

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
MESTRADO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

FÁBIO COSTA FARIAS

**DETECÇÃO DA DIVERSIDADE E ASSOCIAÇÃO DE *Lasiodiplodia
theobromae* COM O CAJUEIRO UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

**FORTALEZA
2008**

FÁBIO COSTA FARIAS

DETECÇÃO DA DIVERSIDADE E ASSOCIAÇÃO DE *Lasiodiplodia theobromae* COM O
CAJUEIRO UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitotecnia, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia/Fitotecnia

Área de concentração: Fitotecnia

Orientador: Prof. PhD. José Emilson Cardoso

FORTALEZA
2008

F238d Farias, Fábio Costa
Detecção da diversidade e associação de *Lasiodiplodia theobromae*
com o cajueiro utilizando marcadores microssatélites / Fábio Costa Farias,
2008.

42f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Ph. D. José Emilson Cardoso

Área de concentração: Fitotecnia

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências Agrárias. Depto. de Fitotecnia, Fortaleza, 2008.

1. SSR 2. Resinose 3. PPH 4. Caju I. Cardoso, José Emilson (orient.)
II. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Agronomia
/Fitotecnia III. Título

CDD 631

FÁBIO COSTA FARIAS

DETECÇÃO DA DIVERSIDADE E ASSOCIAÇÃO DE *Lasiodiplodia theobromae* COM O
CAJUEIRO UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Aprovada em: 25 / 07 / 2008

Prof. PhD. José Emilson Cardoso (Orientador)
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Ervino Bleicher
Professor da Universidade Federal do Ceará

Dr. Francisco Marto Pinto Viana
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que me deu força e coragem para persistir nesta árdua caminhada.

A meus pais José Lamartine Farias e Teresinha Dinis Costa Farias pela dedicação, carinho e amor por todos esses anos, sempre procurando me proporcionar melhores condições.

Aos meus irmãos Tércio Costa Farias, Lícia Costa Farias e Régia Costa Farias pelo companheirismo.

A minha namorada Luciana Ferreira de Lima pelo amor, carinho, dedicação compreensão e renúncia.

A todos os tios, tias, primos e primas, que esta conquista seja uma homenagem, pois todos contribuíram para sua realização.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade para a realização deste curso.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Funcap, pela concessão de bolsa.

Ao CNPq pela colaboração financeira.

À Embrapa Agroindústria Tropical que através do Macroprograma 3 possibilitou a realização deste trabalho.

Em especial, ao Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, José Emilson Cardoso pela amizade, oportunidade, orientação e apoio.

A Dr. Marto pela amizade, paciência e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Dr. Ervino Bleicher pela amizade, credibilidade, força, confiança, paciência e por ter me tolerado durante todos estes anos de convívio.

À equipe de estagiários e pesquisadores dos Laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular que direta ou indiretamente colaborou para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos: João Gutemberg, Ciro, Naide, Janser, Sadi, Elivan, Fred, Franzé, Herbeth, Glauber, Raul, Ariadne, Carol, Virgínia, Fabrícia, Giovana, Juliana, Nilvia, Alexandre Campos, Fabiana, Zirlane, Conceição, Ana Lúcia, Alexandre Bosco por tolerarem a mim e as minhas brincadeiras.

Em especial aos amigos Alex, Cássia, Eveline, Jefté e Tomil pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

“Não há nada que seja maior evidência de insanidade do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes”.

Albert Einstein

RESUMO

A cultura do cajueiro representa uma das mais importantes atividades agroindustriais do Nordeste do Brasil, sobretudo pelo seu caráter social e econômico para esta região. Entretanto, a ocorrência epifítica de doenças como a resinose e a podridão-preta-da-haste, ambas causadas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, têm produzido severas perdas principalmente nas regiões semi-áridas. Essas já assumem a posição de principais doenças em algumas regiões do semi-árido nordestino. Entretanto, os conhecimentos básicos sobre a biologia populacional, constituição genética e interação do patógeno com as plantas hospedeiras, por exemplo, são reduzidos e superficiais, não permitindo significativos avanços no manejo dessas enfermidades. Este estudo teve como objetivos estabelecer uma população de isolados *L. theobromae* associados ao cajueiro em diferentes micro-regiões do nordeste brasileiro, determinar a capacidade deste fungo sobreviver endofiticamente em tecidos de cajueiro e caracterizar geneticamente essa população usando marcadores microssatélites. Inicialmente, foram coletadas amostras de caules de cajueiro em três ecossistemas naturais brasileiros visando isolar o patógeno. Foi estabelecida uma população de 41 isolados de *L. theobromae* associados ao cajueiro. Bioensaios visando a determinação da sobrevivência do fungo em tecidos não infectados, mas próximos às lesões foram desenvolvidos a partir de amostras de caules com resinose. Uma sub-população de 15 isolados de *L. theobromae* foi usada na extração de DNA e posterior submissão a reações de polimerase (PCR) em cadeia usando 15 *primers* flanqueadores de regiões contendo seqüências simples repetidas (microssatélites). Os produtos amplificados do PCR foram observados em gel de eletroforese corados com brometo de etídio e analisados pelo método de agrupamento não balanceado baseado na média aritmética (UPGMA), estimando-se as similaridades genéticas pelo coeficiente de Nei e Li. *L. theobromae* foi isolado de tecidos do caule do cajueiro até 90 cm de distância da extremidade da lesão característica de resinose nos dois sentidos (ascendente e descendente) em relação à lesão, confirmando o comportamento endofítico desse fungo em cajueiro. Uma grande variabilidade genética da população avaliada, representada por 16 grupos de similaridade variando de 91% a 5%, foi observada. Nenhum isolado foi igual (100% similaridade). As maiores similaridades (91%) foram observadas entre isolados comprovadamente patogênicos e supostamente endofíticos.

Palavras chave: SSR, PCR, Resinose, Podridão preta das hastes.

ABSTRACT

The cashew crop is one of the most important agribusiness activity in northeastern Brazil, mainly due to its social and economic impact in that region. Nevertheless, severe outbreaks of gummosis and black branch dieback, both caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* have imposed great losses under semi-arid conditions. Presently, these diseases are the most important ones over semi-arid conditions in Northeast Region. However, the limited amount of basic knowledge about population biology, genetic structure and pathogen, host and environment interaction are likely to hinder the efforts to manage this pathogen. This study was developed in order to establish a *L. theobromae* population associated with cashew plant from different ecological regions in the northeastern Brazil, to determine the survival endophytic ability of this fungus in cashew tissues and to characterize this population by using microsatellite markers. Initially, samples of cashew stems were gathered from three natural ecosystems in Brazil in order to isolate *L. theobromae*. A population of 41 isolates associated with cashew was obtained. Bioassays aiming to determine the surviving ability of this fungus in non infected tissues close to gummosis lesions were conducted using sampled stems. A subpopulation of 15 isolates of *L. theobromae* was used for DNA extraction followed by polimerase chain reaction (PCR) using 15 oligonucleotides primers designed to amplify microsatellites regions. PCR products were observed on agarose gel in ethidium bromide electrophoresis and analyzed by the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) by the Nei and Li similarity coefficient. *L. theobromae* was successfully isolated from cashew tissues as far as 90 cm from the border of the gummosis lesion in both up and down directions. This result confirms the endophytic behavior of this fungus in cashew plant. A great genetic variability of *L. theobromae* population was observed as determined by 16 similarities groups varying from 91% to 5%. None isolate achieved 100% similarity. The greatest similarity was found between pathogenic and endophytic isolates.

Keywords: SSR, PCR, Gummosis, Black branch dieback.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Características morfológicas de *Lasiodiplodia theobromae*. A - crescimento micelial em meio de cultura. Foto: M. A. Khanzada; A. M. Lodhi; S. Shahzad; B – conídios maduros. Foto: F. C. Farias. 16
- Figura 2 – Sintomas típicos da resinose do cajueiro. A – ramo apresentando grande quantidade de resina (goma). B – porta enxerto apresentando necrose escura sob a casca, C – planta de cajueiro anão-precoce (CP-76) exibindo morte parcial dos ramos. Fotos: J.E. Cardoso 17
- Figura 3 – Sintomas típicos da podridã-preta-da-haste do cajueiro (PPH). A – detalhe da PPH no ramo B – sintomas gerais na copa. . Fotos: J.E. Cardoso. 18
- Figura 4 – Mapas apresentando os estados e os municípios onde foram coletadas as amostras referidas na Tabela 1..... 22
- Figura 5 – Gel de agarose submetido a eletroforese para visualização de amostras de extração de DNA em transluminador. Foto: F. C. Farias..... 27
- Figura 6 – Amplificações em gel de agarose submetidas a eletroforese de reações de polimerase em cadeia (PCR) do isolado 32 (Tabela 1) de *Lasiodiplodia theobromae* com 15 iniciadores que flanqueiam regiões contendo marcadores microssatélites. Foto: F. C. Farias..... 29
- Figura 7 – Porcentagem de isolamento de *Lasiodiplodia theobromae* de tecido de cajueiro conforme a distancia do cancro (0). Os dados representam médias de quatro repetições. 32
- Figura 8 – Porcentagem de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* isolado de tecido de cajueiro conforme a distância e a posição, descendente e ascendente, em relação ao cancro. 33
- Figura 9 – Dendrograma representando a variabilidade genética de 18 isolados de *L. theobromae* calculado com base nas reações de polimerase em cadeia com 15 pares de iniciadores que flanqueiam regiões contendo marcadores microssatélites..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – População de <i>L. theobromae</i> obtida a partir das amostras de cajueiro (anão e comum) e outras espécies, coletadas em diferentes estados brasileiros, Fortaleza, CE. 2008	21
Tabela 2 – Relação de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> utilizados nas reações de polimerase em cadeia, Fortaleza, CE. 2008.....	27
Tabela 3 – Lista de “Primers” utilizados nas reações de PCR, para a determinação da variabilidade genética dos diversos isolados de <i>L. theobromae</i> de cajueiro. Fortaleza, CE. 2008	28
Tabela 4 – Relação dos reagentes utilizados para uma reação de PCR com N amostras, Fortaleza, CE. 2008	29
Tabela 5 – Tipo de cajueiro, localização das plantas e presença ou ausência de sintomas da resinose que produziram colônias de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , Fortaleza, CE. 2008.	31

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
SUMÁRIO	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Anacardium occidentale</i> L.	14
2.2 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	15
2.2.1 Resinose	16
2.2.2 Podridão preta das hastes (PPH)	18
2.3 Marcadores moleculares	18
2.3.1 Seqüência simples repetidas (SSR) ou Microsatélites	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Coleta de amostras	21
3.2 Isolamento do fungo	24
3.3 Determinação da presença do patógeno ao longo do ramo a partir da lesão	24
3.4 Extração de DNA	25
3.5 Reações de polimerase em cadeia (PCR)	27
3.6 Análise dos dados e obtenção de dendograma	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Coleta e isolamento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	31
4.2 Determinação da presença do patógeno ao longo do ramo a partir da lesão	32
4.3 Análise dos dados e obtenção de dendrograma	34
5 CONCLUSÃO	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L. é uma planta encontrada em quase todo o mundo tropical, embora em termos de importância econômica sua exploração restrinja-se à Índia, Brasil, Moçambique, Tanzânia (PIMENTEL, 1988) e Vietnã, este se destacando como maior produtor mundial (FAO, 2007). Segundo Barros *et al.* (1993), o cajueiro é originário do Brasil, onde pode ser encontrado em todo o território. Pimentel (1996) complementa, mostrando que o Ceará, o Piauí e o Rio Grande do Norte são responsáveis por 94% da produção nacional.

