

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

JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Lasiodiplodia theobromae*
ASSOCIADO AO CAJUEIRO**

**FORTALEZA-CE
2010**

JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Lasiodiplodia theobromae*
ASSOCIADO AO CAJUEIRO**

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: Fitopatologia

Orientador: Prof. PhD. José Emilson Cardoso

**FORTALEZA-CE
2010**

M485d Melo, José Glauber Moreira
Diversidade genética e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae*
associado ao cajueiro / José Glauber Moreira Melo, 2010.
60 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. PhD. José Emilson Cardoso
Área de concentração: Fitopatologia
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências Agrárias, Depto. de Fitotecnia, Fortaleza, 2010.

1. Cajueiro – Doenças e pragas. 2. *Lasiodiplodia theobromae*. 3.
Resinose. 4. Podridão preta das hastes. I. Cardoso, José Emilson (Orient.).
II. Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Agronomia. III. Título

CDD 631

JOSÉ GLAUBER MOREIRA MELO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Lasiodiplodia theobromae*
ASSOCIADO AO CAJUEIRO**

Aprovada em: 27 / 01 / 2010.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dra. Carmem Dolores Gonzaga Santos
Professora da Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Marlon Vagner Valentim Martins
Pesquisador Embrapa Agroindústria Tropical

Aos meus pais, José Pereira e Edinar.
Aos meus irmãos, Cláudio e Clauber.
À minha irmã, Marie (*In memorian*)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter sempre me presenteado com inúmeras graças, dando-me forças para eu superar todos os obstáculos. Por sempre ter sido generoso e bondoso comigo.

Aos meus pais, pela dedicação, amor, e ensinamentos, devo a vocês tudo que conquistei até hoje, muito obrigado.

Aos meus irmãos, Cláudio e Clauber, pela amizade, companheirismo e apoio dado a mim.

A minha querida Dulcineide, minha segunda mãe, agradeço por ter surgido em nossas vidas.

Ao meu orientador, José Emilson Cardoso, pelos ensinamentos, dedicação e confiança. Obrigado por me apresentar ao mundo das pesquisas.

Aos professores Carmem Dolores, Ervino Bleicher, Marcos Esmeraldo e Renato Inneco, pelos ensinamentos que me fizeram ampliar o conhecimento.

Aos meus grandes amigos, Marcelo, Keilla, Adembergue, Gledson e Wesceley, pela amizade.

Aos companheiros de laboratórios, Alex, Aldiel, Edson, Emília, Eveline, Fábio, Fred, Gustavo, Jaqueline, Joilson, Kairo, Renato, Samara, e todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho, e principalmente, pela amizade e grandes momentos de alegria.

Aos meus amigos do mestrado, Afrânio, Aline, Ana Lúcia, Hayna, Nathália, Ravena, pelo companheirismo e pelos muitos momentos de estudos e diversão.

A todos os colegas da pós, Ciro, Gutemberg, Fabrício, Jonas, Herbert, Jefté, Tomil, Tiago e todos aqueles que me ajudaram de alguma forma.

Aos meus amigos da graduação, Cleilson, Halen, Luciano, Ozail, Ronialison, Rommel, por estarem presentes nos melhores anos da minha vida.

Aos meus avós, tios, primos e todos meus entes queridos, por fazerem parte desta minha enorme família que tanto amo.

Ao Deocleciano, secretário do curso de pós-graduação, pelas informações e ajuda prestada durante todo o meu curso.

À UFC pela oportunidade concedida.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela utilização dos equipamentos, dependências e pela oportunidade concedidas.

“A maior glória não é ficar de pé, mas levantar-se cada vez que se cai.”
Confúcio.

RESUMO

O cajueiro tem uma grande importância sócio-econômica e cultural para a região Nordeste, por gerar emprego para os agricultores, sendo por muitas vezes a sua única fonte de renda. Assim, as pesquisas com esta fruteira têm aumentado bastante nos últimos anos, visando primariamente, reduzir os danos fitossanitários e elevar a produtividade. As doenças, como nas demais espécies cultivadas, causam significativos danos. Dentre as doenças do cajueiro, a resinose e a podridão preta das hastes, ambas causadas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, se destacando entre as principais doenças em algumas regiões do semi-árido nordestino. Porém, ainda há poucos estudos sobre a biologia, morfologia, caracterização genética desse patógeno, fato que dificulta o seu manejo. Este estudo objetivou caracterizar a diversidade genética e patogênica de uma população com 22 isolados de *L. theobromae* associada ao cajueiro, utilizando marcadores microssatélites e inoculações em plantas de cajueiro. Para a caracterização molecular, extraiu-se o DNA de cada isolado a partir do micélio do fungo crescido em meio líquido. Cada amostra foi submetida à reação de polimerase em cadeia (PCR) com 15 pares de iniciadores desenvolvidos para flanquear regiões específicas contendo sequências simples repetidas (microssatélites) dessa espécie. Os produtos amplificados foram observados em gel de eletroforese corados com brometo de etídio, e os dados tabulados em planilha binária e analisados pelo método de agrupamento não balanceado baseado na média aritmética (UPGMA), utilizando o programa MVSP. As similaridades genéticas foram estimadas pelo coeficiente de Nei e Li. Os resultados indicaram uma grande variabilidade genética da população avaliada, representada por diversos grupos de similaridade variando de 22,2% a 100%. Três destes isolados apresentaram entre si, 100% de similaridade genética com os marcadores testados. No entanto, eram morfologicamente diferentes e um deles era procedente de localidade diferente que os demais. Os dados mostraram que a similaridade genética por si só não deve ser aplicado como único fator de diversidade entre isolados. Para se testar a patogenicidade, os isolados foram inoculados em mudas de cajueiro, analisando-se o tamanho da lesão e a taxa de crescimento do fungo. Os resultados mostraram não haver diferenças estatísticas entre os isolados, fato que demonstra que, independente do local de origem, todos os isolados mostraram-se patogênicos, e a sua taxa de crescimento decresce, isto é, a planta deve produzir algum tipo de defesa contra o patógeno, o que dificulta a sua infecção.

Palavras chave: *Anacardium occidentale*, resinose, podridão preta das hastes, marcadores moleculares, detecção de fitopatógenos.

ABSTRACT

The cashew has a major socio-economic and cultural development for the Northeast region, by generating employment for farmers and is frequently their only source of income. Thus, research on this fruit has increased greatly in recent years, aimed primarily to reduce damage and increase plant productivity. Diseases, as in other crops, cause significant damage. Among cashew diseases, gummosis and black stem rot, both caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae*, stand out among the major diseases in some regions of the semi-arid. However, there are few studies on the biology, morphology, genetic characterization of this pathogen, a fact that burden their management. This study aimed to characterize the genetic and pathogenic diversity of a population of 22 isolates of *L. theobromae* associated with cashew, using microsatellite markers and inoculations in cashew plants. For molecular characterization, DNA was extracted from mycelium of each isolated of the fungus grown in liquid medium. Each DNA sample was subjected to a polymerase chain reaction (PCR) with 15 pairs of primers designed to flank specific regions containing simple repeated sequences (microsatellites) in this species. The amplified products were observed in gel electrophoresis stained with ethidium bromide, and the data recorded on a binary and analyzed by grouping unbalanced based on arithmetic mean (UPGMA) using the program MVSP. Genetic similarities were estimated by the coefficient of Nei and Li. The results indicated a large genetic variability of the population, represented by different groups of similarity ranging from 22.2% to 100%. Three of these isolates showed 100% genetic similarity with the markers tested. However, they were morphologically differences and one of them was originated from different location than the others. The data showed that the genetic similarity alone should not be applied as the only factor of diversity among isolates. To test the pathogenicity, each isolate was inoculated on cashew seedlings. Lesion development size and recovery of the fungus were recorded. The results showed no statistical differences between the isolates, which demonstrates that, regardless of place of origin, all isolates were pathogenic, and its growth rate decreases, *i. e.*, the plant must produce some form of defense against pathogen, which hinders their infection.

Keywords: *Anacardium occidentale*, resinose, black rot of the stems, molecular markers, detection of pathogens.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Origem, tipo de cajueiro hospedeiro e de sintoma nos tecidos dos isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> objeto desse estudo e mantidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. 2009.....	32
TABELA 2	Isolados de <i>L. theobromae</i> utilizados nas reações de PCR, Fortaleza-CE, 2009.....	33
TABELA 3	Lista de iniciadores utilizados nas reações de polimerase em cadeia para a determinação da variabilidade genética de isolados de <i>L. theobromae</i> de cajueiro. Fortaleza-CE, 2009.....	37
TABELA 4	Isolados de <i>L. theobromae</i> utilizados no teste de patogenicidade, Fortaleza-CE, 2009.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Sintomas da resinose em cajueiro.....	22
FIGURA 2	Sintomas da podridão preta das hastes em cajueiro.....	23
FIGURA 3	Análise de DNA de <i>L. theobromae</i> por eletroforese em gel de agarose. M = marcador Hiperladder 1 kb, os números 02, 03, 04, 08,13, 25, 41, 42 correspondem aos isolados utilizados.....	34
FIGURA 4	Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose do isolado 08 com os 15 pares de oligonucleotídeos. M = marcador Hiperladder 1 kb, números de 01 – 15 primers utilizados.....	42
FIGURA 5	Dendrograma de 22 isolados de <i>L. theobromae</i> obtido a partir de análises, empregando 15 marcadores microssatélites. A análise de Cluster (UPGMA) foi baseada no coeficiente de Nei e Li (1979), por meio do programa MVSP.....	44
FIGURA 6	A - Sintomas da infecção interna causada por <i>L. theobromae</i> em mudas de cajueiro inoculado com o isolado 48. B e C – Comparação do tratamento com a testemunha.....	45
FIGURA 7	Crescimento médio das lesões de <i>L. theobromae</i> inoculado em mudas de cajueiro. Dados não diferem significativamente na avaliação da patogenicidade dos isolados, pelo teste de Tukey ($p=0,05$).....	46
FIGURA 8	Crescimento médio das lesões (cm) e taxa de crescimento (cm/dia) de <i>L. theobromae</i> inoculado em mudas de cajueiro, avaliado a cada dois dias.....	47
FIGURA 9	Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, do isolado 26, com os 15 pares de iniciadores. M = marcador 'Hyperlader' 1 kb, 1 a 15 pares de iniciadores.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	16
2.2	O fungo (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>).....	18
2.3	Doenças causadas por <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	21
2.3.1	Resinose.....	21
2.3.2	Podridão preta das hastes.....	22
2.4	Técnicas moleculares para a detecção do fungo.....	24
2.4.1	Reação da polimerase em cadeia - PCR.....	24
2.4.2	Marcadores moleculares.....	26
2.4.3	Marcadores microssatélites.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Caracterização molecular dos isolados.....	31
3.1.1	Obtenção dos isolados.....	31
3.1.2	Recuperação dos isolados.....	31
3.1.3	Obtenção do fungo para extração de DNA.....	31
3.1.4	Extração de DNA.....	33
3.1.5	Reação da polimerase em cadeia.....	35
3.1.6	Análise dos dados e obtenção do dendrograma.....	35
3.2	Teste de patogenicidade.....	38
3.2.1	Obtenção do material vegetal.....	38
3.2.2	Produção do inóculo.....	38
3.2.3	Inoculação de <i>L. theobromae</i>	39
3.2.4	Avaliação das lesões.....	39
3.3	Ensaio para detecção de <i>L. theobromae</i> em mudas de cajueiro.....	39
3.3.1	Inoculação do fungo.....	39
3.3.2	Extração de DNA.....	40
3.3.3	Reação da polimerase em cadeia.....	41
3.3.4	Avaliação dos dados.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Caracterização molecular dos isolados.....	42
4.2	Patogenicidade dos isolados.....	45
4.3	Ensaio para detecção de <i>L. theobromae</i> em mudas de cajueiro.....	47
4.4	Detecção de <i>L. theobromae</i> em mudas de cajueiro.....	48
5	CONCLUSÕES.....	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta originária do Brasil, encontrando-se disseminada nas regiões tropicais, sendo cada vez maior o interesse em sua exploração econômica, notadamente nas regiões agrícolas menos desenvolvidas, pelas suas características de geração de emprego e renda, representando uma tradição social e econômica no nordeste brasileiro, caracterizando-se como uma das mais importantes fontes de emprego e renda (BARROS *et al.*, 1993).

O cajueiro teve a partir da década de 70 um crescimento acentuado em área de cultivo, devido principalmente à implantação de técnicas modernas de cultivo, viabilizadas pela introdução de clones melhorados. O cultivo de clones do tipo anão possibilitou o manejo das plantas no pomar, bem como uma produção uniforme de castanha e pedúnculo. Na região semi-árida, por exemplo, apenas o clone CCP-76 responde por mais de 90% dos pomares implantados nas duas últimas décadas (OLIVEIRA; BANDEIRA, 2002).

