

**FRUTIFICAÇÃO IN VITRO,
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
PATOGENICA DE *Crinipellis pernicioso*
(STAHEL) SINGER EM *Theobroma cacao* L.**

GIVALDO ROCHA NIELLA

2000

GIVALDO ROCHA NIELLA

**FRUTIFICAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E PATOGENICA DE *Crinipellis*
perniciosa (STAHEL) SINGER EM *Theobroma cacao* L.**



Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2000

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

Niella, Givaldo Rocha

Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogênica de
Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L. /
Givaldo Rocha Niella. – Lavras : UFLA, 2000.

75 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1.*Crinipellis pernicioso*. 2.*Theobroma cacao* L. 3.Vassoura-de-bruxa.
4.Patogenicidade. 5.Produção artificial. 6.Resistência. 7.Suscetibilidade.
8.RAPD. I Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 633.74942

GIVALDO ROCHA NIELLA

**FRUTIFICAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
PATOGENICA DE *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER EM
Theobroma cacao L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para
a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 15 de dezembro de 2000

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende (CO-ORIENTADOR)	UFLA
Prof. Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Pesq. Dr ^a Stela Dalva V. M. Silva	CEPLAC/CEPEC/SEFIT
Pesq. Dr ^a Edna Dora M. N. Luz	CEPLAC/CEPEC/SEFIT


Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha esposa Eliana Raquel,

**que esteve ao meu lado em cada momento dessa difícil caminhada;
aos nossos filhos Yuri e Raquel, fruto do nosso amor.**

Aos meus pais Antônio Miguel e Maria Selma Niella

pelos ensinamentos de perseverança, garra e honestidade.

A minha irmã Ana Rosa pelo apoio, incentivo e carinho.

**Aos meus sogros Evilásio e Railda Vieira pela
acolhida como filho.**

OFEREÇO

A Deus que dotou o ser humano de inteligência.

DEDICO.

BIOGRAFIA

GIVALDO ROCHA NIELLA, filho de Antônio Miguel Niella e Ana Selma Rocha Niella, nasceu em Itapé, Estado da Bahia, a 17 de dezembro de 1962. Concluiu o primeiro grau em Itabuna – BA, no Instituto Municipal de Educação de Itabuna – IMEI, em 1978. Concluiu o segundo grau em Salvador – BA, no colégio NOBEL, em 1981. Em 1982, iniciou o curso de Agronomia na Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (EAUFBA), em Cruz das Almas – BA, concluindo-o em dezembro de 1985. Ingressou como extensionista, na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira CEPLAC, no dia 20 de maio de 1986, trabalhando como extensionista dessa data até setembro de 1992. Chefiou o escritório local da CEPLAC, em Medeiros Neto de 1986 a 1988. Foi chefe do escritório especial de extensão da CEPLAC, em Linhares, Espírito Santo de 1988 a 1989. Chefiou o escritório local da CEPLAC, em Camacan – BA, no período de 1989 a 1992. Ingressou no Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC, em setembro de 1992, trabalhando até dezembro de 1994, como pesquisador no setor de Fitopatologia. Em março de 1995, iniciou Curso de Pós-Graduação, Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras – MG, concluindo-o em fevereiro de 1997. Em março de 1997, iniciou Curso de Pós-Graduação, Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, concluindo em dezembro de 2000. Na dissertação de Mestrado e na tese de Doutorado, foram realizados estudos sobre a doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, no sudeste do Estado da Bahia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, responsável pelos meus Cursos de Pós-Graduação de Mestrado e Doutorado.

À CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), através do Centro de Pesquisas do Cacau, pela oportunidade concedida para realizar esses cursos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão das bolsas de estudos.

Ao Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelo apoio recebido proporcionando condições ao desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Professor Dr José da Cruz Machado, chefe do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS), pelo apoio e concessão de espaço na câmara climatizada, para realização dos trabalhos do primeiro capítulo desta Tese.

Ao Prof. Dr João Bosco dos Santos, do Departamento de Biologia da UFLA, pelos ensinamentos de genética molecular, pelo apoio, incentivo e orientações prestadas em seu laboratório de biologia molecular.

A Profª Drª Antônia dos Reis Figueira, do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em disponibilizar seu laboratório, os reagentes e sua atenção; sem tal apoio, não seriam possíveis os trabalhos iniciais do segundo capítulo dessa Tese sobre caracterização molecular de *Crinipellis pernicioso*.

Aos colegas da CEPLAC de Belém – PA e de Ouro Preto D'Oeste – RO, Paulo Sérgio Bevilacqua de Albuquerque e Fernando Luiz de Oliveira Corrêa, respectivamente. Sem eles, a quem agradeço pelo envio dos isolados dessas e de outras regiões do Brasil, os trabalhos de patogenicidade seriam muito mais difíceis.

Ao Prof. Dr Mário Lúcio Vilela de Resende, meu co-orientador, pelos ensinamentos e valiosas sugestões no decorrer desse trabalho. Ao orientador, amigo e “pai”, Prof. Dr Hilário Antônio de Castro, pelo carinho, ensinamentos de honestidade, hombridade, lealdade, respeito e sinceridade, que me transmitiu durante esses seis anos de convívio.

A Profª Drª Maria das Graças Cardoso, pelo carinho, amizade, “força” e estímulo transmitidos durante todos esses anos de convívio na UFLA. Até breve minha amiga.

Aos colegas da CEPLAC/CEPEC/Fitopatologia, Drª Edna Dora Martins Newman Luz, Drª Stela Dalva Vieira Midlej Silva, Dr José Luiz Bezerra, Luiz Carlos Cordeiro de Almeida, Marival Lopes de Oliveira, Ana Rosa Rocha Niella Cerqueira, Virgínia Oliveira Damasceno, Denise Maria Argolo Ferreira, Cenilda da Silva Serra Rocha, Márcia Araújo Paim, Ademildes Cerqueira, Maria de

Lurdes Alves (Lurdinha), e tantos outros que nos apoiaram e ajudaram nesse trabalho.

Aos companheiros e colegas de caminhada, Hudson Teixeira, Andrei Muratore Gurvitz, Flávio Henrique Reis Moraes, Ottoniel Freitas Silva, Maria Floriana Esteves de Abreu, Viviane Talamini, Flávio Henrique Linhares Magalhães, Leonardo Sousa Cavalcanti, Jane Oliveira Perez, Augusto Carlos dos Santos Pinto, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira Pasin, Nilza de Lima Pereira Sales, Sônia Maria de Lima Salgado, Alessandra Keiko Nakasone Ishida, Leimi Kobayasti, Gutemberg Barone de Araújo Nojosa, Gilvane Aparecida de Carvalho, Luís Henrique Carregal Pereira da Silva, Juliana Moraes Boldini, Alesandra Boari, Eloísa Aparecida das Graças Leite, Ângela de Fátima Carvalho Santos, Terezinha de Jesus A. Ferreira Maia, Zélia Maria Silva Leite, Ana Maria Santos Castro, Alessandra de Jesus Boari, Carlos Roberto Torres (Carzinho), Cleber Maximiniano e tantos outros com quem convivemos, pelos momentos alegres e pela “força” nos momentos difíceis.

Às secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Leisa Mara Silva e Maria de Lurdes Oliveira Silva, pela atenção e apoio durante a realização desse curso.

Às estudantes de iniciação científica, Aparecida Gomes de Araújo e Gabriela Carolina Guimarães Andrade, pelo apoio e ajuda nos trabalhos dessa Tese. Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, Antônio Máximo de Carvalho, José Maria dos Santos, Maria de Lurdes Carvalho, Cássio Harley Resende de Sousa, e a todos os demais, pelo apoio na parte bibliográfica desse trabalho.

Aos demais colegas de curso, funcionários e professores da UFLA com os quais trabalhei, que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, cujo nomes não foram citados.

“Seus filhos não são vossos filhos, vieram através de vós, mas não vos pertencem, são como flechas lançadas ao vento, são filhos e filhas do mundo”.

Jibran Kalil Jibran

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Frutificação in vitro de basidiocarpos e basidiósporos.....	3
2.2 Caracterização molecular de <i>Crinipellis pernicioso</i>	6
2.3 Caracterização patogênica de <i>Crinipellis pernicioso</i>	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO 1: APERFEIÇOAMENTO DA METODOLOGIA DE PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE BASIDIOCARPOS DE <i>Crinipellis pernicioso</i>.....	17
1 Resumo.....	18
2 Abstract.....	19
3 Introdução.....	20
4 Material e Métodos.....	23
4.1 Material genético.....	23
4.2 Metodologia.....	23
4.3 Delineamento experimental.....	25
5 Resultados e Discussão.....	26
6 Conclusões.....	30
7 Referências Bibliográficas.....	31

CAPÍTULO 2: DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE <i>Crinipellis Perniciosa</i> BASEADO EM MARCADORES RAPD.....	34
1 Resumo.....	35
2 Abstract.....	36
3 Introdução.....	37
4 Material e Métodos.....	39
4.1 Obtenção de isolados.....	39
4.2 Meio de cultura líquido.....	41
4.3 Extração de DNA.....	41
4.4 Amplificação de DNA.....	42
4.5 Determinação das distâncias genéticas.....	43
5 Resultados e Discussão.....	45
6 Conclusões.....	49
7 Referências Bibliográficas.....	50
CAPÍTULO 3: PATOGENICIDADE DE <i>Crinipellis perniciosa</i> EM <i>Theobroma cacao</i> L.....	53
1 Resumo.....	54
2 Abstract.....	55
3 Introdução.....	56
4 Material e Métodos.....	60
4.1 Material genético.....	60
4.2 Produção de inóculo.....	61
4.3 Delineamento experimental.....	62
4.4 Inoculação.....	62
4.5 Avaliação.....	62
5 Resultados e Discussão.....	63
6 Conclusões.....	67
7 Referências Bibliográficas.....	68
Considerações finais.....	71
Anexos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BDA	Batata Dextrose Ágar
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
BSA	Albumina Soro Bovina
CaCO_4	Carbonato de cálcio
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cálcio bihidratado
CTAB	Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre penta hidratado
DBC	Delineamento em Blocos casualizados
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs	d-Nucleotídeos
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
KCl	Cloreto de potássio
mL	Mililitro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio hepta hidratado
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
ng	Nanograma
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Ácido nitro fosfórico
OPA13	“Primer” da Operon, A nº 13
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
P/V	Peso/volume
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
RNA	Ácido Ribonucleico

RNase	Enzima que degrada RNA (Ribonuclease)
RPM	Rotação Por Minuto
Taq	<i>Termus Aquaticus</i>
TBE	Tris EDTA Borato
TE	Tris EDTA
TRIS	Trizma base
ZnSO₄.7H₂O	Sulfato de zinco hepta hidratado
cm	Centímetro
Cv	Cultivar
h	Horas
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
μL	Micro litro
μg	Micro grama
β	Beta
°C	Graus Centígrado Celsius

RESUMO

NIELLA, GIVALDO ROCHA. **Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L.** LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doutorado - Tese em Agronomia / Fitopatologia)*

Estudos de frutificação in vitro de basidiocarpos, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau, foram realizados em Lavras – Minas Gerais e Ilhéus - Bahia, Brasil. A dificuldade de produção contínua in vitro de basidiósporos de *C. perniciosa* é uma etapa limitante aos trabalhos de pesquisa dessa devastadora doença. O objetivo do capítulo 1 foi frutificar in vitro basidiocarpos e obter basidiósporos de *C. perniciosa*, promovendo alterações na metodologia já descrita (Griffith e Hedger, 1993). O início da frutificação de basidiocarpos ocorreu 66 dias após inoculação, em meio farelo vermiculita, sugerindo uma melhoria na metodologia, baseado no corte temporário do suprimento de água à teia micelial coberta com turfa e suspensa. No capítulo 2, foi estudada a diversidade genética, utilizando marcadores RAPD de dez isolados monospóricos de *C. perniciosa*, provenientes de seis Estados brasileiros (BA, MG, AM, MT, PA, e RO) e de três hospedeiros (*T. cacao*, *Heteropterys acutifolia* e *Solanum lycocarpum*). O DNA genômico foi extraído de cada isolado e amplificado com nove “primers” decâmeros, gerando 101 marcadores RAPD. As distâncias genéticas entre os isolados variaram de 0,149 a 0,589. O valor mínimo de distância diferente de zero foi de 17,4% e mostrou a formação

de um grupo principal, com três isolados da Bahia e um do Pará. Os outros isolados foram distintos destes e os isolados do Mato Grosso (cacau) e Minas Gerais (*H. acutifolia* e *S. lycocarpum*) foram os mais divergentes. Os resultados evidenciaram variabilidade genética do patógeno nos seis Estados brasileiros, dentro da região cacauceira da Bahia e nos três hospedeiros. Tal variabilidade deve ser considerada nos estudos de patogenicidade e no melhoramento do cacauceiro, visando resistência a esse patógeno. No capítulo 3, a possibilidade da existência de raças fisiológicas de *C. pernicioso* foi investigada através de testes de patogenicidade, com isolados provenientes de três Estados da Amazônia (AM, PA e RO). Quatro clones, SCA 6, RB 29, IMC 67 (resistente) e SIAL 69 (suscetível), com reações diferenciais conhecidas a *C. pernicioso*, foram inoculados. Sessenta dias após a inoculação foi avaliada a incidência da doença. O isolado de Rondônia foi o único a causar infecção em SCA 6. Este resultado mostra que há variabilidade patogênica em *C. pernicioso* proveniente de cacau e a existência de uma possível raça fisiológica apta a infectar SCA 6.

