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

**Variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*, agente causal da
rubelose dos citros**

Fernanda Luiza de Souza

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba

2006

Fernanda Luiza de Souza

Farmacêutica

**Variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*, agente causal da
rubelose dos citros**

Orientadora:

Prof.^a. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Souza, Fernanda Luiza de

Variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*, agente causal da rubelose dos citros / Fernanda Luiza de Souza. - - Piracicaba, 2006.
55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Fungo fitopatogênico 3. Fruta cítrica 4. Variação genética 5. Marcador molecular 6. Rubelose I. Título

CDD 634.3

DEDICATÓRIA

A Deus que sempre está comigo.

Aos meus pais Luiz e Marlete, pelo constante amor e educação durante toda a minha vida.

Ao meu amor Fernando.

Ao meu irmão Cleber, cunhada Mirela e amada sobrinha Aninha.

A todos da minha família e amigos.

Com amor,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou para este estudo.

À Professora Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela orientação e amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo pela amizade e sugestões.

À minha família e ao meu noivo pelo incentivo e amor.

Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo pela amizade.

Aos Professores e alunos do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do laboratório: Fernando, Aline, Maria Carolina, Zezo, Cristina, Joelma, Maria Beatriz, Ana Paula, Luana, Uirá, Xico, Adalgisa, Taís, Mayra, Rudi, Aldo, Marise, Cláudia, Lacava, Ricardo, Manuella, Luciana, Fernanda, Sônia, Priscilla, Francisco, Rodrigo, Carlão, Heloize, Léa, pela amizade, companheirismo e ajuda.

Ao Fundo de defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo apoio na coleta dos materiais.

Ao pesquisador Marcel Bellato Spósito pela ajuda na coleta dos materiais.

Aos funcionários do departamento de Genética, ESALQ/USP pela ajuda e amizade.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão Bibliográfica.....	11
2.1.1 História da citricultura.....	11
2.1.2 Importância econômica e social da cultura de citros.....	12
2.1.3 Rubelose.....	13
2.1.4 Agente etiológico.....	14
2.1.5 Sinais e Sintomas da rubelose.....	15
2.1.6 Transmissão e Controle.....	16
2.1.7 Hospedeiros.....	17
2.1.8 Análise da variabilidade genética por meio de marcador molecular RAPD.....	17
2.1.9 Controle Biológico.....	18
2.1.10 Anastomose de hifas e incompatibilidade vegetativa.....	20
2.1.11 Objetivos.....	22
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1 Linhagens de <i>Erythricium salmonicolor</i> e condições de cultivo.....	23
2.2.2 Meio de cultura e soluções.....	24
2.2.2.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA).....	24
2.2.2.2 Meio BDA líquido.....	24
2.2.2.3 Solução de Clorofil.....	24
2.2.2.4 Solução de Clorofane.....	24
2.2.2.5 Tampão de corrida TAE 50X.....	24
2.2.2.6 Solução estoque Tris-HCl 1M pH 8,0.....	25
2.2.2.7 Solução de EDTA 0,5M pH 8,0.....	25
2.2.2.8 Solução de NaCl 5M.....	25

	6
2.2.2.9 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%.....	25
2.2.2.10 Tampão de extração de DNA de fungos filamentosos.....	25
2.2.2.11 Tampão TE.....	26
2.2.2.12 Fenol saturado.....	26
2.2.2.13 <i>Primers</i> de RAPD.....	26
2.2.2.14 <i>Primers</i> da região ITS do rDNA.....	26
2.2.2.15 <i>Primers</i> da região 16S do rDNA.....	26
2.2.2.16 dNTPs.....	27
2.2.2.17 Corante Lactofenol – Azul algodão.....	27
2.2.3 Isolamento do fungo <i>Erythricium salmonicolor</i>	27
2.2.4 Extração de DNA de fungos filamentosos.....	28
2.2.5 Extração do DNA total de bactérias.....	29
2.2.6 Quantificação do DNA extraído.....	30
2.2.7 Análise da variabilidade genética do fungo <i>Erythricium salmonicolor</i>	30
2.2.7.1 Variabilidade genética por marcadores de RAPD.....	30
2.2.8 Análise dos dados.....	30
2.2.9 Amplificação e seqüenciamento da região ITS do rDNA.....	31
2.2.10 Amplificação e seqüenciamento do 16S rDNA.....	31
2.2.11 Compatibilidade vegetativa entre isolados de <i>Erythricium salmonicolor</i> e anastomose de hifas.....	32
2.2.12 Seleção de bactérias antagônicas ao fungo <i>Erythricium salmonicolor</i>	33
2.3 Resultados e Discussões.....	34
2.3.1 Isolamento do fungo <i>Erythricium salmonicolor</i>	34
2.3.2 Variabilidade genética de <i>Erythricium salmonicolor</i> por RAPD.....	34
2.3.3 Teste de compatibilidade vegetativa.....	38
2.3.4 Controle Biológico.....	43
3 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*, agente causal da rubelose dos citros

A rubelose é uma doença que atinge galhos e ramos, e é causada pelo fungo *Erythricium salmonicolor*, o qual infecta várias espécies vegetais, tais como citros, seringueira, e macieira. Esta doença vem chamando a atenção dos citricultores devido à redução de até 10% da produção de citros, a qual é preocupante para o Brasil, o maior produtor de laranja do mundo. Entretanto, a diversidade do fungo *E. salmonicolor* em cultivares brasileiras ainda não foi avaliada. Desta maneira, este trabalho teve como objetivos: *i*) avaliar a variabilidade genética, por meio de RAPD, de isolados do fungo *E. salmonicolor* provenientes de diferentes regiões citrícolas de São Paulo e Minas Gerais, *ii*) avaliar a compatibilidade vegetativa e fusão de hifas deste fungo e *iii*) selecionar bactérias endofíticas com potencial para o controle deste fungo fitopatogênico. Após a análise por RAPD, foram observados 6 grupos distintos (A, B, C, D, E, F), os quais não apresentaram correlação com o local de origem e espécie hospedeira. No teste de compatibilidade vegetativa houve encontro de hifas em todos os cruzamentos e 84% destes apresentaram fusão entre as hifas. Foi verificada compatibilidade entre linhagens, embora não tenha sido observada correlação com os haplótipos. No teste de antagonismo, 8 isolados bacterianos inibiram *E. salmonicolor*. Entretanto, foi observada diferença na interação entre as bactérias e diferentes isolados de *E. salmonicolor*, visto que bactérias diferentes inibiram os dois genótipos do fungo, revelando a variabilidade genética entre estas linhagens que pertencem a diferentes haplótipos. Os resultados observados neste trabalho indicam a importância de futuros estudos sobre a fase sexual de *E. salmonicolor*, uma vez que a anastomose de hifas precede a formação de heterocário, responsável pelos processos de recombinações sexuais e parassexuais, que geram variabilidade genética em fungos filamentosos.