A produção mundial de castanha, segundo a FAO (2010), é de cerca de 3,7 milhões de toneladas/ano. Os principais países produtores são o Vietnã (1.190.600 t), Índia (665.000 t), Nigéria (660.000 t), Brasil (239.702 t) e Indonésia (142.536 t). Ainda segundo a FAO, a área colhida com cajueiro no mundo é de 4.097.637 ha.

O problema mais significativo da cajucultura na região Nordeste do Brasil tem sido a baixa produtividade dos pomares, atualmente com rendimento semelhante à média do Brasil, que alcança apenas a marca de 284 kg/ha (IBGE, 2010). A causa deste baixo rendimento está relacionada a diversos fatores, dentre eles, destacam-se os problemas fitossanitários, tais como, as doenças e as pragas. Dentre as doenças, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e o mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*), responsáveis por grandes danos na quantidade e qualidade dos frutos produzidos. Além dessas doenças, a resinose e a podridão preta das hastes, ambas causadas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon ; Maubl., vem crescendo de importância nas áreas produtoras do semi-árido nordestino (CARDOSO *et al.*, 1998).

A resinose do cajueiro 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. Contudo, esta hipótese foi logo desconsiderada face à constatação da doença em níveis epidêmicos em pomares sob diversas

condições de manejo, inclusive no cajueiro-anão precoce. Essa 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 cultivo irrigado. (BEZERRA *et al.*, 2003). Nos últimos anos foi selecionado e lançado um clone de cajueiro, o BRS 226-Planalto na região semi-árida, o qual é resistente à resinose (PAIVA *et al.*, 2002), revelando a existência de variabilidade genética em clones.

O mesmo fungo é capaz de causar outra doença, a podridão preta das hastes, a qual já foi observada em pomares irrigados de cajueiro nos estados do Ceará e Piauí (CARDOSO *et al.*, 2000; 2002).

Em Beberibe – CE a doença ocorreu, inicialmente, em vários clones selecionados que compõem o experimento de competição de clones de cajueiro anão precoce, sendo detectada, posteriormente, na área do clone CAP 09. Os sintomas desta doença caracterizam-se pelo escurecimento longitudinal dos tecidos da haste terminal (herbácea) do cajueiro com eventuais exsudações de goma em pontos específicos. Esse sintoma progride até a necrose total e queima descendente do ramo (CARDOSO *et al.*, 2000).

A disseminação do patógeno ocorre através de sementes, propágulos vegetativos e porta-enxertos, geralmente sem sintomas de infecção (CARDOSO *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2004). Esta característica é considerada a maior responsável pelas epidemias observadas na microrregião do sudeste do Piauí (CARDOSO *et al.*, 1998; CARDOSO; SANTOS, 2004; FREIRE; CARDOSO, 2002).

Recentemente, foi evidenciada a importância do propágulo infectado como veículo de introdução da resinose e da podridão preta das hastes em áreas isoladas (CARDOSO; WILKINSON, 2008). Esses estudos permitiram estabelecer o caráter endofítico de *L. theobromae* em plantas de cajueiro.

Estudos em populações de patógenos utilizando ferramentas moleculares têm tido importantes contribuições para o entendimento da epidemiologia, co-evolução hospedeiro-patógeno, mecanismos de variação do patógeno, manejo da resistência e métodos de controle de doenças. Diversas técnicas de biologia molecular que detectam variabilidade genética ao nível de sequência de DNA estão hoje disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Ainda segundo esses autores, a tecnologia que amplifica regiões contendo marcadores moleculares específicos, tais como seqüência simples repetidas (microsatélites) de DNA, através de reações em cadeia de polimerase (PCR) representa uma significativa e poderosa ferramenta na recombinação de DNA, na determinação da diversidade genética de populações, nos níveis de relacionamento genético e nos estudos de evolução. A detecção de seqüências simples repetidas ou SSR representa uma poderosa ferramenta de caracterização genética, altamente polimórfica e capaz de gerar um perfil de bandas discriminatórias denominadas “impressão digital genética” ou “DNA-fingerprint”.

O uso de marcadores moleculares poderá permitir a caracterização (“fingerprinting”), a detecção, o diagnóstico e o monitoramento da disseminação de específicos ecotipos do *L. theobromae* entre pomares e até entre regiões. A detecção da presença de tipos patogênicos do fungo em propágulos assintomáticos poderá ser feito com absoluta segurança, usando esses marcadores através da PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O processo de recuperação da cultura do cajueiro no Nordeste prevê o plantio em larga escala de clones melhorados de cajueiro anão-precoce nos próximos anos. O diagnóstico e a supressão do *L. theobromae* no material propagativo e nas mudas tornam-se indispensáveis para o sucesso desses programas. O uso de mudas seguramente livres do patógeno constitui-se em uma importante medida de exclusão da doença em outras regiões.

Esse estudo teve por objetivos a caracterização molecular de uma população de *L. theobromae* associada ao cajueiro, por meio de marcadores microsatélites; avaliação da reação de patogenicidade em mudas de cajueiro, além do desenvolvimento de uma metodologia de detecção do fungo em tecidos de mudas de cajueiro inoculados artificialmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)

Originário da América Tropical, o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família Anacardiaceae, que inclui árvores e arbustos tropicais e subtropicais, encontrando-se disperso numa extensa faixa compreendida entre os paralelos 27° N, no Sudeste da Flórida, e 28° S, na África do Sul (FROTA; PARENTE, 1995).

A maior diversidade de cajueiro encontra-se no Nordeste brasileiro, sendo essa a única espécie cultivada e a de maior dispersão do gênero *Anacardium* em diversos ecossistemas, especialmente nas zonas costeiras, compondo a vegetação de praias, dunas e restingas. Estas razões indicam que o seu cultivo tenha origem no Nordeste, onde toda uma tradição de exploração pelas tribos indígenas da região é descrita pelos primeiros colonizadores (LIMA, 1988; BARROS; CRISÓSTOMO 1995).

Na natureza existem dois tipos de cajueiros bem definidos em relação ao porte e a precocidade: são os tipos comum e anão-precoce. O cajueiro-comum apresenta porte elevado, com altura variando de 8 a 15 m e envergadura da copa que chega a atingir 20 m. Esse tipo apresenta não somente uma grande variação na distribuição de ramos e formatos de copa, que vai desde ereta e compacta até aberta e dispersa, como também uma grande variação na produção de seus principais, a castanha e o pedúnculo. Embora a maioria das plantas produza menos de 5 kg de castanha por safra, plantas com produção máxima de 200 kg são encontradas com frequência. O peso da castanha varia de 3 a 33 g e do pedúnculo, de 20 a 500 g. A estabilização da produção não ocorre antes dos oito anos, mas pode alcançar entre 12 a 14 anos. A quase totalidade dos plantios existentes no Nordeste é de cajueiro-comum (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

O cajueiro-anão-precoce, também conhecido por cajueiro-de-seis-meses, caracteriza-se pelo porte baixo, copa homogênea, diâmetro do caule e envergadura bem inferiores ao do tipo comum (BARROS *et al.*, 2002). A maioria das plantas propagadas por semente (pé-franco) ou por enxertia inicia o florescimento já no primeiro ano. O peso da castanha nas populações naturais varia de 3 a 10 g e do pedúnculo de 20 a 160 g, o que significa dizer que são características com menor variação em relação ao tipo comum. A

capacidade produtiva individual também é menor, com a produção máxima em torno de 63 kg de castanha por planta (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

O cajueiro encontra-se praticamente em todos os estados brasileiros, contudo adapta-se melhor ao clima do litoral nordestino. Ao longo das últimas décadas, a agroindústria do caju vivenciou um rápido crescimento nos seus indicadores quantitativos: a área ocupada com a cultura no país alcançou os 650 mil hectares e a capacidade instalada da indústria processadora de castanha atingiu cerca de 280 mil toneladas/ano (OLIVEIRA, 2002). Ainda segundo o mesmo autor, a importância dessa agroindústria para os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde são colhidos cerca de 95% da produção e onde é feito todo o processamento da castanha, é representada pela movimentação de 157 milhões de dólares em exportações de amêndoas, como também, milhares de empregos diretos e indiretos em todas as atividades dos segmentos produção, industrialização e comercialização da cadeia agroindustrial.

O uso de clones resistentes a patógenos e a insetos representa uma forma de manejo econômico, ecológico e seguro, contribuindo para redução dos danos provocados por doenças e pragas, além de proporcionar uma melhor utilização da variabilidade genética da espécie (PAIVA; BARROS, 2004).

A produtividade potencial do cajueiro-anão-precoce em cultivo de sequeiro é de cerca de 1.000 kg de castanha/ha e 10.000 kg de pedúnculo/ha, enquanto que em cultivo irrigado é de 3.800 kg de castanha e 30.000 kg de pedúnculo para a mesma área (OLIVEIRA, 2002). Entretanto, este potencial de produção tem alcançado cerca de 1.500 kg no sexto ano de avaliação em experimentos conduzidos com novos clones de cajueiro-anão em cultivo de sequeiro (BARROS *et al.*, 2000).

Por outro lado, o pedúnculo ou pseudofruto, que representa cerca de 90% do peso do fruto completo, cujo aproveitamento, até meados dos anos 90, não ultrapassava 5% da produção, vem se tornando, aos poucos, importante segmento da agroindústria do caju (PAIVA; BARROS, 2004). Ainda segundo os mesmos autores, verifica-se um crescente aumento das vendas do pedúnculo, apontando para a conquista de novos mercados com a oferta de 30 subprodutos, dos quais se destacam o suco concentrado, hoje o mais vendido no país, doces, refrigerante gaseificado e cajuína, um suco puro e clarificado bastante consumido no Estado do Ceará. Entre os fatores responsáveis por essa tendência, pode-se destacar a

expansão do consumo do pedúnculo “in natura”, viabilizado com o cultivo de clones melhorados e tecnologias pós-colheita, atraindo novos e importantes mercados.

Apesar da sua rusticidade e elevada adaptação às condições de ambiente, o cajueiro é hospedeiro de inúmeros agentes patogênicos que impõem severos danos à produção. Durante muito tempo as doenças foliares causadas por fungos se constituíram nas principais ameaças à cultura. A principal doença do cajueiro é a antracnose (*Colletotricum gloeosporioides*) que ocorre endemicamente em todas as regiões do Brasil. Sob condições de elevada umidade e temperatura durante o período de floração e lançamento foliar, severas epidemias da antracnose podem causar grandes prejuízos à produção e qualidade do fruto (FERNANDES *et al.*, 2009).

2.2 O fungo (*Lasiodiplodia theobromae*)

Existem 19 sinônimas para *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.), incluindo *Diplodia gossypina* Cooke e *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon ; Maubl. (PUNITHALINGAM, 1976). Para Sutton (1980), *Lasiodiplodia* é o nome genérico a ser adotado para este patógeno em substituição a *Botryodiplodia theobromae* (Pat.).

Lasiodiplodia theobromae (forma imperfeita de *Botryosphaeria rhodina* (Berk.; M.A. Curtis) é um fungo polífago, capaz de infectar, isoladamente ou em associação com outros patógenos, aproximadamente 500 espécies de plantas, causando sintomas como tombamento de plântulas, podridão radicular, murcha, queima foliar, cancro, gomose, podridão de frutos e de sementes, morte descendente e envassouramento, além de outros sintomas mais específicos em determinados hospedeiros, causando sérios prejuízos (PUNITHALINGAM, 1976). Este fungo encontra-se disseminado em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, conseqüentemente pressupõe-se uma grande variabilidade genética (CARDOSO *et al.*, 1998).

A disseminação primária deste patógeno ocorre através de sementes, propágulos vegetativos e portas-enxerto, geralmente sem sintomas de infecção (CARDOSO *et al.*, 1998; CARDOSO; SANTOS, 2004; CARDOSO; WILKINSON, 2008). Esta característica é considerada como a maior responsável pelas epidemias observadas na microrregião do sudeste do Piauí (CARDOSO *et al.*, 1998; CARDOSO; SANTOS, 2004; FREIRE; CARDOSO, 2002).

Hospedeiros infectados por *L. theobromae* podem apresentar diferentes sintomas tais como: seca descendente (*die-back*), murcha, podridão basal dos frutos, cancro em raízes, caules e ramos, podendo também causar a morte de mudas e enxertos. É também considerado um dos principais patógenos de pós-colheita devido à alta incidência nos frutos (SANTOS *et al.*, 2000).