*Comitê Orientador: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

ABSTRACT

NIELLA, GIVALDO ROCHA. **In vitro fructification, molecular and pathogenic characterization of *Crinipellis pernicioso* (Stabel) Singer, in *Theobroma cacao* L.** LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doctorate – Thesis in Agronomy / Phytopathology)*

Studies of in vitro basidiocarps production, pathogenic and molecular variability of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom of cacao tree, were carried out in Lavras, Minas Gerais and Ilhéus, Bahia, Brazil. The difficulty of continuous in vitro production of basidiospores of *C. pernicioso* is a limitant step concerning research on this devastating disease. The objective of chapter 1 was to produce basidiocarps and basidiospores of *C. pernicioso* in vitro, promoting alterations in the methodology already described (Griffith and Hedger, 1993). The beginning of the basidiocarps production, 66 days after inoculation in brain-vermiculite media was achieved, suggesting a methodological improvement based on a temporary cut in water supply to the hanging mycelial covered with peat. In chapter 2, it was studied the genetic diversity utilizing RAPD markers of ten monosporics isolates of *C. pernicioso* coming from six brazilian States (BA, MG, AM, MT, PA and RO) and from three hosts (*T. cacao*, *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*). Genomic DNA was extracted from each isolate and amplified with nine decamer primers generating 101 RAPD markers. The genetic distances among isolates ranged from 0.149 to 0.589. A dendrogram, with the minimum genetic distance of 17,4 % showed the formation of one principal group with three isolates from

Bahia and one from Para. Other isolates were distinct from those and isolates from Mato Grosso (cacao) and Minas Gerais (*H. acutifolia* and *S. lycocarpum*) were even more distinct. The results showed genetic variability in the pathogen population sampled from six Brazilian States, including inside cacao region of Bahia and from three hosts. This variability should be taken in account for further studies of pathogenicity and cacao breeding for witches' broom resistance. In chapter 3, the possible existence of physiological races of *C. pernicioso* was investigated through pathogenicity tests with isolates from different Amazonian states (AM, PA and RO). Four clones, SCA 6, RB 29, IMC 67 (resistant) and SIAL 69 (susceptible) with known differential reaction to *C. pernicioso* were inoculated. Sixty days after inoculation, disease incidence was assessed. The isolate from Rondonia was the only one causing infection on SCA 6. This result demonstrated the existence of pathogenic variability in *C. pernicioso* from cacao, allowing the detection of a possible physiological race of the pathogen able to infect SCA 6.

*Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA, e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, é uma das doenças de maior impacto econômico, em países produtores de cacau da América do Sul e das Ilhas do Caribe (Silva, 1997). É, atualmente, a doença mais importante do cacau na Bahia, na Amazônia brasileira e nos outros países do novo mundo onde ela ocorre: Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela, Guiana Francesa, Granada, Trinidad e Tobago (Luz et al., 1997).

Apenas oito anos após a constatação da vassoura-de-bruxa do cacau no sudeste da Bahia por Pereira et al. (1989), onde a doença encontrou condições agroecológicas altamente propícias à sua disseminação, os efeitos sentidos sobre a produção são devastadores, com queda de 75% da produção, gerando desemprego, êxodo rural e derrubada dos remanescentes da Mata Atlântica (Trevizan e Silva, 1995; Luz et al., 1997).

A área cultivada com o cacau no sudeste da Bahia supera os 600.000 hectares, distribuídos em 89 municípios, onde se encontra uma população de, aproximadamente, 2.000.000 de habitantes, que estão envolvidas, direta ou indiretamente, com o cultivo e comercialização do cacau (Rocha, 1995).

A disseminação geográfica da vassoura-de-bruxa é de especial interesse epidemiológico. A doença permanece restrita ao hemisfério sul, ao continente Americano, um século depois de seu primeiro relato em 1895, no Suriname (Holliday, 1952). Em maio de 1989, a doença foi detectada no sul da Bahia, alastrando-se por todo o Estado, ocorrendo, hoje, em todas as regiões produtoras de cacau (Sgrillo e Araújo, 1994). Sua disseminação não foi controlada em mais

de 600.000 ha de cacau, devastando uma indústria, que havia gerado cerca de um bilhão de dólares anualmente (Pereira, 1996).

A produção de cacau, no Estado da Bahia, correspondia, até 1989, cerca de 84,5% da produção nacional e 15% da mundial, porém, com a ocorrência da doença na região cacaueira baiana, a partir de maio de 1989 (Pereira et al., 1989), a produção de cacau vem caindo, a ponto de ameaçar a própria competitividade da cacaucultura nacional (Silva, 1997).

Diante da necessidade de contribuir para o estabelecimento de uma estratégia de manejo integrado dessa doença, com conhecimentos mais aprofundados do patógeno e da interação patógeno x hospedeiro, o presente estudo objetivou:

- a) aperfeiçoar a metodologia existente para produção artificial (in vitro) de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*;
- b) estudar a variabilidade genética do patógeno, avaliando a distância genética de 10 isolados monospóricos, de diferentes Estados brasileiros e de diferentes hospedeiros;
- c) verificar a existência de raças fisiológicas, realizando estudos de patogenicidade, inoculando mudas de cinco clones, utilizados no programa de melhoramento genético do cacaueiro, pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Frutificação in vitro de basidiocarpos e basidiósporos

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

fusão nuclear e meiose da fase diplóide, que constitui o seu curto período de maturação. Normalmente, quatro basidiósporos surgem em esterigmas expostas na parte de fora da superfície da basídia. Os basidiósporos são liberados através de um mecanismo explosivo. A morfogênese sexual pode ser considerada em três estágios, plasmogamia e formação do dicariótico, a iniciação do primórdio de basidiocarpo e o desenvolvimento e maturação do basidiocarpo (Smith e Berry, 1976).

No ciclo de vida típico da maioria dos basidiomicetos superiores, dois estados vegetativos diferentes podem ser distinguidos: o monocário (ou homocário) e o dicário. O monocário é o micélio primário, que se desenvolve da germinação de um esporo sexual simples. O dicário é o micélio secundário, que predomina na natureza, sendo altamente diferenciado em corpos de frutificação.

O agente causal da vassoura-de-bruxa, *C. pernicioso*, é um patógeno hemibiotrófico com dois tipos de micélio. Em tecidos verdes, o micélio é mais espesso (5-8 μm), biotrófico ou parasítico, sem grampo de conexão e cresce intercelularmente, enquanto que, em vassouras secas, o micélio é saprofítico ou necrotrófico, cresce inter e intracelularmente, sendo menos espesso (1,5-5 μm), apresentando grampo de conexão (Delgado e Cook, 1976; Evans, 1980; Griffith e Hedger, 1994). A formação do grampo de conexão, em hifas de culturas monospóricas (Baker e Crowdy, 1943), a dicarionização de hifas monocarióticas, derivadas de um único basidiósporo uninucleado (Delgado e Cook, 1976), e a produção de basidiocarpos, a partir de culturas monospóricas (Purdy, Trese e Arangudi, 1983), indicam que *C. pernicioso* é primariamente homotático (Griffith e Hedger, 1994; Andebrhan et al., 1999).

Os basidiósporos, liberados dos basidiocarpos de *C. pernicioso*, infectam os tecidos meristemáticos do cacaueiro e induzem sintomas em gemas

vegetativas, almofadas florais, flores e frutos (Baker e Holliday, 1957; Thorold, 1975; Evans, 1981). Para se estabelecer hospedeiros diferenciais e raças do fungo são necessários suprimentos regulares e suficientes de basidiocarpos e basidiósporos de cada isolado, uma vez que essa é a única forma infectiva do patógeno (Evans e Bastos, 1980; Griffith e Hedger, 1993).

Basidiocarpos e basidiósporos de *C. pernicioso* são produzidos no campo, sobre vassouras necrosadas, quando essas são submetidas a períodos alternados de umidade (8 h por dia) e seca (16 h por dia), sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h (Rocha e Wheeler, 1982). Pedacos de vassouras secas podem produzir basidiocarpos em condições de laboratório, após 8 a 12 semanas, podendo os basidiósporos serem utilizados, para inocular plantas hospedeiras (Purdy e Dickstein, 1990).

A produção artificial de *C. pernicioso*, na ausência do hospedeiro foi conseguida por Griffith e Hedger (1993), utilizando-se um meio à base de farelo de trigo, vermiculita, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio. Dezoito diferentes isolados frutificaram através desse método, incluindo isolados de todos os 4 biótipos conhecidos de *C. pernicioso*. A produção de basidiocarpos teve início entre 70 e 112 dias da inoculação. Stein et al. (1996) testaram a metodologia de Griffith e Hedger (1993), para produção artificial de basidiocarpos do isolado C990 de *C. pernicioso* do cupuaçuzeiro e obtiveram sucesso, iniciando a produção de basidiocarpos, 70 dias após transferência do laboratório para a câmara úmida, tendo sido gastas oito semanas (56 dias) de incubação, no laboratório, mais 70 dias para início da produção, totalizando-se 126 dias.

2.2 Caracterização molecular de *Crinipellis perniciosa*

Os métodos tradicionais de identificação de fungos, os quais se baseiam na observação direta da morfologia da cultura e no exame microscópico das estruturas reprodutivas, após o período de incubação, não têm se mostrado suficientes para a identificação de subespécies, variedades, raças e biótipos, devido à semelhança da maioria das características morfológicas desses agentes, nesses níveis taxonômicos. Técnicas moleculares, baseadas na imunologia e análises de ácidos nucleicos, têm sido aplicadas em diversas áreas da micologia possibilitando diagnóstico rápido, preciso e específico de patógenos de plantas.

Griffith, Wilson e Hedger (1993) estudaram a estrutura da população de *C. perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa, em populações do Brasil e do Equador, através de tipos compatíveis, incompatibilidade somática e polimorfismo de DNA mitocondrial. Distinguiram três biótipos do fungo: o tipo C, patótipo formador da vassoura no cacau; o tipo S, formador de vassoura, encontrado em espécies de *Solanum*; e o tipo L, que causa uma infecção assintomática em "liana" - *Arrabidaea verrucosa* (Bignoniaceae). Duzentos isolados da costa do Equador foram pareados e determinou-se que, a população do biótipo C, dessa região, consistiu de um simples SCG (grupo de compatibilidade somática).

Oliveira (1995) estudou a compatibilidade somática de 29 isolados de *C. perniciosa* da Bahia e da Amazônia, e verificou que com poucas exceções, os isolados provenientes dos mesmos municípios comportaram-se como compatíveis entre si. Todos os isolados originários da Amazônia foram incompatíveis com os isolados de cacau da região cacaueira da Bahia, demonstrando que não há similaridade entre isolados das duas regiões em termos de compatibilidade.

Yamada e Oliveira (2000 - no prelo) estudaram 14 sistemas de enzimas em 110 isolados de *C. pernicioso*. Os sistemas utilizados foram: Malato Desidrogenase (MDH), Isocitrato Desidrogenase (IDH), Esterase Fluorescente (FLE), Diaforase (DIA), Fosfoglucoisomerase (PGI), Fosfoglucomutase (PGM), Aldolase (ALD), Peptidase (PEP), Álcool Desidrogenase (ADH), Aspartato AminoTransferase (AAT), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PG), Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6P), Shiquimato Desidrogenase (SKD) e Fosfatase Ácida (ACP). Destes, somente dois sistemas (DIA e SKD) não apresentaram bandas com boa resolução. Os melhores resultados foram com os sistemas: MDH, FLE, PGI, PGM, ALD, PEP, 6PG e ACP. Os eletromorfos dos seis sistemas de enzimas: MDH, PEP, PGI, PGM, 6-PG e IDH foram encontrados em 101 isolados de *C. pernicioso* provenientes do cacauero e de outros hospedeiros das regiões sul da Bahia e Amazônica. A análise com isoenzimas mostrou-se útil ao estudo da variabilidade de populações desse patógeno, podendo ser empregado como critério adicional, na confirmação, ou mesmo na caracterização de grupos de isolados.

Com o surgimento da técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) houve uma verdadeira revolução no desenvolvimento das técnicas moleculares. Um dos aspectos fundamentais dessa revolução foi a possibilidade de se amplificar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA, em grandes quantidades podem ser facilmente detectados a olho nu, diretamente em gel de eletroforese, através de corantes específicos para DNA (ex: brometo de etídio). Entretanto, a técnica da PCR ainda apresentava uma limitação significativa, na obtenção de marcadores anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de "primers" para amplificação via PCR, depende, essencialmente, do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a

seqüência de DNA de interesse, necessitando da clonagem e seqüenciamento da região, gerando elevação de custos e demandando tempo para realização da técnica (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A técnica de RAPD (Randomic Amplified Polymorphic DNA), desenvolvida por Williams et al. (1990), baseada na reação da polimerase em cadeia, tem sido utilizada na descrição da variabilidade de fungos fitopatogênicos. Ela é baseada na delimitação de fragmentos de DNA, abaixo de 3 kbp, pelo anelamento, em cada extremidade de 10 bases de oligonucleotídeos, atuando como “primers”. A amplificação ou não, do loco específico é devido à presença ou ausência de sítios adequados para ligação dos “primers” (Casela, 1995). A técnica de RAPD foi derivada da reação em cadeia, da polimerase (PCR), sendo que a amplificação ao acaso do DNA polimórfico (RAPD) não necessita do seqüenciamento, prévio das bordas do segmento DNA, porque os “primers” são de seqüência aleatória, pareiam-se com as seqüências complementares ao longo do genoma.

O método de RAPD, é um dos recursos mais acessíveis para uso rotineiro, devido à sua rapidez e simplicidade. Contudo, para o uso dessa técnica deve-se trabalhar com culturas puras do fitopatógeno, pois os “primers” são aleatórios e podem, portanto, amplificar qualquer molécula (DNA) que esteja na mistura (Caetano-Anolles, Bassam, Gresshoff, 1991; Henson e French, 1993).