A produção anual de castanha tem experimentado um acentuado declínio nos últimos dez anos (IBGE, 2007), face a uma série de fatores relacionados, entre outros, com a obsolescência dos pomares, manejo inadequado e variações climáticas e mercadológicas. Entretanto, a cultura do caju ainda tem um importante papel social a cumprir, através da provisão de alimento natural rico em vitaminas e sais minerais, acessível às populações mais pobres, bem como pela possibilidade de contribuir para a redução do fluxo migratório para os centros urbanos, uma vez que propicia um meio de ocupação e renda durante a entressafra da agricultura de subsistência. Estima-se que atualmente o setor produtivo do caju empregue cerca de 62 mil trabalhadores rurais no Nordeste (IBGE, 2007).

A cadeia produtiva do caju representa cerca de 170 milhões de dólares para o Brasil, embora movimente de ponta a ponta da cadeia mais de 600 milhões de dólares. Estes dados, entretanto, estão bem abaixo do volume potencial que esta cultura pode oferecer, uma vez que, para uma área de 615.303 hectares de cajueiros (IBGE, 2007) estas cifras estão realmente aquém das reais possibilidades caso os índices de produtividade atingissem pelo menos parte do potencial produtivo das cultivares melhoradas do tipo anão, por exemplo. Obviamente, existem vários fatores que concorrem para este declínio, mas o sistema de cultivo, ainda desprovido de técnicas de manejo dos fatores relacionados à produção, como doenças e pragas, representam pontos críticos nesta queda de produção. O semi-extrativismo predominante deve ceder lugar para sistemas modernos, competitivos e auto-sustentados sob pena do declínio persistir ainda mais.

O potencial sócio-econômico do cajueiro no semi-árido é altamente estratégico, uma vez que se ajusta plenamente ao modelo de exploração conjunta com produtos de subsistência (feijão-de-corda, milho e mandioca) no tempo e no espaço, pois além de oferecer uma fonte de renda, permite a ocupação dos produtores no período de entressafra dessas

culturas. Além disso, o desempenho produtivo do cajueiro nas condições do semi-árido é comprovadamente elevado, tanto em termos de quantidade quanto em qualidade do produto. As condições climáticas são favoráveis, ensejando a uma alta capacidade fotossintética das plantas, contribuindo para o acúmulo de sólidos solúveis no pedúnculo.

O clima predominantemente seco e quente nas microrregiões semi-áridas contribui para limitar a incidência epidêmica de doenças foliares, como a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), mancha angular (*Septoria anacardii*), mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*) e oídio (*Oidium anacardii*), provocando danos quase sempre abaixo dos níveis de danos econômicos para estas doenças. Entretanto, as doenças causadas por patógenos de plantas submetidas a estresses hídricos são favorecidas por essas condições.

A resinose do cajueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* foi descrita pela primeira vez no Brasil por Freire (1991). Na oportunidade, julgava-se tratar de uma doença de pouca importância, uma vez que fora observada em plantas velhas de cajueiro comum, sob estresse. Esta hipótese logo foi descartada, face à constatação da doença em níveis epidêmicos em pomares sob diversas condições de manejo, inclusive no cajueiro anão-precocce. Presentemente, esta doença já assume a posição de principal doença em algumas regiões do semi-árido nordestino, onde é observada, indistintamente, em plantas estressadas e vigorosas, inclusive sob condições de cultivo irrigado.

Presume-se que em cajueiro, como ocorre na maioria das outras plantas atacadas, este patógeno se mantém quiescente nos tecidos dos ramos, caules e frutos. A incidência de resinose em áreas isoladas e em proporções elevadas sugere a hipótese de transmissão do patógeno pela muda, ou seja, via sementes e/ou propágulos infectados. O isolamento desse patógeno em sementes reforça esta hipótese (FREIRE *et al.*, 1993).

A crescente expansão das doenças causadas por *L. theobromae* em fruteiras tropicais vem causando inestimáveis perdas, tanto no sistema produtivo como em pós-colheita, representando uma ameaça à fruticultura no nordeste. Mesmo no cajueiro, uma outra doença com quadro sintomatológico diferente, mas causado pelo mesmo agente, foi descrita, sob a denominação de podridão-preta-da-haste (CARDOSO *et al.*, 2002).

A modernização da atividade frutícola na região requer fundamentalmente a adoção de medidas de prevenção e erradicação de doenças causadas por *L. theobromae* em campo e em pós-colheita. Entretanto, os conhecimentos básicos sobre a biologia populacional, constituição genética e interação do patógeno com as plantas hospedeiras, por exemplo, são reduzidos e superficiais, não permitindo significativos avanços no manejo ecológico e econômico dessas enfermidades.

O desenvolvimento e a caracterização de marcadores moleculares microssatélites de *L. theobromae* (BURGESS *et al.*, 2003; CARDOSO; WILKINSON, 2008) são instrumentos importantes nos estudos de caracterização genética e de evolução desta espécie.

Este estudo tem como objetivos estabelecer uma população de isolados *L. theobromae* associados ao cajueiro em diferentes micro-regiões do nordeste brasileiro, determinar a capacidade deste fungo sobreviver endofiticamente em tecidos de cajueiro e caracterizar geneticamente essa população usando marcadores microssatélites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Anacardium occidentale* L.

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., é a única espécie cultivada e a mais dispersa deste gênero (BARROS *et al.*, 2002), pertencendo à família anacardiaceae, que compreende cerca de 60 a 70 gêneros e 400 a 600 espécies (BARROS *et al.*, 1993). A maior diversidade da espécie no Nordeste do Brasil indica a origem da espécie, embora na Amazônia e no Cerrado sejam reconhecidos como centros de diversidade do gênero (BARROS *et al.*, 2002).

Dois tipos de cajueiros são definidos com relação ao porte da planta. O cajueiro comum é o mais difundido, apresentando altura de 8 a 15 m e envergadura de copa que chega a 20 m. Neste tipo de cajueiro é encontrada a maior variabilidade fenotípica. O cajueiro-anão-precoce tem porte baixo, copa homogênea, diâmetro do caule e envergadura bem inferiores ao do tipo comum (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

O cajueiro tem uma importância marcante na economia do Nordeste, notadamente, pela manutenção dos níveis de emprego e renda para os pequenos produtores no meio rural e trabalhadores suburbanos dos grandes centros, além de ser uma fonte de recursos externos para o Brasil. Estima-se que atualmente o setor produtivo do caju empregue cerca de 60 mil trabalhadores rurais no Nordeste (IBGE, 2007). A cultura do caju ainda tem um importante papel social a cumprir, através da provisão de alimento natural rico em vitaminas e sais minerais, acessível às populações mais pobres, bem como pela possibilidade de contribuir para a redução do fluxo migratório para os centros urbanos, uma vez que propicia um meio de ocupação e renda durante a entressafra da agricultura de subsistência.

As doenças e pragas do cajueiro estão entre os principais entraves à exploração eficiente do caju, seja pelos danos diretos na fisiologia e na integridade física ou indiretamente na interação com outros tipos de estresses. Dependendo dos fatores climáticos e da localização geográfica, as principais doenças do cajueiro nas microrregiões produtoras do nordeste brasileiro são a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), a resinose, (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.)Griffon), o mofo-preto [*Pilgeriella anacardii* (Bat., Bez., Cast & Matta) Von Arx & Müller], a podridão-preta-da-haste, recentemente descrita (CARDOSO *et al.*, 2002), e a deterioração fúngica da amêndoa (FREIRE *et al.*, 1993).

Enquanto que as pragas mais destrutivas do cajueiro são a broca-das-pontas (*Anthistarcha binocularis*), a traça-das-castanhas (*Anacampsis phytomiella*), o tripés-da-cinta-vermelha (*Selenothrips rubrocinctus*), as brocas-do-tronco e da raiz (*Marshallius anacardii* e *M. bondari*), a mosca-branca (*Aleurodicus coccois*) e as lagartas desfolhadoras (*Cicinnus callipsius*, *Thagona prostropaea*, *Eacles imperialis magnifica* e *Cerodirphia rubripes*).

2.2 *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. e Maubl. [= *Botryodiplodia theobromae* (Pat.)] forma anamorfa de *Botryosphaeria rhodina* (BERK.; CURTIS) Arx. foi primeiramente descrito causando podridão dos frutos de cacau no Equador (PATOULLARD; DE LAGERHEIM, 1892 apud PUNITHALINGAM, 1980).

L. theobromae é um membro da família Sphaeropsidales que possui micélio branco-acinzentado e picnídios escuros agregados, podendo chegar a 5 mm (Figura 1A). Esses picnídios contêm esporos com cerca de 20 – 30 µm de comprimento por 10 – 15 µm de largura, de coloração variando do hialino, quando jovens, ao marrom escuro, quando atingem a maturidade. Quando jovens, os esporos são hialinos, unicelulares e lisos e a medida que amadurecem ficam marrom-escuro, ganham estrias longitudinais e se tornam bicelulares (Figura 1B) (PUNITHALINGAM, 1980).