Palavras chaves: *Erythricium salmonicolor*; RAPD; Compatibilidade Vegetativa; Controle Biológico; rubelose

ABSTRACT

Genetic variability of fungus *Erythricium salmonicolor*, causal agent of pink disease of citrus

The fungus *Erythricium salmonicolor* is the causal agent of pink disease, which infects branches of many host plants, such as citrus, rubber, and apple. This disease may be a serious problem in Brazil, since it can reduce the citrus production up to 10%. Brazil is the major world citrus producer, therefore this problem is alarming. The genetic diversity of *E. salmonicolor* from Brazilian plants has not been evaluated, so the aims of this study were *i*) to evaluate the genetic diversity by RAPD of *E. salmonicolor* isolates from São Paulo and Minas Gerais; *ii*) to evaluate the vegetative compatibility and hyphal fusion of this fungus; and *iii*) to select endophytic bacteria able to inhibit the *E. salmonicolor* growth. RAPD analysis showed at least 6 distinct haplotypes (A, B, C, D, E, F), which did not have correlation with the isolation site and host plant. Also, vegetative compatibility tests showed that 84% of crosses resulted in hyphal fusion, but this compatibility was not related to the RAPD haplotypes. Eight endophytic bacteria were selected against *E. salmonicolor*, which could be used for biological control of this pathogen. However it was observed different types of interaction among endophytic bacteria and *E. salmonicolor* strains, since these bacteria inhibited differentially two fungi isolates. It reveals the genetic variability between these fungi isolates that belongs to different haplotypes. These results show the importance of future studies concerning the sexual phase of *E. salmonicolor*, since the genetic variability seems to be high and this hyphal fusion, which precede the formation of heterokaryon (sexual and parasexual reproduction), could be responsible for the variability in this filamentous fungus.

Keywords: *Erythricium salmonicolor*; RAPD; vegetative compatibility; biological control; pink disease

1 INTRODUÇÃO

O Brasil lidera a produção mundial de laranja, desde meados dos anos de 1980, apresentando domínio sobre 80% do comércio internacional de suco de laranja concentrado. O agronegócio citrícola brasileiro movimenta cerca de R\$ 10 bilhões por ano, investindo aproximadamente US\$ 410 milhões em insumos e trazendo divisas de US\$ 1,5 bilhões com exportações de produtos citrícolas. O Brasil possui uma área cultivada de 820 mil hectares, dos quais 77% encontram-se na região Sudeste. A laranja representa 49% da fruticultura brasileira. As laranjas frescas brasileiras são exportadas principalmente para a Holanda e a Espanha, que participam, respectivamente, com 38 e 33% nas exportações.

O setor citrícola brasileiro gera aproximadamente 400 mil empregos diretos e 1,2 milhão de empregos indiretos, sendo, portanto, muito importante para a economia de muitos municípios do Estado de São Paulo.

As plantas cítricas são multiplicadas por enxertia, e isso acarreta a diminuição da variabilidade do pomar e, conseqüentemente, os citros são atingidos por inúmeras doenças e pragas. A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são prejudicadas principalmente devido ao ataque de fungos, bactérias e vírus. Dessa forma, a citricultura brasileira vem apresentando muitos problemas fitossanitários, incluindo mais de 50 doenças causadas por fungos. As doenças fúngicas mais importantes são pinta preta ou mancha preta (*Guignardia citricarpa*), verrugose (*Elsinoe spp.*), melanose (*Diaporthe citri*), podridão floral (*Colletotrichum acutatum*), mancha marrom de *Alternaria* (*Alternaria alternata*) e rubelose (*Erythricium salmonicolor*).

A rubelose, também conhecida como mal rosado, é causada pelo fungo *Erythricium salmonicolor*, e é uma doença caracterizada pela morte de galhos e ramos infectados, tornando a planta cítrica improdutiva. Em ataques de menor ou média intensidade, ocorre a queda de frutos, mas em casos de maior severidade pode haver a morte de toda a planta.

No início da infecção, há a formação de goma e o crescimento micelial de coloração branca sobre a casca do tronco e de ramos. Com a evolução da doença, o micélio branco adquire uma tonalidade rósea e ocorre o aparecimento de rachaduras nas cascas infectadas, seca de galhos e ramos e queda de frutos ligados a galhos lesionados. Estes sintomas estão relacionados com a diminuição da produtividade da planta, chamando a atenção dos citricultores. Isso pode resultar na redução de até 10% da produção de citros. Portanto, estudos básicos sobre esse fungo são

importantes para a elaboração de estratégias de controle dessa doença, bem como para evitar a expansão do patógeno nas áreas citrícolas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 História da citricultura

As plantas cítricas apresentam origem no Sudeste Asiático, incluindo o Sul da China, Nordeste da Índia e Burma. A citricultura foi introduzida no Brasil no início da colonização portuguesa, entre 1530 e 1540. No início do período colonial, a produção era predominantemente caseira, apresentando pouca importância econômica (ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

Apenas no século 20, o setor citrícola foi explorado comercialmente e, em menos de cem anos, o país se transformou no maior produtor e exportador de cítricos do mundo. O clima tropical úmido proporcionou condições favoráveis para o aumento da produção de laranja, assim, foram iniciadas as exportações de cítricos para a Argentina e Europa nas décadas dos 1920 e 1930, respectivamente. Com a segunda guerra mundial, a Europa diminuiu drasticamente as importações do produto citrícola brasileiro, desta forma, restou apenas a exportação para a Argentina (SINCLAIR, 1961). Além disso, neste período do fim da década dos 30, o vírus da tristeza levou à erradicação de nove milhões de árvores, ou seja, 80% das plantas cítricas paulistas foram dizimadas (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

