungo *C. pernicioso*, uma vez que, isolados de cacau e cupuaçu foram patogênicos às diferentes espécies avaliadas. Até o presente momento, não existe uma série diferenciadora de raça para *Crinipellis pernicioso* em cacau que expresse claramente e diferentemente os sintomas da vassoura-de-bruxa, dificultando, assim, a utilização deste marcador fenotípico. É necessário que novos genótipos sejam testados com isolados de diferentes regiões geográficas e hospedeiros do fungo. Conhecendo a constituição genética das espécies utilizadas e identificando dissociações de patogenicidade do fungo, será possível efetivar reações características deste marcador fenotípico, o qual ajudará no sucesso dos programas de melhoramento genético do cacauzeiro e cupuaçuzeiro.

Os resultados mostraram que são necessários estudos adicionais de patogenicidade com uma maior quantidade de isolados de diferentes regiões e hospedeiros, em diferentes genótipos, com variados graus de resistência, para se avaliar o grau de virulência de cada isolado, visando a identificação de espécies/cultivares diferenciadoras e a possível existência de *formae speciales*/raças fisiológicas do fungo *Crinipellis pernicioso*.



1. Bicolor (*Theobroma bicolor*); 2. Catongo (*T. cacao*); 3. Comum (*T. cacao*); 4. Cupuaçu (*T. grandiflorum*).

FIGURA 2 Sintomas de vassoura-de-bruxa em diferentes genótipos, noventa dias após a inoculação com diferentes isolados de *Crinipellis pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

6 CONCLUSÕES

- 1) Os isolados de cacau e cupuaçu da Bahia foram patogênicos a todas as espécies e não diferiram entre si em relação à incidência de doença nos materiais genéticos testados.
- 2) O isolado de cipó foi patogênico aos genótipos de cupuaçu e Catongo, entretanto, o isolado de lobeira foi patogênico apenas ao genótipo de cupuaçu.
- 3) Entre as espécies de genótipos avaliados, não foi observada a presença de *formae speciales* de *C. perniciosa*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, Academic Press, New York, 635 p., 1997.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches' broom disease) on Solanaceous host. **Plant Pathology**, 34, Oxford, n.2, p.306-312, June. 1985.
- CAMARGO, L. E. A. **Análise genética da resistência e da patogenicidade**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed., São Paulo, Agronômica Ceres, v.1, p.470-492, 1995.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. **Controle genético**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed., São Paulo, Agronômica Ceres, v.1, p.729-760, 1995.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador: 1. The fungus. **Annals of Applied Biology** 89, London, n.2, p.185-192, July, 1978.
- FONSECA, S. A., ALMEIDA, L. C.; ANDEBRHAN, T. Reação de *Theobroma sp.* a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. **Proceedings of the 9th International Cocoa Research Conference**, Lome, Togo, 223-6, 1984.
- FRIAS, G. A. **An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cocoa**. Gainesville: University of Florida, 1987. 111 p. (PhD Thesis).
- GONÇALVES, J. R. C. *Theobroma grandiflorum* (Spreng) Schum. as source of inoculum of witches' broom disease of *Theobroma cacao* L. **Tropical agriculture** 42, Trinidad, n.3, p.261-3, July, 1965.
- LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. Doenças do cacauzeiro. In: VALE, F.X.R e ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de Doenças de Plantas**. v.2, Viçosa: UFV, p. 611-656, 1997.
- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A.; SILVA, L. H. C. P.; CARVALHO, J. A. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n. 4, p. 523-527, Dez., 1999.

- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Revista Agrotrópica*, Ilhéus, n.1, v.1, p.79-81, Jan/Abr., 1989.
- PONTE, J. J. *Fitopatologia: princípios e aplicações*. 2 ed., São Paulo: Nobel, 250p., 1980.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cocoa witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.
- RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R., GILVANE, A. C.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia* A. Juss., é patogênico ao cacauero. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, Brasília, n.1, p. 88-91, Mar., 2000.
- ROBINSON, R.A. *Plant Pathosystems*. Springer-Verlag. New York, 1976, 184 p.
- SISVAR. Programa para análise estatística. FURTADO, D. F. (ed.), versão 4.3, UFLA, Lavras, 1999.
- ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathology* 34, 319-28, 1985.
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. *Solanum paniculatum*, hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. *Agrotrópica*, Ilhéus, n.1, v.4, p.17-20. Jan/Abr., 1992.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. Seleção de variáveis na avaliação de progênies de cacauero (*Theobroma cacao*) quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso*. *Agrotrópica*, Ilhéus, v.10, n.2, p.87-94, Maio/Ago., 1998.
- VIANA JÚNIOR, C. A.; RESENDE, M. L.V.; LANDA NETO, L.; PEREZ, J. O. Patogenicidade de *Crinipellis* sp. proveniente de *Solanum lycocarpum* (lobeira) em *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p. 453, Ago., 2000. (Resumos).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura sobre variabilidade de *C. pernicioso* é relativamente nova. Muito se avançou sobre o conhecimento da compatibilidade sexual e estudos de patogenicidade do fungo, entretanto, estudos mais apurados para alguns biótipos de *C. pernicioso* ainda não foram realizados. Um grande número de trabalhos experimentais sob condições laboratoriais, relativos aos grupos de compatibilidade somática, surgiu a partir da necessidade de desvendar a variabilidade de *C. pernicioso* em diferentes regiões do Brasil. A compatibilidade somática é vislumbrada como uma importante ferramenta em estudos de diversidade genética entre populações do patógeno, e pode auxiliar os estudos de patogenicidade que utilizem os mesmos isolados, caracterizando relacionamento genético destes em testes de inoculações cruzadas, ratificando a correlação entre SCG e distribuição geográfica de isolados do fungo.

A utilização de patogenicidade como marcador na descrição da diversidade existente em biótipos do fungo é importante no sentido de se identificarem dissociações, o que permitirá a seleção de espécies diferenciadoras, caracterizando formas patogênicas e possibilitando uma melhor compreensão da durabilidade dos materiais que são utilizados em programas de melhoramento genético do cacaueteiro. A identificação de marcadores fenotípicos através de dissociações de patogenicidade que estejam ligados aos genes de resistência do hospedeiro é relevante para dar suporte à identificação de possíveis variantes do fungo, com a presença de *formae speciales*, ou até mesmo da raça fisiológica de *Crinipellis pernicioso*.

É importante buscar metodologias de inoculações que permitam estabelecer parâmetros mais confiáveis para determinação quantitativa da patogenicidade em relação às diferentes espécies hospedeiras. O conhecimento

da herança genética dos hospedeiros utilizados nas avaliações de resistência possibilitará a identificação de marcadores fenotípicos caracterizando a existência de raças patogênicas, a qual poderá ser decisiva para os programas que buscam fontes de resistência mais duradoura e efetiva contra *C. pernicioso*.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e a facilidade para caracterização de resultados mais confiáveis, estudos futuros com marcadores RAPD, análises de isoenzimas e do polimorfismo do mtDNA e a identificação e clonagem de genes de patogenicidade poderão trazer novas contribuições para estudos sobre os mecanismos que regulam a interação ataque/defesa no patossistema *Crinipellis pernicioso* x cacaueteiro, assim como esclarecer sobre variabilidade do patógeno de diferentes regiões geográficas e hospedeiros.

Portanto, o intercâmbio institucional de pesquisadores poderá nortear estratégias conjuntas para ações efetivas em programas de melhoramento genético e em estudos de variabilidade para controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro e cupuaçueteiro.

TABELA 5

Reação de genótipos de cupuaçu e Catongo em relação ao diâmetro e comprimento das vassouras provocados por diferentes isolados de *C. pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001.....60

MEIOS DE CULTURA

Meio V8 para pareamento entre isolados de *C. pernicioso* no teste de compatibilidade somática.....60

Meio BDA (Batata-dextrose-agar).....60

TABELA 5 Reação de genótipos de cupuaçu e Catongo em relação ao diâmetro e comprimento das vassouras provocados por diferentes isolados de *C. pernicioso*. UFLA, Lavras, MG, 2001.

GENÓTIPOS/Isolados	Diâmetro Vassoura	Comprimento Vassoura
CUPUAÇU		
Cacau (BA)	4,10mm	11,1cm
Cupuaçu (BA)	3,94mm	10,7cm
Cipó (MG)	3,35mm	8,20cm
CATONGO		
Cacau (BA)	5,85mm	14,9cm
Cupuaçu (BA)	4,74mm	13,7cm
Cipó (MG)	3,25mm	6,70cm

MEIOS DE CULTURA

Os meios utilizados neste trabalho foram esterilizados a 121°C por 20 minutos. As quantidades utilizadas são para o preparo de 1 litro de meio de cultura.

Meio V8 para pareamento entre isolados de *C. pernicioso* no teste de compatibilidade somática. (Hine e Aragabi, 1963; Andebrhan e Furtek, 1994)

	gL⁻¹
V8	200
CaCO ₃	3
Agar	5
Água destilada	800 mL

Meio BDA (Batata-dextrose-agar)

	gL⁻¹
Batata	200
Agar	20
Dextrose	20