Menezes *et al.*, (1997), estudando *L. theobromae* em mamoeiro (*Carica papaya* L.), observaram que o fungo isolado em BDA, a partir da podridão da haste, apresentou colônia inicialmente branca, tornando-se de coloração cinza-esverdeada a preta, com micélio aéreo vigoroso e de aspecto algodinoso, extensão micelial rápida, cobrindo toda a superfície da placa em 48 horas.

L. theobromae é um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, portanto, com reduzida especialização patogênica, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas em regiões tropicais e temperadas, (PUNITHALINGAM, 1980), causando os mais variados sintomas. As fruteiras tropicais mais comumente afetadas por este patógeno são: o Cajueiro (FREIRE, 1991), a mangueira (TAVARES, 1993), as anonáceas (PONTE, 1985), o coqueiro (SOUZA FILHO *et al.*, 1979), as *Spondias* (PONTE *et al.*, 1988; FREIRE; CARDOSO, 1997), a bananeira (GOOS *et al.*, 1961), a aceroleira e o saptizeiro (FREIRE *et al.*, 2003).

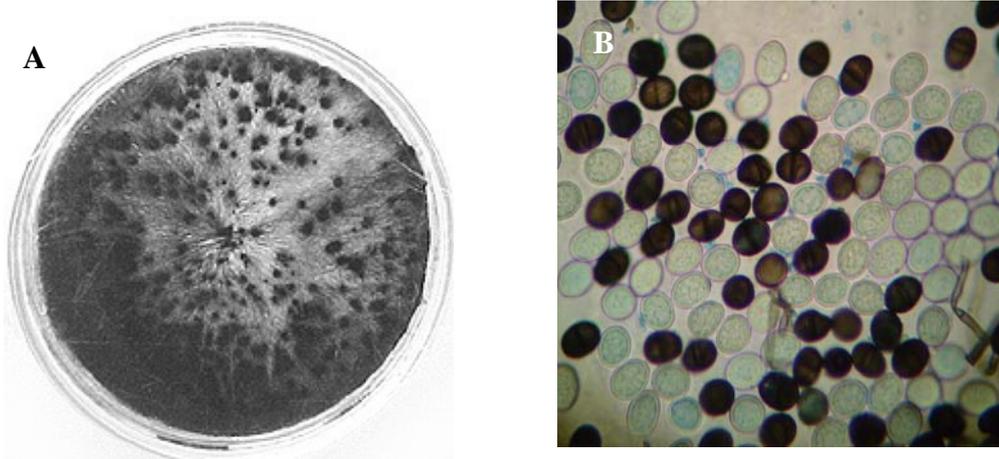


Figura 1 – Características morfológicas de *Lasiodiplodia theobromae*. A - crescimento micelial em meio de cultura. Foto: M. A. Khanzada; A. M. Lodhi; S. Shahzad (2004); B – conídios maduros. Foto: F. C. Farias.

2.2.1 Resinose

A resinose, do cajueiro, doença causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, foi descrita pela primeira vez no Nordeste brasileiro, no município de Santo, Ceará (FREIRE, 1991). É a principal doença do cajueiro no semi-árido nordestino, estando geralmente associada a plantas estressadas e submetidas a fermentos naturais ou provocados por insetos, pássaros, primatas e pelo próprio homem, através de práticas culturais. Os primeiros sintomas da resinose, geralmente ocorrem após a primeira safra comercial do cajueiro, cerca de 24 a 36 meses após o plantio (CARDOSO *et al.*, 2006), a doença ataca não somente o cajueiro como também outras anacardiáceas considerada de grande importância na Região Semi-Árida do Nordeste (CARDOSO *et al.*, 1998).

Os primeiros sintomas da resinose se caracterizam pelo escurecimento, intumescimento e rachadura da casca, formando cancrs pronunciados no caule e ramos lenhosos, seguido de intensa exsudação de goma (Figura 2A). Sob a casca, observa-se um escurecimento dos tecidos, o qual se estende, até atingir a região cortical e o câmbio vascular (Figura 2B). Com o progresso da doença, sintomas de deficiências nutricionais, murcha, queda de folhas e morte dos ramos são observados (Figura 2C), até o colapso total da planta (FREIRE, 1991). Estudos preliminares em pomares da região limítrofe entre os estados do Ceará e Piauí (CARDOSO *et al.*, 1995), revelaram uma maior incidência da resinose nos ramos em relação aos caules, entretanto, ainda são desconhecidas as razões deste fato.

Os danos para a planta devido à resinose são decorrentes da redução da produção fotossintética pelo bloqueio do movimento da seiva nos primeiros estágios de infecção, já a queda na produção do pomar ocorre pela morte de plantas em virtude da expansão dos cancrios (BEZERRA *et al.*, 2003).

Estudos recentes revelaram que a transpiração das plantas com resinose não foi alterada, contudo, houve redução significativa da condutância estomática e da fotossíntese líquida, principalmente quando a doença ocorreu nos caules (BEZERRA *et al.*, 2003). As folhas dos ramos doentes apresentaram reduzidas condutância estomática, transpiração e fotossíntese em relação àquelas dos ramos sadios da mesma planta doente. A influência da resinose nas funções fisiológicas do cajueiro, notadamente na taxa fotossintética, revela que os danos causados não se referem apenas à redução do estande no pomar ou na translocação de água e nutrientes, mas também pela interferência deletéria na atividade fotossintética das plantas.

O rápido aumento da área cultivada com clones susceptíveis, como CCP-76 tem propiciado severas epidemias em algumas regiões do Nordeste do Brasil (CARDOSO *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2002).



Figura 2 – Sintomas típicos da resinose do cajueiro. A – ramo apresentando grande quantidade de resina (goma). B – porta enxerto apresentando necrose escura sob a casca, C – planta de cajueiro anão-precoce (CP-76) exibindo morte parcial dos ramos. Fotos: J.E. Cardoso

2.2.2 Podridão preta das hastes (PPH)

A doença, denominada podridão-preta-das-hastes é também causada por *Lasiodiplodia theobromae* e foi observada, em 1999, em plantios comerciais e experimentais, nos municípios de Pio IX, PI e Beberibe, CE. Os sintomas da fitomoléstia caracterizam-se pelo escurecimento longitudinal dos tecidos da haste terminal (herbácea) do cajueiro com eventuais exsudações de goma em pontos específicos (figura 3A). Esse sintoma progride até a necrose total do ramo (figura 3B) (CARDOSO *et al.*, 2002).



Figura 3 – Sintomas típicos da podridão-preta-da-haste do cajueiro (PPH). A – detalhe da PPH no ramo B – sintomas gerais na copa. . Fotos: J.E. Cardoso.

2.3 Marcadores moleculares

Até meados da década de 60, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética estava associada às características morfo-fenológicas. Porém, este método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo, além do gasto excessivo de tempo e dinheiro (SANSVINI, 1998), e muitas vezes, a identificação baseada somente no fenótipo deixa muitas dúvidas quanto à verdadeira identidade dos genótipos (PANCALDI *et al.*, 1999).

Buscando superar este fator limitante, novos métodos de análise foram sendo introduzidos em auxílio à caracterização genética. Inicialmente, a análise isoenzimática foi empregada (PANCALDI; BATTISTINI, 1991), entretanto, esta técnica não fornece polimorfismo suficiente para uma caracterização detalhada de genótipos de baixa variabilidade, não permitindo a individualização, mas somente a separação em grupos (ARULSEKAR; PARFITT, 1986; LIMA, 2001).

Porém, quando se utilizam marcadores moleculares, a possibilidade de identificação de genótipos aumenta consideravelmente (MULCAHY *et al.*, 1993), pois a combinação de poucos marcadores é suficiente para diferenciá-las, produzindo um tipo de impressão digital molecular, também conhecida como *fingerprinting*, a qual é obtida a partir da análise do DNA (SANSVINI, 1998).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para análise de divergência genética (CATTANEO, 2001); identificação de cultivares (BAUM *et al.*, 2000), mapeamento genético (RAFALSKI, 2002; BRESSAN-SMITH, 1998), filogenia (GEHRIG *et al.*, 1997); melhoramento genético visando resistência a doenças (SANTOS, 2000) e sexagem (URASAKI *et al.*, 2002). Todos estes estudos buscam identificar variações em seqüências genômicas que possam estar relacionadas com um fenótipo específico. Assim, a análise da variação das seqüências é de maior importância nos estudos genéticos e os marcadores moleculares são uma ferramenta útil para determinar e analisar essas variações.

Atualmente uma gama de marcadores como RFLP, RAPD, AFLP e seqüência simples repetidas (SSR) têm sido utilizadas para diferentes espécies (PHILIPS *et al.*, 2001; VARSHNEY *et al.*, 2004).

2.3.1 Seqüência simples repetidas (SSR) ou Microsatélites

Entre os marcadores moleculares disponíveis atualmente para análise genética, as SSR são relativamente novas, baseadas em seqüências curtas, envolvendo 1 a 6 pares de bases, repetidas lado a lado no genoma (MILACH, 1998). Em razão da distribuição dessas seqüências ao longo do genoma formando verdadeiras “ilhas” cunhou-se o nome microsatélites (LITT; LUTY, 1989).

Estes marcadores são compostos de seqüências simples repetidas de nucleotídeos “*in tandem*” na seqüência de DNA, tais como (CA)_n (AGAT)_n (ATT)_n. O polimorfismo nestes locos é resultado de variações do número de repetições das seqüências de nucleotídeos (AKKAYA *et al.*, 1992). A repetição pode ser perfeita ou interrompida por muitos nucleotídeos não repetidos sendo chamada de repetições compostas (SAGHAI-MAROOF *et al.*, 1994).

Os marcadores SSR têm sido úteis para integração de mapas genéticos e mapas físicos e tem proporcionado aos melhoristas e geneticistas com uma ferramenta eficiente para associar variação genética e fenotípica (GUPTA; VARSHNEY, 2000).

As seqüências das regiões que flanqueiam os SSRs são conservadas em indivíduos da mesma espécie. Dessa maneira, os SSRs são amplamente distribuídos em todo genoma e podem ser amplificados por oligos específicos (iniciadores ou “*primers*”) sintetizados a partir destas regiões flanqueadoras (PONCET *et al.*, 2004).

As SSRs por serem polimórficas aumentam a possibilidade de detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie, ou até mesmo entre indivíduos numa população (YU *et al.*, 1999). O polimorfismo é detectado após a amplificação do DNA via PCR e separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose e corados em brometo de etídio (WU; TANKSLEY, 1993).