O polimorfismo do DNA de *C. pernicioso* foi revelado por análises de RAPD em vários gêneros e espécie de Sterculiaceae, Solanaceae e Bixaceae. As comparações foram feitas entre isolados de *T. cacao* (cultivares Scavina 6 - resistente), e os suscetíveis: *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *Herrania sp* (todos coletados próximo a Belém, Brasil, em três lotes com dois km de distância de um para o outro), *Bixa orellana* e *Solanum rugosum* (150 km

e 144 km de Belém, respectivamente). Similaridades genéticas foram determinadas pelo coeficiente de Sorensen (Sc_{ij} , fração de bandas divididas), variando de 1,00 (Scavina 6 e *T. grandiflorum*) para 0,56 (*S. rugosum* e *T. subincanum*). Os resultados indicam que a proximidade é mais importante do que a espécie hospedeira, para determinar a relação genética entre isolados, e que das duas fontes de inóculo independentes, a situada próximo a Belém (o inóculo de *B. orellana*) é a mais relacionada geneticamente com o isolado de *T. cacao* suscetível à *C. pernicioso*. Também foram feitas comparações entre culturas monospóricas de diferentes basidiocarpos, de algumas vassouras obtidas de cultivares de *T. cacao* suscetíveis à *C. pernicioso*, bem como de culturas monospóricas de basidiocarpos de *S. rugosum*. As bandas padrões foram similares entre os basidiocarpos da mesma vassoura, mas diferenças foram detectadas entre culturas monospóricas do mesmo basidiocarpo (Andebrhan e Furtek, 1994).

2.3 Caracterização patogênica de *Crinipellis pernicioso*

Os hospedeiros do fungo *C. pernicioso* incluem *Theobroma cacao* L., principal hospedeiro, além de outras espécies de *Theobroma* e *Herrania* (*T. bicolor*; *T. grandiflorum*; *T. obovatum*; *T. microcarpum*; *T. subincanum*; *T. speciosum*; *H. albiflora*; *H. nitida*; e *H. purpurea*.), *Sterculia speciosa* (Evans, 1978), *Bixa orellana* (Bastos e Andebrhan, 1986), *Solanum rugosum* e *S. lasiantherum* (Bastos e Evans, 1985), *Athanaea aff pagogena* (Bastos, Silva e Almeida, 1991), *Entata gigas* (Evans, 1978), *Solanum paniculatum* (Silva, Gramacho e Almeida, 1992), *Solanum lycocarpum* e *Heteropterys acutifolia* Juss. (fam. Malpighiaceae) (Resende, Resende e Bezerra, 1998; Resende et al., 2000).

Existem diferentes formas patogênicas (patótipos) de *C. pernicioso*, embora não se possa falar de raças, porque ainda não foram estabelecidos hospedeiros diferenciais (Luz et al., 1997). Isso indica variação na população desse patógeno, em função da adaptação a outras espécies de plantas, como o biótipo-S, que incluem patótipos de *C. pernicioso*, adaptados a hospedeiros da família Solanáceas, o biótipo-B, com patótipos de *C. pernicioso*, adaptados a hospedeiros da família Bixaceae (*Bixa orellana*), além dos biótipos C (cacau) e L (Liana) (Purdy e Schmidt, 1996).

Wheeler e Mepsted (1988), avaliando os resultados de 30 experimentos sobre a variabilidade patogênica entre isolados de *C. pernicioso* de cacau, de várias áreas da Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Trinidad e Venezuela sugeriram a existência de dois grupos ou populações de *C. pernicioso* no cacau cultivado. Um grupo A, composto de isolados da Bolívia e Pichilingue (Equador) e a maioria dos isolados testados da Colômbia, os quais induziram sintomas severos no cacau Scavina 6, bem como, em um dos seus pais; e o outro grupo (B), composto de isolados do Brasil, Trinidad e Venezuela, os quais não causaram sintomas severos no Scavina 6. Dentro desses grupos poderiam ser adicionadas variantes distinguidas por reações particulares do hospedeiro. Isolados do Equador, especialmente vindos do oriente, centro de diversidade de *T. cacao*, demonstraram uma variação de patogenicidade comparável àquela encontrada entre os isolados de cacau cultivado sobre extensas áreas.

Existem algumas hipóteses, que tentam explicar a variabilidade patogênica dos diferentes isolados de *C. pernicioso*, dentre elas Wheeler e Mepsted (1988) citam uma comunicação pessoal de Gregory (1978), onde este relata as etapas de formação das vassouras. Quando uma vassoura surge de um basidiósporo simples, o micélio na vassoura seca resultante é provavelmente

autodicariótico. Entretanto, algumas vassouras surgem de infecções de múltiplos basidiósporos. Anastomoses vegetativas entre micélios originários de diferentes basidiósporos poderiam dar oportunidades ao surgimento de heterocários, no micélio saprofítico, aumentando subsequente a variabilidade na próxima geração de basidiósporos. O teste dessa hipótese é de fundamental interesse porque o potencial de diversidade desse patógeno, especialmente dentro de uma região produtora de cacau, é importante no planejamento de programas de manejo da doença, que incluem o uso da resistência do hospedeiro.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggest two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D.B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 6, p.1020-1027, dec. 1994.
- BASTOS, C. N.; ANDERBRAN, T. Urucun (*Bixa orellana*): nova espécie da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 963-965, out. 1986.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 306-312, june 1985.
- BASTOS, C. N.; SILVA, S. D. V. M.; ALMEIDA, O. C. Ocorrência de vassoura-de-bruxa em solanáceas silvestres na região produtora de cacau da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v.3, n.2, p.109-110, maio/ago. 1991.
- BAKER, R.; COWDY, S. H. Studies in the witches' broom disease of cocoa caused by *Marasmius pernicioso* Stahel. Part 1. Introduction, symptoms and etiology. **Imperial College Tropical Agriculture**, v. 7, p. 1-28, 1943.
- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. **Witches' broom disease of cacao** (*Marasmius pernicioso* Stahel). Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1957. 42p. (Phytopathological Paper, 2).

- CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, New York, v. 9, p. 553-557, 1991.
- CASELA, C. R. Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*): caracterização da variabilidade genética do patógeno e identificação de resistência no hospedeiro. **Projeto submetido ao CNPq em julho de 1995**. 25p.
- DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, n. 1/2, p. 66-72, june 1976.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosus*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v. 74, pt. 3, p. 515-523, june 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease, a case study. **Cocoa Growers' Bulletin**, Birmingham, n. 32, p. 5-19, 1981.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosus*) in Ecuador: 1. The fungus **Annals of Applied Biology**, New York, v. 89, n. 2, p. 185-192, june 1978.
- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosus* (Witches' broom disease) in cocoa cultivars. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v. 74, pt. 3, p. 525-536, june 1980.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). In: ___. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1996. Cap. 6, p. 38-51.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosus*. **Heredity**, Essex, v. 72, p. 278-289, 1994.

- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. *Netherlands Journal Plant Pathology*, Dordrecht, v. 99, p. 227-230, 1993.
- GRIFFITH, G.W.; WILSON, F.J.; HEDGER, J.N. Population structure, breeding biology and evolutionary relationships en the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11., 1993, Costa do Marfin. *Proceedings...* Costa do Marfin: Cocoa Producers' Alliance, 1993. p. 45-51.
- HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.
- HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). *H. M. Stationery office*, 8 p. (Colonial, 286). 1952.
- LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacauero. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. (eds). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa: UFV, 1997. v. 2, p. 611-656.
- OLIVEIRA, M. L. de. Estudos de compatibilidade entre isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes de cacau e de outros hospedeiros. *Informe de Pesquisas*, 1991. CEPLAC: Ilhéus, Bahia, Brasil, p. 99-101 (250 p.), 1995.
- PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. *Resumos...* Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 51.
- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. DE. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotropica*, Ilhéus, v. 1, n. 1, p. 79-81, jan./abr. 1989.

- PURDY, L. H.; DICKSTEIN, E. R. Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 7, p. 493-495, July 1990.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.
- PURDY, L. H.; TRESE, A. T.; ARANGUDI, J. A. Proof of pathogenicity of *Crinipellis pernicioso* to *Theobroma cacao* by using basidiospores produced in vitro cultures. **Theobroma**, Ilhéus, v. 13, p. 157-163, 1983.
- RESENDE, M. L. V. de; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.1, p. 88-91, mar. 2000.
- RESENDE, M. L. V. de; RESENDE, D. V.; BEZERRA, J. L. Variabilidade de *Crinipellis pernicioso* sp. em diferentes hospedeiros no sul de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 275, ago. 1998. Resumo 368. Suplemento.
- ROCHA, H. M. Ações governamentais para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauero na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 272-273, ago. 1995. Suplemento.
- 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**, Oxford, v.34, n. 3, p. 319-328, Sept. 1982.
- SGRILLO, R. B.; ARAUJO, M. R. P. de. Modelo de simulação da evolução da vassoura-de-bruxa do cacauero na Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 6, n. 3, p. 73-84, set./dez. 1994.

- SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis pernicioso***, Viçosa: UFV, 1997. 93 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 4, n. 1, p.17-20, jan./abr. 1992.
- SMITH, J. E.; BERRY, D. R. Sexual reproduction. In: ____. **Introduction to Biochemistry of Fungal Development**. London. New York: Academic, 1976. Cap. 7, p. 253-263.
- STEIN, R. L. B.; ITO, T.; ALBUQUERQUE, F. C. de; NASCIMENTO, R. M. do. **Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro em meio de farelo-vermiculita**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1996. 15p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 167).
- THOROLD, C. A. **Diseases of cocoa**. Oxford: Clarendon Press, 1975. 425 p.
- TREVIZAN, S. D. P.; SILVA JR., M. F. DA. Mudanças sócio-econômicas e ambientais associadas à vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 273, ago. 1995. Suplemento.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 475-488, dec. 1988.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. V.; RAFALSKI, J. A.; TINGEX, S. V. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- YAMADA, M. M.; OLIVEIRA, M. L. de. Métodos e protocolos para eletroforese em gel de amido de isoenzimas de *Crinipellis pernicioso*. **Agrotropica**, Ilhéus, 2000. No prelo.

CAPÍTULO 1

APERFEIÇOAMENTO DA METODOLOGIA DE PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE BASIDIOCARPOS DE

Crinipellis perniciosa

1 RESUMO

NIELLA, GIVALDO ROCHA. **Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*.***
LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doutorado - Tese em Agronomia / Fitopatologia)**

O presente estudo objetivou aperfeiçoar a metodologia para produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*, baseada em meio farelo-vermiculita descrito na literatura. Os tratamentos incluíram o meio original de farelo e vermiculita como testemunha, e oito modificações desse meio correspondentes a eliminação ou a presença em dobro de cada um dos seguintes ingredientes: vermiculita, farelo de trigo, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaCO_3 . Um décimo tratamento foi incluído e constou do dobro da quantidade de todos ingredientes em relação à testemunha. O tratamento, no qual somente a quantidade de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi dobrada produziu, significativamente, mais basidiocarpos que os demais tratamentos ($P=0,05$). Além da adição da quantidade de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, duas outras modificações realizadas na metodologia original, também parecem ter contribuído para aperfeiçoá-la: 1) o aumento do inóculo inicial de 3 para 6 discos de micélio/bandeja, que pode ter resultado, na redução observada do tempo de colonização do substrato; 2) a interrupção no fornecimento de água por quatro dias, 15 dias após as bolachas (substrato totalmente colonizado pelo *C.pernicioso*) terem sido dependuradas e que pode ter sido responsável pela redução notada no tempo, para início da frutificação, em relação ao mencionado na literatura.

* Publicado na revista *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 523-527, 1999.
*Comitê Orientador: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

2 ABSTRACT

NIELLA, GIVALDO ROCHA. **Improved methodology for artificial production of basidiocarps of *Crinipellis pernicioso*.*** LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doctorate - Thesis in Agronomy / Phytopathology)**

The present study was aimed at improving the methodology for artificial production of basidiocarps of *Crinipellis pernicioso*, based on the bran-vermiculite medium described in the literature. The treatments included the standard bran-vermiculite medium as control, plus eight different media where the standard medium was modified by having ingredients either doubled in weight or excluded from its composition. The tenth treatment consisted of a medium that had a doubled quantity of all ingredients. The substrate, in which only the quantity of $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was doubled presented a trend to produce significantly more basidiocarps than the other treatments ($P = 0,05$). In addition, two other modifications of the original methodology also appeared contributed to improve it: 1) initial inoculum of 3 mycelial discs was doubled and it was noted that time of colonization of the substrate was reduced; 2) Irrigation was interrupted for four days, 15 days after the cracker was hanged and time for initiation of fructification appeared to be consequently reduced.

*Published in the magazine *Brazilian Phytopathology*, v. 24, n. 4, p. 523-527, 1999.

**Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

3 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer é a doença de maior impacto econômico do cacauero na Bahia, na Amazônia brasileira e em outros países do Novo Mundo onde ela ocorre (Luz et al., 1997; Silva, 1997). O basidiósporo de *C. pernicioso* é a única forma infectiva, utilizada na seleção de cultivares resistentes ao patógeno. Assim sendo, suprimentos regulares de basidiocarpos são fundamentais para investigações dos processos de patogênese e avaliação de progênies de cacaueros.

Suarez (1977); Rocha e Wheeler (1982, 1985) investigaram as condições climáticas necessárias à produção natural de basidiocarpos a partir de vassouras secas e concluíram que a irrigação diária das vassouras, durante 8 horas, temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, foram condições ótimas à produção de basidiocarpos. Esse método, porém, requer grande quantidade de vassouras secas, o início da produção de basidiocarpos é demorado (em média de 2 a 3 meses) e as vassouras são suscetíveis a contaminações por outros organismos. Dessa forma, os métodos naturais de produção de basidiósporos podem levar a reações não confiáveis de resistência ou suscetibilidade no hospedeiro, uma vez que não tem sido possível utilizar-se em inoculações, basidiósporos, produzidos a partir de culturas monospóricas.