Dentre os inúmeros hospedeiros podemos citar diversas fruteiras como a gravioleira, a ateira, e o sapotizeiro (PONTE, 1985; FREIRE *et al.*, 2004), e também espécies de grande importância econômica para o país como o cajueiro, a mangueira, o coqueiro, a aceroleira e o maracujazeiro, todas em regiões tropicais e temperadas (TAVARES, 1995; FREIRE, 1995; VIANA *et al.*, 2002; FREIRE; CARDOSO, 2003).

Em meio de cultura composta de batata dextrose ágar (BDA), as colônias de *L. theobromae* apresentam coloração variando de acinzentadas a escuras, com abundante micélio aéreo. Formam picnídios simples ou compostos, freqüentemente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides para elipsóides – oblongos, com parede espessa e base truncada. Os conídios maduros de *L. theobromae* tornam-se uniseptados e de coloração castanho – amarelados, sendo longitudinalmente estriados. As dimensões dos conídios variam entre 18 – 30 x 10 – 15µm. As paráfises, quando presentes, são hialinas, cilíndricas, algumas vezes septadas, tendo mais de 50µm de comprimento. Nas folhas, caules e frutos de plantas infectadas por este fungo, os picnídios são imersos. Podem ocorrer isoladamente ou agrupados, apresentando 2 a 4 mm de largura. São ostiolados e freqüentemente pilosos e podem apresentar extrusão de conídios com aspecto de uma massa preta (PUNITHALINGAM, 1976).

Alguns autores têm constatado variações em colônias de *L. theobromae*, Ram (1993), ao avaliar as características culturais, como desenvolvimento micelial, esporulação, morfologia e patogenicidade de dez isolados de *L. theobromae* de diferentes hospedeiros em meio de cultura BDA verificou que os isolados variaram na coloração da colônia e no crescimento micelial.

Menezes *et al.* (1997), em estudos com *L. theobromae* isolado da podridão da haste em mamoeiro (*Carica papaya* L.), observaram que o fungo cultivado em meio de cultura BDA, apresentou colônia inicialmente branca, tornando-se cinza-esverdeada a preta,

com micélio aéreo vigoroso e de aspecto cotonoso, com extensão micelial rápida, cobrindo toda a superfície da placa em 48h.

Moraes *et al.* (1995), ao avaliar o crescimento micelial, produção de picnídios e picnidiósporos de *L. theobromae* oriundo de lesões em ramos de plantas cítricas, utilizaram meios de decocção de folhas das tangerineiras (*Citrus* spp.) ‘Murcot’ e ‘Ponkan’ em comparação com meios tradicionais, BDA e extrato malte-ágar. Os autores observaram que houve grande variação nos aspectos da colônia e dos esporos do fungo nos meios utilizados, havendo, contudo, maior crescimento micelial em BDA e em malte-ágar.

Segundo Machado (1980), de um modo geral, os microrganismos apresentam uma grande variabilidade que pode refletir em sua morfologia, fisiologia ou patogenicidade. Variações na capacidade de utilização de diferentes substratos, de tolerância a determinados valores e faixas de temperatura e pH, de produção de toxinas ou outros metabólitos, que são manifestações de diferenças fisiológicas dentro de uma população, resultam, às vezes, em variações na patogenicidade dos biótipos.

Vários outros estudos relataram os aspectos da fisiologia de *L. theobromae*. Rao e Singhal (1978) verificaram que a formação de picnídios em meio de cultura é dependente de indução pela luz. Honda e Aragaki (1978) obtiveram maior produção de picnídios sob comprimentos de onda entre 344,5 e 519nm e exsudação de conídios apenas sob comprimento de ondas inferiores a 333nm, sendo estes valores próximos às faixas de luz ultravioleta e azul. De acordo com Okey e Adisa (1977), as condições ótimas para a germinação de conídios de *L. theobromae* caracteriza-se por 100% de umidade relativa, temperatura de 30°C e pH 7,0, não sendo influenciada pela luz. Gupta (1977) verificou que a germinação de conídios, a 30°C, aumenta em função da concentração de sacarose no meio. Estudos de Wang e Pinckard (1972) mostraram ainda a capacidade de *L. theobromae* em produzir várias enzimas pécticas, além de celulasas, proteases e outras.

2.3 Doenças causadas por *Lasiodiplodia theobromae*

2.3.1 Resinose

A resinose do cajueiro, doença causada pelo fungo *L. theobromae*, foi descrita pela primeira vez no nordeste brasileiro, no município de Alto Santo - Ceará (FREIRE, 1991). É a principal doença do cajueiro no semi-árido nordestino, estando geralmente associada a plantas estressadas e submetidas a ferimentos 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 se manifesta não somente no cajueiro como também em outras anacardiáceas consideradas de grande importância na região semi-árida do Nordeste (CARDOSO *et al.*, 1998).

De acordo com Fernandes *et al.* (2009), esta doença ocorre no caule e ramo provocando a necrose da casca e, posteriormente, a morte da planta. Em plantas adultas, a resinose caracteriza-se pelo escurecimento, intumescimento e rachadura da casca (Figura 1), formando cancrs no tronco e ramos, seguidos de intensa exsudação de goma. Abaixo da casca do cajueiro, observa-se um escurecimento dos tecidos o qual se prolonga até a parte interna do lenho. Ocorrem também amarelecimento e queda foliares. A disseminação da doença é feita pelo vento, sementes, insetos, animais silvestres e pelo homem por meio de instrumentos agrícolas.

Sob a casca, observa-se um escurecimento dos tecidos, o qual se estende, até atingir a região cortical e o câmbio vascular. Com o progresso da doença são observados sintomas de deficiências nutricionais, murcha, queda de folhas e morte dos ramos são observados, até o colapso total da planta (FREIRE, 1991). Estudos preliminares em pomares da região limítrofe entre os estados do Ceará e Piauí revelaram uma maior incidência da resinose nos ramos em relação aos caules, entretanto, ainda são desconhecidas as razões deste fato (CARDOSO *et al.*, 1995).



Figura 1 – Sintomas da resinose em cajueiro. Foto: J. G. M. Melo, 2010

Os danos 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 cancos (BEZERRA *et al.*, 2003).

A prática de substituição de copa do cajueiro torna esta doença uma ameaça maior, pois a disseminação do patógeno é evidente durante o processo, além da predisposição dos brotos provocados pelo estresse (CARDOSO *et al.*, 2000).

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; CARDOSO, 2002).

2.3.2 Podridão preta das hastes

A podridão preta das hastes (PPH), outra doença causada por *L. theobromae*, foi observada em pomares irrigados e de sequeiro de cajueiro nos estados do Ceará e Piauí, (CARDOSO *et al.*, 2000; 2002). Apesar de sua restrita incidência no semi-árido, a PPH vem sendo considerada a doença mais importante do cajueiro no ecossistema do cerrado brasileiro (CARDOSO *et al.*, 2002).

Os sintomas da fitomoléstia caracterizam-se pelo escurecimento longitudinal dos tecidos da haste terminal (herbácea) (Figura 2) do cajueiro com eventuais exsudações de goma em pontos específicos. Esse sintoma progride até a necrose total do ramo (CARDOSO *et al.*, 2002).



Figura 2 – Sintomas da podridão preta das hastes em cajueiro. Foto: J.E.Cardoso, 2009.

Ainda segundo Cardoso *et al.* (2000), a doença atingiu 30,67% das plantas nas áreas experimentais. A maior intensidade de plantas doentes foi observada nas plantas mais próximas das bordas do plantio, diminuindo a incidência, à medida que as plantas se distanciavam das bordas. A ocorrência de PPH em clones melhorados sob avaliação indicou que o clone END-189, com 59% de incidência foi o mais afetado, ao passo que o clone Embrapa 51, com 13% de incidência, foi o menos afetado. Entretanto, acredita-se que esta variação decorreu muito mais da disposição dos clones (escape) no campo do que da resistência genética. A distribuição espacial da doença sugere uma disseminação contagiosa com fortes indícios de envolvimento de artrópodes e/ou do próprio homem, através dos tratamentos culturais (CARDOSO *et al.*, 2000).

Em amostras de hastes com os sintomas da PPH, foram isolados os fungos *L. theobromae* e *Pestalotiopsis* sp. Testes de patogenicidade revelaram que somente *L. theobromae* foi capaz de reproduzir os sintomas quando inoculado sob a forma de micélio na extremidade do ramo da muda de cajueiro. *Pestalotiopsis* sp. quando inoculado em mudas de cajueiro, não reproduziu os sintomas. Estudos eletroforéticos destes isolados revelam diferenças genéticas entre esses isolados e o fungo *L. theobromae* (CARDOSO *et al.*, 2000).

O controle das doenças causadas por *L. theobromae* torna-se difícil em razão da gama de hospedeiros apresentada pelo fungo. O controle químico, não oferece proteção nem

controle curativo ao fungo, sendo então indicada a adoção de uma série de medidas adicionais como o manejo cultural e o controle biológico (TAVARES, 1995).

2.4 Técnicas moleculares para detecção do fungo

2.4.1 Reação da polimerase em cadeia - PCR

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa, visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica passou a ser usada por ser uma ferramenta poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes oligonucleotídeos são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Permite amplificar um segmento específico de uma molécula de DNA usando dois *primers* ou iniciadores (sequências curtas de nucleotídeos) complementares às extremidades do segmento que se quer amplificar e uma DNA polimerase. Na reação, a molécula de DNA é inicialmente desnaturada pelo aumento de temperatura: as fitas se separam. A temperatura é então abaixada, permitindo que cada oligonucleotídeo pareie ou hibridize com sua sequência complementar presente nas extremidades do segmento a ser copiado. Em seguida, a DNA polimerase sintetiza o trecho de fita complementar a cada uma das fitas originais a partir do par de oligonucleotídeos. O ciclo de desnaturação, hibridização e extensão, se repete muitas vezes, resultando em milhares de cópias do segmento desejado. É importante observar que o conjunto de oligonucleotídeos escolhido é o responsável pela definição do segmento de DNA que vai ser amplificado. Outros fatores influenciam a especificidade da reação, como a temperatura de pareamento, a concentração de magnésio, o conteúdo de bases C e G do primer, etc (SILVA; ANDRADE, 2001).

Estudos usando técnicas de biologia molecular com *L. theobromae* resultaram no desenvolvimento e caracterização de lócus contendo 28 seqüências simples repetidas de bases (SSR ou microssatélites). Esses estudos permitiram o desenho de iniciadores específicos para amplificação de fragmentos contendo essas seqüências de bases do referido fungo (BURGESS *et al.*, 2003; CARDOSO; WILKINSON, 2008).

As tecnologias de detecção de patógenos em tecidos vegetais visando à execução de medidas de exclusão devem considerar, fundamentalmente, o custo, a rapidez, a sensibilidade, a reprodutibilidade (confiabilidade) e a viabilidade em avaliar número significativo de amostras. Técnicas moleculares baseadas na amplificação de fragmentos específicos de DNA da amostra via PCR têm sido usadas extensivamente na detecção de fungos patogênicos em tecidos de plantas e amostras de solo com sucesso (CAO *et al.*, 2007; FAGGIAN *et al.*, 1999) face a maior rapidez, alta especificidade e sensibilidade, quando comparado com métodos tradicionais de isolamento e cultivo em meio de cultura.

Collozzi Filho e Cardoso (2000), estudando a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo e nas raízes de cafeeiro e crotalária, por meio de técnicas moleculares, usando *primers* da região ITS, foi possível caracterizar FMAs na rizosfera e nas raízes colonizadas do cafeeiro. Fato que levou à conclusão de que as técnicas moleculares podem auxiliar no estudo da dinâmica populacional de FMAs no campo.

Outro exemplo do uso da PCR na detecção de patógenos causadores de doenças é descrito para *Colletotrichum acutatum* (Screenivasaprasad, 1996), onde este fungo, causador da antracnose em morango, sendo bastante severo. Assim, o Reino Unido exige que toda planta de morango proveniente de outros países, seja testada quanto à presença do patógeno. As plantas a serem introduzidas, permanecem estocadas em câmara fria, de forma segura, até que se tenha o resultado do teste de sanidade. Como o tempo necessário para a obtenção dos resultados pelo método tradicional (isolamento e identificação) é longo, levando-se à perda de vigor de muitas plantas, inviabilizando o seu comércio. Logo, a necessidade de reduzir o tempo de estocagem das plantas em análise, levou os pesquisadores a desenvolverem *primers* para amplificação de regiões ITS, específicas para *C. acutatum* a partir de plantas de morango. Tornando viável a detecção deste patógeno, com resultados rápidos e precisos.

2.4.2 Marcadores moleculares

Até meados da década de 60, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética estava associada às características morfofenológicas. 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).