Os marcadores SSR são abundantes em todo o genoma; estão uniformemente distribuídos; apresentam polimorfismo do tipo codominância; são altamente multialélicos; são automatizáveis em sistemas multiplex, permitindo avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos; necessitam de pequenas quantidades de DNA; podem ser transferíveis entre espécies de um mesmo gênero e compartilhados entre diferentes laboratórios (SANSAVINI, 1998; SOSINSKI *et al.*, 2000; POWELL *et al.*, 1996).

Os principais limites de seu emprego em larga escala estão no custo elevado e nas tecnologias necessárias para a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam e amplificam regiões altamente repetitivas do DNA. Mas, se disponíveis, o custo assemelha-se à técnica RAPD, com exceção da separação dos fragmentos amplificados que normalmente é feita em géis de poliacrilamida, por permitirem maior resolução, entretanto, pode ser realizada em géis de agarose (MILACH, 1998). Mesmo assim, seu uso é compensado pelo elevado polimorfismo revelado, fazendo com que este marcador seja uma das melhores opções na caracterização da diversidade genética de germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Recentemente, 14 marcadores microssatélites com elevado grau de polimorfismo de *L. theobromae* foram desenvolvidos (BURGESS *et al.*, 2003; CARDOSO; WILKINSON 2008), possibilitando estudos visando à determinação da estrutura genética, da herança e do grau de relacionamento de populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras

Foram realizadas três viagens para microrregiões produtoras de caju (Figura 4) quando se coletou 25 amostras de caules com sintomas típicos de resinose (cancro e exsudado de goma) e em sintomas de resinose (Tabela 1).

Tabela 1 – População de *L. theobromae* obtida a partir das amostras de cajueiro (anão e comum) e outras espécies, coletadas em diferentes estados brasileiros, Fortaleza, CE. 2008.

Nº	Local	Sintomas*	Hospedeiro
1	Br 230 - Oeiras, PI	SS	Anão pé franco
2	Faz. Vareda da raposa - Floriano, PI	RE	Comum pé franco
3	Faz. Vareda da raposa - Floriano, PI	RE	CP 76
4	Faz. Luiziana - S Raimundo Nonato, PI	RE	CP 76
5	Museu - S. Raimundo Nonato, PI	SS	Umbu
6	Serra Vermelha – São Raimundo Nonato, PI	MD	Manga
7	Faz. Gaia - Canto do Buriti, PI	RE	CP 76
8	Projeto Barreiras Norte - Barreiras, Ba	PPH	CP 09
9	Projeto Barreiras Norte - Barreiras, Ba	PPH	CP 76
10	Br 122 - Senhor do Bonfim, BA	CA	Comum pé franco
11	Br 122 Km 50 - Petrolina, PE	RE	CAP 14
12	Faz. Jacaju Beberibe, CE	RE	Comum pé franco
13	Campo de heterose – Pacajus, CE	RE	Comum pé franco
14	Barreiras, BA	PPH	CP 09
15	Terra Nova do Norte, MT	PPH	Anão-pé franco
16	Trairi, CE	SS	Anão-pé franco
17	Alto Santo 1, CE	CA	Comum pé franco
18	Alto Santo 2, CE	CA	Comum pé franco
19	Severiano Melo, RN	CA	Comum pé franco
20	Cajazeiras, PB	CA	Comum pé franco
21	Quixeré, CE	CA	Comum pé franco
22	Crato, CE, Jenaro	SS	Comum pé franco
23	Milagres, CE	SS	Comum pé franco
24	Palmácia CE	SS	Comum pé franco
25	Iguatu, CE	SS	Comum pé franco
26	Serra do mel, RN	CA	Comum pé franco
27	Trairi, CE	PPH	Comum pé franco
28	Trairi, CE	CA	Comum pé franco
29	Itapipoca, CE	SS	Comum pé franco
30	Marco, CE	SS	Comum pé franco
31	Jijoca, CE - Estrada Cruz	SS	Comum pé franco
32	Jijoca, CE - Lagoa das pedras	SS	Comum pé franco

Tabela 1 – População de *L. theobromae* obtida a partir das amostras de cajueiro (anão e comum) e outras espécies, coletadas em diferentes estados brasileiros (Cont.), Fortaleza, CE. 2008.

Nº	Local	Sintomas	Hospedeiro
33	Camocim, CE	SS	anão-precoce
34	UEP – Parnaíba, PI	SS	Cajui
35	Ilha Grande / St. Isabel – Parnaíba, PI	SS	Comum pé franco
36	Estrada Cocal – Viçosa, CE	SS	Comum pé franco
37	Guaraciaba do Norte, CE - Sr. Bráulio	SS	Comum pé franco
38	Ipu, CE - Sitio Minas	SS	Comum pé franco
39	Hidrolândia, CE - Faz. Alto Alegre	SS	anão-precoce
40	Hidrolândia, CE - Faz. Alto Alegre	CA	Graviola
41	Hidrolândia, CE - Faz. Alto Alegre	CA	Atemóia
42	Itaquaruçu, TO Faz. Mata do Sossego	PPH	anão-precoce
43	Palmas TO Faz. Exp. da SAG.	PPH	anão-precoce
44	Fortaleza, CE	MD	Neem

(*) SS = sem sintomas; RE = resinose característica; MD = morte descendente; CA = cancro, sem exsudação; PPH = podridão-preta-da-haste.

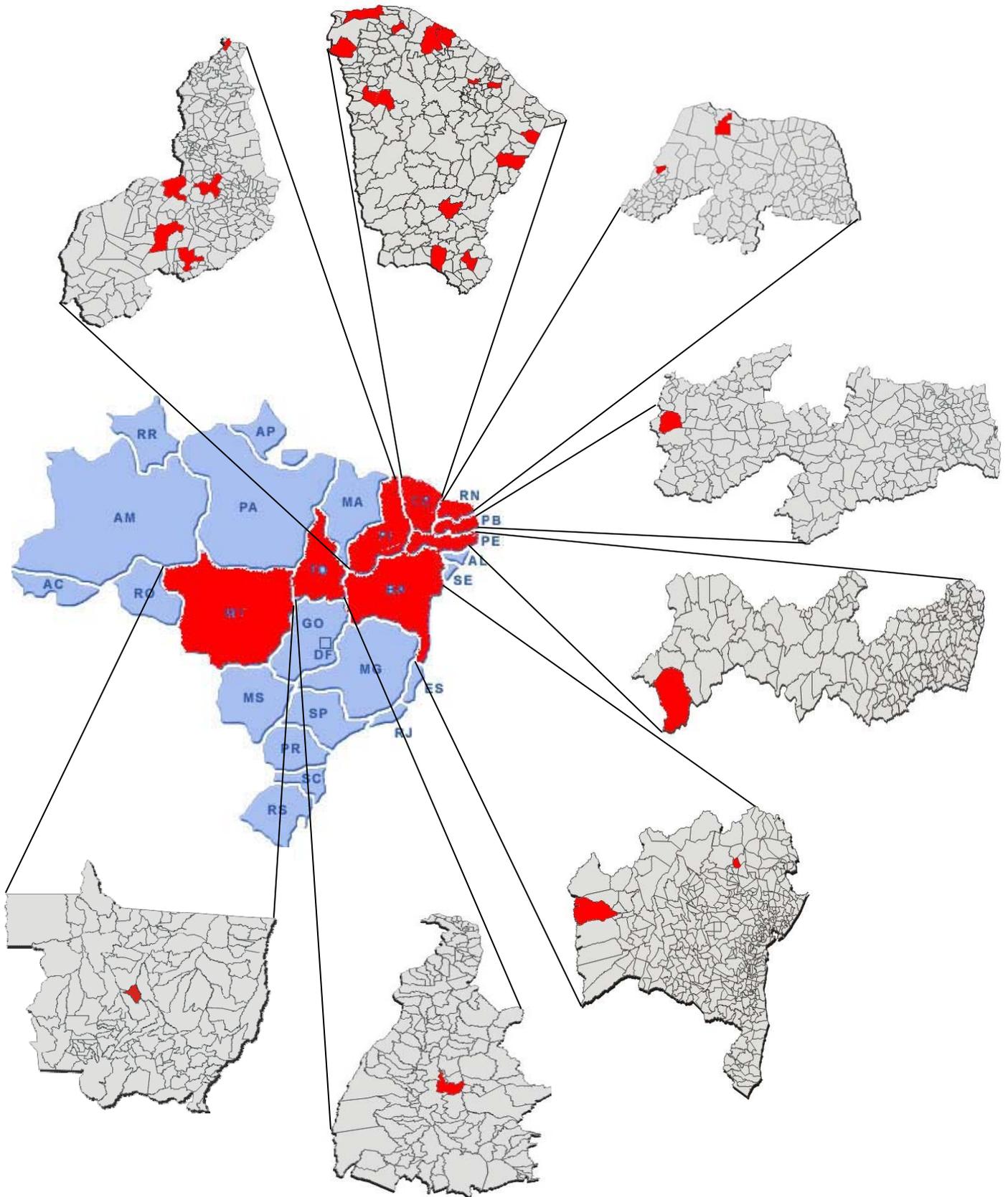


Figura 4 – Mapas apresentando os estados e os municípios onde foram coletadas as amostras referidas na Tabela 1.

3.2 Isolamento do fungo

As amostras de caules coletadas, com sintomas característicos, foram conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical para isolamento do patógeno. Foram retirados fragmentos imediatamente abaixo da casca e do xilema, da região de transição da doença que após lavagem com água corrente, imersão em álcool 96 % e flambagem, foram colocados sobre meio de cultura água-agar (10 %) contidos em placas de Petri de 90mm de diâmetro, e incubados em condições ambiente durante três a quatro dias. Após a incubação o crescimento fúngico foi repicado para meio contendo 4g batata, 20g dextrose e 15g agar por litro (DifcoTM, Sparks, MD, USA) (BDA), sendo ao final de uma semana examinados sob microscopia ótica, a fim de confirmar a identificação de *L. theobromae*. Os isolados obtidos foram armazenados em BDA contido em tubos de ensaio e mantidos sob refrigeração (3°C). As amostras de tecidos sem sintomas foram tratadas de forma semelhante em relação aos pontos de provável ocorrência do patógeno.