As exportações brasileiras de produtos cítricos aumentaram lentamente na década de 50, até que, no início de 1960, o país alterou a produção comercial de fruta fresca. Nesse momento, a laranja passou a ser utilizada como matéria prima para o suco concentrado congelado, levando ao avanço da citricultura brasileira no mercado internacional rumo à liderança na produção mundial de laranja. A industrialização no setor citrícola contribuiu muito para o aumento nas exportações na década de 60. Além disso, no período de 1962 a 1963, ocorreu uma forte geada na Flórida, principal concorrente do Brasil, provocando a destruição de aproximadamente 13 milhões de plantas cítricas nos Estados Unidos, desabastecendo o mercado de suco desse país (MOREIRA, 1991).

Em 1977, foi criado o Fundo Paulista de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), que é um órgão responsável por estudos sobre os problemas fitossanitários, que atingem a citricultura brasileira (MOREIRA, 1991).

Em 1980, a Flórida foi atingida novamente com uma seqüência de geadas, diminuindo a produção de laranja no país. Com esta situação, o Brasil alcançou a posição de maior produtor de citros e sucos cítricos do mundo. Entre os anos de 1970 e 1990, a produção nacional de citros aumentou 160%. Neste período, o Brasil firmou contrato com os Estados Unidos, Europa e Ásia, que ainda hoje são os principais importadores do produto cítrico brasileiro (ROY; GOLDSCHIMIDT, 1996).

2.1.2 Importância econômica e social da cultura de citros

O Brasil tem a posição de maior produtor de frutas cítricas do mundo, dominando aproximadamente 1/3 da produção mundial. A produção brasileira de citros está concentrada no Estado de São Paulo, que é responsável por 70% da produção nacional de laranja (Associação Brasileira de Exportadores de Cítricos – ABECITRUS, 2006; NEVES et al., 2003).

Grande parte da laranja produzida no país é destinada às indústrias de sucos. Aproximadamente 71% da indústria brasileira da área de sucos produzem o de laranja. Entretanto, esse produto é pouco consumido no Brasil, devido ao baixo poder aquisitivo da população. Cerca de 20% da laranja nacional é destinada para o consumo interno. Menos de 1% da laranja *in natura* é conduzida para o mercado externo e 80% da laranja nacional são destinadas para as indústrias de suco (NEVES; BOTEON, 1998).

Durante o período de 1990 a 2005, as exportações de suco de laranja concentrado e congelado brasileiro variaram entre 786.345t a 1.411.173t, na safra 2004/2005 atingiu 1.411.173t (ABECITRUS, 2006). O principal país importador do suco de laranja congelado brasileiro é a Bélgica, que apresenta 43% de participação nas exportações deste produto, seguida dos Estados Unidos e Holanda, que correspondem, respectivamente, a 20% e 17% das exportações do produto cítrico brasileiro (NEVES et al., 2003).

Já em relação à laranja *in natura* nacional, a maior parte é consumida pelo mercado interno. No período de 1990 a 2005, as exportações da laranja na forma de fruta variaram entre 40.312t a 133.944t. Na safra de 1994/1995, atingiu o seu maior índice quando exportou cerca de 133.944t de laranja *in natura* (ABECITRUS, 2006).

Além da contribuição econômica da cultura de citros, também existe a social, visto que essa atividade gera grande impacto no mercado de trabalho. Em 2001, o sistema agroindustrial citrícola gerou aproximadamente 400 mil empregos diretos, representando 2% da mão-de-obra agrícola brasileira e 11% da paulista. Na colheita da laranja, é utilizada a mão-de-obra manual, mesmo em países mais desenvolvidos como os Estados Unidos, pois ainda não há tecnologia avançada no setor de colheita mecânica no mundo (DRAGONE et al., 2002).

2.1.3 Rubelose

A rubelose atinge todas as culturas cítricas, apresentando maior agressão em pomares adensados e sombreados, e em plantas vigorosas e adultas. Essa doença caracteriza-se pela morte de galhos e ramos infectados. Entretanto, em ataques muito severos, pode ocorrer a morte da planta hospedeira (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; LARANJEIRA, 1994).

A rubelose é uma enfermidade que não apresenta sintomas aparentes no início da infecção, porém ela pode matar os galhos e ramos de muitas árvores hospedeiras tropicais. Essa doença apresentou-se como problema fitossanitário no final da década de 1960, sendo controlada durante muitos anos. Entretanto, no final da década de 1990, reapareceu causando perdas econômicas à citricultura brasileira (ASSIS, 2003).

Pesquisadores do Estado de São Paulo têm estudado os danos provocados por esta enfermidade na citricultura brasileira. No Brasil, a rubelose tem provocado danos de aproximadamente 10% na produção, um valor muito preocupante para a produção citrícola brasileira. A produção pode ser afetada inicialmente com a queda dos frutos, ou mais lentamente, com a seca de galhos infectados e a morte de toda a planta (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

Esta enfermidade vem chamando a atenção dos pesquisadores, devido ao aumento de ocorrência desta doença e, ainda, à falta de conhecimento científico sobre ela. A rubelose vem gerando perdas econômicas em países tropicais e em regiões menos úmidas, conforme já constatado em muitos países, como Colômbia, Bolívia, Costa Rica, Cuba, Equador, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Venezuela, Austrália, Nova Zelândia, Japão, Brasil e Índia, entre outros (RIOS; PITMAN, 2000; HOLLIDAY, 1995; KEANE, 2001). No Brasil, a rubelose é

encontrada em regiões tropicais úmidas, como a Amazônia, Pará e em regiões com menor teor de umidade, onde se localizam os principais municípios citrícolas paulistas (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

A rubelose foi descrita inicialmente em café na Ásia (Ceilão), em 1870, por Thwaites, e, posteriormente, foi encontrada na Malásia, Java, Sul da Índia, Indochina, Filipinas e Burma, entre os anos de 1897 e 1926. No continente americano, a primeira ocorrência da rubelose foi observada por Nowell na Dominica e Santa Lúcia, em 1916. No Brasil, essa doença foi encontrada primeiramente em citros, por Viégas, em 1945, e, posteriormente, no México e Peru, em 1947 e 1953, respectivamente. Na África, a rubelose foi observada em 1953 em Camarões, Costa do Marfim e Congo (HILTON, 1958).