Antes do início da utilização de técnicas moleculares para a detecção de variabilidade genética com base na sequência de DNA, os marcadores morfológicos eram muito utilizados para estudos genéticos, tais como ligação gênica e, também, para a construção de mapas genéticos. No entanto, a probabilidade de associações significativas entre marcadores morfológicos e caracteres agronomicamente importantes era reduzida, devido ao pequeno número desses marcadores em uma mesma linhagem, tornando seu uso limitado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Atualmente, diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção de polimorfismo genético em várias espécies de plantas, o que não ocorria com os marcadores morfológicos, que se restringiam a poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelo para estudos genéticos, tais como milho, tomate e ervilha, nas quais a disponibilidade de informações genéticas eram maiores (BROGIN, 2005).

Buscando superar este fator limitante, novos métodos de análises 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 (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 (“fingerprinting”) a qual é obtida a partir da análise do DNA (SANSVINI, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) ou ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélite (ou SSR - “Simple Sequence Repeats”); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (MILACH, 1998).

A técnica de RFLP é laboriosa; mais demorada que as outras técnicas para obtenção de resultados, possui custo relativamente alto e tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. Mesmo assim, os RFLPs têm sido utilizados em um grande número de estudos de caracterização de cultivares (*GEBHARDT et al.*, 1989; *O'DONOUGHUE et al.*, 1994; *AUTRIQUE et al.*, 1996). Isso tem sido devido principalmente a sua alta consistência e repetibilidade na obtenção dos resultados (MILACH, 1998).

Os minissatélites ou locos VTNR são seqüências repetitivas de DNA, adjacentes e em número variável (*JEFFREYS et al.*, 1985). Essa técnica é similar a de RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado, e apresentando as vantagens e desvantagens já demonstradas para a técnica anterior. Uma vantagem adicional dos minissatélites é o alto grau de polimorfismo apresentado, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas, e do número e tipos das seqüências repetitivas. De fato, utilizando apenas uma sonda de minissatélite, *Nybohm et al.* (1990) caracterizaram quatro cultivares de *Malus sp.*, quatro de *Prunus serotina* e oito de *Rubus sp.*

A técnica de RAPD, dentre as apresentadas, é a de menor custo, de menor número de etapas, e de tempo para obter os resultados. Contudo, tem a desvantagem de possuir repetibilidade baixa e ser pouco consistente, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Assim, cuidados devem ser tomados na padronização da técnica para a caracterização de cultivares. O nível de polimorfismo obtido com RAPDs varia grandemente com a espécie estudada, e tem sido utilizada com sucesso na caracterização de variedades de plantas, como a cevada (*TINKER et al.*, 1993; *PENNER et al.*, 1998), o arroz (*MACKILL*, 1995), entre outras (MILACH, 1998).

Marcadores SCAR são amplificados com *primers* específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (PARAN; MICHELMORE, 1993). Muitos desses *primers* são obtidos da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Essa conversão, em geral, resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido por SCAR. Contudo, isso pode ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados e com o sequenciamento das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de *primers* que amplificam seqüências mais variáveis entre os genótipos. A técnica de SCAR é muito semelhante à técnica RAPD, com a vantagem de ser mais consistente e desvantagem de envolver o desenvolvimento de *primers*, o que eleva o custo (MILACH, 1998).

A técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares. De fato, tem sido utilizado com sucesso em girassol para essa finalidade. Entre as vantagens do uso, estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. AFLP é a mais elaborada das técnicas de PCR, necessita de gel de poliacrilamida para resolução dos fragmentos e é protegida por patente (MILACH, 1998).

Os Microssatélites envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que é um processo elaborado e caro. Mas, uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de RAPD, com exceção de que os géis para a resolução dos fragmentos de DNA devem ser de poliacrilamida e esses são de custo mais elevado. A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade (MILACH, 1998).

Os 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 da maior importância nos estudos genéticos e os marcadores moleculares são uma ferramenta útil para determinar e analisar essas variações.

2.4.3 Marcadores microssatélites

Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre sequências de DNA é a sequências simples repetidas, SSR ou ainda microssatélites (LITT; LUTY, 1989). Esta técnica baseia-se no uso de pares de primers na reação de PCR para detectar variações em locos de sequências repetitivas. Estas são constituídas de 2 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos. A técnica de SSR revela polimorfismo em um loco devido a diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG)_n se repete naquele loco. Essas variações no número de repetições de sequências se constituem, em última análise, em variações no comprimento do segmento detectado pela reação de polimerase em cadeia e na separação de fragmentos amplificados em gel de eletroforese (BUSO *et al.*, 2003).

Os marcadores microssatélites tornaram-se rapidamente os mais utilizados pelos geneticistas de humanos para o desenvolvimento de mapas de ligação e para identificação de indivíduos. Em plantas, os microssatélites são muito freqüentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, também sendo amplamente utilizados nos estudos de diversidade genética, caracterização de germoplasma, construção de mapas genéticos e mapeamento de genes e de QTL's (BROGIN, 2005).

Segundo Buso *et al.* (2003), os marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratarem de sequências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR. A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR é a obtenção dos oligonucleotídeos que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco.

Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas na detecção e caracterização de fungos patogênicos. Arruda (2005), realizou a caracterização molecular e morfofisiológica de 28 isolados de *Metarhizium* ssp. por análises de seqüências do espaçador transcrito interno (ITS1 e ITS2), confirmando a identidade taxonômica dos isolados avaliados como *M. anisopliae* var. *anisopliae* ou *M. anisopliae* var. *majus* e mostrou que dois isolados (CG291 e

CG423), previamente classificados como *Metarhizium flavoviride*, são pertencentes à *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Gouveia (2004), trabalhando com 49 isolados de *Phytophthora spp.* associados com a doença da tinta do castanheiro, sendo identificados por PCR-RFLP da região ITS-rDNA amplificada pelos “primers” universais ITS6 e ITS4. A restrição enzimática do fragmento amplificado foi realizada com as enzimas Alu I, Msp I e Taq I cujo perfil de restrição permite a identificação ao nível da espécie no gênero *Phytophthora*. A caracterização RAPD permitiu a separação das espécies de *Phytophthora* associadas à doença da tinta embora os “primers” “10-mer” utilizados não tivessem possibilitado a caracterização dos isolados de *P. cinnamomi*. O estudo RAPD, porém, permitiu identificar um fragmento de amplificação característico de *P. cinnamomi*. O fragmento foi purificado clonado e sequenciado (SCAR) e desenharam-se primers específicos (Cin1, Cin2 e Cin3) para a detecção e identificação de *P. cinnamomi* por PCR.

Burgess (2003) estudando isolados de *L. theobromae* de diferentes localidades e hospedeiros, desenhou 13 pares de “primers” SSR específicos para esta espécie. Já Cardoso e Wilkinson (2008), trabalhando com isolados de *L. theobromae* coletados no Brasil, objetivaram desenhar “primers” específicos para este fungo. Foram obtidos dez marcadores microssatélites, que podem ser usados para determinar a diversidade genética deste patógeno, podendo ainda, serem usados para testes de diagnósticos para distinguir ecótipos deste fungo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização molecular dos isolados

3.1.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de *L. theobromae* provenientes de cajueiros empregados neste estudo estão relacionados na Tabela 1, sendo coletados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. A coleção de 48 isolados pertence ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical. A identificação dos isolados provém de dados do próprio Laboratório, onde nem todos os isolados foram possíveis de serem recuperados, devido a este fato, somente alguns isolados foram utilizados para os diferentes testes realizados neste estudo.

3.1.2 Recuperação dos isolados

Todos os isolados de *L. theobromae* descritos na Tabela 1 foram repicados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), visando o crescimento micelial do fungo. Para isso, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro foi retirado do tubo de ensaio onde o fungo estava preservado, transferindo-o em seguida, para uma placa de Petri com 9 cm de diâmetro contendo BDA e incubado por sete dias a uma temperatura de 25°C, com 12 horas de luz.

3.1.3 Obtenção do fungo para extração de DNA

Para proceder à extração de DNA, os fungos cujo micélio se desenvolveu bem em BDA foram repicados para erlenmeyers contendo meio líquido de batata dextrose (BD). Repicaram-se cinco discos de micélio de cada isolado do fungo crescido em BDA para os erlenmeyers, contendo 100 mL de meio de cultura BD. A incubação dos isolados em cultura, ocorreu nas mesmas condições descritas anteriormente e após 10 dias, a manta micelial do fungo foi seca em papel de filtro dentro da câmara de fluxo laminar por 24h, tendo o cuidado de deixar o fluxo de ar ligado, evitando assim a contaminação da manta, e em seguida, procedeu-se a extração de DNA.

Vinte e dois dos 48 isolados de *L. theobromae* foram recuperados da população original (Tabela 1) e foram utilizados neste estudo, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 1 – Origem, tipo de cajueiro hospedeiro e de sintoma nos tecidos dos isolados de *Lasiodiplodia theobromae* objeto desse estudo e mantidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. 2009.

Nº	ORIGEM	TIPO DE CAJUEIRO	SINTOMAS
1	BR 230 - Oeiras-PI	Cajueiro Anão	Sem sintomas
2	Faz. Vareda da Raposa - Floriano-PI	Cajueiro Comum	Resinose
3	Faz. Vareda da Raposa - Floriano-PI	CCP 76	Resinose
4	Faz. Luiziana - São Raimundo Nonato-PI	CCP 76	Resinose
6	Serra Vermelha - São Raimundo Nonato - PI	CCP 76	Morte descendente
7	Faz. Gaia - Canto do Buriti - PI	CCP 76	Resinose
8	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - BA	CCP 09	PPH
9	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - BA	CCP 76	PPH
10	BR 122 - Senhor do Bonfim - BA	Cajueiro Comum	Cancro
11	BR 122 - Km 50 - Petrolina - PE	Cajueiro Anão	Resinose
12	Faz. Jacaju - Beberibe - CE	Cajueiro Comum	Resinose
13	Campo de Heterose - Pacajús - CE	Cajueiro Comum	Resinose
14	Barreiras - BA	CCP 09	PPH
15	Terra Nova do Norte - MT	Anão pé franco	PPH
16	Trairi - CE	Anão pé franco	Sem sintomas
17	Alto Santo - CE	Cajueiro Comum	Cancro
18	Alto Santo - CE	Cajueiro Comum	Cancro
19	Severiano Melo - RN	Cajueiro Comum	Cancro
20	Cajazeiras - PB	Cajueiro Comum	Cancro
21	Quixeré - CE	Cajueiro Comum	Cancro
22	Jenaro - Crato - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
23	Milagres - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
24	Palmácia - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
25	Iguatu - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
26	Serra do Mel - RN	Cajueiro Comum	Cancro
27	Trairi - CE	Cajueiro Comum	PPH
28	Trairi - CE	Cajueiro Comum	Cancro
29	Itapipoca - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
30	Marco - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
31	Estrada Cruz - Jijoca - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
32	Lagoa das Pedras - Jijoca - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
33	Camocim - CE	Cajueiro Anão	Sem sintomas
35	Ilha Grande - Santa Isabel - Parnaíba -PI	Cajueiro Comum	Sem sintomas
36	Estrada Cocal - Viçosa - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
37	Sr. Bráulio - Guaraciaba do Norte - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
38	Sítio Minas - Ipu - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
39	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Sem sintomas
40	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Cancro
41	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Cancro
42	Faz. Mata do Sossego - Itaquaruçu - TO	Cajueiro Anão	PPH
43	Faz. Exp. Secretaria de Agricultura - Palmas - TO	Cajueiro Anão	PPH
45	Limoeiro do Norte - CE	Cajueiro Comum	Resinose
46	João Teixeira - Quixeré - CE	Cajueiro Comum	Resinose
47	Saco Virgem Picos - PI	Cajueiro Comum	Resinose
48	Campo de heterose - Pacajús - CE	Cajueiro Comum	Resinose
49	Pio -IX	Cajueiro Comum	PPH
50	Pio -IX	Cajueiro Comum	Resinose
51	Areia - PB	Cajueiro Comum	Resinose

Tabela 2 – Isolados de *L. theobromae* utilizados nas reações de PCR, Fortaleza-CE, 2009.