3.3 Determinação da presença do patógeno ao longo do ramo a partir da lesão

Paralelamente ao isolamento dos fungos, amostras de ramos de cajueiro com cancos característicos da resinose foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram lavados em água corrente e desinfestados superficialmente com etanol (70%), hipoclorito de sódio (3% de cloro ativo) e lavados com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, cada ramo foi seccionado assepticamente, retirando-se 20 fragmentos (1-2 mm) da região de transição da doença, no câmbio vascular, a cada 10 cm de distância a partir do centro do cancro até 80 cm no sentido ascendente. Os fragmentos foram então colocados em meio de cultura como no item anterior. Após uma semana de incubação à 28°C, as hifas emergentes semelhantes a *L. theobromae* foram transferidas para placas contendo BDA para posterior confirmação, quando se estimaria a percentagem de fragmentos que geraram colônias de *L. theobromae*.

Realizou-se um segundo ensaio, utilizando à mesma metodologia do primeiro, porém retirando-se os fragmentos do ramo em dois sentidos (descendente e ascendente) em

relação ao centro do cancro. As distâncias onde se coletou os fragmentos variaram de 0 à 90 cm retiradas a cada 10 cm.

Visando confirmar a sobrevivência do fungo em tecidos de cajueiro sem sintomas da resinose, realizou-se um terceiro ensaio, em que amostras de ramos e troncos de 30 cajueiros, com e sem sintomas de resinose, provenientes de diversos municípios do Nordeste foram levados para o laboratório e, a exemplo do procedimento acima descrito, fragmentos retirados desses materiais foram plaqueados em meio água-agar e incubados sob temperatura de 28°C, sendo monitorados quanto ao desenvolvimento de colônias de *L. theobromae*.

3.4 Extração de DNA

Os isolados armazenados na geladeira foram repicados para erlenmeyer contendo meio de cultura líquido de batata-dextrose (BD), de onde, após duas semanas, foram retirados e postos para secar em papel de filtro contidos em placas de Petri no interior de câmara de fluxo laminar. Após totalmente secas, as mantas de fungo obtidas foram liofilizadas no laboratório de Pós colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, para a completa remoção da água, por cerca de 1 semana.

A população de *L. theobromae* (Tabela 2) usada nesse estudo foi de 18 isolados, 15 provenientes de cajueiro, 1 de graviola (*Annona muricata*), 1 de atemóia (*Annona atemoia*) e 1 de neen (*Azadirachta indica*) (1). Dos isolados de cajueiro, seis foram obtidos de tecidos com resinose, quatro com podridão-preta-da-haste e cinco sem sintomas. Quanto ao ecossistema de origem, sete isolados vieram do litoral, sete do semi-árido e quatro do cerrado, sendo todos do Brasil.

Após liofilizadas as mantas, procedeu-se a extração do DNA de *Lasiodiplodia theobromae*, seguindo o protocolo proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998), com pequenas alterações:

1. Pesou-se aproximadamente 0,07-0,09 g do micélio;
2. Triturou-se as amostras em um almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido, transferindo-as para um eppendorf e colocando-as no gelo;
3. Adicionou-se 700ul CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) + PVP (polyvinylpyrrolidone) 2 % em cada microtubo;

4. Homogeneizou-se em vórtex;
5. Colocou-se em banho-maria à 65°C por 2 - 3 min.;
6. Homogeneizou-se em vórtex;
7. Adicionou-se 700ul de clorofórmio: isoamil (24:1), em capela de exaustão;
8. Mexeu-se bem, invertendo, por 2-3 min, com cuidado para não quebrar o DNA;
9. Centrifugou-se por 10 minutos em velocidade máxima (13000rpm);
10. Cuidadosamente, transferiu-se a fase superior para um novo microtubo (com o auxílio de uma pipeta de 200ul). Quando a solução estava turva, repetia-se o 7º passo;
11. Adicionou-se 450ul (2/3 volume) de isopropanol frio (-20°C) para o DNA precipitar;
12. Mexeu-se bem, invertendo ($\pm 5x$);
13. (Centrifugou-se) em velocidade máxima por 5 min;
14. Despejou-se o sobrenadante, todo o líquido do microtubo, Invertendo-o em toalha de papel;
15. Lavou-se o “pelete” de DNA adicionando 500ul de etanol 70% frio (-20°C);
16. Cuidadosamente inverteu-se 2-3 vezes;
17. Centrifugou-se em velocidade máxima por 5 min;
18. Removeu-se, cuidadosamente, o etanol com uma pipeta de 200ul;
19. Secou-se o DNA deixando o microtubo aberto por no mínimo 12 horas em temperatura ambiente (ou 10 min a 60°C no secador à vácuo);
20. Resuspendeu-se o DNA em 50ul do tampão TE;
21. Deixou-se o DNA durante a noite a 4°C;
22. Adicionou-se RnaseA na concentração final 10ug/ml (0,5ul de 1 mg/ml RnaseA em 50ul TE), encubando-o por 15 min a 37°C, em estufa, para a digestão do RNA.
23. Armazenou-se a - 20°C.

Em seguida alíquotas de 4,5 μ l da amostra de DNA e 1 μ L da solução de carregamento foram submetidos a eletroforese em cubas de acrílico Max Fill (15 x 25cm) a 120 volts durante 30min em gel agarose (1%), TBE (1X) (10,8 g de tris, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA 0,5M pH 8,0, completando o volume para 100ml com água deionizada) e 3 μ L de brometo de etídio e visualizado sob luz UV (Figura 5).

A concentração de DNA foi estimada pela comparação da intensidade de fluorescência da amostra em brometo de etídio, com a intensidade de uma fração conhecida do DNA marcador ‘Hyperladder I’ (Bioline^R), fazendo-se uma diluição do DNA quando necessária, usando um sistema de imagem transiluminator de ultravioleta (Vilber Lourmat).

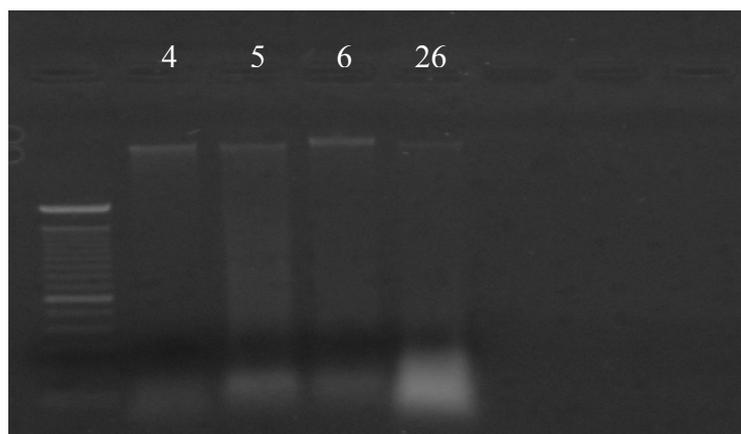


Figura 5 – Gel de agarose submetido a eletroforese para visualização de amostras de extração de DNA em transluminador.
Foto: F. C. Farias.

3.5 Reações de polimerase em cadeia (PCR)

Foram utilizados 15 *primers* (Tabela 3) flanqueadores de microsatélites desenhados para amplificar regiões expressas em 18 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* utilizados nas reações de polimerase em cadeia, Fortaleza, CE. 2008.

Nº	Local	Sintoma
4	Faz. Luiziânia - S Raimundo Nonato - Pi	RE
8	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - Ba	PPH
9	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - Ba	PPH
14	Barreiras – Ba	PPH
16	Trairi – Ce	RE
20	Cajazeiras, PB	RE
22	Crato, Jenaro – Ce	SS
25	Iguatu, CE	SS
26	Serra do mel, RN	RE
27	Trairi – Ce	RE
28	Trairi – Ce	RE
32	Jijoca, Lagoa das pedras - Ce	SS
33	Camocim – Ce	SS
39	Hidrolândia, Faz. Alto Alegre - Ce	SS
40	Hidrolândia, Faz. Alto Alegre - Ce - Graviola	SS
41	Hidrolândia, Faz. Alto Alegre - Ce - Atemóia	SS
43	Palmas - TO Faz. Exp. Da secret. De Agric.	SS
44	Fortaleza, Ce – Neem	MD

(*) SS = sem sintomas; RE = resinose característica; MD = morte descendente; CA = cancro, sem exsudação; PPH = podridão-preta-da-haste

Tabela 3 – Lista de “Primers” utilizados nas reações de PCR, para a determinação da variabilidade genética dos diversos isolados de *L. theobromae* de cajueiro. Fortaleza, CE. 2008.

Pares de "primers" SSR	Sequência 5'	Temp. de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento(pb)	SSR	Padrão da banda
LT1 for LT1 rev	GAGGGTTTTGTGCTCCATGT GGAAAACGGTGGTCAAAGAA	52-62	202	(CA) ₆	Polimórfico
LT2 for LT2 rev	ATTGGAAAGGAGGGAAAAGGA GCGCGCTTCTCCAGAAA	55-60	102	(CA) ₈	Polimórfico
LT3 for LT3 rev	GTAGATGTGGTCGCGGAGTT TCCCCATGTATAACCAGGTC	55-62	234	(GGT) ₈	Monomórfico
LT 4 for LT4 rev	GTTGCTCCTCATCTGCACCT GTAGATGTGGTCGCGGAGTT	54-62	255	(CCA) ₇	Polimórfico
LT8 for LT8 rev	CTCGTTAGGAAGGAAAGCAT GAACTATCCCCGCATCTACT	54	188	(GGT) ₇	Polimórfico
LT9 for LT9 rev	GGGAAAATAAAATGGTCTGG GAAACCCTTGTTCCATGC	55-57	143	(GA) ₉	Polimórfico
LT10 for LT10 rev	CAAGGATACGATGTGGACTG AAGATGGAAAGGAGAACGAG	52-61	156	(GTC) ₈	Polimórfico
LT3/4 for LT3/4 rev	GACTCATTACGGTCTCATGG GTGGAGCGGAACTGTCTGCT	58	361	(CT) ₅	Polimórfico
LT13/14 for LT13/14 rev	GAGTTGTTAGTGCGGGCGCC GCAGCCCCACAATTCACCAG	58	317	(GA) ₃	Polimórfico
LT15/16 for LT15/16 rev	GCCAGATCCGTGCCCACTG CATGCAGAGGTCGCAAAGTG	58	317	(CT) ₅	Polimórfico
LT17/18 for LT17/18 rev	GATCTTCCAGCTCTTCGGCC GACTGTCAGTAGGTTAGCGG	58	254	(A) _n	Polimórfico
LT21/22 for LT21/22 rev	GGAAGATGATGGGATGGTTGC GTACAAGAACGAACTCCGGGT	58	387	(CA) ₅	Polimórfico
LT27/28 for LT27/28 rev	CGAACAGGGTTTTTCGTGACGT CTCATATCTCGCCGTTGCC	58	462	(CG) ₄	Polimórfico
LT29/30 for LT29/30 rev	GACGAGGTCAAGGGCGACA CCTCCATGTCGGATTCTTG	58	191	(CAA) ₇	Polimórfico
LT35/36 for LT35/36 rev	GGCATCACAACGACCAACCC GCGAGAGTCGCAAGTACAGC	58	379	(CCTT) ₁₀	Polimórfico

Para o preparo do mix utilizado na PCR procedeu-se inicialmente o descongelamento do tampão, magnésio, dNTPs, DNAs e primers, centrifugando-os por 10 segundos à 2000 rpm e colocando-os no gelo.