Segundo Griffith e Hedger (1993), a primeira tentativa bem sucedida para obtenção de frutificação de *C. pernicioso*, em meio de cultura, foi realizada por Stahel (1919), quando este dependurou uma porção de micélio em pote de porcelana, em uma árvore no Suriname. Purdy, Trese e Aragundi (1983) e Purdy e Dickstein (1990) refinaram esse método com algum sucesso através do

crescimento micelial asséptico, seguido da colocação de discos de micélio sobre vassouras autoclavadas e outros suportes, simulando assim, as condições presentes nos trópicos úmidos, favoráveis à produção de basidiocarpos. Merchan (1979); Purdy, Trese e Aragundi (1983); Pickering e Hedger (1987), também, obtiveram basidiocarpos de *C. pernicioso*, através da deposição de discos de micélio, em vassouras estéreis, imersas em ágar-água dentro de erlenmeyers. Bastos e Andebrhan (1987) relataram a produção de basidiósporos sem formação de basidiocarpos, diretamente a partir de callus, em culturas miceliais crescidas em meio Lutz modificado (Tuite, 1969). Entretanto, o grande avanço na produção artificial de basidiocarpos de *C. pernicioso*, somente ocorreu a partir do trabalho de Griffith e Hedger (1993). Estes autores cultivaram o fungo em um meio à base de farelo de trigo e vermiculita, usualmente utilizado para o cultivo de cogumelos comestíveis. Após o crescimento micelial, submeteram o meio colonizado a certas condições de flutuação de umidade essenciais à frutificação. Stein et al. (1996) obtiveram, também, basidiocarpos de *C.pernicioso* (isolado de cupuaçuzeiro) em dez semanas, utilizando-se o meio e os procedimentos descritos por Griffith e Hedger (1993).

Entretanto, apesar dos avanços exemplificados nos trabalhos supracitados, a dificuldade de produção artificial contínua de basidiocarpos, continua sendo um fator limitante aos trabalhos de pesquisa com vassoura-de-bruxa, em cacau, uma vez que essa produção é ainda inconstante, além de demandar muito tempo. Um exemplo da literatura sobre cultivo de cogumelos comestíveis (Elliot, 1985; Bononi e Trufem, 1986; Chang, 1993) indicou que seriam recomendáveis estudos complementares, sobre as proporções dos componentes do meio farelo-vermiculita, visando a obtenção de uma formulação capaz de viabilizar uma produção mais precoce e constante de basidiocarpos de *C. pernicioso*.

O presente trabalho, objetivou explorar a hipótese de que alterações nas proporções dos componentes do meio farelo-vermiculita, alterações na quantidade do inóculo e nas condições ambientais, para frutificação desse patógeno, podem diminuir o tempo para início da produção artificial de basidiocarpos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos, no período de janeiro a dezembro de 1998, no laboratório de patologia de sementes (LAPS), da Universidade Federal de Lavras (MG).

4.1 Material genético

Foi utilizada uma cultura pura de *C. pernicioso*, obtida do isolamento de vassoura verde de cacauete infectado pelo patógeno, coletada no município de Ipiaú, sudeste da Bahia.

4.2 Metodologia

Testou-se a metodologia descrita por Griffith e Hedger (1993), com modificações nas quantidades dos componentes e no dobro de inóculo preconizado, ou seja, 6 discos de micélio, buscando-se reduzir o tempo de colonização do substrato. O meio básico de Griffith e Hedger (1993) foi considerado como testemunha (TRAT 1) e nos demais tratamentos, dobrou-se a quantidade de um dos componentes (g/120 mL de água), ou excluiu-se o mesmo da composição (Tabela 1).

TABELA 1. Composição do substrato para cultivo in vitro de *C. pernicioso*.

TRATAMENTOS	VERMICULITA	FARELO	CaSO ₄ ·2H ₂ O	CaCO ₃
	(A)	(B)	(C)	(D)
GRAMAS				
TRAT 1 (TEST- T)	40	50	6	1,5
TRAT 2 (+A)	80*	50	6	1,5
TRAT 3 (-A)	00*	50	6	1,5
TRAT 4 (+B)	40	100*	6	1,5
TRAT 5 (-B)	40	00*	6	1,5
TRAT 6 (+C)	40	50	12*	1,5
TRAT 7 (-C)	40	50	00*	1,5
TRAT 8 (+D)	40	50	6	3*
TRAT 9 (-D)	40	50	6	00*
TRAT 10 (2XT)	80*	100*	12*	3*

*Constituinte mudado em relação ao tratamento 1 (testemunha).

Para cada composição do substrato (tratamento), foram adicionados 120 mL de água destilada deionizada, pH 7,0 - 7,5 antes da homogeneização. Cada substrato foi então distribuído em 4 bandejas descartáveis, de alumínio (15 x 10 x 5 cm), à proporção de 30 g do substrato/bandeja, sendo as bandejas enroladas em papel alumínio e autoclavadas por 20 minutos a 121 °C. A inoculação foi realizada, colocando-se 6 discos (5 mm diâmetro) de micélio, retirado de cultura em BDA, com 15 dias e colocados em pontos equidistantes nas bandejas. Após à inoculação, as bandejas foram colocadas em câmara de crescimento, com temperatura ajustada para 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante duas semanas (10/02 a 24/02/98).

Após esse período de incubação, as bandejas foram abertas em câmara de fluxo laminar e a superfície de cada substrato foi coberta com 15 g de um composto autoclavado, constituído de 200 g de turfa grossa, 50 g de CaCO₃ e 50g de vermiculita, ao qual foram adicionados 125 mL de água destilada

deionizada. Após a cobertura, as bandejas permaneceram por mais duas semanas (24/02 a 10/03/98) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo então novamente abertas. O conteúdo de cada bandeja, já agregado pela colonização micelial (bolachas) foi então dependurado (10/03/98) dentro de quatro vassouzeiros (câmaras de vidro com 90 x 60 x 37 cm cada). Esses vassouzeiros tinham microaspersores na parte superior que foram regulados para fornecerem uma irrigação de 800 mL de água/dia, divididos em dois intervalos de 30 segundos cada, um pela manhã e outro à tarde, para manter a umidade relativa uniforme acima de 90 %. Os vassouzeiros foram deixados dentro de sala climatizada, com temperatura ambiente, regulada para $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Quinze dias após (25/03/98), o fornecimento de água nos vassouzeiros foi suspenso por 4 dias consecutivos, objetivando criar uma situação de estresse e induzir à produção mais precoce de basidiocarpos. A variável analisada foi a produção total de basidiocarpos por tratamento e, em cada face dos blocos, sendo realizadas contagens diárias de basidiocarpos com posterior coleta e armazenamento de basidiósporos, utilizando metodologia de Frias (1987). Para confirmar a patogenicidade do fungo, os basidiósporos assim produzidos foram inoculados, na concentração de 10^5 basidiósporos/mL, em 50 mudas de cacau Cv. Catongo (suscetível) com duas semanas da emergência. Após à inoculação, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação com sistema automatizado de controle de umidade e temperatura.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento foi em blocos casualizados (DBC); cada tratamento constou de quatro repetições, com uma bandeja por repetição. Os dados de produção total de basidiocarpos foram submetidos à análise de variância e comparadas com o teste de Duncan.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento na quantidade do inóculo inicial, passando de 3 (Griffith e Hedger, 1993) para 6 discos, reduziu o período de colonização dos substratos de 56 para 42 dias. A produção de basidiocarpos teve início 24 dias após a colocação das bolachas nos vassoueiros (03/04/98), ou seja, 46 dias a menos que o conseguido por Stein et al. (1996), que necessitaram de 70 dias para o início da produção de basidiocarpos. Observou-se que 48 horas após as bolachas terem sido retiradas das bandejas e dependuradas nos vassoueiros, ocorreram modificações na coloração do micélio, passando de branco para amarelo e que no 7º dia, a coloração amarelada mudou e estabilizou-se em um vermelho vinho, indicativo do início da formação de basidiocarpos.

Os basidiósporos obtidos, a partir de basidiocarpos produzidos nesses substratos, induziram sintomas característicos da doença, em mais de 60% das mudas inoculadas, o que é similar ao obtido em inoculações feitas com basidiósporos, produzidos pelo método convencional a partir de vassouras secas (Rocha e Wheeler, 1985).

De acordo com a produção de basidiocarpos/tratamento, os resultados demonstram que o tratamento 6, com o dobro da quantidade de sulfato de cálcio, em relação à testemunha, produziu mais basidiocarpos, do que os tratamentos 2, 3 e 5 (Figura 1) ($P = 0,05$), com uma tendência de produzir mais basidiocarpos que os demais tratamentos, incluindo-se a testemunha.

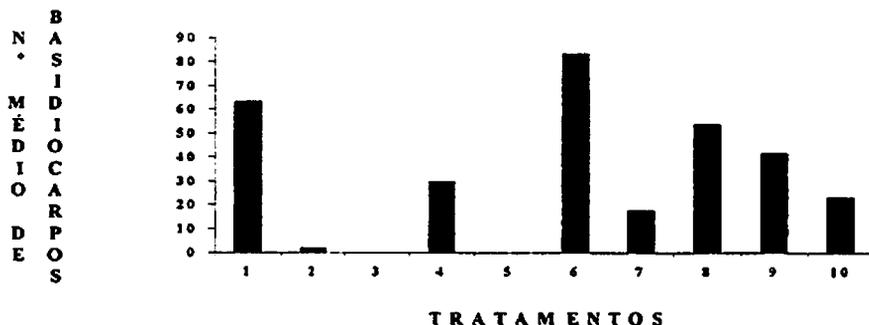


FIGURA 1. Número médio de basidiocarpos de *C. perniciosus* em meio básico de farelo-vermiculita, com diferentes composições. (Tabela 1).

Segundo Griffin (1993), o substrato para o cultivo de cogumelos deve ter um equilíbrio entre os macronutrientes. O melhor resultado, em termos de produção de basidiocarpos, foi obtido quando se dobrou a quantidade de sulfato de cálcio, podendo se fazer algumas conjecturas, como por exemplo: 1) a quantidade de sulfato, no meio original, não era ainda suficiente para a produção de aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína, essenciais à síntese protéica; 2) o aumento da quantidade de sulfato de cálcio, no meio, pode ter tido influência na alteração do pH e ser o real responsável pelo resultado obtido.

Nos tratamentos 2, 3 e 5, a produção média de basidiocarpos foi mínima. Nos tratamentos 2 e 3, o excesso ou falta de vermiculita, afetou a estrutura física das bolachas, causando excesso ou deficiência de umidade disponível, gerando um ambiente desfavorável à produção de basidiocarpos, concordando assim, com vários autores, que afirmam que a umidade é o fator mais importante na produção de basidiocarpos (Thorold, 1975; Bastos e Silva, 1980; Andebrhan, Almeida e Fonseca, 1983). No tratamento 5, a ausência total de farelo de trigo, certamente, prejudicou a produção de basidiocarpos, em função de ser esse

componente a principal fonte de carbono do substrato. Esses resultados demonstram que é necessário haver um equilíbrio entre os dois componentes de maior peso, na mistura (farelo e vermiculita), concluindo-se que as quantidades de 500g de farelo e 400g de vermiculita, no meio original (Griffith e Hedger, 1993) sejam as ideais.

No tratamento 10, onde a quantidade de todos os ingredientes do substrato foi dobrada, observou-se que a produção de basidiocarpos foi prejudicada. Possivelmente, isso ocorreu porque havia, proporcionalmente, metade da água acrescida inicialmente ao meio, causando assim uma deficiência hídrica no meio.

Foi quantificada a produção de basidiocarpos em toda a superfície das bolachas. Os dados demonstraram que, independente do tratamento, foram produzidos basidiocarpos, nas superfícies cobertas ou não (Figura 2), com médias de 9,23; 18,88 e 3,95 basidiocarpos, respectivamente, por face micelial, face coberta e faces laterais. Essas observações realçam a importância de se dependurar as bolachas, evitando-se perdas de superfícies, por apoio em suportes sólidos, tornando-se obstáculo à frutificação do patógeno.

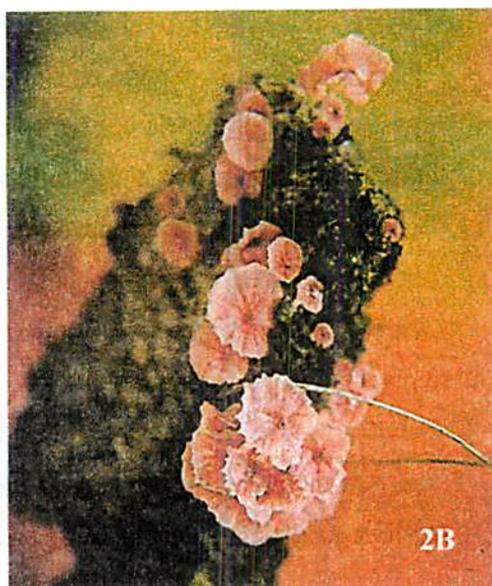
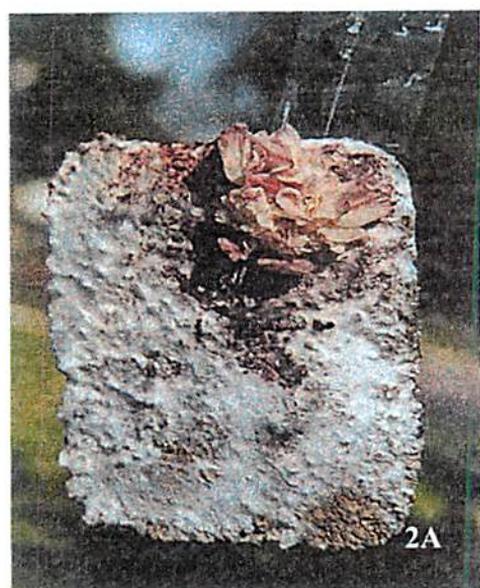


FIGURA 2. Produção de basidiocarpos de *C. pernicioso*, em meio farelo-vermiculita. 2A – Início da produção, ainda com presença abundante de micélio; 2B – Após 60 dias do início da produção, com substrato já se decompondo.