2.1.4 Agente etiológico

A rubelose, também conhecida como mal rosado, tem como agente etiológico o fungo *Erythricium salmonicolor* (*Corticium salmonicolor*) (NOMI; SATO; KOBAYASHI, 2000; GEZAHGNE; ROUX; WINGFIELD, 2003), o qual está incluído no grande grupo: *Eukaryota*; Reino: *Fungi*; Filo: *Basidiomycota*; Classe: *Homobasidiomycetes*; Ordem: *Aphyllphorales*; Família: *Corticaceae*; Gênero: *Erythricium* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>).

Erythricium salmonicolor cresce moderadamente em BDA, onde apresenta crescimento máximo na faixa de 24-28°C. Este fungo apresenta a fase sexuada, quando produz basidiósporos, ou fase assexuada, produzindo conídios que são chamados de *Necator decretus* (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

A observação deste fungo ao microscópio revela um sistema de hifas monomítico e ausência de grampos de conexão. As hifas apresentam-se pequenas e alongadas 10-15µm no subhimênio, e as hifas basais possuem paredes finas com 6-8µm de diâmetro. Os basídios são sinuosos e longos, de 40-50 x 8-12µm, e os basidiósporos mostram-se longamente elipsoidais (ASSIS, 2003). Os basidiósporos apresentam-se hialinos, lisos, piriformes a elipsóides, e medem 8-11 x 8-9,8µm. São formados a partir de basídios subclavados com 2 a 4 esterigmas cada (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

2.1.5 Sinais e Sintomas da rubelose

No processo inicial da infecção, ocorre a formação de exsudatos e o crescimento micelial de coloração branca nas axilas de ramos e galhos, onde há um ambiente adequado (úmido) para o desenvolvimento do agente etiológico. O micélio esbranquiçado inicialmente torna-se róseo com o desenvolvimento da doença. Esse micélio posteriormente desaparece, deixando no local da infecção filamentos longos esbranquiçados ou acinzentados, os quais representam os sinais típicos da rubelose (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; LARANJEIRA, 1994).

No início da infecção, o fungo penetra possivelmente através de lenticelas em tecidos e, posteriormente, em regiões mais profundas do lenho. As cascas dos ramos afetados têm superfície de coloração rósea que, através do tempo, apresentam rachaduras longitudinais e perdem a cor viva, devido à necrose dos tecidos nas áreas afetadas. Com o desenvolvimento da doença, as camadas mais internas do lenho são afetadas. Assim, devido às lesões, ocorre o anelamento em galhos e ramos, que secam da extremidade até as áreas atingidas pelo fungo *Erythricium salmonicolor* (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; LARANJEIRA, 1994).

As regiões infectadas apresentam incrustações de coloração rosada, as quais são constituídas por corpos de frutificações hifais. As incrustações rosadas são formadas por milhões de esporos localizados na superfície e dentro do córtex da casca dos ramos lesionados. A presença do fungo na região cortical causa necrose, interrompendo os processos fisiológicos, como o transporte de nutrientes e água, e, conseqüentemente, as folhas dos ramos afetados adquirem coloração amarelada e, finalmente, secam e caem. A desordem nos processos fisiológicos gera a queda precoce dos frutos dos ramos afetados, não completando a maturação dos mesmos (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; PLOETZ, 2003).

Quando o fungo ataca a planta, ataca processos celulares e teciduais que estão relacionados com a proliferação das células. Isso gera, conseqüentemente, o aparecimento do cancro na área afetada, o qual é uma resposta celular da planta frente à invasão do fungo *Erythricium salmonicolor* (OLD et al., 2000; GEZAHGNE; ROUX; WINGFIELD, 2003). Além disso, o fungo causa necrose nos tecidos da casca e no câmbio, podendo também atingir o lenho. Em conseqüência, ocorre um estrangulamento dos ramos ou tronco. Os tecidos morrem e as folhas ligadas aos ramos infectados amarelecem e secam. De modo geral, no entanto, as lesões ocorrem nos ramos em regiões altas da copa, o que provoca brotações na parte inferior não afetada. Isso

pode deformar as árvores e afetar seu crescimento (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; RICARDO; RODRIGUEZ, 1983). A Figura 1 revela os sintomas típicos da rubelose.

Figura 1 - Sintomas da rubelose. Observar a) fendas longitudinais, b) exsudação e c) crescimento micelial sobre o ramo infectado por *Erythricium salmonicolor*

2.1.6 Transmissão e Controle

A rubelose é transmitida por meio da invasão do fungo na casca das árvores hospedeiras. Regiões com alta pluviosidade favorecem a formação e liberação dos basidiósporos e, portanto, clima úmido e chuvoso e o vento são importantes fatores que contribuem na disseminação do mal rosado. Além de o clima úmido contribuir para a liberação e disseminação dos basidiósporos, ele favorece a fixação dos mesmos na casca úmida das plantas onde ocorre a germinação (NOMI; SATO; KOBAYASHI, 2000).

As cascas infectadas contribuem para a propagação da rubelose, pois elas são fontes de inóculo do fungo *Erythricium salmonicolor* para as árvores não infectadas. Desta maneira, é importante que o produtor realize a poda de inverno dos galhos e ramos atacados, promovendo a redução e remoção do agente etiológico, e melhorando a aeração no interior da copa das árvores (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). Essa poda deve ser realizada no inverno, pois próximo a junho ocorre o aparecimento de emaranhado micelial fino que se expande a partir da massa micelial, e os basidiósporos que foram produzidos começam a se disseminar pelo vento (NOMI; SATO; KOBAYASHI, 2000). Os cortes devem ser feitos de 15 a 30cm abaixo do limite inferior das lesões. O ramo podado deve ser protegido com uma pasta fúngica à base de cobre

(oxicloreto de cobre, óxido cuproso, ou sulfato de cobre). Para prevenir essa moléstia são efetuadas pulverizações com produtos à base de cobre nos ramos internos das plantas, onde é alto o teor de umidade (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). Além disso, os pomares devem ser monitorados para detecção de possíveis focos iniciais desta doença.