Para uma amostra de PCR, utilizando-se marcadores microsatélites e reagentes da Invitrogen, a quantidade para o preparo do mix foi a seguinte (Tabela 4), onde cada reagente do mix foi multiplicado do pelo número de amostras (N) + uma (reserva). Sendo esta a ordem da reação, que foi rigorosamente seguida, ficando a Taq polimerase por último.

Tabela 4 – Relação dos reagentes utilizados para uma reação de PCR com N amostras, Fortaleza, CE. 2008.

Reagentes	Volume p/ 1 amostra	Volume p/ N + 1 amostras
H ₂ O	12,8	(N X 12,8) + 12,8
Tampão	2,0	(N X 2,0) + 2,0
MgCl ₂	0,6	(N X 0,6) + 0,6
dNTP	0,4	(N X 0,4) + 0,4
Primer F	1,0	(N X 1,0) + 1,0
Primer R	1,0	(N X 1,0) + 1,0
Taq polimerase	0,2	(N X 0,2) + 0,2
DNA	2,0	(N X 2,0) + 2,0
Total	20,0	-

A amplificação foi realizada em um termociclador modelo Techine Flexigene utilizando o seguinte perfil térmico de amplificação: 3 minutos a 94°C (desnaturação), seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C (anelamento), 30 segundos a 72°C (extensão), finalizando a reação de amplificação, 10 minutos a 72°C.

Em seguida, semelhantemente ao que aconteceu após a extração de DNA, alíquotas de 4,5 µL da PCR e 1µL da solução de carregamento foram submetidos a eletroforese em cubas de acrílico (15 x 25cm) a 120 volts durante 30min em gel de agarose (1%), TBE (1X) e 3 µl de brometo de etídio e visualizado sob luz UV (figura6).

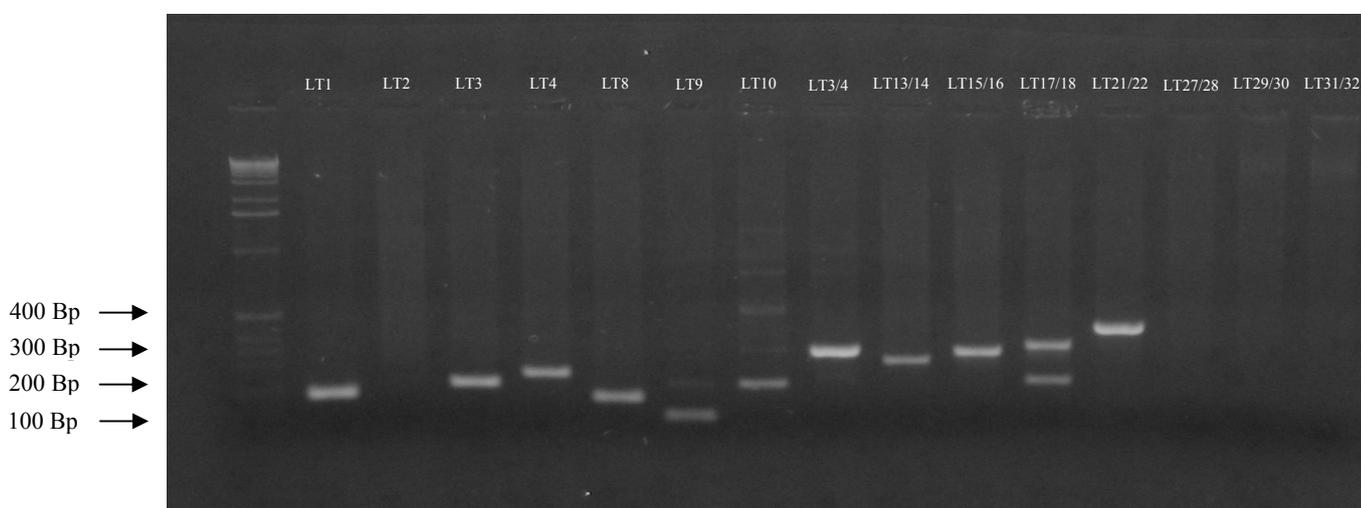


Figura 6 – Amplificações em gel de agarose submetidas a eletroforese de reações de polimerase em cadeia (PCR) do isolado 32 (Tabela 1) de *Lasiodiplodia theobromae* com 15 iniciadores que flanqueiam regiões contendo marcadores microssatélites. Foto: F. C. Farias.

3.6 Análise dos dados e obtenção de dendograma

A presença e ausência de bandas nas reações de PCR's submetidas à eletroforese foram tabuladas em uma planilha binomial de Excell. O pacote estatístico MVSP (Multi-Variate Statistical Package v.3.13p) (Kovach Computing Services, Anglesey, Wales - <http://www.kovcomp.com/mvsp/mvspbro.html>) foi usado na geração do dendograma usando a análise de máxima verossimilhança pelo método de agrupamento não balanceado baseado na média aritmética ("unweighted pair-group method with arithmetic mean" = UPGMA). As similaridades genéticas foram calculadas pelo coeficiente de Nei e Li (1979).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e isolamento de *Lasiodiplodia theobromae*

Vinte e cinco colônias de *L. theobromae*, 11 isoladas de tecidos sintomáticos e 14 assintomáticos, foram obtidas de trinta amostras de ramos e troncos de cajueiro de diferentes municípios do Nordeste, sendo que 12 apresentavam sintomas característicos da resinose (cancro) enquanto 18 amostras não apresentavam sintomas. Cerca de 92% dos fragmentos de tecidos com sintomas e 78% dos fragmentos de tecidos sem sintomas produziram colônias do fungo, revelando a capacidade de *L. theobromae* de sobreviver naturalmente em tecidos de cajueiro sem que a planta manifeste o sintoma (Tabela 5).

Tabela 5 – Tipo de cajueiro, localização das plantas e presença ou ausência de sintomas da resinose que produziram colônias de *Lasiodiplodia theobromae*, Fortaleza, CE. 2008.

Tipo ou clone	Local	Sintoma
Comum	Pacajus, CE	+
Comum	Beberibe, CE	+
Comum	Alto Santo, CE	+
Comum	Quixeré, CE	+
Comum	Crato, CE	-
Comum	Palmácia, CE	-
Comum	Iguatu, CE	-
Comum	Trairi, CE	+
Comum	Itapipoca, CE	-
Comum	Marco, CE	-
Comum	Jijoca – Estrada Cruz, CE	-
Comum	Jijoca – Lagoa, CE	-
Clone, CCP 76	Camocim, CE	-
Comum	Guaraciaba do Norte, CE Sr. Bráulio, CE	-
Comum	Ipu - Sitio Minas, CE	-
Clone, CCP 76	Hidrolândia, CE	-
Comum	Oeiras, PI	+
Comum	Floriano, PI	+
Clone, CCP 76	Floriano, PI	+
Clone, CCP 76	São Raimundo Nonato, PI	+
Comum	Parnaíba, PI	-
Comum	Severiano Melo, RN	+
Comum	Serra do Mel, RN	-
Comum	Cajazeiras, PB	+
Clone, CAP 14	Petrolina, PE	-

4.2 Determinação da presença do patógeno ao longo do ramo a partir da lesão

No primeiro ensaio, *L. theobromae* foi identificado e isolado de fragmentos de tecidos do tronco do cajueiro ao longo de 9 diferentes distâncias em relação ao cancro na direção ascendente, (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 cm). O maior valor percentual do crescimento de colônias encontrado foi no centro do cancro com 50% de colônias obtidas nas quatro repetições. No restante dos fragmentos coletados nas outras distâncias de 10 a 80 cm foi observada uma variação na porcentagem de colônias de 10 a 45% à medida que a distância aumentava (Figura 7). Esperava-se que o número de colônias desenvolvidas fosse decrescente em relação a distancia do cancro, o que não ocorreu. A pouca uniformidade no tamanho e na localização do fragmento plaqueado pode ser responsável por essa irregularidade. Pois a escolha do sítio de retirada do fragmento foi feita com base em medidas (*i. e.* 10 cm) e não se levando em conta o tipo de tecido (*i. e.* gema ou internódio).

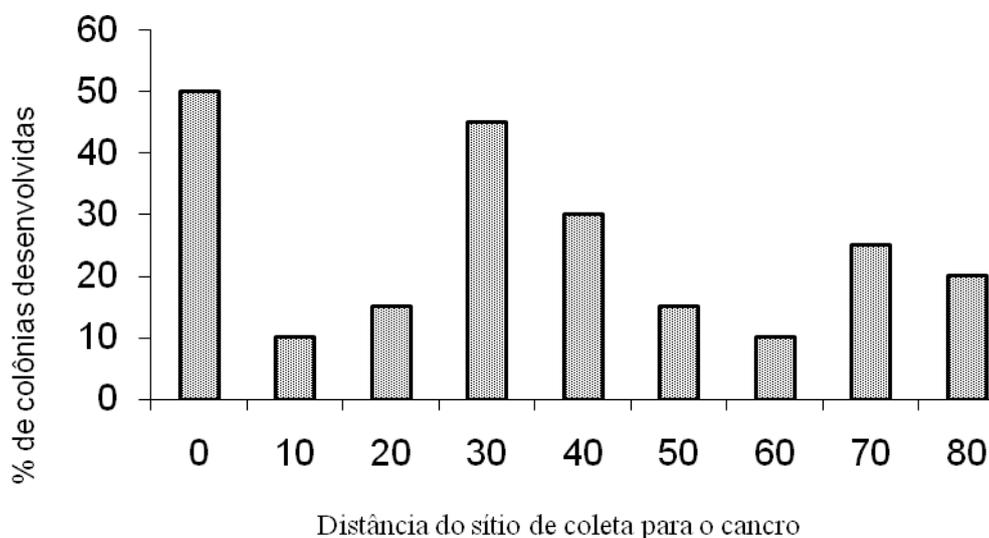


Figura 7 – Porcentagem de isolamento de *Lasiodiplodia theobromae* de tecido de cajueiro conforme a distancia do cancro (0). Os dados representam médias de quatro repetições.