6 CONCLUSÕES

- 1) É possível iniciar a produção de basidiocarpos de *C. pernicioso*, 66 dias após à inoculação em meio farelo-vermiculita.
- 2) O estresse causado pela cobertura com turfa e o estresse hídrico funcionam como indutores, para o início da produção de basidiocarpos.
- 3) O período máximo da produção de basidiocarpos foi de 52 dias, após esse período ocorreu a incidência de fungos, principalmente, dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* e outros organismos contaminantes prejudicaram à manutenção da produção.
- 4) Estudos sobre o controle dos fungos contaminantes, sem afetar a sobrevivência de *C. pernicioso*, certamente, contribuirão para um maior período na produção artificial de basidiocarpos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; FONSECA, S. E. A. **Doenças do cacauero**. Belém. CEPLAC/DEPEA/COPEs, 1983. 20 p.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. In vitro production of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, the causative agent of witches' broom disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v. 88, p.406-409, 1987.
- BASTOS, C. N.; SILVA, H. M. **Doenças do cacauero na Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC/DEPEA/COPEs, 1980. (Boletim Técnico, 2).
- BONONI, V. R. L.; TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. 3. ed. São Paulo: Icone, 1986.
- CHANG, S. T. **Mushroom biology: The impact on mushroom production and mushroom products**. Hong Kong: Chinese University of Hong Kong, 1993.
- ELIOT, T. J. Spawn-making and spawn. In: FLEGG, P. B.; SPENCER, D. M.; WOOD, D. A. (eds). **The biology and technology of the cultivated mushrooms**. London: John Wiley and Sons, 1985. p. 131-140.
- FRIAS, G. A. **Inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao** Gainesville: University of Florida, 1987. p. 111p. (PhD Thesis).
- GRIFFIN, D. H. **Chemical requirements for growth**. In: GRIFFIN, D. H. (ed.) **Fungal physiology**. 2nd ed. New York. John Wiley e Sons, 1993.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 227-230, 1993.

- LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacauero. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. (eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 2, p. 611-656.
- MERCHAN, V. M. Formación en medios de cultivo de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Ascolfi Informa**, Colômbia, v. 5, p. 54-56, 1979.
- PICKERING, V.; HEDGER, J. N. Production of basidiocarps of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* in vitro culture. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v. 88, pt.3, p. 404-406, Apr. 1987.
- PURDY, L. H.; DICKSTEIN, E. R. Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, p. 493-496, 1990.
- PURDY, L. H.; TRESE, A. T.; ARAGUNDI, J. A. Proof of pathogenicity of *Crinipellis pernicioso* to *Theobroma cacao* by using basidiospores produced in vitro cultures. **Theobroma**, Ilhéus, v. 13, p. 157-163, 1983.
- 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*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 319-328, sept. 1985.
- ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Water balance as an important factor in basidiocarp production by *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of cocoa witches' broom. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8., 1982, Cartagena, Colombia. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 1982. p. 361-368.
- SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis pernicioso***. Viçosa: UFV, 1997. 93 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).

STAHEL, G. Contribution to the knowledge of witches' broom disease. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 9, p. 167-176, 1919.

STEIN, R. L. B.; ITO, T.; ALBUQUERQUE, F. C.; NASCIMENTO, R. M. **Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro em meio de farelo-vermiculita.** Belém: EMBRAPA/CPATU, 1996. 15 p. (EMBRAPA/CPATU. Boletim de Pesquisa, 167).

SUAREZ, C. **Growth of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in vivo and in vitro.** London: University of London, 1977. (PhD Thesis).

THOROLD, C. A. **Diseases of Cocoa.** Oxford: Clarendon Press, 1975. 425 p.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria.** Minneapolis: Burg. Publications Cooperation, 1969. 239 p.

CAPÍTULO 2

DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE *Crinipellis pernicioso*, BASEADO EM MARCADORES RAPD

1. RESUMO

NIELLA, GIVALDO ROCHA. **Divergência genética de *Crinipellis perniciosa*, baseado em marcadores RAPD.** LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doutorado – Tese em Agronomia / Fitopatologia)*

O fungo *Crinipellis perniciosa*, originário da região Amazônica tem sido encontrado causando sintomas de vassoura-de-bruxa em vários hospedeiros em diferentes regiões do Brasil. Objetivando estudar a diversidade genética de dez isolados monospóricos de *C. perniciosa* provenientes de seis Estados brasileiros: AM, BA, MG, MT, PA e RO; e de três hospedeiros: *Theobroma cacao*, *Heteropterys acutifolia* e *Solanum lycocarpum*, utilizou-se marcadores RAPD. De cada isolado foi extraído o DNA genômico e amplificado com nove primers decâmeros, gerando 101 marcas RAPD. A partir desses dados foram estimadas as distâncias genéticas, baseada no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979). As distâncias genéticas variaram entre 0,149 e 0,589. O valor mínimo de distância diferente de zero foi de 17,4% e mostrou a formação de um grupo principal, com três isolados da Bahia e um do Pará. Os demais isolados foram distintos do grupo principal, sendo que os de Mato Grosso (cacau) e Minas Gerais (cipó e lobeira) foram os que apresentaram maiores divergências. Os resultados evidenciaram variabilidade genética do patógeno nos seis Estados brasileiros, dentro da região cacauzeira da Bahia e nos três hospedeiros. Tal variabilidade deve ser considerada nos estudos de patogenicidade e no melhoramento do cacauzeiro, visando resistência a esse patógeno.

*Comitê Orientador: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Orientador), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

2 ABSTRACT

NIELLA, GIVALDO ROCHA. Genetic divergence between isolates of *Crinipellis pernicioso*, based on RAPD markers. LAVRAS: UFLA, 2000. 75 p. (Doctorate – Thesis in Agronomy / Phytopathology)*

Crinipellis pernicioso is a fungus originated from the Amazon region and has been found causing witches' broom symptoms in various hosts in different regions of Brazil. Aiming to study the genetic diversity of ten monosporic isolates of *C. pernicioso* obtained from six Brazilian States: AM, BA, MG, MT, PA and RO and three hosts - *Theobroma cacao*, *Heteropterys acutifolia* and *Solanum lycocarpum*, RAPD markers were used. From each isolate the genomic DNA was extracted and amplified with nine primers generating 101 RAPD marks. Using those data the genetic distances were estimated from the complement of genetic similarities according to Nei and Li (1992) procedure, and grouped by the nearest neighbor clustering. The relative genetic distances varied from 0.149 to 0.589. A dendrogram, with the minimum genetic distance of 17,4 % showed the formation of one principal group with three isolates from Bahia and one from Para. The other isolates were distinct from the principal group, and the isolates from States of Mato Grosso (*T. cacao*) and Minas Gerais (*H. acutifolia* and *S. lycocarpum*) were the most divergent. The results showed genetic variability in the pathogen population sampled from six brazilians States, including inside cacao region of Bahia and from three hosts. This variability should be taken in account for further studies of pathogenicity and cacao breeding for witches' broom resistance.

*Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro – UFLA (Major Professor), Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA, e Stela Dalva Vieira Midlej Silva – CEPLAC.

3 INTRODUÇÃO

É importante se conhecer a diversidade genética das espécies fúngicas fitopatogênicas para se aumentar a eficiência de controle dos mesmos. Entretanto, nem sempre é fácil realizar o levantamento da diversidade. Para isso existem várias alternativas de caracteres marcadores que dão idéia da sua magnitude, alguns mais fáceis de serem avaliados do que outros.

Na maioria das espécies fúngicas, marcadores morfológicos são raros e pouco observados em populações naturais e são, muitas vezes, influenciados pelas condições ambientais. Por esse motivo, marcadores bioquímicos e moleculares, vem sendo utilizados como ferramentas auxiliares, em estudos de variabilidade genética, fisiologia e ecologia de fungos (Michelmore e Hulbert, 1987).

Para fungos causadores de doenças, em plantios comerciais, a patogenicidade é utilizada como um marcador fenotípico nos estudos de variabilidade genética. A identificação de raças é feita através das reações de suscetibilidade e resistência, expressadas por diferentes graus de patogenicidade, apresentados pelo fungo, inoculando-se, cada isolado, em uma série diferenciadora. Até a presente data, não existe uma série diferenciadora para a cultura do cacau (*Theobroma cacao* L.), que expresse com diversidade de sintomas a doença vassoura-de-bruxa, dificultando assim, a utilização desse marcador fenotípico (Luz et al., 1997). O uso de marcadores moleculares isoenzimáticos e baseados no DNA têm aumentado nos últimos anos, abrangendo diversos patossistemas, pois são ferramentas, que complementam o estudo da variabilidade genética e permitem explorar outros aspectos da diversidade dos fitopatógenos (Al-Kherb, Roelfs e Groth, 1987).

Os marcadores RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) estão entre os mais utilizados em associações, com estudos de identificação de raças e testes de patogenicidade, visando esclarecer alguns aspectos correlacionados ao patógeno e auxiliar, no entendimento da sua evolução no meio ambiente (Otoya, Resrepe e Pastor-Corales, 1995). Adicionalmente, os marcadores RAPD estão sendo utilizados no estudo da diferenciação e caracterização de raças fisiológicas (Vilarinhos et al., 1995; Alzate-Marin et al., 1997; Mesquita et al., 1998).

O fungo *Crinipellis perniciosa* é originário da região Amazônia e encontra-se difundido em diferentes regiões do Brasil, não só associado a cultura do cacau como em outros hospedeiros. Existem várias formas patogênicas de *C.perniciosa*, indicando haver variação na população desse patógeno (Wheeler e Mepsted, 1988), em função da adaptação a outras espécies de plantas (Bastos e Evans, 1985; Bastos, Silva e Almeida, 1991; Silva, Gramacho e Almeida, 1992), embora não tenham ainda sido determinadas raças, porque não foram estabelecidos hospedeiros diferenciais, dentro da espécie *T. cacao*. Estudos sobre a variabilidade genética do fungo são importantes para se entender a dinâmica populacional, bem como traçar estratégias para o melhoramento genético do cacaueiro, visando a obtenção de resistência ao patógeno.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de dez isolados monospóricos de *C. perniciosa*, provenientes de seis Estados brasileiros (Amazônia, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará e Rondônia) e de três hospedeiros: *T. cacao*, *Heteropterys acutifolia* (cipó) e *Solanum lycocarpum* (lobeira), utilizando marcadores RAPD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no período de janeiro a dezembro de 1999, nos laboratórios de Patologia de Sementes e Virologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. No laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus - BA, foram realizadas, apenas, as ampliações dos DNAs.

4.1 Obtenção de isolados

Foram utilizados dez isolados de *C. pernicioso*, obtidos nos Estados do Amazonas (Manaus), no Pará (Belém), no Mato Grosso (Alta Floresta) e na Bahia (Santo Amaro da Purificação, Ipiaú, Ilhéus e Camacan), enviados pela CEPLAC, em tubos de ensaio contendo BDA. Os isolados de Rondônia (Ouro Preto D'Oeste) e de Minas Gerais (Lavras e Itumirim), foram obtidos a partir de vassouras verdes. Todos os isolados estão representados na Tabela 1.

TABELA 1 – Identificação do isolado de *C. pernicioso* pelo local de coleta e do hospedeiro.

ISOLADO	MUNICÍPIO	HOSPEDEIRO
ITU	Itumirim	<i>H. acutifolia</i>
LAV	Lavras	<i>S. lycocarpum</i>
CAM	Camacan	<i>T. cacao</i>
ILH	Ilhéus	<i>T. cacao</i>
IPI	ipiaú	<i>T. cacao</i>
STA	Stº Amaro	<i>T. cacao</i>
ALF	Alta Floresta	<i>T. cacao</i>
OPO	Ouro P. D'Oeste	<i>T. cacao</i>
BEL	Belém	<i>T. cacao</i>
MAN	Manaus	<i>T. cacao</i>

Para obtenção das culturas monospóricas, os isolados obtidos anteriormente foram cultivados em BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar/1000 mL de água) e mantidos em BOD, com temperatura ajustada para $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h de luz. Quinze dias após, as culturas puras, de cada isolado, foram utilizadas para a produção de “bolachas” e posterior produção de basidiocarpos, utilizando-se a metodologia de Griffith e Hedger (1993), aperfeiçoada por Niella et al., (1999). Os basidiósporos obtidos foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido, conforme metodologia de Frias (1987 e 1995).

Os basidiósporos liberados dos basidiocarpos foram coletados em glicerol a 16% e a concentração da suspensão de esporos foi quantificada com o auxílio de um hemocitômetro. Essa suspensão foi submetida a diluições sucessivas (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3) e as várias diluições foram distribuídas em placas de Petri, para germinação e obtenção de microcolônias, que foram transferidas, em câmara de fluxo laminar com auxílio de um microscópio estereoscópio e estilete, para placas de Petri, contendo meio BDA, obtendo-se assim, um exemplar monospórico, de cada um dos dez isolados.

O micélio para extração de DNA foi obtido de um disco de 0,5 cm de diâmetro, retirado da borda das culturas monospóricas, com quinze dias de repicadas e depositado no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, adicionando-se, posteriormente, 10 mL de meio de cultura líquido, até ao nível do disco (BDA + micélio).