2.1.7 Hospedeiros

O fungo *Erythricium salmonicolor* infecta várias espécies de plantas tropicais e subtropicais como: mangueira, citros, noz-moscada, seringueira, erva mate, limeira, videira, canforeira, crotalária, jaqueira, eucalipto, cacaueiro, abacateiro, macieira, cafeeiro, pimenteira, ervilha, ameixeira, coca, caneleira, chá, e algumas plantas ornamentais como o jasmim, gardênia, acácia, rosa (BRISTON-JONES, 1934), *Artocarpus integer*, *Calliandra surinamensis*, *Durio zibethinus*, *Eugenia aquea*, *Nerium oleander*, *Ricinus communis*, *Stenolobium stans*, *Tephrosia cândida*, *Thevetia peruviana*, e *Thunbergia erecta* (LASS, 1985), produzindo sintomas similares em todos estes hospedeiros. Há maior incidência da rubelose quando estas plantas hospedeiras estão localizadas em regiões tropicais úmidas (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; RICARDO; RODRIGUEZ, 1983).

2.1.8 Análise da variabilidade genética por meio de marcador molecular RAPD

Atualmente, há várias técnicas moleculares que detectam polimorfismos de DNA como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*); seqüências de subunidades do rDNA; RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) (MCDONALD, 1997; TAYLOR et al., 2001; FAGBOLA; ABANG, 2004). Entre estas, o RAPD surgiu com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; MCCLELLAND, 1990), sendo baseada na amplificação simultânea de vários locos anônimos dispersos no genoma, utilizando um único *primer* de seqüência arbitrária de bases, que se anelam em vários pontos do DNA genômico. A

amplificação de um determinado fragmento do genoma ocorre quando dois sítios de homologia ao *primer* estão adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação invertida (FUNGARO; VIEIRA, 1998).

As principais vantagens de marcadores RAPD são a simplicidade, rapidez e baixo custo. Esse método requer baixa quantidade de DNA, e revela alto grau de bandas polimórficas. Além disso, essa técnica amplifica vários locos gênicos, não exigindo o conhecimento prévio das seqüências alvos (LOPES et al., 2002; MICHELMORE; PARAN; KISSELI, 1991).

Marcadores moleculares como RAPD têm sido empregados para avaliação da variabilidade genética (LACAVA et al., 2001; IRAN; AHMAD, 2005; TAKO; CSERNETICS, 2005); estudos de populações (JAMIL et al., 2000); identificação taxonômica (GUZMÁN et al., 1999; STRONGMAN; MACKAY, 1993; STILES et al., 1993); caracterização de isolados fúngicos (FUNGARO, 2000) e produção de *fingerprints* genômicos para inúmeras espécies de microrganismos (WELSH; MCCLELLAND, 1990).

2.1.9 Controle Biológico

O controle biológico é um fenômeno natural que está relacionado com a redução da densidade do inóculo, ou da capacidade de um patógeno ou parasita em causar doença (BAKER; COOK, 1974; HUFFAKER; DAHLSTEN, 1999).

Nos últimos anos, os pesticidas químicos vêm apresentando um relativo sucesso na agricultura. Entretanto, eles causam sérios efeitos em organismos não-alvo, gerando problemas como a contaminação do meio ambiente e de alimentos. O aparecimento desses problemas incentivou pesquisas sobre métodos alternativos no controle de doenças em plantas (KUMAR et al., 2005; KIM et al., 2004; BANO; MUSARRAT, 2003). No Brasil, centros de pesquisas, universidades e indústrias vêm realizando estudos para desenvolver novos produtos biológicos que poderiam ser utilizados no controle de doenças e pragas. Nos programas de controle biológico de fitopatógenos, está incluída a prática de manejo favorecendo antagonistas nativos e a adição de microrganismos previamente estudados (MELO, 1998).

Os produtos utilizados no controle biológico, quando comparados aos defensivos agrícolas, apresentam baixo custo e toxicidade e são menos agressivos ao meio ambiente, devido à

redução da aplicação de produtos químicos utilizados no controle de doenças, como os antibióticos e fungicidas (KIM et al., 2004).

Nesse contexto, vários estudos com microrganismos têm sido desenvolvidos para controlar fungos fitopatogênicos. Os potenciais agentes fúngicos utilizados no biocontrole são *Trichoderma sp.* (HERMOSA et al., 2000; GRINYER et al., 2005), *Gliocladium roseum*, *Coniothyrium minitans*, *Talaromyces flavus*, *Penicillium spp.*. Já os agentes bacterianos são compostos principalmente por *Bacillus subtilis* (FEIO et al., 2004; COOK et al., 1995; CHO et al., 2003), *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium radiobacter* e *Streptomyces spp.* (GETHA; VIKINESWARY, 2002).

O sucesso nos programas de controle biológico está relacionado com as propriedades antagonicas e mecanismos de ação do antagonista. Há vários fungos e bactérias que inibem os fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, oxigênio e espaço, parasitismo direto ou produção de metabólitos secundários que degradam a parede celular como enzimas líticas e biosurfactantes. Além disso, várias espécies de bactérias, principalmente *Pseudomonas* e *Streptomyces*, produzem vários tipos de antibióticos, os quais podem ser utilizados também pela indústria farmacêutica (BANO; MUSARRAT, 2003; MOUSSAIF et al., 1997; GETHA; VIKINESWARY, 2002; FEIO et al., 2004; KIM et al., 2004; ELLIS; TIMMS-WILSON; BAILEY, 2000; GOMES et al., 2001).