No segundo ensaio, *L. theobromae* foi isolado até 90 cm em ambas as direções e, como no primeiro ensaio, com proporções variáveis em relação ao cancro. Diferentemente dos dados anteriores, os maiores valores de porcentagem de colônias isoladas não foram na região do cancro, provavelmente por ser uma região em que os tecidos já se encontravam em estágios avançados de necrose, conseqüentemente com maior população de microrganismos

oportunistas que suprimiam o crescimento de *L. theobromae*. Nas demais distâncias testadas, foram observadas irregularidades quanto à proporção de colônias, a exemplo do ensaio anterior. Entretanto, estes dados revelam o comportamento endofítico de *L. theobromae* também em troncos de cajueiro (Figura 8).

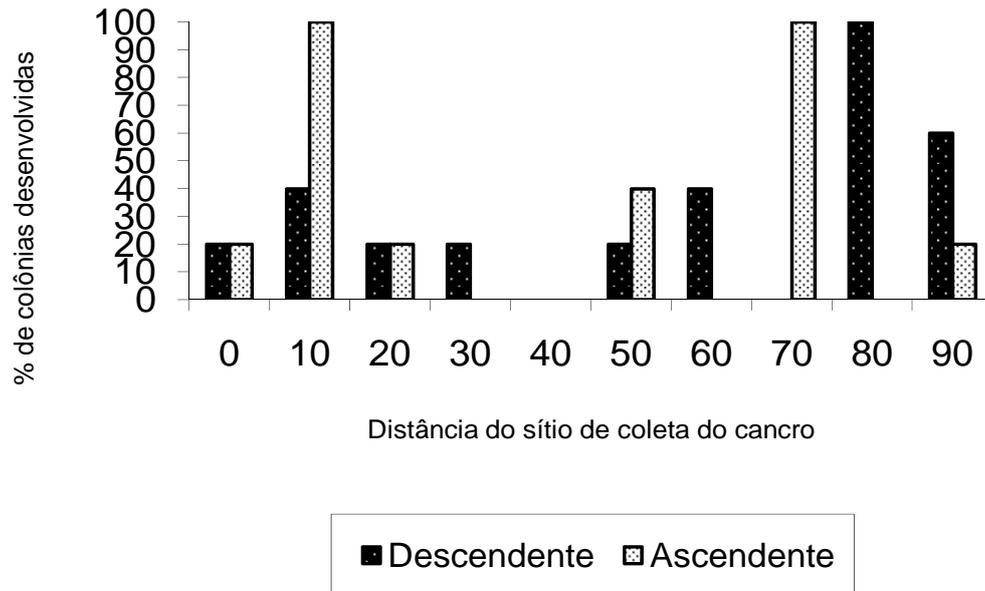


Figura 8 – Porcentagem de crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* isolado de tecido de cajueiro conforme a distância e a posição, descendente e ascendente, em relação ao cancro.

No presente estudo, o comportamento endofítico de *L. theobromae* foi confirmado, conforme suposições anteriores baseadas em observações em outras espécies (MOHALI *et al.*, 2005, MULLEN *et al.*, 1991 e RUBINI *et al.*, 2005). Esta informação reveste-se de uma importância marcante no delineamento de estratégias de manejo da resinose, sendo, por conseguinte, muito mais difícil o emprego eficiente de medidas de exclusão. A falta de especialização por hospedeiro aliado ao caráter endofítico de *L. theobromae*, certamente, impõe severos obstáculos ao controle de doenças causadas por esse organismo. Estudos genéticos baseados em marcadores de DNA objetivando identificar e caracterizar as populações prevalentes nos diferentes tecidos, hospedeiros e localização geográfica tornam-se cada vez mais críticos na elucidação dos mecanismos de interação desse patógeno com as plantas cultivadas.

4.3 Análise dos dados e obtenção de dendrograma

Este estudo não possibilitou a identificação do número de alelos, restringindo-se apenas aos dados referentes a amplificação ou não do DNA de cada isolado com os 15 iniciadores (Tabela 4). A análise dos dados pelo coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979) são apresentados sob a forma de dendrograma (Figura 9).

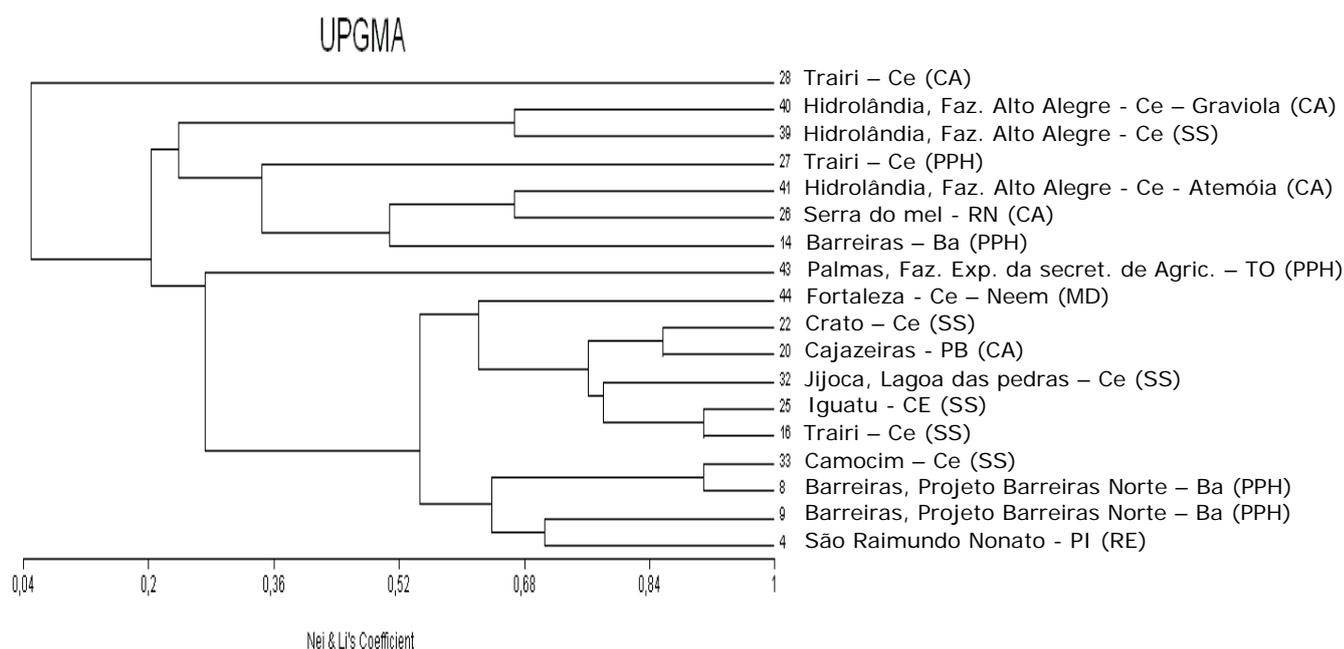


Figura 9 – Dendrograma representando a variabilidade genética de 18 isolados de *L. theobromae* calculado com base nas reações de polimerase em cadeia com 15 pares de iniciadores que flanqueiam regiões contendo marcadores microssatélites.

A população reduzida da população original (Tabela 1) de *L. theobromae* usada no estudo de caracterização molecular deveu-se à ausência de um protocolo de extração de DNA igualmente eficiente para todos os isolados, resultando quantidades insuficientes para a realização das reações de polimerase. Várias alterações nos protocolos foram testadas anteriormente até se chegar àquela descrita na metodologia.

Os resultados indicam a grande variabilidade genética da população avaliada, representada por 16 grupos de similaridade variando de 91% a 5%. Nenhum isolado foi igual (100% similaridade) a outro, mesmo aqueles obtidos da mesma localidade, como os isolados 39 e 40 (Tabela 3), originários de graviola e atemóia em Hidrolândia que apresentaram 67% de similaridade com os marcadores usados.

Os isolados obtidos de plantas de cajueiro sem sintomas apresentaram um maior índice de similaridade entre eles do que aqueles de plantas com sintomas, levantando a hipótese de uma maior variabilidade dentre esses últimos, pressupondo-se o processo evolutivo dessa espécie para patogenicidade. Entretanto, as maiores similaridade (91%) foram observadas entre isolados comprovadamente patogênicos e endofíticos, quais sejam: isolados 8 (PPH de Barreiras, BA) e 33 (sem sintomas de Camocim, CE), isolados 16 (resinose de Trairi, CE) e 25 (sem sintomas de Iguatu, CE). Esses dados confirmam o caráter endofítico e oportunista desse fungo. Estudos preliminares com 9 isolados de *Pinus* sp. e *Eucaliptus* spp. indicam que os hospedeiros são mais importantes do que a localização geográfica na determinação da variabilidade entre isolados de *L. theobromae* (BURGESS *et al.*, 2003). Porém a grande variabilidade entre isolados de diferentes hospedeiros apresentada por Cardoso e Wilkinson (2008) põe dúvida sobre esta observação. Embora esse estudo não objetivasse avaliar a variabilidade de isolados de diferentes hospedeiros, três isolados de hospedeiros diferentes do cajueiro foram usados a guisa de comparação. A grande variabilidade observada entre os isolados do cajueiro não permite inferir sobre a especificidade na associação com hospedeiros nesse estudo.

Observações sobre a variabilidade entre e dentro do mesmo tipo de sintoma (i.e. PPH e resinose) não permite nenhuma conclusão, pois nenhuma correlação pode ser observada.