Nº	ORIGEM	TIPO DE CAJUEIRO	SINTOMAS
2	Faz. Vareda da Raposa - Floriano-PI	Cajueiro Comum	Resinose
3	Faz. Vareda da Raposa - Floriano-PI	CCP 76	Resinose
4	Faz. Luiziana - São Raimundo Nonato-PI	CCP 76	Resinose
6	Serra Vermelha - São Raimundo Nonato - PI	CCP 76	Morte descendente
8	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - BA	CCP 09	PPH
9	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - BA	CCP 76	PPH
13	Campo de Heterose - Pacajús - CE	Cajueiro Comum	Resinose
14	Barreiras - BA	CCP 09	PPH
20	Cajazeiras - PB	Cajueiro Comum	Cancro
24	Palmácia - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
25	Iguatu - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
26	Serra do Mel - RN	Cajueiro Comum	Cancro
30	Marco - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
31	Estrada Cruz - Jijoca - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
32	Lagoa das Pedras - Jijoca - CE	Cajueiro Comum	Sem sintomas
33	Camocim - CE	Cajueiro Anão	Sem sintomas
39	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Sem sintomas
40	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Cancro
41	Faz. Alto Alegre - Hidrolândia - CE	Cajueiro Anão	Cancro
42	Faz. Mata do Sossego - Itaquaruçu - TO	Cajueiro Anão	PPH
43	Faz. Exp. Secret. Agric. - Palmas - TO	Cajueiro Anão	PPH
51	Areia - PB	Cajueiro Comum	Resinose

3.1.4 Extração de DNA

Foram realizados vários testes para a extração de DNA, utilizando protocolos diferentes, como o descrito por Doyle e Doyle (1987), Cavalcanti (2004), Zolan e Pukkila (1986), Raeder e Broda (1985) e Alves *et al.* (2004). Porém, o método que apresentou os melhores resultados foi o descrito por Cavalcanti (2004), com modificações, sendo este utilizado na extração do material avaliado.

O DNA dos isolados foi extraído a partir de 220 mg de micélio. O micélio, previamente seco, foi triturado em almofariz em nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionaram-se 700 µL de tampão CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) + PVP (polyvinylpyrrolidone) a 2% cada, previamente aquecido a 65°C, em cada microtubo, os quais foram homogeneizados no vortex. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 65°C por 5 min. Seguindo-se a homogeneização manual e adição de 700 µL de clorofórmio: isoamil (24:1), sob capela de exaustão. Procedeu-se a agitação dos tubos, de forma cuidadosa para não quebrar o DNA, e centrifugação das amostras a 13.000 rpm por 10 minutos.

A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, adicionando 450 μ L de isopropanol a -20°C para precipitar o DNA. As amostras foram agitadas por suaves inversões e novamente centrifugadas na mesma condição anteriormente descrita. Os sobrenadantes foram descartados, e o precipitado, lavado com etanol 70%, a -20°C, invertendo os tubos cuidadosamente, e sendo mais uma vez levados para a centrifuga. Terminada esta fase, o etanol foi descartado, e o precipitado de DNA foi deixado para secar à temperatura ambiente.

O precipitado foi ressuspendido com 50 μ L de tampão de extração (10 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0, 0,2 g de EDTA 0,5 M, pH 8,0, completando o volume para 1000 mL com água deionizada), e em cada microtubo adicionou-se 1 μ L de RNase (1 μ g/1 μ L). Os microtubos foram colocados em banho-maria a 37° C por 1 hora para digestão dos ácidos ribonucléicos (RNA).

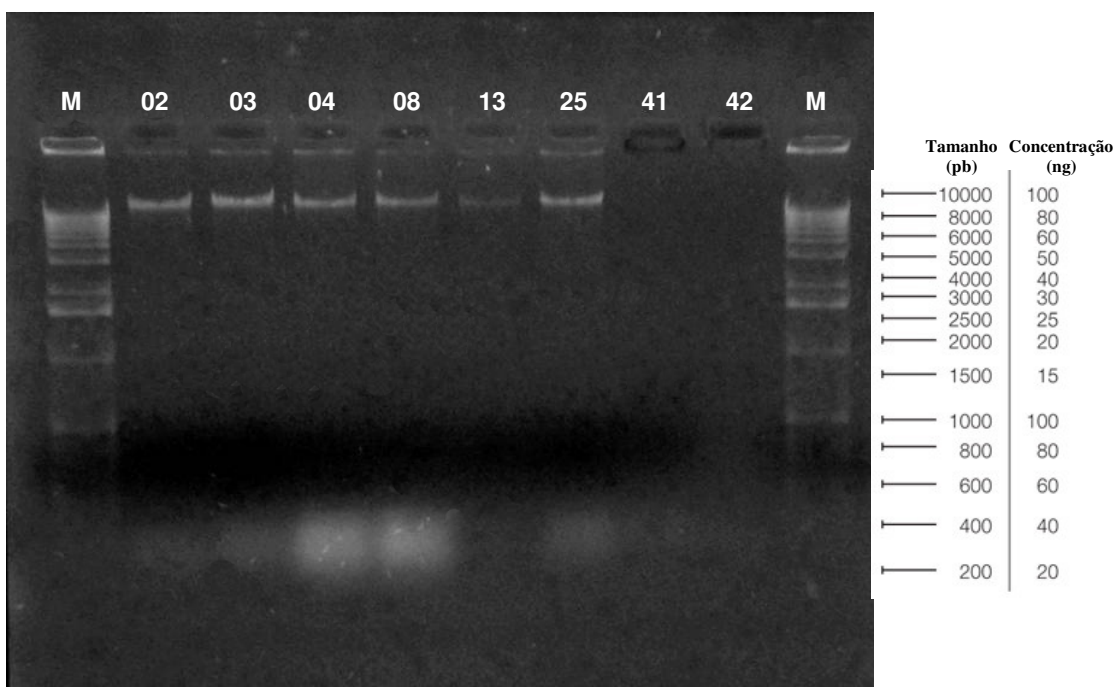


Figura 3 – Análise de DNA de *L. theobromae* por eletroforese em gel de agarose. M = marcador Hiperladder 1 kb, os números 02, 03, 04, 08, 13, 25, 41, 42 correspondem aos isolados utilizados.

3.1.5 Reação da polimerase em cadeia

Os isolados de *L. theobromae* obtidos de cajueiro (Tabela 2) foram submetidos à reação de PCR, com 15 iniciadores específicos (Tabela 3), previamente descritos para o fungo (BURGESS *et al.*, 2003; CARDOSO; WILKINSON, 2008).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 µl, contendo 2µL de DNA genômico, 1,0µL de cada primer, 0,4µL de dNTPs, 0,6µL MgCl₂, 2,0µL de Tampão 10x “buffer”, 0,2µL de Platinum Taq DNA polimerase e 12,8µL de água ultra pura para completar o volume final. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C/1 min., 35 ciclos, sendo cada um a 94°C/30 seg., 52°C por 30 seg. e 72°C/2 min., e um ciclo final de extensão de 72 °C/7 min.

Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose a 2,0%, onde alíquotas de 5µL de cada amostra era adicionada a 1µL da solução de carregamento, homogêneas e distribuídas no gel, sendo submetidas a eletroforese em cuba de acrílico, a 90 volts durante 40 min em gel de agarose, TBE (1X) e 3 µl de brometo de etídio e visualizado sob luz UV.

3.1.6 Análise dos dados e obtenção de dendrograma

Após os procedimentos de extração, cada amostra de DNA obtida foi diluída 100 vezes em água Milli-Q (20 µL de solução de DNA para 1980 µL de água), tendo sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260 nm (UV - Concentração do DNA em mg/ml = $Abs \times 100 \times 50$ µg/ml) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi indicativa do grau de pureza do DNA obtido.

A eletroforese para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1,0%. A esse gel foi aplicada uma amostra de cada um dos microtubos, com 5 µl da amostra de DNA e 1µL da solução de carregamento (230 mg de azul de bromofenol, 12 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 40 g de sacarose, completar o volume para 100 mL com água deionizada).

Em seguida, alíquotas de, foram submetidos à eletroforese em cubas de acrílico Max Fill (15 x 25cm) a 90 volts durante 40 min em gel agarose (1%), imerso em 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 µL de brometo de etídio e visualizado sob luz UV (Figura 3).

A presença e ausência de bandas nas reações de PCR, submetidas à eletroforese, foram tabuladas em uma planilha do Excel, anotando-se valores de 0 e 1, respectivamente. Utilizou-se o pacote estatístico MVSP (Multi-Variate Statistical Package v.3.13p) (Kovach Computing Services, Anglesey, Wales - <http://www.kovcomp.com/mvsp/mvspwbro.html>) na geração do dendrograma usando a análise de máxima verossimilhança pelo método de agrupamento não balanceado baseado na média aritmética, UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic mean”). As similaridades genéticas foram calculadas pelo coeficiente de Nei e Li (1979).

A concentração de DNA foi estimada pela comparação da intensidade de fluorescência das amostras de DNA em brometo de etídio, com a intensidade de uma fração conhecida do DNA marcador `Hyperladder Γ (Bioline[®]), usando um sistema de imagem transiluminator de ultravioleta (Vilber Lourmat). Assim, constatando-se a quantidade de DNA nas amostras.

Tabela 3 – Lista de iniciadores utilizados nas reações de polimerase em cadeia para a determinação da variabilidade genética de isolados de *L. theobromae* de cajueiro. Fortaleza-CE, 2009.

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	ATTGGAAAGGAGGGAAAGGA 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 CATGCAGAGGTGCGAAAGTG	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	CGAACAGGGTTTTCGTGACGT CTCATATCTCGCCGGTTGCC	58	462	(CG) ₄	Polimórfico
LT29/30 for LT29/30 rev	GACGAGGTCAAGGGCGACA CCTCCATGTCCGATTCTTG	58	191	(CAA) ₇	Polimórfico
LT35/36 for LT35/36 rev	GGCATCACAACGACCAACCC GCGAGAGTCGCAAGTACAGC	58	379	(CCTT) ₁₀	Polimórfico

3.2 Teste de Patogenicidade

Visando detectar o potencial patogênico dos isolados procedeu-se a inoculação de mudas de cajueiro com os isolados que apresentaram maiores variabilidades morfológicas entre os mesmos.

3.2.1 Obtenção do material vegetal

Utilizaram-se mudas de cajueiro anão precoce do clone CCP 76, enxertado sobre plântulas obtidas de sementes de polinização aberta de plantas do clone CCP 09. As mudas foram fornecidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, sendo produzidas no Campo Experimental situado em Pacajús - CE. Todas as mudas tinham em torno de 45 dias de idade.

3.2.2 Produção do inóculo

O inóculo usado no teste de patogenicidade consistiu de oito diferentes isolados de *L. theobromae* (Tabela 4). Discos de micélio de 2 mm do fungo foram cultivados em placas de Petri, contendo meio de cultura batata-cenoura-água (BCA) e incubados por 10 dias sob 25° C com 12 horas de luz.

Tabela 4 – Isolados de *L. theobromae* utilizados no teste de patogenicidade, Fortaleza-CE, 2009.

Nº	ORIGEM	TIPO DE CAJUEIRO	SINTOMAS
8	Projeto Barreiras Norte - Barreiras - BA	CCP 09	PPH
13	Campo de Heterose - Pacajús - CE	Cajueiro comum	Resinose
26	Serra do Mel - RN	Cajueiro comum	Cancro
47	Saco Virgem Picos - PI	Cajueiro comum	Resinose
48	Campo de heterose - Pacajús - CE	Cajueiro comum	Resinose
49	Pio – IX - PI	Cajueiro comum	PPH
50	Pio – IX - PI	Cajueiro comum	Resinose
51	Areia - PB	Cajueiro comum	Resinose

3.2.3 Inoculação de *L. theobromae*

O fungo foi inoculado em mudas do clone CCP 76 em condições de casa de vegetação, a mais ou menos 2 cm acima do ponto de enxertia. Cada isolado do fungo consistiu de um tratamento. A inoculação foi realizada perfurando-se o caule com auxílio de uma broca de 2 mm de diâmetro a uma profundidade de cerca de 0,5 mm. Em cada orifício aberto foi colocado um disco de meio de cultura (BCA) com estruturas do fungo, de 2 mm de diâmetro, retirado da periferia de culturas em placas de Petri, com 10 dias de cultivo, ficando o inóculo em contato com a estrutura vascular da planta. Após a inoculação, utilizou-se vaselina sólida para evitar entrada de umidade, e o local foi envolvido com fitas de parafilm. Nas testemunhas, foram colocados discos de meio de cultura que não continham estruturas do fungo. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura em torno de 30° C, e umidade relativa em torno de 70%. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por tratamento.