Diversos trabalhos relatam que as bactérias endofíticas vêm apresentando grande potencial para o controle de fitopatógenos como fungos, bactérias e nematóides (ARAÚJO et al., 2002; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; KRECHEL et al., 2002; DOWNING; THOMSON, 2000; CAO et al., 2005). As bactérias endofíticas compõem a flora microbiana natural, colonizando os tecidos internos das plantas saudáveis. Além disso, essas bactérias são encontradas no mesmo tecido que os fitopatógenos, tornando-as excelentes candidatas para agentes de biocontrole (HALLMANN et al., 1997).

Muitos pesquisadores vêm trabalhando na área de biocontrole, entretanto, poucos produtos biológicos foram introduzidos no mercado. O sucesso do controle biológico em condições naturais de campo está relacionado ao melhor entendimento sobre a ecologia dos agentes antagonistas e do patógeno. É necessário o conhecimento sobre espectro de ação, produção de antibióticos, resistência a fatores ambientais estressantes e instabilidade genética dos agentes de biocontrole (MELO, 1998).

2.1.10 Anastomose de hifas e incompatibilidade vegetativa

A anastomose é caracterizada pela fusão de hifas, permitindo a comunicação entre os compartimentos das mesmas. Quando ocorre a fusão entre hifas de organismos diferentes há a formação de um heterocário, ou seja, um único talo apresenta dois ou mais núcleos geneticamente distintos (GLASS; JACOBSON; PATRICK, 2000). A formação de heterocário está relacionada com os processos de recombinações sexuais e parassexuais em fungos filamentosos (DEBETS, 1998; DI PRIMO; CARTIA; KATAN, 2001).

A habilidade de formar heterocários intraespecíficos é um caráter único e comum para a maioria das espécies de fungos filamentosos (senão em todas) (JACOBSON; BEURKENS; KEOMPARENS, 1998). Entretanto, um fungo individualizado é limitado a formar um heterocário com outro fungo de constituição genética similar, devido ao mecanismo genético denominado de incompatibilidade vegetativa, ou somática, ou ainda de incompatibilidade de heterocário, que ocorre em grande parte das espécies de fungos (WORRAL et al., 1997; DEBETS, 1998). Portanto, essa incompatibilidade impõe uma barreira nos cruzamentos entre organismos geneticamente semelhantes, contribuindo para a conservação da variabilidade genética dentro da população (CASSELTON; OLESNICKY, 1998; BROWN; CASSELTON, 2001; JOHANNESSON; STENLID, 2004).

A incompatibilidade vegetativa impede a formação de heterocário estável entre indivíduos que apresentam diferentes alelos para o loci *het* (incompatibilidade de heterocário) ou loc *vic* (incompatibilidade vegetativa) dependendo da espécie do fungo (JACOBSON; BEURKENS; KEOMPARENS, 1998). Geralmente, a incompatibilidade somática em fungos filamentosos está relacionada a um processo lítico que resulta na morte das células heterocarióticas fusionadas (LESLIE, 1993).

O mecanismo envolvido com a anastomose de hifas tem sido muito estudado em várias espécies de fungos, como nos cruzamentos entre linhagens compatíveis formando heterocários estáveis e entre aquelas que apresentam incompatibilidade vegetativa formando heterocários instáveis (NAUTA; HOEKSTRA, 1996; JAMES; LIOU; VILGARYS, 2004; AIMI et al., 2005; AIMI; YOTSUTANI; MORINAGA, 2002; MCCABE; GALLAGHER; DEACON, 1999). A anastomose de hifas é dividida em três etapas: pré-contato, pós-contato, e pós-fusão. Provavelmente, o início do pré-contato das hifas está relacionado com a difusão de substâncias

químicas no meio de cultura. Na etapa de fusão das hifas, há inicialmente a desestruturação das paredes celulares devido à ação de enzimas hidrolíticas no ponto de contato entre as hifas. A etapa de pós-contato de fusão de hifas é caracterizada por mistura de citoplasmas e fusão das membranas plasmáticas (GLASS; JACOBSON; PATRICK, 2000; JACOBSON; BEURKENS; KEOMPARENS, 1998).

Além da variabilidade genética causada pela mutação, os fungos filamentosos apresentam sistemas de recombinação (ciclo sexual e parassexual) que combinam caracteres de diferentes organismos em um único indivíduo. Esse sistema é iniciado com as anastomoses entre hifas de diferentes linhagens para a formação de um heterocário estável, onde ocorrerá a fusão de núcleos diferentes, e posterior meiose, contribuindo, assim, para o aumento da variabilidade. Portanto, o estudo da anastomose de hifas é importante para a compreensão sobre a variabilidade genética apresentada por um determinado patógeno (AZEVEDO, 1998).

Espécies de fungos que apresentam grande variabilidade molecular contribuem para a quebra de resistência genética a doenças em plantas hospedeiras. Logo, estudos sobre a variabilidade genética desses agentes etiológicos são muito importantes, pois geram informações relevantes que são utilizadas em programas de melhoramento genético de cultivares resistentes a doenças. Também se observa quebra de resistência a fungicidas que atuam sobre agente patológico com grande variabilidade genética (AYYADURAI et al., 2005; JIMÉNEZ-GASCO; NAVAS-CORTES; JIMENES-DIAS, 2004; YORINORI; KIIHL, 2001).

2.1.11 Objetivos

Considerando o exposto, o objetivo do presente trabalho foi:

- a) Avaliar a variabilidade genética de isolados de *Erythricium salmonicolor* por meio de marcadores de RAPD;
- b) Analisar a compatibilidade entre as linhagens de *Erythricium salmonicolor*;
- c) Selecionar bactérias endofíticas que controlam o fungo *Erythricium salmonicolor*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Linhagens de *Erythricium salmonicolor* e condições de cultivo

As linhagens utilizadas neste estudo estão representadas na Tabela 1. Foram utilizadas linhagens de *Erythricium salmonicolor* cedidas pela Dra. Neusa de Lima Nogueira (Laboratório de Histopatologia Vegetal - CENA - USP), Dr. Mário Barreto Figueiredo (Laboratório de Micologia Fitopatológica - Instituto Biológico) e, Dr. Nelson Sidnei Massola Jr. (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ).