O estágio perfeito de *L. theobromae* nunca foi descrito no Brasil, sugerindo a reprodução mitótica como predominante. A ocorrência e reduzido número de bandas duplas nos géis dos produtos amplificados com o mesmo *primer*, confirma a hipótese de condição haplóide do talo da maioria dos indivíduos da população estudada. O modo endofítico de associação de *L. theobromae* com outros hospedeiros (MOHALI *et al.*, 2005, MULLEN *et al.*, 1991 e RUBINI *et al.*, 2005) e com o cajueiro (demonstrado no item 4.2) pode ser interpretado como uma co-evolução entre o fungo e o hospedeiro influenciado pelas condições adversas do ambiente, indicado anteriormente por Burgess *et al.* (2003). A menor variação entre os isolados dentro do ecossistema semi-árido (>50% similaridade) em relação aos outros dois ecossistemas (cerrado <30% e litoral <20%) pode ser decorrente do fluxo de “migração” do cajueiro cultivado, presumivelmente no sentido litoral, sertão e cerrado.

A elevada gama de hospedeiro, a variabilidade genética, a distribuição geográfica e a alta dependência de fatores de ambiente no processo infectivo são fatores de grande complexidade que exigem estudos aprofundados de caracterização populacional e de manejo

das doenças causadas por esse fungo. A possibilidade da existência de espécies biológicas morfológicamente semelhantes não está descartada a partir desses estudos.

5 CONCLUSÃO

1. *Lasiodiplodia theobromae* pode ser isolado de tecidos do caule do cajueiro até 90 cm de distância da extremidade da lesão característica de resinose nos dois sentidos, ascendente e descendente, em relação à lesão;
2. *Lasiodiplodia theobromae* sobrevive endofiticamente em tecidos de caule e ramos de cajueiro;
3. A população testada de *Lasiodiplodia theobromae* foi altamente variada pelos marcadores microssatélites usados;
4. A sub-população de *Lasiodiplodia theobromae* isolada de tecidos sem sintomas agregou-se geneticamente à sub-população isolada de tecidos infectados;
5. Isolados de *Lasiodiplodia theobromae* obtidos de tecidos infectados não diferem geneticamente daqueles de tecidos não infectados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics.**, v. 132, p. 1131-1139, 1992.

ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E. Isozymes analyses procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. **HortScience.**, Alexandria, v. 21, n. 4, p. 928-933, 1986.

BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 73-93. 1995.

BARROS, L. M.; PAIVA, J. R.; CAVALCANTI, J. J. V.; ARAÚJO, J. P. P. Cajueiro. In: Bruckner, C. H. (ed.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: Editora UFV, 2002. p. 159-176.

BARROS, L. M.; PIMENTEL, C. R. M.; CORREA, M. P. F.; MESQUITA, A. L. M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro-anão-precoce**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1993. 65 p. (Circular Técnica, 1).

BAUM, B., LI, W.; PERRIMON, N. A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during *Drosophila* oogenesis and in yeast., **Current Biology.**, v.10, p. 964-973. 2000.

BEZERRA, M. A.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A.; Vidal, J. C.; ALENCAR, E. S. **Efeito da Resinose na Fotossíntese do Cajueiro-Anão Precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2003 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8).

BRESSAN-SMITH, R. E. **Mapeamento de locos de características quantitativas associadas com a morfologia, a fotossíntese e o rendimento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1998. 99 f. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 1998.

BURGESS, T.; WINGFIELD M.J.; WINGFIELD B.D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes.**, v. 3, p. 91-94, 2003.

CARDOSO, J.E. ARAGÃO, M.L., BLEICHER, E.; CAVALCANTE, M.J.B.. Efeito de práticas agrônômicas na ocorrência da resinose do cajueiro **Fitopatologia Brasileira.**, v. 20 p. 242. 1995. (suplemento)

CARDOSO J. E., VIDAL J. C., SANTOS A. A., FREIRE F. C. O., VIANA F. M. P., (2002) First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brasil. **Plant Disease**, v. 86, p. 558.

CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; SÁ, F. T. Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. **Fitopatologia Brasileira.**, v. 23, n. 1, p. 48-50. 1998.

CARDOSO, J. E.; PAIVA, J. R.; CAVALCANTI, J. J. V.; SANTOS, A. A.; VIDAL, J. C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brasil. **Crop Protection.**, v. 25, p. 855-859. 2006.

CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C.; UCHOA, C. N.; ALENCAR, E. S.; SILVA, R. C. **Diagnóstico do sistema produtivo do cajueiro no sudeste do Piauí.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2003 (Série Embrapa – Comunicado técnico 83).

CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathol.**, v. 34, n. 1, p. 55-57, 2008 .

CATTANEO, L. F. **Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.).** 2001. 94 f. Tese (Doutorado em produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2001.

FAO. 2007. **FAOSTAT - Food and agriculture organization of the United Nations.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>> Acesso em: 26 maio 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

FREIRE, F.C.O. A resinose do cajueiro. **Caju Informativo**, Fortaleza, v. 4, n. 1-2, 1991.

FREIRE, F, C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. 687p.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. P. Diseases of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, p. 489-494, 2002.

FREIRE, F. C. O.; CAVALCANTE, M. J. B.; BEZERRA, J. L. Deterioração fúngica de amêndoas de castanha do cajueiro no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18 (suplemento), p. 229-270, 1993.

FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E. Doenças da Spondias - cajarana (*S. cytherea* Sonn.), cajazeira (*S. mombin* L.), ciriguela (*S. purpurea* L.), umbu (*S. tuberosa* A. Cam.) e umbuguela (*Spondias* spp.) no Brasil. **Agrotropica**, v. 9, n. 2, p. 75-82, 1997.

GEHRIG, H. H.; ROSICKE, H.; KLUGE, M. Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoe* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and ecophysiological photosynthetic behaviour of the species. **Plant Science**, v. 125, p. 41- 41, 1997.

GOOS, R. D.; COX, E. A.; STOTZKY, G. Botryodiplodia theobromae and its association with Musa species. **Mycologia**, 53:262-277. 1961.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, p. 163-185, 2000.

IBGE, 2007. **Dados de Previsão de Safra Disponível** em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf>>. Acesso em 13 mai 2007.

LIMA, M. R. M. S. **Caracterização de cultivares de *Prunus persica* (L.) Batsch através de marcadores moleculares**. 2001. 33f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

LITT, M.; LUTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44: p. 398-401.

MENEZES, M.; MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M. Podridão da haste do mamoeiro “Sunrise-solo” causada por *Botryodiplodia theobromae* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica** n. 23, p. 44-45. 1997.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology.**, v. 35, p. 385-396, 2005.

MULCAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSAVINI, S.; DOUGLAS, G.C.; LINSKENS, H.F.; BERGAMINI MULCAHY, G.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 54, p. 89-96, 1993.

MULLEN, J. M.; GILLIAM, C. H.; HAGAN, A. K.; MORGAN-JONES, G. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced stress or cultivar selection. **Plant Disease**, v. 75, p. 886-889, 1991.

Nei, M. and W.-H. Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, n. 76, p. 5269-5273. 1979.

PANCALDI, M.; BATISTTINI, S. Utilizzo degli isoenzime per l'identificazione varietale in albicocco. **Atti Convegno Agro-Bio-Frut.**, p. 195-202. 1991.

PANCALDI, M.; KAÇAR, T.; KUDEN, A. B.; SANSAVINI, S. Impiego di microsatelliti sequenziati nel pesco per il "fingerprinting" e l'analisi genealogica del mandorlo. **Frutticoltura**, Bologna, n. 11, p. 70-73. 1999.

PATOUILLARD, N.; De LAGERHEIM, G. Champignons de l'Equateur (Pugillus II). **Bulletins de la Société Mycologique de France.**, v.8 p. 119-140. 1892.

PHILIPS, R. L.; VASIL, I. K. (Ed.). DNA-Based Markers in Plants. Dordrecht: Kluwer **Academic Publishers**, p. 497. 2001.

PIMENTEL, C. R. M. **Aspectos da distribuição e produção de caju no Estado de Ceará:** Fortaleza: CNPCa, 1988. 12 p. (Embrapa-CNPCa. Documentos, 01).

PIMENTEL, C.R.M. **Impacto dos investimentos em pesquisa realizado pela EMBRAPA:** o caso do cajueiro anão precoce. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1996.15p.

PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. SSR cross- amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, v. 47, p.1071-1081, 2004.

PONTE, J. J. da.; ATHAYDE, C.; SENA, C. B. de.; VALE, C. C.; BEZERRA, J. L. Etiologia da resinose de frutíferas do gênero Spondias. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 280-281. 1988.

PONTE, J. J. Uma nova doença da ateira (*Annona squamosa*) e da gravioleira (*A. muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 10. p. 689-690. 1985.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to Botryodiplodia theobromae**. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p.

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**., v. 162, p. 329- 333. 2002.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI C. S.; ARAÚJO W. L.; SANTOS, D. R. D.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**., v. 1, p. 24-33. 2005.

SAGHAI MAROOF, M. A.; BIYASHEV, R. M.; YANG, G. P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R. W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 91, p. 5466-5470, 1994.

SANSAVINI, S. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**., n. 5, p.75-81. 1998.

SANTOS, A. S. **Marcadores de DNA no melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. 140p. 2000. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, 2000.

SOSINSKI, B.; GANNAVARAPU, M.; HAGER, L. D. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**., n. 101, p. 421-428, 2000

SOUZA FILHO, B. F.; SANTOS FILHO, H. P.; ROBBS, C. F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 4. p. 5-10. 1979.

TAVARES, S. C. C. de H. Botryodiplodia theobromae Lat. em mangueira no submédio São Francisco. II. Condições Predisponentes - Controle. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v 15, n. 1, :p. 147-152. 1993.

URASAKI, N.; TOKUMOTO, M.; TORORA, K.; BAN, Y.; KAYANO, T.; TANAKA, H.; OKU, H.; CHINEN, I.; TERAUCHI, R. A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics.**, v. 104, n.2-3, p.281-285, 2002.

VARSHNEY, R. K.; KORZUN, V. BÖRNER, A. Molecular maps in cereals: met hodology and progress. In: GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. (Ed.). **Cereal Genomics.**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 35-82, 2004.

WU, K-S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 241, p. 225-235. 1993.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v. 42, p. 27-34, 1999.