4.2 Meio de cultura líquido

O meio de cultura líquido utilizado para a produção de micélio monospórico de *C. pernicioso*, visando posterior extração de DNA, foi o de Mills, Sreenivasaprasad e Bronn (1994), Tabela 1A, Anexo A.

Para não cobrir o micélio da superfície do disco com o meio líquido, foi adicionado um volume de 10 mL. Com isso, o suprimento de oxigênio foi suficiente para o desenvolvimento do micélio. As placas de Petri foram incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 dias, com ciclos de 12 h de luz, em câmara de crescimento (BOD).

4.3 Extração de DNA

A metodologia utilizada para extração de DNA do micélio monospórico foi baseada no protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987, 1990). Em almofariz, adicionou-se 10 g do micélio úmido de cada isolado, 5 mL de tampão de extração CTAB a 2% aquecido previamente a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 μL de 2 β -mercaptoetanol e 2 g de areia (a areia utilizada nesse processo foi lavado 5 vezes em peneira de 8 mesh, sendo as duas últimas lavagens com água destilada e a seguir, queimada em mufla a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora). O conteúdo do almofariz foi macerado e homogeneizado durante 20 minutos e transferido para tubos de centrífuga. O almofariz foi lavado com mais 5 mL de CTAB, o conteúdo adicionado aos tubos. Incubou-se os tubos durante uma hora, em banho-maria, a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, esfriado-se, posteriormente, em água à temperatura ambiente.

Adicionou-se 10 mL de clorofórmio - álcool isoamil a 25 %, agitou-se lentamente, inverteu-se 30 vezes e centrifugou-se a 5000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, acrescentou-se 3 vezes o

volume coletado com acetato de amônio 7,5 M - etanol 95° (1:6), e colocou-se no freezer a -20 °C por 24 horas (pernoite), para precipitação do DNA. O precipitado do DNA foi seco à temperatura ambiente e após, dissolvido em 300µL de Tris-EDTA (TE), 1 mM tris e 0,1 mM EDTA, em banho-maria, a 65 °C por 20 minutos. Estando o DNA completamente dissolvido, foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamil e centrifugado a 14000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se 3 vezes o volume com etanol a 95° - acetato de sódio a 3 M (20:1) e colocado no freezer durante 2 horas, para nova precipitação do DNA. Em seguida, o etanol - acetato de sódio foi descartado e o DNA dissolvido em TE.

Para eliminar resíduos de RNA, foi utilizado o tratamento com RNase. Objetivando purificar os DNAs de impurezas, estes foram precipitados com álcool etílico (70%) e centrifugados rapidamente (spin), para eliminar o álcool e o TE. O DNA foi seco e ressuspendido novamente em 100 µL de TE, adicionando-se 10 µL de RNase, previamente diluída e a seguir incubados por 60 minutos a 37 °C. Após, o DNA foi quantificado, retirada uma alíquota e armazenado em ultra freezer a - 80 °C.

4.4 Amplificação do DNA

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica de RAPD, seguindo-se o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), tabela 2A, Anexo A. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100™, da MJ Research Inc., programando-se 40 ciclos, cada um constituído da seguinte sequência: 60 segundos a 92 °C, para desnaturação do DNA; 60 segundos a 35 °C, para anelamento dos “primers”; e 2 minutos a 72 °C, para extensão. Após os 40 ciclos, foi feita uma última etapa de extensão de 5 minutos a 72 °C, para

finalizar os produtos amplificados, reduzindo-se, posteriormente, a temperatura para 4 °C. Foram utilizados os seguintes “primers” a 0,4 mM nas ampliações: OPA13, OPB15, OPC4, OPC19, OPG8, OPG12, OPF2, OPF9, OPE9.

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,2 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas a 75 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

4.5 Determinação das distâncias genéticas

A determinação das distâncias genéticas entre os isolados de *C.perniciosa* foi realizada a partir dos produtos de amplificação do DNA. A interpretação dos dados foi feita da seguinte forma: bandas de DNA em comum, entre os isolados, foram consideradas similaridades genéticas, enquanto que, bandas não comuns, diferenças genéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os dados obtidos foram utilizados para a geração de uma matriz de valores binários, construída de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas em comuns nos diferentes isolados. Essa matriz possibilitou o cálculo das distâncias genéticas (dg_{ij}) entre os isolados *i* e *j*, baseada no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), por meio da seguinte expressão:

$$dg_{ij} = 1 - [2a / (2a + b + c)]$$

em que $a = 1,1$ nas raças *i* e *j*; $b = 1,0$ nas raças *i* e *j*; $c = 0,1$ nas raças *i* e *j*.

A matriz de distâncias genéticas foi utilizada no método de agrupamento do vizinho mais próximo, reunindo os isolados, em um dendrograma. Para identificar diferenças genéticas entre os isolados foi considerada a distância genética mínima significativa (d_{gm}), utilizando o teste t e a média dos erros associados à cada distância (s_{dgm}) segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992), empregando-se a seguinte expressão:

$$d_{gm} = t s_{dgm}$$

em que t é o valor tabelado a um dado nível de probabilidade (99 %), com $n-2$ graus de liberdade e n é o número de bandas polimórficas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo da caracterização genética de *C. perniciososa*, foram utilizados 9 “primers” decâmeros, os quais geraram 101 marcadores RAPD, fornecendo uma média de 11,22 marcadores por “primer”. A Figura 1, mostra o perfil de bandas, obtido com o “primer” OPA-13 para os dez isolados (Tabela 1) e exemplifica uma banda polimórfica (A) e uma monomórfica (B), bem como, os padrões de pesos moleculares expressos na canaleta λ .



FIGURA 1 - Perfil de bandas de 10 isolados de *C. perniciososa*, utilizando o “primer” OPA-13.

TABELA 2. Matriz de distâncias genéticas entre dez isolados de *C. pernicioso*, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979).

Isolados	ITU	LAV	CAM	ILH	IPI	STA	ALF	OPO	BEL	MAN
ITU	0,000									
LAV	0,388	0,000								
CAM	0,425	0,406	0,000							
ILH	0,423	0,362	0,244	0,000						
IPI	0,490	0,393	0,278	0,370	0,000					
STA	0,408	0,371	0,188	0,294	0,176	0,000				
ALF	0,504	0,481	0,365	0,469	0,265	0,282	0,000			
OPO	0,464	0,455	0,250	0,407	0,248	0,208	0,224	0,000		
BEL	0,589	0,438	0,296	0,238	0,237	0,280	0,409	0,253	0,000	
MAN	0,459	0,447	0,290	0,333	0,205	0,218	0,300	0,149	0,211	0,000

A partir das 101 bandas polimórficas, foi possível a construção de uma matriz binária relativa à presença e ausência de cada banda, em cada um dos dez isolados. Com base nessa matriz, foram calculadas as distâncias genéticas, entre os 10 isolados estudados (Tabela 2). Essa tabela mostra que a menor distância genética foi de 0,149, obtida entre os isolados, coletados no município de Ouro Preto D'Oeste – Rondônia (isolado OPO) e Manaus – Amazonas (isolado MAN), ambos os isolados de *T. cacao*. Enquanto que a maior distância genética foi de 0,589, obtida entre os isolados, coletados no município de Itumirim – Minas Gerais (isolado ITU) e Belém – Pará (isolado BEL), sendo o primeiro coletado do hospedeiro *H. acutifolia* e o segundo, do hospedeiro *T. cacao*. O isolado de *C. pernicioso*, procedente de *H. acutifolia*, um cipó da família Malphigiaceae, foi recentemente relatado por Resende et al. (2000) como sendo patogênico ao *T. cacao*.

A análise da Tabela 2, mostra que o isolado de Alta Floresta – Mato Grosso (isolado ALF), é o que tem maior distância dos demais isolados. Isso sugere a necessidade da realização de testes de patogenicidade cruzadas entre esse isolado e os demais.

O agrupamento das distâncias pelo método do vizinho mais próximo, permitiu a construção de um dendrograma (Figura 2), onde se nota que a distância genética mínima diferente de zero no nível de 99 % de probabilidade foi de 17,4 %, e mostrou a formação de um grupo principal com três isolados da Bahia (Ilhéus, Santo Amaro e Camacan) e o do Pará (Belém). Os demais isolados, foram distintos daqueles do grupo principal, sendo que o de Alta Floresta – Mato Grosso (cacau), de Itumirim e Lavras – Minas Gerais (cipó e lobeira) foram os mais divergentes. Observou-se também divergência entre os isolados da Bahia, sendo Ipiaú diferente dos demais desse Estado.

DISTÂNCIA GENÉTICA RELATIVA (%)

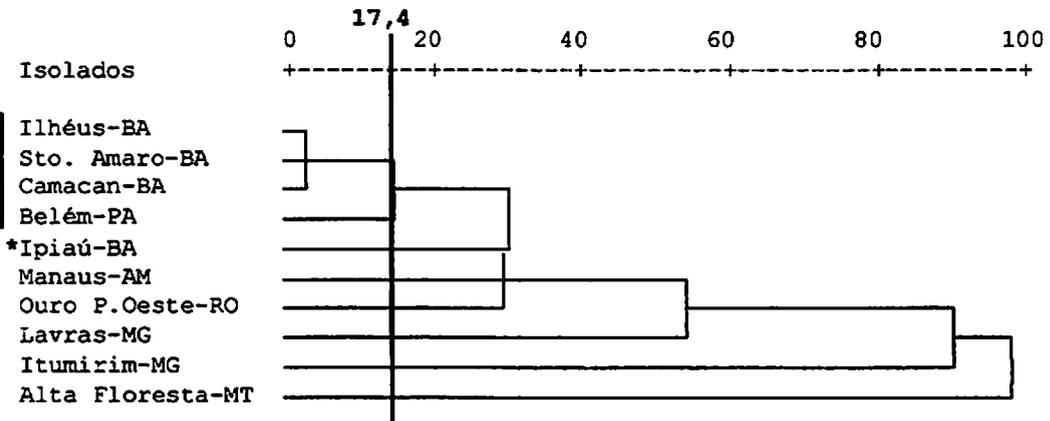


FIGURA 2 - Dendrograma de dez isolados monospóricos de *C. perniciosa*, com base na matriz das distâncias genéticas.

Os dados do dendrograma acima, corroboram com vários trabalhos usando marcadores moleculares RAPD, realizados com esse patógeno (Yamada, Andebrhan e Furtek, 1998; Andebrhan et al., 1999; Gomes, 2000), pois evidenciam que isolados coletados na mesma região geográfica tendem a ser geneticamente próximos. Entretanto, o isolado de Ipiaú mostrou-se diferente dos demais do Estado da Bahia, indicando haver diversidade genética deste patógeno nessa região.

É necessário amplificar o número de amostras de isolados em cada região geográfica, buscando-se entender a relação *T. cacao* x *C.perniciosa* em cada ecossistema, bem como testes de patogenicidade para avaliar o grau de agressividade de cada isolado.

6 CONCLUSÕES

- 1) Há divergência genética de *C. pernicios* nos seis Estados brasileiros amostrados e dentro do Estado da Bahia com base em marcadores RAPD.**
- 2) As maiores divergências genéticas ocorreram entre os isolados de hospedeiros diferentes.**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KHERB, S. M.; ROELFS, A. P.; GROTH, J. V. Diversity for virulence in a sexually reproducing population of *Puccinia coronata*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.65, n. 5, p.994-998, may 1987.
- ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S.; FALEIRO, F. G.; CARVALHO, G. A.; PAULA Jr, T. J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 85-88, mar. 1997.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprint suggest two primary outbreaks of witches' broom disease (*C. pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, p. 306-312, 1985.
- BASTOS, C. N.; SILVA, S. D. V. M.; ALMEIDA, O. C. Ocorrência de vassoura-de-bruxa em solanáceas silvestre na região produtora de cacau da Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 3, n. 2, p. 109-110, 1991.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, London, v. 12, p. 13-15. 1990.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.
- FRIAS, G. A. **An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao**, Gainesville: University of Florida, 1987. 111 p. (PhD Thesis).

- FRIAS, G. A.; PURDY, L. H. An inoculation method to evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 787-791, Aug. 1995.
- 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. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 33., 2000, Belém. **Resumos...** Brasília: SBF, 2000. p. 377.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 227-230, 1993.
- LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacauero. In: ZAMBOLIM, L. e VALE, F. X.R. (eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v. 2, p. 611-656.
- MESQUITA, A. G. G.; FALEIRO, F. G.; PAULA Jr.; T. J.; RAGAGNIN, V. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Use of molecular markers to differentiate *Colletotrichum lindemuthianum* races 89 and 69. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 58-61, mar. 1998.
- MICHELMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.
- MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BRONN, A. E. Detection of the anthracnose pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. **Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Qualification**. Wallingford: Redwood Press, 1994. p. 183-189.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms de restriction endonucleases. **Proceeding Natland Academic Science, USA**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V. DE; CASTRO, H. A. DE; SILVA, L. H. C. P. DA; CARVALHO, J. A. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 4, p. 523-527, 1999.
- OTOYA, M. M.; RESREPO, S.; PASTOR-CORALES, M. Amplificación al azar del ADN polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia. *Fitopatologia Colombiana*, v. 19, p. 7-14, 1995.
- RESENDE, M. L. V. de; NOJOSA, G. B. A.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacauero. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n.1, p. 88-91, 2000.
- SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; ALMEIDA, O. C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. *Agrotropica*, Ilhéus, v. 4, n. 1, p. 17-21, jan./abr. 1992.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data, IN: SYMPOSIUM APLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992, Minneapolis, MN. *Proceedings...* Minneapolis, MN.: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.
- VILARINHOS, A. D.; PAULA Jr., T. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 194-198, jun. 1995.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, Oxford, v. 37, n. 4, p. 475-488, dec. 1988.
- YAMADA, M. M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationships to isolates from *Theobroma cacao*. *Agrotropica*, Ilhéus, v. 10, n. 2, p. 123-126, maio/ago. 1998.