Tabela 1 - Descrição dos isolados, hospedeiros e procedência das linhagens de *Erythricium salmonicolor* avaliadas neste trabalho

Isolados	Hospedeiro	Origem	Referência
Cs03	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs04	Citrus	Conchal - SP	(Assis, 2003)
Cs06	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs07	Citrus	Guaraci - SP	(Assis, 2003)
Cs08	Citrus	Guaraci - SP	(Assis, 2003)
Cs12A	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs12B	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs13	Citrus	Barretos - SP	(Assis, 2003)
Cs14	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs15	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
Cs16	Citrus	Bebedouro - SP	(Assis, 2003)
CsPA	Citrus	Capitão Poço - PA	(Assis, 2003)
RWB190	Araçazeiro	Viçosa - MG	(Assis, 2003)
CsSC	Macieira	Frei Rogério - SC	(Assis, 2003)
CsL	Figueira	Lavras - MG	(Assis, 2003)
CsBR	Citrus	Brotas - SP	Nelson Massola
CsBH	Citrus	Belo Horizonte - MG	FUNDECITRUS
IB16/02	Citrus	Bebedouro - SP	Mário Figueiredo
IB14/02	Citrus	Conchal - SP	Mário Figueiredo

Os fungos foram cultivados em meio de cultura Batata, Dextrose Ágar (BDA) a 28°C.

2.2.2 Meio de cultura e soluções

2.2.2.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Batata	200,0g
Ágar	15,0g
Glicose	20,0g
Água destilada	1000mL

A batata foi cozida durante 30 minutos em 1000mL de água destilada e posteriormente foi filtrada em gaze. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

2.2.2.2 Meio BDA líquido

Preparado de acordo com o item anterior sem ser adicionado ágar.

2.2.2.3 Solução de Clorofil

Foram misturados clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

2.2.2.4 Solução de Clorofane

Foram misturados um volume de fenol com um volume de clorofórmio.

2.2.2.5 Tampão de corrida TAE 50X

Trizma-Base	242,0g
Ácido Acético Glacial	57,1mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100mL
Água destilada	1000mL

A solução foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente.

2.2.2.6 Solução estoque Tris-HCl 1M pH 8,0

Trizma-Base	121,0g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2.2.7 Solução de EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	37,22g
Água destilada	100mL

O pH foi ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2.2.8 Solução de NaCl 5M

NaCl	29,16g
Água destilada	100mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2.2.9 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS	10,0g
Água destilada	100mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2.2.10 Tampão de extração de DNA de fungos filamentosos (RAEDER; BRODA, 1985)

SDS 10%	4mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2mL
Tris-HCl 1M pH 8,0	8mL
NaCl 5M	2mL
Água Milli Q	24mL

O tampão foi preparado no momento de uso.

2.2.2.11 Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8,0	1mL
EDTA 0,5M pH 8,0	0,2mL

O volume foi completado para 100mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2.2.12 Fenol saturado (SAMBROOK et al., 1989)

O fenol cristalizado (Synth) foi dissolvido em banho-maria a 65°C e adicionado um volume de tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,0. Após agitação, durante aproximadamente 1 hora, a fase aquosa foi retirada e o procedimento repetido com o Tris-HCl 0,1M (pH 8,0) até o pH da fase fenólica atingir 8,0 (medido com papel de filtro). Em seguida, removeu-se a fase aquosa e adicionou-se 1/10 do volume final de Tris-HCl 0,1M (pH 8,0). O fenol foi estocado em frasco âmbar a 4°C.

2.2.2.13 Primers de RAPD

Foram utilizados os *primers* AX17, C08, W04, AX10, G13, A02, P12 (*Operon Technologies*), CA, EUA, que foram diluídos a uma concentração final de 4µM em água Milli Q. Os *primers* foram mantidos diluídos a -20°C.

2.2.2.14 Primers da região ITS do rDNA

Foram utilizados os *primers* ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA.

2.2.2.15 Primers da região 16S do rDNA

Foram utilizados os *primers* P027F (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3').

2.2.2.16 dNTPs

Os nucleotídeos apresentam concentração inicial de 100mM. Para uso, foram misturadas partes iguais de modo a obter-se uma concentração final de 2,5mM de cada dNTP. A solução foi mantida a -20°C.

2.2.2.17 Corante Lactofenol - Azul algodão

Lactofenol

Fenol	20g
Ácido láctico	40mL
Glicerina	40mL
Água destilada	20mL

Azul algodão

Azul algodão	0,5g
Água destilada	50mL

Para o preparo da solução final, foram misturados 100mL de lactofenol, 5mL de azul algodão e 20mL de ácido acético glacial.

2.2.3 Isolamento do fungo *Erythricium salmonicolor*

Caules de laranjeira apresentando sintomas da rubelose, como o fendilhamento e crescimento micelial na superfície dos galhos, foram utilizados no isolamento do fungo *Erythricium salmonicolor*. Inicialmente, os caules infectados foram lavados com escova em água corrente e, depois de secos, os galhos foram desinfetados com solução de hipoclorito 3,5% durante 5 minutos. A seguir, os galhos foram lavados duas vezes em água esterilizada. Esse material foi mantido sobre um papel filtro durante 5 minutos para secar. Posteriormente, foi removida a casca em regiões com sintomas da doença e ao redor delas. A casca foi cortada, com o auxílio de um bisturi esterilizado, em pequenos fragmentos de aproximadamente 1cm². Foram

introduzidos cinco fragmentos da casca em cada placa com meio BDA sólido (item 2.2.2.1) suplementado com tetraciclina e penicilina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a 4°C (em geladeira), pois o fungo *Erythricium salmonicolor* cresce a baixa temperatura. O micélio do fungo que apareceu após 15 dias foi transferido para placas de Petri com meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em BOD a 28°C .

2.2.4 Extração de DNA de fungos filamentosos

Para a extração de DNA, as linhagens foram crescidas em meio BDA líquido durante 7 dias sob agitação de 150rpm a 37°C . Posteriormente, o micélio foi filtrado em filtro de *Buchner*, lavado em água destilada autoclavada e em seguida pesado.