3.2.4 Avaliação das lesões

A avaliação da infecção foi realizada 15 dias após a inoculação do fungo, medindo-se o comprimento das lesões internas observadas nas plantas., mediante corte longitudinal do caule das mudas. Os dados submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico Sisvar, sendo as médias submetidas ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

3.3 Ensaio para detecção de *L. theobromae* em mudas de cajueiro

3.3.1 Inoculação do fungo

Este ensaio teve como objetivo desenvolver uma metodologia de detecção de *L. theobromae* em mudas de cajueiro usando técnicas moleculares. Mudas do clone CCP 76 obtidas do Campo Experimental de Pacajús - CE foram inoculadas com o isolado 26 (Tabela 4), por este apresentar maior velocidade de crescimento micelial, podendo este ser mais agressivo que os demais. Os tratamentos, em número de 10, consistiram do tempo em dias da inoculação à avaliação da infecção, efetuada de dois em dois dias, durante 20 dias. Assim, em

T1 (tratamento 1), as plantas são avaliadas dois dias após a inoculação e em T10, a infecção é avaliada após 20 dias. Foram utilizadas 16 plantas por tratamento, onde cada planta foi considerada uma repetição.

A inoculação foi realizada conforme a metodologia descrita no item anterior, e nas plantas utilizadas como testemunha, consistiu da introdução de discos de ágar não colonizados pelo fungo. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, sob as mesmas condições citadas anteriormente. O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado.

3.3.2 Extração de DNA

Amostras do tecido do caule infectado foram coletadas e submetidas à extração de DNA do isolado 26 do *L. theobromae*. Dois protocolos diferentes foram testados, sendo um deles o mesmo utilizado nos testes anteriores para este fungo (CAVALCANTI, 2004) e o outro, o kit de extração Qiagen (DNeasy[®] Plant Mini Kit).

O protocolo de extração de DNA desenvolvido por Cavalcanti (2004), seguiu os mesmos procedimentos descrito anteriormente.

Os passos utilizados na extração com o kit Qiagen foram os recomendados pelo fabricante. Inicialmente, cerca de 100 mg de tecido fresco (caule da muda inoculada com o fungo) foi macerado com auxílio de pistilo e almofariz, em seguida, adicionou-se 400 µL do Buffer AP1 (reagentes que acompanham o kit) e 4 µL de RNase A, onde em seguida o material foi levado ao vórtex e incubado por 10 min à 65° C, invertendo-se os tubos de duas a três vezes.

O próximo passo foi adicionar 130 µL de buffer AP2, com posterior inversão dos tubos, visando à homogeneização, e em seguida, incubou-se por 5 min no gelo. Centrifugou-se o material por 5 min a 13000 rpm. Logo após este passo, o material foi pipetado para uma coluna “QIA shedder” de 2 mL, com posterior centrifugação por 2 min a 13000 rpm. E, seguida, transferiu-se o sobrenadante em um novo microtubo, e adicionou-se 1,5 volumes do buffer AP3/E, misturando com auxílio de uma pipeta. Novamente transferiu-se o material resultante desta mistura, para a coluna “DNeasy mini spin”, centrifugando-se por 1 min a 8000 rpm, descartando o sobrenadante.

Transferiu-se a coluna “DNeasy mini spin” para um novo microtubo de 2 mL e adicionou-se 500 µL de buffer AW, centrifugando por 1 min a 8000 rpm, descartando o sobrenadante, repetindo este processo.

Por fim, transferiu-se a coluna “DNeasy mini spin” para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 100 µL de buffer AE para diluição do DNA, incubando-se por 5 min à temperatura ambiente.

3.3.3 Reação da polimerase em cadeia

O DNA obtido por meio dos métodos de extração descritos das amostras de tecido do clone CCP 76 de todas as plantas inoculadas com o isolado 26 do *L. theobromae* foram submetidas à reação de PCR, com os 15 pares de iniciadores (Tabela 3), de acordo com a mesma metodologia descrita anteriormente, da mesma forma que a tabulação dos dados.

3.3.4 Avaliação dos dados

A cada dois dias após a inoculação avaliou-se os sintomas da doença, medindo-se o comprimento das lesões internas do caule ao longo do sítio de inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar, e as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($p=0,05$). Após a medição do comprimento das lesões, foi feito o reisolamento do fungo a partir das lesões avaliadas, visando comprovar a presença do mesmo nos tecidos infectados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular dos isolados

De acordo com os resultados, o protocolo descrito por Cavalcanti (2004) foi o que apresentou os melhores resultados. A quantidade de DNA foi compatível com a amplificação por PCR, com quantidades em torno de 10 ng de DNA. Em relação à qualidade, não houve diferença entre os protocolos, todos apresentaram DNA puro, sem sujeiras ou contaminações, sendo suficientes para as reações de PCR.

Os resultados das PCR das amostras de DNA avaliadas com os 15 iniciadores (Tabela 3) podem ser observados sob a forma de dendrograma (Figura 7), que leva em consideração, a amplificação ou não do DNA dos isolados, combinados com os iniciadores.

Observa-se a disposição dos isolados de *L. theobromae* em diversos grupos, independente do local de origem. Os resultados indicam a grande variabilidade genética da população avaliada, representada por diversos grupos de similaridade variando de 22,2% a 100%. Os isolados 8 e 9, originários de Barreira, BA e o isolado 25 proveniente do Iguatu, Sertão Central do Ceará, revelaram-se monomórficos em relação aos 15 marcadores testados, a visualização da amplificação da PCR pode ser observado (figura 4A e 4B). Porém, foi observado que diferiam morfologicamente entre si. O isolado 8 apresentou coloração escura, micélio denso e algodinoso, enquanto que o isolado 9 mostrou com um crescimento mais lento, coloração branca e micélio menos denso, aspecto muito parecido com o apresentado pelo isolado 25.

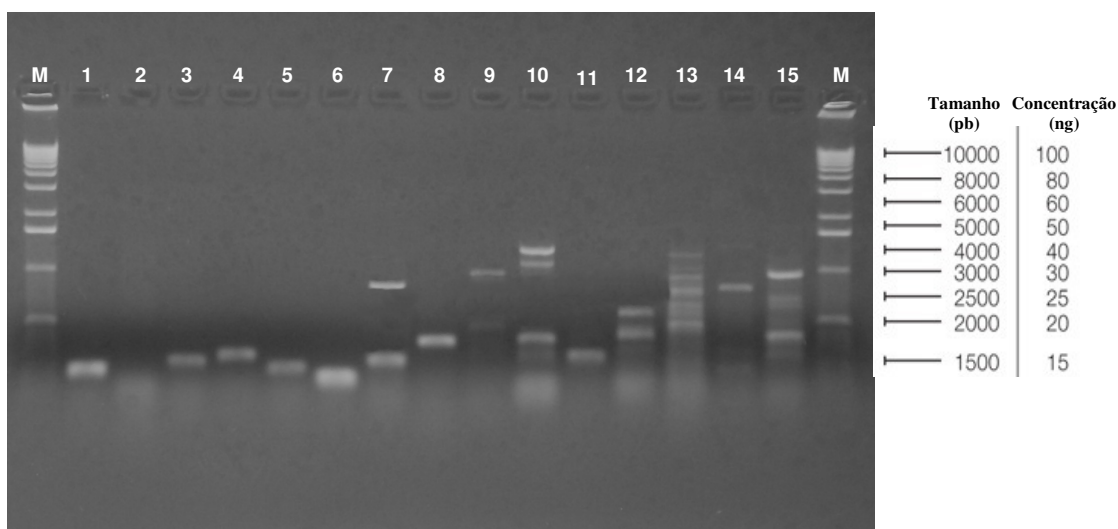


Figura 4 – Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose do isolado 08 com os 15 pares de oligonucleotídeos. M = marcador Hiperladder 1 kb, números de 01 – 15 primers utilizados.

Observa-se que há alguns poços não amplificados, significando que não há aquela região específica determinada pelo oligonucleotídeo, naquele referido isolado. A partir destas comparações de amplificações de determinados isolados com os “primers”, torna-se possível realizar um grupamento genético, avaliando o quanto um isolado é próximo a outro, sob o ponto de vista genético.

Comparando-se os isolados um a um, não há nenhuma relação entre o local onde o material foi coletado e os sintomas, que explique a aproximação genética. Visto que, como já citado, as maiores similaridades apresentadas por três isolados (8, 9 e 25) são oriundos de localidades diferentes, apresentando sintomas de infecção ou assintomáticos. Esses dados confirmam os estudos realizados por Burgess *et al.* (2003), com nove isolados de *L. theobromae* de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* spp. indicando que os hospedeiros são mais importantes do que a localização geográfica na determinação da variabilidade entre isolados de *L. theobromae*. Cardoso e Wilkinson (2008) demonstraram uma grande variabilidade entre isolados de *L. theobromae* de diferentes hospedeiros corroborando aquela observação feita por Burgess *et al.* (2003).

Os isolados que apresentaram sintomas de PPH (isolados 8, 9, 14, 42, 43), foram os que se mostraram mais similares, variando de 88 a 100%. Já os isolados que apresentaram os sintomas típicos de resinose (isolados 2, 3, 4, 13, 51), mostraram-se menos similares com valores entre 22 e 60%. Demonstrando a grande variabilidade do fungo causador destas doenças. Em relação ao local de coleta, o mesmo foi observado, mostrando uma intensa variabilidade da espécie do fungo estudada.

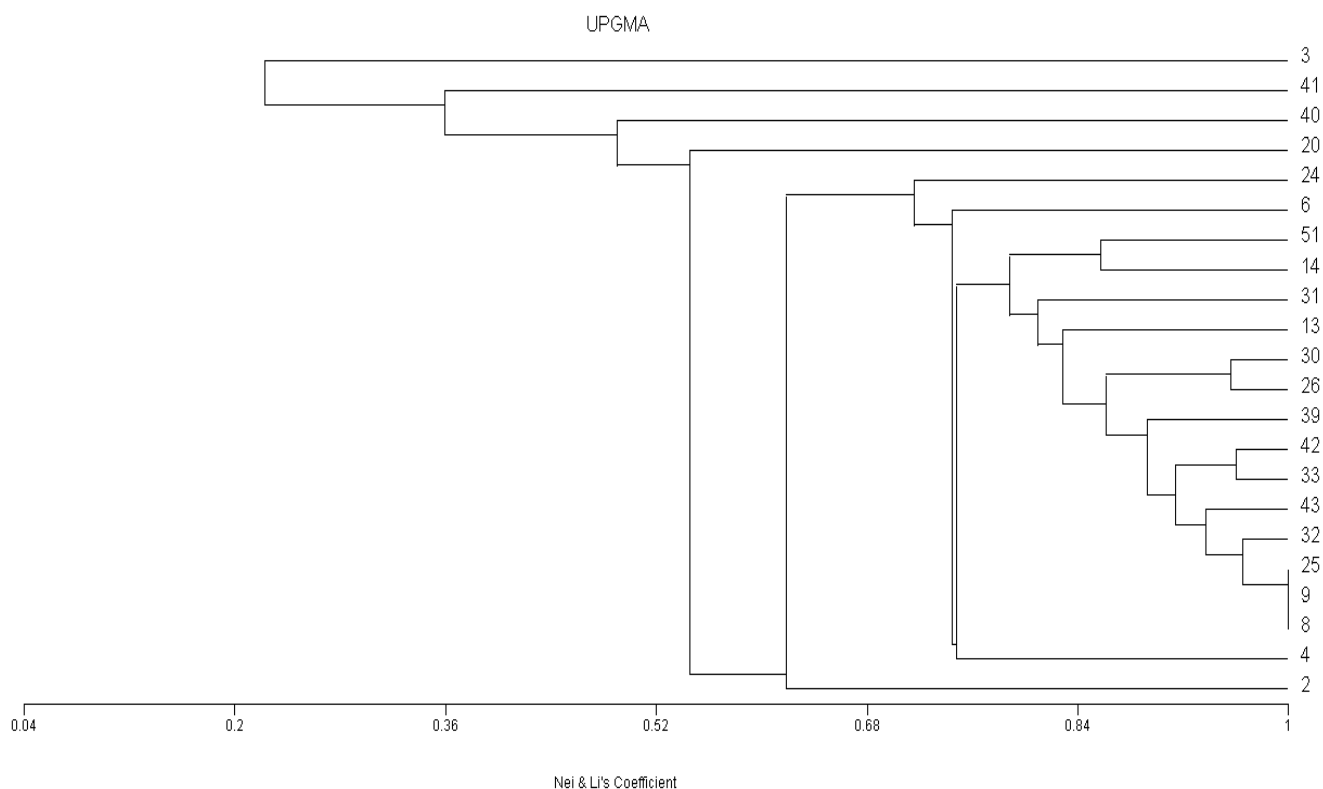


Figura 5 – Dendrograma de 22 isolados de *L. theobromae* obtido a partir de análises, empregando 15 marcadores microssatélites. A análise de Cluster (UPGMA) foi baseada no coeficiente de Nei e Li (1979), por meio do programa MVSP.