CAPÍTULO 3

PATOGENICIDADE DE *Crinipellis pernicioso*, EM *Theobroma cacao* L.

3 INTRODUÇÃO

Diferentes cultivares de cada espécie manifestam diferentes graus de resistência à incidência de patógenos, entretanto, somente a partir de 1900, com o progresso dos conhecimentos sobre herança da resistência, foi possível determinar graus de resistência a patógenos ou raças destes, e a interação genética do hospedeiro com o patógeno. Dependendo do objetivo do estudo, são utilizados diferentes termos para se referir à resistência de plantas à enfermidades (Nelson, 1978; Robinson, 1969 e 1976).

Van der Plank (1963 e 1968) postulou que a resistência de plantas à doença pode ser classificada em dois níveis: Resistência vertical e horizontal. Conceituou como resistência vertical ou específica, aquela de natureza oligogênica, que atua com grande eficiência sobre raças específicas do patógeno, enquanto a resistência horizontal, inespecífica, ou de campo é de natureza poligênica, sendo ativa contra todas as raças do patógeno, embora com menor eficiência, podendo ser afetada por fatores do ambiente. A resistência vertical envolve mecanismos cuja herança é governada por poucos genes, geralmente dominantes, sendo portanto geneticamente mais fácil de ser manipulada (Robinson, 1971). A resistência horizontal é governada, na maioria das vezes, por muitos genes, sendo difícil identificá-los individualmente. Nenhum gene possui um efeito tão grande para que possa ser seguido e localizado, conhecendo-se apenas o efeito combinado dos genes como um todo (Van der Plank, 1968). A resistência vertical é preferida, em alguns programas de melhoramento, principalmente em culturas de ciclo curto.

Enquanto a resistência vertical pode oferecer controle completo de uma doença é também passível de ser “quebrada”. Tanto o tempo decorrido para

quebra, quanto sua importância, dependem da natureza da enfermidade (Robinson, 1971). Provavelmente, a resistência vertical nunca ocorre desacompanhada da resistência horizontal, porque se tal fato ocorresse, a planta hospedeira atuaria como meio de cultura ideal para o patógeno. A resistência horizontal ocorre em todas as plantas contra todos os patógenos, apesar de algumas cultivares não apresentarem controle a um nível agrônomico satisfatório (Robinson, 1976). O valor da resistência vertical pode ser consideravelmente aumentado, quando reforçado com níveis úteis de resistência horizontal (Macer, 1960; Robinson, 1973; Van der Plank, 1963).

A resistência vertical, do ponto de vista epidemiológico, por ser eficiente apenas contra algumas raças do patógeno e não contra todas, age no sentido de reduzir a quantidade efetiva de inóculo inicial (X_0), retardando o início da epidemia (Robinson, 1976; Van der Plank, 1968). A resistência horizontal, por ser efetiva contra todas as raças do patógeno, reduz a taxa de desenvolvimento da epidemia (r), sem afetar, significativamente, o inóculo inicial. Todos os seus efeitos são parciais ou podem atuar simultaneamente: menor número de esporos podem infectar a folha e causar lesões; as lesões podem se desenvolver mais lentamente; as lesões demoram mais tempo para produzir esporos e os esporos são menos abundantes (Van der Plank, 1963; Robinson, 1971; Nelson, 1978; Camargo e Bergamin Filho, 1995).

Quando cultivares do hospedeiro inoculadas com raças do patógeno apresentam interação diferencial, diz-se que, as cultivares possuem resistência vertical. Quando raças e cultivares não apresentam interação diferencial, têm-se então, cultivares com resistência horizontal (Van der Plank, 1968; Robinson, 1969).

Wheeler e Mepsted (1988), avaliando os resultados de 30 experimentos

sobre a variabilidade patogênica, entre isolados de *C. pernicioso* de cacau, de várias áreas da Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Trindade e Venezuela sugeriram a existência de dois grupos, ou populações de *C. pernicioso* no cacau cultivado. Um grupo A, composto de isolados da Bolívia, Pichilingue (Equador) e a maioria dos isolados testados da Colômbia, os quais induziram sintomas severos no cacau Scavina 6, bem como, em um dos seus pais; e o outro grupo (B), composto de isolados do Brasil, Trindade e Venezuela, os quais não causaram sintomas severos no SCA 6. Isolados do Equador, especialmente do oriente, um centro de diversidade de *T. cacao*, demonstraram uma variação de patogenicidade comparável à encontrada entre os isolados do cacau cultivado sobre extensas áreas.

Existem algumas hipóteses, que tentam explicar a variabilidade patogênica dos diferentes isolados de *C. pernicioso*, dentre elas Wheeler e Mepsted (1988) citam uma comunicação pessoal de Gregory (1978), que relata a formação de vassoura. Na vassoura oriunda de um basidiósporo simples, o micélio resultante provavelmente é autodicariótico. Entretanto, quando a vassoura é formada da infecção de múltiplos basidiósporos, anastomoses vegetativas entre micélios de diferentes basidiósporos podem dar oportunidade ao surgimento de heterocários no micélio saprofítico, aumentando conseqüentemente, a variabilidade na próxima geração de basidiósporos. O teste dessa hipótese é de fundamental interesse, porque o potencial de diversidade desse patógeno, especialmente dentro de uma região produtora de cacau, é importante no planejamento de programas de manejo da doença, que incluem o uso da resistência do hospedeiro.

Na Amazônia brasileira, visando avaliar a resistência de *T. cacao* a *C. pernicioso*, os autores Fonseca e Albuquerque (1999) avaliaram 521 clones de

cacaueiros oriundos de diversas bacias hidrográficas da região, instalados no banco de germoplasma da CEPLAC em Belém – Pará, sob pressão natural de inóculo. Verificaram que a melhor relação entre a quantidade de clones coletados e os selecionados foi obtida no Estado de Rondônia (35/29), seguida pelo Acre (117/44), Amazonas (200/68) e Pará (46/12).

Fonseca et al. (1999), avaliaram a incidência de *C. pernicioso* em híbridos de *T. cacao* no Estado de Rondônia e verificaram que os descendentes de SCA 6 apresentaram baixa incidência de sintomas da doença, quando a pressão de inóculo natural era baixa, porém comportavam-se como suscetíveis a medida que a quantidade de inóculo aumentava. As menores taxas de sobrevivência do "stand" de plantas foram observadas nos híbridos de SCA 6 x ICS 1 (55 %) e IMC 67 x SIAL 69 (44 %). Neto, Almeida e Machado (1999), também avaliaram o desempenho de híbridos de cacaueiros sob pressão natural de inóculo e verificaram que a média de perdas de frutos era em torno de 60%, em Ouro Preto D'Oeste, Rondônia.

Luz et al. (1999) avaliaram progênies de cacau quanto a resistência/tolerância a *C. pernicioso* no sudeste da Bahia e verificaram que, dentre outras progênies, SCA 6 apresentou características de resistência/tolerância a este patógeno, quando inoculadas com isolados oriundos de vassouras secas do município de Camacan. Pires et al. (1999) relatam a mesma resistência/tolerância de SCA 6, quando avaliado em condições de campo.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a patogenicidade de três isolados de cacau, provenientes da Amazônia brasileira, inoculados em quatro clones de cacau, utilizados no melhoramento genético na Bahia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG, no período de novembro a dezembro de 1999.

4.1 Material genético

As mudas de cacau foram preparadas no Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC, Ilhéus –BA, durante os meses de maio a outubro de 1999. Os genótipos utilizados foram ramos plagiotrópicos dos clones: Scavina 6, IMC 67 e RB 29, como padrões de resistência, e um tipo de cacau comum – SIAL 69, como padrão de suscetibilidade foram selecionados e coletados no BAG – Banco Ativo de Germoplasma do CEPEC e enxertados, na forma de garfagem no topo, com fenda aberta, em porta enxerto de cacau comum, plantado em saquinhos de polietileno de 2 kg, com idade de 8 meses (Figura 1). Após o pegamento dos enxertos, as mudas enxertadas foram transportadas para casa-de-vegetação, do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em Lavras, MG, região não produtora de cacau.



FIGURA 1: A - Enxertia de uma planta.

B - Desenvolvimento dos clones sessenta dias após a enxertia.

4.2 Produção de inóculo

Vassouras verdes foram enviadas para Lavras - MG, pelas unidades da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, localizadas nos municípios de Manaus-AM, Belém-PA e Ouro Preto D'Oeste-RO. No Laboratório de Patologia de Sementes – LAPS, da UFLA, procedeu-se o isolamento do patógeno, a partir dessas vassouras, utilizando meio BDA e, após repicagens, obteve-se culturas puras desses isolados.

Em seguida, os isolados foram repicados para meio artificial, à base de farelo-vermiculita, cuja metodologia de Griffith e Hedger (1993) foi melhorada por Niella et al. (1999). Os basidiósporos produzidos foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido, seguindo-se metodologia de Frias (1987 e 1995). Figuras 2 (A- C).

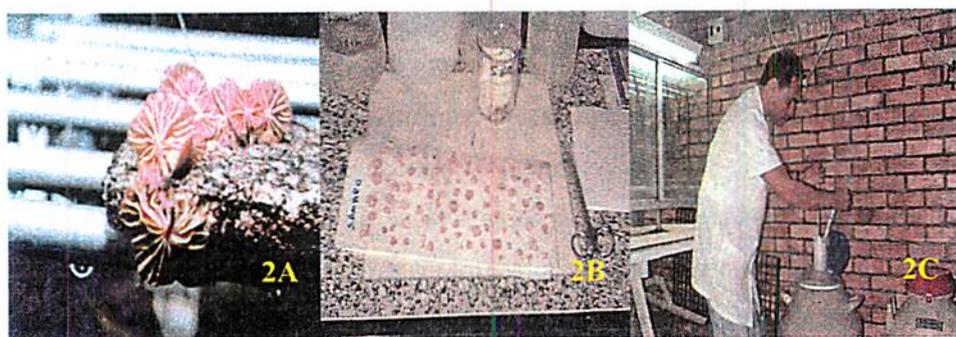


FIGURA 2: A - Basidiomas produzidos in vitro.

B - Coleta de basidiocarpos.

C - Armazenamento das suspensões de basidiósporos.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, no esquema fatorial (3 isolados x 4 clones), com 5 blocos de 6 plantas cada. Sessenta dias após a inoculação foi realizada a avaliação, estabelecendo-se a incidência de doença.

4.4 Inoculação

Utilizou-se uma concentração de $1,0 \times 10^5$ basidiósporos viáveis/mL, sendo realizado o teste de viabilidade em lâminas escavadas, colocando-se 10 μL da suspensão de basidiósporos em 50 μL de água destilada estéril, por cavidade, incubando-se em câmara úmida, montada em placa de Petri e, quantificando-se a porcentagem de germinação 4 horas depois. A inoculação foi realizada, utilizando-se atomizador manual, aplicando-se, aproximadamente, 1 mL da suspensão de basidiósporos por muda.

As inoculações foram realizadas após as 18:00 horas, mantendo-se as mudas 24 horas antes sob nebulização, com uma umidade relativa (UR) do ar próxima à saturação (100%). As mudas tiveram suas folhas cortadas em 2/3, um dia antes da inoculação, para acelerar a emissão de novos brotos. Após a inoculação, por um período de 24 horas, foi mantida a UR próxima a 100%.

Para evitar a deriva do inóculo, durante as pulverizações, foram utilizadas cortinas de polietileno, separando os tratamentos, utilizando um atomizador para cada isolado.

4.5 Avaliação

Sessenta dias após inoculação, foi avaliado a presença ou ausência de sintoma de vassoura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia, incitou doença em todos os 4 clones estudados, sendo o único capaz de provocar sintomas em Sca 6. Manaus, Amazônia, provocou maior incidência de sintomas em RB 29 e SIAL 69. E Belém, Pará, foi o menos agressivo dos três, apresentando níveis de incidência inferiores a 5% (Figura 1).

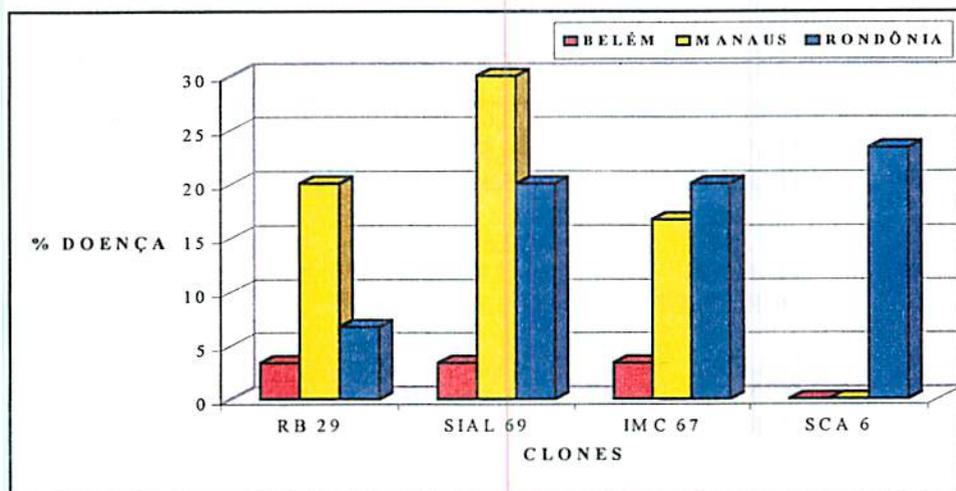


FIGURA 1. Incidência da vassoura-de-bruxa em quatro clones de cacau, sessenta dias após a inoculação com três isolados, provenientes da região amazônica.