Outra observação importante pode ser verificada entre o isolado 2 e os isolados 3, 40 e 41, apresentaram os menores índices de similaridade. Os isolados 2 e 3 são originados da mesma localidade com a mesma sintomatologia e mesmo assim observou-se apenas 22% de similaridade. O mesmo ocorre com os isolados 40 e 41, de mesma origem e mesma sintomatologia, mas apenas 35% de similaridade. Esta distância genética pode ser devido ao grande índice de polimorfismo apresentado pela espécie estudada.

A variabilidade apresentada pelo isolados de *L. theobromae* neste estudo, pode representar a sua variabilidade genética, podendo esta variabilidade ser dependente do ambiente, como uma forma de sobrevivência do mesmo. Ou ainda, que o agente causador destas doenças, não é apenas somente uma espécie do fungo, o que explicaria a grande variabilidade, mesmo em condições ambientais similares, requerendo, todavia de maiores investigações.

4.2 Patogenicidade dos isolados

Após a inoculação, os sintomas típicos da doença podiam ser observados, evidenciando que, sob as condições de temperaturas variando de 25°C a 33°C e umidade relativa em torno de 50% e 80%, houve a infecção do fungo. Sintomas de escurecimento do lenho (Figura 6A) foram observados acompanhados da presença característica de goma (Figura 6B). Nenhuma das plantas testemunhas apresentou-se qualquer sintoma ou exsudação de goma (Figura 6B, 6C).

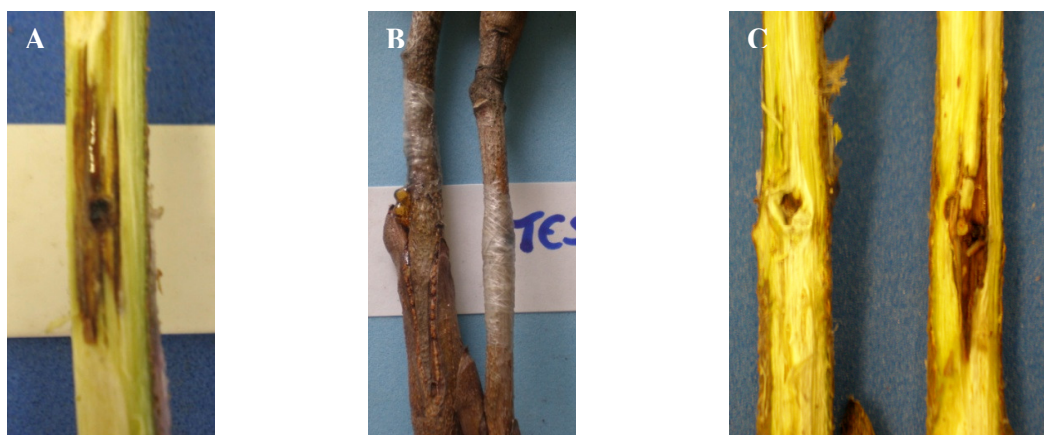


Figura 6 – A - Sintomas da infecção interna causada por *L. theobromae* em mudas de cajueiro inoculado com o isolado 48. B e C – Comparação do tratamento com a testemunha. Foto: J. G. M. Melo

Todos os oito isolados (Tabela 4) testados foram igualmente patogênicos às mudas de cajueiro, de acordo com o tamanho das lesões apresentados pelas mudas inoculadas. As lesões evoluíram tanto de forma ascendente, como descendente. Embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada (Tukey, $p=0,05$), o isolado 51 apresentou maior severidade em relação aos demais (Figura 7), por apresentar maior desenvolvimento da lesão, ao ser avaliado o tamanho da mesma. Por outro lado, o isolado 49 foi menos agressivo, apresentando lesões menores que os demais isolados. Esta evidência sugere que o isolado 51 terá mais condições de colonizar e infectar uma planta de cajueiro, de forma mais drástica do que o isolado 49. Podendo esta agressividade ser devido ao local de origem do isolado, evoluindo para uma maior capacidade patogênica.

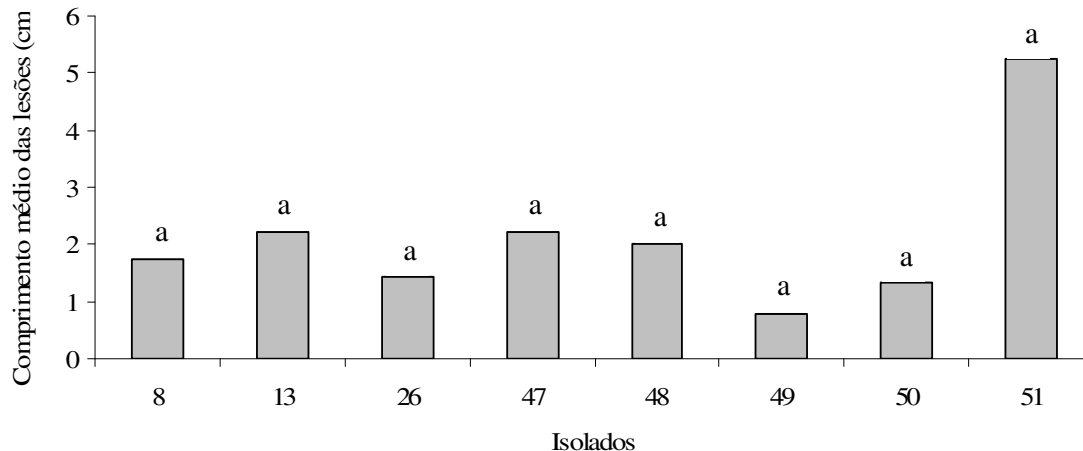


Figura 7 – Crescimento médio das lesões de *L. theobromae* inoculado em mudas de cajueiro. Dados não diferem significativamente na avaliação da patogenicidade dos isolados, pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

Todas as plantas inoculadas com cada um dos oito isolados de *L. theobromae* exibiram exsudação de goma a partir do 4º dia após a inoculação. Esses resultados sugerem que a reação da planta é semelhante independentemente da variação de patogenicidade dos isolados de diferentes localidades.

A variação de crescimento das lesões entre isolados de *L. theobromae*, observada neste trabalho e relatada por outros autores como Sousa Filho *et al.* (1979), Moraes *et al.* (1995) Lima (1996) e Ram (1993), podem ser explicadas por fatores externos, como as diferenças edafoclimáticas das regiões de onde procederam os isolados, ou internos, em que uma espécie difere de outra e um isolado dentro da mesma espécie difere de outro devido à sua composição genética. Segundo Lilly e Barnett (1951), entre fungos a diversidade é uma norma, enquanto a uniformidade é uma exceção em relação ao comportamento entre espécies e isolados.

4.3 Ensaio para detecção de *L. theobromae* em mudas de cajueiro

Os dados referentes às médias de crescimento longitudinal da lesão no caule ao longo do período de avaliação da infecção visando o estudo de técnicas de detecção podem ser visualizados na Figura 8.

Observou-se um padrão irregular em relação ao tempo. Ao se avaliar os dados referentes ao comprimento das lesões, verifica-se que o tratamento 7 (avaliados 14 dias após a inoculação), a lesão atingiu uma média de crescimento superior aos demais, mesmo até em relação aos tratamentos 8, 9 e 10, que teoricamente deveriam crescer mais, por haver mais tempo para o ciclo de infecção (Figura 8). Este fato pode ser devido a alguma reação da planta sob a infecção do patógeno, como uma estratégia de defesa para impedir o desenvolvimento mais acentuado da lesão. Esta teoria pode ser visualizada ao observar os dados da taxa de crescimento da lesão (Figura 8), onde no início da infecção a taxa é significativamente superior aos demais tratamentos. A partir do 12º dia de infecção (tratamento 6), a taxa de crescimento da lesão foi mais lenta do que no início. O pico de crescimento ocorreu no 14º dia de infecção (tratamento 7), tornando-se constante.

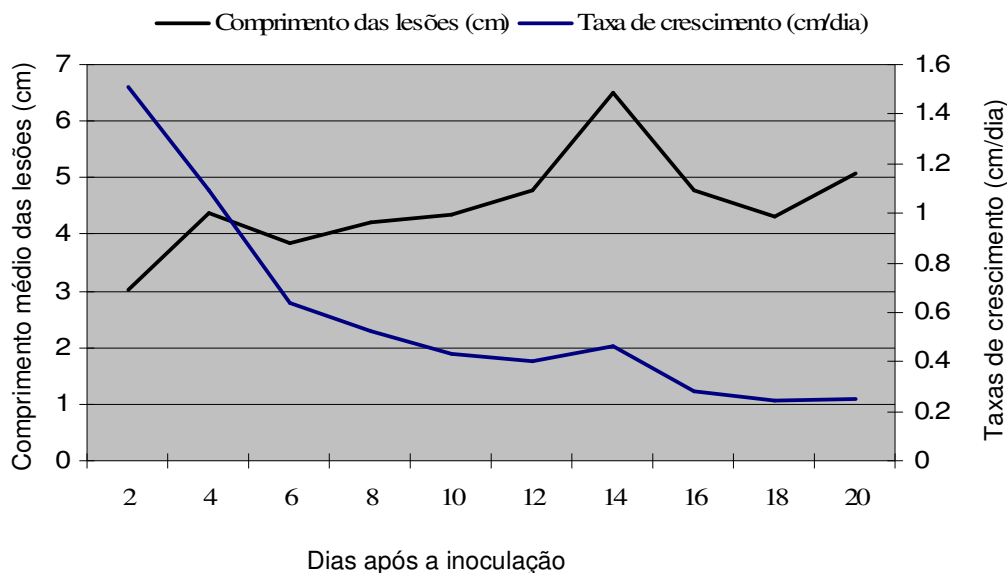


Figura 8 – Crescimento médio das lesões (cm) e taxa de crescimento (cm/dia) de *L. theobromae* inoculado em mudas de cajueiro, avaliado a cada dois dias.

Vale ressaltar que, em todos os tratamentos houve exsudação de goma, o que provavelmente é uma estratégia vegetal em reação a um processo de infecção, uma vez que, as plantas não inoculadas não apresentaram nenhuma exsudação. Assim, a exsudação nesse caso está relacionada à infecção e não devido a danos mecânicos.

4.4 Detecção de *L. theobromae* em mudas de cajueiro

Os protocolos de extração de DNA dos tecidos do caule do cajueiro revelaram diferenças em eficácia. O protocolo descrito por Cavalcanti (2004) foi o melhor tanto em quantidade quanto em qualidade do DNA extraído, enquanto que o kit de extração Qiagen obteve-se apenas DNA em quantidade e não em qualidade para a manta do fungo, contendo muitas impurezas no DNA. As grandes quantidades de compostos fenólicos contidos nos tecidos do cajueiro podem ter contribuído para esses insucessos.

PCR com DNA de todas as amostras (10 tratamentos, tempos da inoculação) foram realizadas, mesmo com quantidades de DNA insuficientes. Porém, não houve nenhuma amplificação nas reações com todos os iniciadores (Figura 9). Este fato pode ser devido às pequenas quantidades do fungo em relação ao DNA vegetal. Sendo assim, os iniciadores não se anelariam às regiões de interesse, não havendo a amplificação das sequências de DNA.

Nenhum método de extração de DNA mostrou-se eficaz na detecção do patógeno, quando este está presente no material vegetal. Sugere-se que métodos mais eficazes para a extração de DNA fúngico, inoculado em plantas ainda devem ser mais elucidadas, para posteriores avanços nesta área.

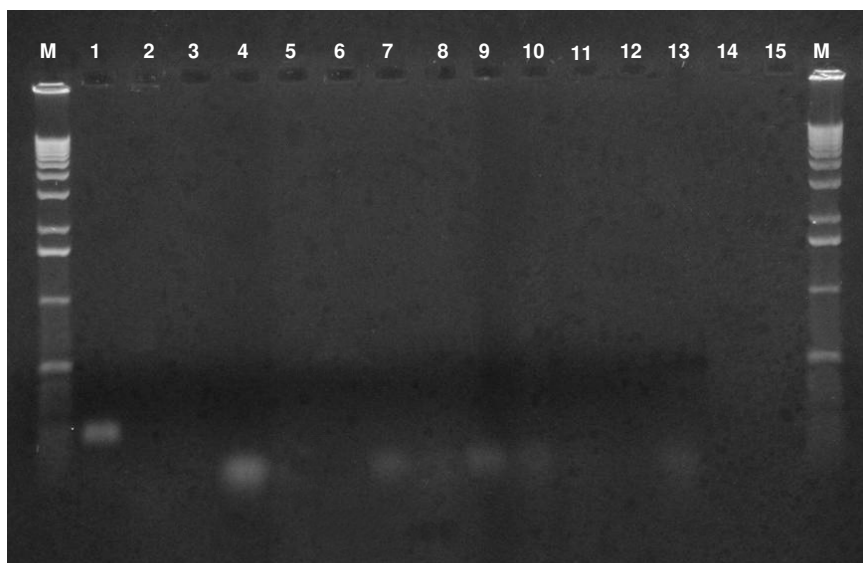


Figura 9 – Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, do isolado 26, com os 15 pares de iniciadores. M = marcador 'Hyperlader' 1 kb, 1 a 15 pares de iniciadores.

5 CONCLUSÕES

- 1 O protocolo de extração de DNA descrito por Cavalcanti (2004) foi o mais eficiente para o fungo *L. theobromae*;
- 2 A população de *L. theobromae* avaliada por marcadores microssatélites tem alta diversidade genética;
- 3 A diversidade genético-molecular da população de *L. theobromae* não se correlaciona com o local de origem do isolado;
- 4 Isolados de *L. theobromae* obtidos de tecidos infectados não diferem geneticamente daqueles de tecidos não infectados;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. *et al.* **Botryosphaeria cortícola sp. nov. on *Quercus species*, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*.** Mycologia. 2004, v.96, pp. 598-613.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*.** 2005. 176f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

AUTRIQUE, E. *et al.* **Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage.** Crop Science, 1996, v.36, pp. 735-742.

BARROS, L. M. Melhoria. In: LIMA, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: BNB; ETENE, 1988. pp. 321-356. (Estudos Econômicos e Sociais, 35).

BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas.** 1991. 256 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

BARROS, L. M. *et al.* **A cultura do cajueiro anão.** Fortaleza: EPACE, 1984. 67 p.

BARROS, L. M. *et al.* Seleção de clones de cajueiro anão para o plantio comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2000, v. 35, n. 11, pp. 2197-2204.

BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoria genética do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. **Cajucultura: modernas técnicas de produção.** Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1995. pp.73-96.

BARROS, L. M. *et al.* Cajueiro. In: BRUCKNER, C. H. (ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais.** Viçosa: Editora UFV, 2002. pp. 159-176.

BARROS, L. M. *et al.* **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*, 2000, v. 10, pp. 964-973.

BEZERRA, M. A. *et al.* **Efeito da resinose na fotossíntese do cajueiro-anão precoce.** Fortaleza: EMBRAPA, 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. 99f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1998.

BROGIN, R. L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTL's envolvidos na resistência à septoriose em soja.** 2005. 93f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2005.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J. E.; WINGFIELD, B. D. **Development and characterization of microsatellite loci for the tropical pathogen *Botryosphaeria rhodina*.** *Molecular Ecology Notes*, 2003, v. 3, n. 1. pp. 91-94.

BUSO, G. S. C. *et al.* **Marcadores microssatélites em espécies vegetais.** *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2003. ed. 30.

CAO, T.; TEWARI, J.; STRELKOV, S. E. **Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae* causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil.** *Plant Disease*, 2007. v. 91, n. 1, pp. 80-87.

CARDOSO, J. E. *et al.* **Efeito de práticas agronômicas na ocorrência da resinose do cajueiro.** *Fitopatologia Brasileira*, 1995, v. 20, pp. 242.

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, 1998, v. 23, n. 1, pp. 48-50.

CARDOSO, J. E. *et al.* **Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brasil.** Crop Protection, 2006, v. 25, pp. 855-859.

CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Relationship between incidence and severity of Cashew Gummosis in the semi-arid Brazilian.** Plant Pathology, 2004, v. 53, n. 1, pp. 363-367.

CARDOSO J. E. *et al.* **First report of black branch dieback of cashew caused by Lasiodiplodia theobromae in Brasil.** Plant Disease, 2002, v. 86, pp. 558.

CARDOSO, J. E. *et al.* **Ocorrência da podridão preta dos ramos do cajueiro no Ceará e Piauí.** Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2000. 3p. (Comunicado Técnico, 52).

CARDOSO, J. E. *et al.* **Diagnóstico do sistema produtivo do cajueiro no sudeste do Piauí.** Fortaleza: EMBRAPA, 2003. 4p. (Comunicado técnico, 83).

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

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, Rio de Janeiro, 2001.

CAVALCANTI, J. J. V. **Genetic mapping and QTL identification in cashew (*Anacardium occidentale* L.).** 2004. 178f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – University of Reading, Reading, 2004.

CRISÓSTOMO, L. A. *et al.* **Cultivo do cajueiro anão precoce: Aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2001 (Série Embrapa, Circular técnica 10).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochem Bull*, 1987 v. 19, pp. 11-15.

FAGGIAN, R. *et al.* **Specific polymerase reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water.** *Phytopathology*, 1999, v. 89, pp. 392-397.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT - Food and agriculture organization of the United Nations.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> >. Acesso em 10 mar 2010.

FERNANDES, J. B. *et al.* **Recomendações técnicas para o cultivo do cajueiro.** Natal: EMPARN, 2009. 18 p.

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, 1991.

FREIRE, F. C. O. Doenças da acerola no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A. R.; ALVES, R. E. (Ed). **Acerola no Brasil: produção e mercado.** Petrolina: DFZ/UESB, 1995. pp. 71-76.

FREIRE, F. C. O. *et al.* **Diseases of cashew (*Anacardium occidentale* L.).** *Crop Protection*, 2002, v. 21, pp. 489-494.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. **Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil.** *Crop Protection*, 2002, v. 21, pp. 489-494.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. Doenças do coqueiro. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: EMBRAPA, 2003. pp.191-226.

FREIRE, F. C. O. *et al.* **Novos hospedeiros dos fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. Fortaleza: EMBRAPA, 2004. 6 p. (Comunicado Técnico, 91).

FROTA, P. C. E.; PARENTE, J. I. G. Clima e fenologia. In: ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. (Org.) **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1995. pp. 43-54.

GEBHARDT, C. *et al.* **Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP fingerprints**. Theoretical and Applied Genetics, 1989. v. 78, pp.16-22.

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, 1997, v. 125, pp. 41- 44.

GOUVEIA, M. E. M. **Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro**. 2004. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas / Protecção de Plantas) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2004.

GUPTA, O. **A note on effect of different concentrations of sucrose on spores germination of *Colletotrichum papaye* and *Botryodiplodia theobromae***. Indian Phytopathology, 1977, v. 30, n°. 1, pp. 282-283.

HONDA, Y.; ARAGAKI, M. **Effect of monochromatic radiation on pycnidia formation and exudation of conidia in *Botryodiplodia theobromae***. Mycologia, 1978, v. 70, n°. 3, pp. 605-613.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=25&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acesso em 10 mar 2010.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. **Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA**. *Nature*, 1985. v. 316 pp. 76-79.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 434 p.

LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1951. 464 p.

LIMA, J. A. S. **Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterástica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.)**. 1996. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 1996.

LIMA, V. P. M. S. Origem e distribuição geográfica. In: LIMA, V. P. M. S. (Org.). **Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1988. pp. 1-10.

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. **A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. *American Journal of Human Genetics*, 1989, v. 44, pp. 398-401.

MACHADO, A. A. **Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e variabilidade do método de inoculação de esporos sem estudos de seleção de**

germoplasma resistente.1980. 57f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 1980.

MACKILL, D.J. **Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers**. Crop Science, 1995, v. 35, pp. 889-894.

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, 1997, v. 23, pp. 44-45.

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, pp.17-28.

MORAES, W. S. *et al.* **Caracterização morfológica e cultural de *Botryodiplodia theobromae* em diferentes meios de cultura**. Fitopatologia Brasileira, 1995, v. 20, pp. 366 (Resumo).

MULCAHY, D. L. *et al.* **The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes**. Scientia Horticulturae, 1993, v. 54, pp. 89-96.

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

NYBOM, H.; ROGSTAD, S.H.; SCHAAL, B.A. **Genetic variation detected by use of the M13 “DNA fingerprint” probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae)**. Theoretical and Applied Genetics, 1990, v. 79, pp. 153-156.

O’DONOUGHUE, L.S. *et al.* **Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms**. Crop Science, 1994, v. 34, pp. 1251-1258.

OLIVEIRA, V. H. **Cultivo do caju anão precoce: sistema de produção.** Fortaleza, CE, 2002 Tropical (Fortaleza, CE). – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 36p (Frutas do Brasil; 31).

OKEY, E. N.; ADISA, V. A. **Some nutritional requirements and the effects of four environmental factors on spore germination and growth of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudocercospora tinorensis*.** Cryptogamie Mycologie, 1977, v. 9, n° 1, pp. 282-283.

PAIVA, J. R.; BARROS, L. M. **Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas.** Fortaleza: EMBRAPA, 2004. 26 p. (Documentos, 82).

PAIVA, J. R. *et al.* **Clone de cajueiro anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região semi-árida do Nordeste.** Fortaleza: EMBRAPA, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, 78).

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

PANCALDI, M. *et al.* **Impiego di microsatelliti sequenziati nel pesco per il "fingerprinting" e l'analisi genealogica del mandorlo.** Frutticoltura: Bologna, 1999, n° 11, pp. 70-73.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. **Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce.** Theoretical and Applied Genetics, 1993, v. 85, pp. 985-993.

PAULA PESSOA, P. F. A.; LEITE, L. A. S. Cadeia produtiva do caju: subsídios para a pesquisa e desenvolvimento. In: CASTRO, A. M. G. *et al.* (Ed.). **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica.** Brasília: EMBRAPA, 1998. cap.11. pp.275-301.

PENNER, G.A.; ZHENG, Y.; BAUM, B. **Identification of DNA fingerprints for two-row barley cultivars registered in Canada.** Genome, 1998.

PONTE, J. J. **Uma nova doença da ateira (*Annona squamosa*) e da gravioleira (*A. muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae*.** Fitopatologia Brasileira, 1985, v. 10, n. 3, pp. 689-691.

PUNITHALINGAM, E. ***Botryodiplodia theobromae*. CMI. Description of Pathogenic Fungi and bacteria.** Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England, 1976, n. 519, 3p.

RAEDER, U.; BRODA., P. **Rapid preparation of DNA from filamentous fungi.** Lett Applied Microbiology, 1985. v.1, pp. 17-20.

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

RAM, C. **Efeito de fungicidas aplicados em mistura sobre incidência da queima das folhas de produção do coqueiro.** Fitopatologia Brasileira, 1993, v. 18, pp. 264.

RAO, P. V.; SINGHAL, G. S. **Characterization of light dependent synchronous pycnidial production in *Botryodiplodia theobromae*.** Transactions British Mycological Society, London, 1978, v. 70, n. 1, pp. 121-129.

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

SANTOS, A. A. *et al.* **Controle de *Lasodiplodia theobromae* em frutos de gravioleira e em sementes de ateira.** Fortaleza: EMBRAPA, 2000, 4 p. (Boletim de Pesquisa, 53).

SREENIVASAPRASAD, K. *et al.* **PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry.** Plant Pathology, 1996, v. 45, pp. 650-655.

SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. **Noções básicas de biologia molecular.** Revista Brasileira de Reumatologia, 2001, v. 41, n. 2.

SOUZA, E. C. *et al.* **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil.** *Summa phytopathol.* 2007, v.33, n.2, pp. 129-136.

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

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes.** Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980, 696p.

TAVARES, S. C. C. de H. Principais doenças da mangueira e alternativas de controle. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido (Petrolina, PE). **Informações técnicas sobre a cultura da manga no semi-árido brasileiro.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 1 v.

TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. **Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley.** *Theoretical and applied genetics*, 1993, v. 85, pp. 976-984.

TU, C. C.; CHENG, Y. H. **Studies on the sources of *Diplodia gossypina* Cooke for primary infection on cotton.** *Taiwan*, 1970, v. 12, n. 4, pp. 147-151. In: *Review of Plant Pathology*, London, 1972, v. 51, n. 9, pp. 596, abst. 3384.

URASAKI, N. *et al.* **A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.).** *Theoretical and applied genetics*, 2002, v. 104, n. 2-3, pp. 281-285.

VARMA, V.; BILGRAMI, K. S. **New host records of *Botryodiplodia theobromae*.** *Indian Phytopathology*, New Delhi, 1977, v. 30, n. 4, pp. 579.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Podridão preta: uma nova doença do maracujazeiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* na Região Nordeste.** *Fitopatologia Brasileira*, 2002, v. 25, n. 4, pp. 671.

WANG, S. G.; PINCKARD, J. A. **Some biochemical factors associated with the infection of cotton fruit by *Diplodia gossypina***. *Phytopathology*, 1972, v. 62, n. 4, pp. 460-465.

ZOLAN, M.E.; PUKKILA, P.J. **Inheritance of methylation in *Coprinus cinereus***. *Molecular Cell Biology*, 1986, v. 6, pp.195-200. **Cell Biology** v. 6, p.195-200, 1986.