A transformação dos dados através do arco seno e análise conjunta pelo método dos quadrados mínimos ponderados (Tabela 1), que considera o intervalo de confiança, entre limite inferior e superior, retrata que o isolado de Ouro Preto D'Oeste, inoculado no clone SCA 6 apresentou maior média de proporções estimadas de incidência de doença que os demais isolados, quando

inoculados sobre este clone. Inoculações posteriormente realizadas na UFLA, com o isolado de Ouro Preto D'Oeste, sobre mudas seminais de SCA 6, resultaram em 80% de incidência da doença (Resende, 2000, comunicação pessoal*), corroborando com os resultados aqui encontrados para material clonal.

TABELA 1. Proporções estimadas de incidência de doença. Análise conjunta pelo método dos quadrados mínimos ponderados (dados transformados em arc. seno).

CLONE	ISOLADO	LIM. SUPE.	LIM. INFE.	MEDIA
SIAL 69	BELEM	2,6	0,0	0,6
SIAL 69	MANAUS	6,5	2,4	4,4
SIAL 69	OURO PRETO	5,3	1,3	3,3
RB 29	BELEM	2,6	0,0	0,6
RB 29	MANAUS	5,3	1,3	3,3
RB 29	OURO PRETO	3,1	0,0	1,1
IMC 67	BELEM	3,4	0,0	1,4
IMC 67	MANAUS	5,0	1,0	3,0
IMC 67	OURO PRETO	5,3	1,3	3,3
SCA 6	BELEM	2,6	0,0	0,6
SCA 6	MANAUS	2,0	0,0	0,0
SCA 6	OURO PRETO	5,9	1,9	3,9

*Professor Mário Lúcio Vilela de Resende, Professor de Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, 2000, comunicação pessoal.

Os isolados de Ouro Preto D'Oeste e Manaus tiveram comportamento diferenciado a 5%, quando inoculados sobre SIAL 69 e SCA 6. Pela análise dos dados dessas reações, plotados na Figura 2, observou-se que ocorreu uma interação diferencial a 5%, entre isolados e clones, demonstrando a existência de especialização fisiológica desse patógeno, ao nível de raça.

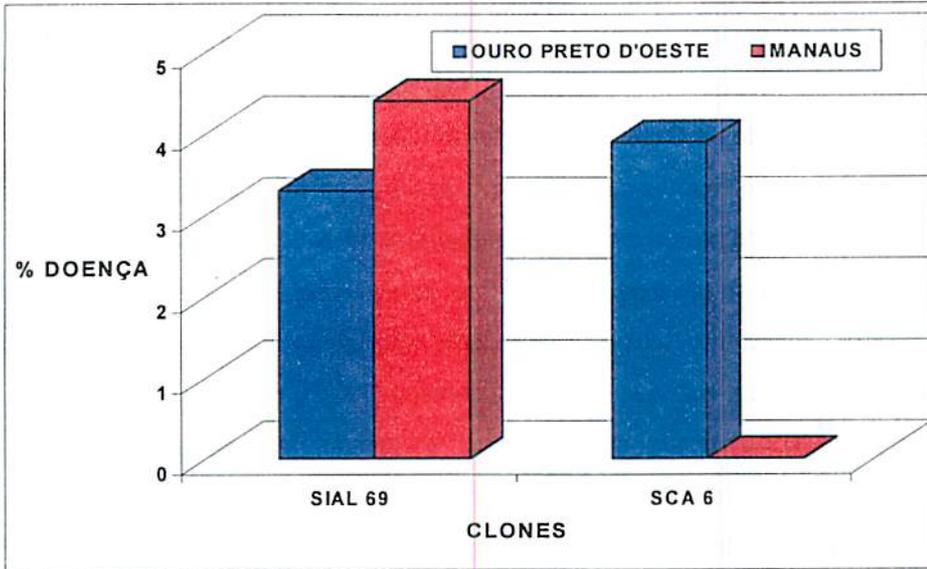


FIGURA 2. Interação diferencial entre dois isolados de *C. pernicioso* e dois clones de cacau.

Os resultados encontrados estão em concordância com os de Wheeler e Mepsted (1988), os quais postularam a existência de pelo menos duas populações de *C. pernicioso*, em cacau, na América do Sul, afirmando que isolados da Bolívia, Equador e a maioria dos isolados da Colômbia eram patogênicos a SCA 6, enquanto que os isolados do Brasil, Trindade e Venezuela não eram patogênicos.

A suscetibilidade de SCA 6 a *C. pernicioso*, sob pressão elevada de inóculo, confirmam os resultados obtidos em Rondônia por Fonseca et al., (1999). Porém, até o presente, não foi constatada suscetibilidade de SCA 6 a *C. pernicioso* no sudeste da Bahia, sendo utilizada como padrão de resistência nos testes de seleção de plantas para o melhoramento genético do cacauero (Luz et al., 1999). Entretanto, só foram utilizados isolados de duas regiões, Camacan e Ilhéus, sendo necessário avaliar isolados dos demais municípios desta região produtora de cacau.

O isolado de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia, pode ter sido originado da população da Bolívia, Equador ou da Colômbia, ou ter ocorrido mutação nesse Estado, suficiente para quebrar a resistência de SCA 6. Tais resultados apontam para a presença de resistência vertical, no ecossistema *T. cacao* x *C. pernicioso*, podendo, entretanto, haver resistência horizontal não detectada nesse experimento, uma vez, que segundo Robinson (1976), resistência vertical nunca ocorre desacompanhada da resistência horizontal. Atualmente, estão sendo realizados em Lavras, testes de patogenicidade, com isolados de *C. pernicioso*, provenientes da Bahia, objetivando verificar a agressividade desses sobre SCA 6.

6 CONCLUSÕES

- 1) O isolado de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia, foi o único capaz de provocar sintomas em SCA 6.
- 2) O isolado de Manaus, Amazônia, foi o mais agressivo em SIAL 69.
- 3) O isolado de Belém, Pará, foi o menos agressivo dos três isolados testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: CERES, 1995. p. 729-758.
- FONSECA, S. E. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B. de. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 149-153.
- FONSECA, S. E. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B. de; MOTA, J. W. da S.; NETO, E. F.; ALMEIDA, C. M. V. C. de. Incidência de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em híbrido de *Theobroma cacao* L. no Estado de Rondônia. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 201-206.
- FRIAS, G. A. **An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao**, Gainesville: University of Florida, 1987. 111 p. (PhD Thesis).
- FRIAS, G. A.; PURDY, L. H. An inoculation method to evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 787-791, 1995.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 227-230, 1993.

- LUZ, E.D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; PINTO, L. R. M.; BRUGNEROTTO, M. I.; PAIM, M. C. A. Evaluation of cocoa progenies in Bahia, Brazil, for resistance to *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 219-226.
- MACER, R.C.F. Nature and explanation of crop plants resistant to disease. **Nature**, v. 186, p. 857-859, 1960.
- NELSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 359-378, 1978.
- NETO, E. F.; ALMEIDA, L. C. de; MACHADO, P. F. R. Desempenho de híbrido de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) sob pressão natural de inóculo de *Crinipellis pernicioso* na Amazônia brasileira. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 463-468.
- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V. DE; CASTRO, H. A. DE; SILVA, L. H. C. P. DA; CARVALHO, J. A. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 523-527, 1999.
- PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; PINTO, L. R. M.; LUZ, E.D. M. N. Resistance to witches' broom - evaluation of genotypes from different origins. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1999. p. 389-397.
- ROBINSON, R.A. Disease resistance terminology. **Review of Applied Mycology**, v. 48, p. 593-606, 1969.
- ROBINSON, R.A. Vertical resistance. **Review of Plant Pathology**, v. 50, p. 233-239, 1971.

- ROBINSON, R.A. Horizontal resistance. **Review of Plant Pathology**, v. 52, p. 483-501, 1973.
- ROBINSON, R.A. **Plant Pathosystems**. Springer-Verlag. New York, 1976, 184p.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. Academic Press, New York, 1963, 349 p.
- VAN DER PLANK, J. E. **Disease Resistance in Plants**. Academic Press. New York, 1968, 206 p.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 475-488, dec. 1988.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aprimoramento na metodologia de produção *in vitro* de *C. pernicioso*, possibilitará o desenvolvimento de outras pesquisas, relacionadas ao manejo integrado, cada vez mais ajustado a realidade de campo da doença vassoura-de-bruxa do cacauieiro. Por ser uma etapa crucial nos estudos das relações patógeno x hospedeiro, a produção abundante e contínua de inóculo consistia num ponto de estrangulamento das pesquisas com esse fungo. A demanda constante, por parte da comunidade científica, que trabalha com *C. pernicioso*, conduziu-nos a publicação imediata dos resultados obtidos nessa etapa, e outros trabalhos já estão em curso, utilizando essa metodologia. Um exemplo disso, são os estudos do genoma funcional desse patógeno, os quais estão se iniciando na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – SP, em parceria com a CEPLAC, UESC e EMBRAPA.

Com a possibilidade da produção, *in vitro*, de inóculo, pode-se estabelecer um cronograma de trabalho, pautado no fato de que no período de verão, no sul da Bahia, é inadequado à realização de inoculações, aproveitando esse período para produzir e armazenar inóculo. Considerando-se que o período máximo de produção das bolachas foi de 52 dias, pode-se realizar uma escala de produção, renovando as unidades, à medida que o tempo de produção se aproxima dos 60 dias. Essa informação é relevante para o processo contínuo de obtenção de inóculo.

Os controles biológico e químico poderão utilizar a metodologia para ensaios *in vitro*, testando a ação antagonista de outros microorganismos, bem como o efeito direto de produtos químicos sobre *C. pernicioso*. O estudo de

hospedeiros alternativos de *C. pernicioso* poderá ser incrementado, produzindo-se inóculo de outros hospedeiros, e os basidiósporos obtidos, utilizados para inoculações cruzadas com o cacau. Será possível saber qual, ou quais hospedeiros são patogênicos ao *T. cacao*.

Os resultados dos estudos com marcadores moleculares RAPD, permitiram concluir que existem variabilidades genéticas em *C. pernicioso* e que existem isolados geneticamente muito diferentes. Informações recentes, atestam que o *Heteropterys acutifolia*, um cipó encontrado em matas ciliares, no município de Itumirim, Minas Gerais, é patogênico ao cacau. As análises da distância genética relativa apontam que os isolados, próximos ao isolado de Itumirim, são de *Solanum lycocarpum* (lobeira) e um isolado de cacau de Alta Floresta, Mato Grosso. Seria interessante produzir inóculo desses isolados, utilizando a metodologia de produção in vitro e realizar inoculações em cacau. Testes preliminares com *S. lycocarpum* não revelaram patogenicidade desse ao cacau. Entretanto, vale ressaltar que a experiência com inoculações, no sul da Bahia, revelaram ser inexistente a presença de sintomas em cacaueiros, quando feitas inoculações no período de temperaturas elevadas (verão).

Marcadores moleculares podem ser uma ferramenta muito importante, na seleção de isolados, para testes de patogenicidade. A realização de testes de patogenicidade, com culturas perenes, algamas, que não têm um protocolo estabelecido de propagação vegetativa, é de difícil condução. Com a informação de que isolados de uma mesma região geográfica têm tendências de serem geneticamente próximos, podem-se utilizar os marcadores moleculares, para realizar agrupamentos e selecionar isolados representantes de cada grupo, máximo de 2, para compor os indivíduos, que farão parte dos testes de patogenicidade. Essa estratégia reduz, consideravelmente, o trabalho, tempo, mão-de-obra e recursos financeiros.

Testes de patogenicidade com 3 isolados da Amazônia brasileira revelaram que um isolado de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia, foi patogênico ao clone Scavina 6, utilizado no programa de melhoramento genético do cacaueteiro na Bahia. Outros isolados de regiões geográficas diferentes, como Santo Amaro da Purificação (recôncavo) e Itamaraju, municípios, geograficamente opostos, (norte e sul) do Estado da Bahia, necessitam ser avaliados, quanto ao grau de patogenicidade dos materiais considerados tolerantes. Recentemente, foram feitas inoculações com material genético de Santo Amaro da Purificação, Bahia. Trabalhos semelhantes, com isolados de Itamaraju, estão programados e em curso de execução.

Batalhas importantes foram vencidas na luta contra a vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. Entretanto, muitas informações ainda permanecem indisponíveis e necessitam ser pesquisadas para se buscar um convívio tecnicamente aplicável e economicamente viável para essa doença.

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A	Meio de cultura líquido de Mills, Sreenivasaprasad e Bronn (1994).....	75
TABELA 2A	Reação de amplificação, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998).....	75

TABELA 1A. Meio de cultura líquido de Mills, Sreenivasaprasad e Bronn (1994).

INGREDIENTES	QUANTIDADES
Extrato de levedura	5 g
Glicose	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL (5% P/V)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (1% P/V)

O volume foi completado para 1000 mL, com água destilada deionizada, e autoclavou-se a 121 °C, a 1 atm, durante 20 minutos.

TABELA 2A. Reação de amplificação, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998).

INGREDIENTES	QUANTIDADES
Água bidestilada autoclavada	3,02 μL
Tampão PCR 10 vezes	1,30 μL
MgCl_2 a 25 mM	1,00 μL
dNTPs a 2,5 mM	1,04 μL
BSA purificada a 10 mg/mL	1,04 μL
Taq DNA Polimerase	0,10 μL
“Primer” a 0,4 mM	2,50 μL
DNA a 10 ng/ μL	3,00 μL

As reações RAPD foram feitas em um volume total de 13 μL .