Foi triturado um grama de micélio, de cada amostra, utilizando nitrogênio líquido, até obter um pó, que foi transferido imediatamente para os tubos de microcentrífuga. Para cada grama de micélio triturado foi adicionado 1mL de solução tampão de extração. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 70°C durante 20 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 X g, por 10 minutos. Foi transferido o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga, onde posteriormente foi adicionado um volume de fenol. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, no qual foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições iniciais. Novamente o sobrenadante foi recuperado e transferido a um novo tubo de microcentrífuga, no qual foi adicionado um volume de clorofórmio. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas novamente a 14000 X g durante 10 minutos. Após a recuperação do sobrenadante, em novos tubos de microcentrífuga, foi realizada a precipitação do DNA, com a adição de 60% de álcool isopropílico ao sobrenadante. Depois de homogeneizadas, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e, posteriormente, foram submetidas à centrifugação a 14000 X g por 10 minutos. Após a centrifugação, o álcool isopropílico foi descartado e o DNA precipitado de cada amostra foi lavado com 500 μL de etanol 70% resfriado a -20°C .

Posteriormente, o etanol 70% foi descartado e os tubos foram invertidos para secagem do DNA, que foi ressuspendido em 100µL de tampão TE.

2.2.5 Extração do DNA total de bactérias

As bactérias foram crescidas em 5mL de TSB5% durante 24 horas a 28°C sob agitação de 150rpm. 2 mL da cultura foram centrifugados a 14000 X g por 5 minutos e, após descartar o sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 500µL de TE (Tris-HCl 0,01M - EDTA 0,001M) e centrifugado a 14000 X g durante 5 minutos. Novamente removeu-se o sobrenadante e adicionaram-se 500µL de TE ao pellet que, posteriormente, foi ressuspendido, adicionando-se 0,5g de sílica (Biospec Products, INC - 0,1mm) e 40µL de SDS 10% em cada amostra. A suspensão foi agitada em um homogenizador (Mine-beadbeater™, Biospec Products) por 60 segundos a 3500 rpm. As amostras foram mantidas no gelo durante aproximadamente 5 minutos. Adicionaram-se 500µL de fenol às células lisadas e as amostras foram misturadas por inversão e em seguida centrifugadas durante 10 minutos a 14000 X g. A fase superior foi transferida para um novo tubo limpo, onde foram acrescentados 500µL de fenol-clorofórmio (fenol:clorofórmio - 1:1). Posteriormente, as amostras foram misturadas por inversão e centrifugadas nas condições anteriores. Removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e, em seguida, adicionaram-se 450µL de clorofórmio e, novamente, as amostras foram misturadas por inversão e centrifugadas durante 10 minutos a 14000 X g. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, onde foi acrescentado 450µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) e, a seguir, as amostras foram misturadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi removido para um tubo limpo onde foi adicionado 0,1 do volume de NaCl e 0,6 do volume de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e deixados em repouso durante 10 minutos no freezer a -20°C. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 14000 X g, descartando-se o sobrenadante. O precipitado do DNA foi lavado com etanol 70% gelado, seco a 37°C por 30 minutos e ressuspendido com TE pelas bordas dos tubos.

2.2.6 Quantificação do DNA extraído

A concentração do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com o DNA do fago *lambda* (Invitrogen) com concentração conhecida. Posteriormente, o gel foi corado em brometo de etídio e fotodocumentado sobre luz UV.

2.2.7 Análise da variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*

2.2.7.1 Variabilidade genética por marcadores de RAPD

A análise da variabilidade genética foi realizada por meio do marcador molecular RAPD, utilizando-se *primers* aleatórios para a geração de polimorfismo. As reações de RAPD foram conduzidas em um termociclador (*Perkin-Elmer Gene Amp®PCR System 9700*) programado para efetuar uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo apresentou uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 92°C, seguida de uma etapa de anelamento de 35°C por 1 minuto e posterior etapa de alongamento de 72°C durante 2 minutos, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

As amostras foram amplificadas em reações com volume final de 25µL, apresentando 0,28mM de cada nucleotídeo; 0,45µM de *primer*; 3U da enzima Taq DNA polimerase (*Fermentas*); 3,2mM de MgCl₂, e 10ng de DNA genômico.

Os produtos gerados na reação de RAPD foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% e em tampão TAE 1X. Posteriormente, o gel foi corado em brometo de etídio, e fotodocumentado sobre luz UV.

2.2.8 Análise dos dados

A diversidade genética com base nos marcadores de RAPD foi calculada por meio do programa NTSYS-PC (*Applied Biostatistics, Inc.*). As bandas analisadas por meio da técnica de RAPD foram transformadas em variáveis binárias utilizando o número 1 para presença de banda e 0 para ausência de banda, e posteriormente, estes dados foram introduzidos no programa NTSYS-

PC. Nesse programa, foi calculada uma matriz de similaridade, a qual foi utilizada para construção do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) de agrupamento hierárquico. Os valores de *Bootstrap* foram calculados utilizando-se o programa *WinBoot*. O dendrograma agrupou os diferentes isolados mostrando o nível de similaridade genética entre eles.

2.2.9 Amplificação e seqüenciamento da região ITS do rDNA

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50µL, contendo: tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM, mistura de nucleotídeos 0,2mM; cada *primer* ITS1 e ITS4 1µM; MgCl₂ 3,7mM; enzima Taq DNA polimerase 2unidades e DNA genômico 15ng. Em todas as reações, foi utilizado um controle negativo que apresentava todos os reagentes da reação, exceto o DNA. A amplificação foi realizada em um termociclador (*Perkin-Elmer Gene Amp® PCR System 9700*) programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, 5µL da reação de PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio, para visualização de um fragmento de aproximadamente 600pb.

As seqüências de DNA amplificadas foram purificadas com o Kit MOBIO (*Laboratories, Inc*) e seqüenciadas no laboratório do Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ). Seqüências de *Erythricium salmonicolor* obtidas foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]).

2.2.10 Amplificação e seqüenciamento do 16S rDNA

A amplificação do 16S rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR com os *primers* universais P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1378R (5'-

CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'). As reações apresentaram volume final de 50µL contendo 0,5 a 10ng de DNA; 0,2µM de cada *primer*, 2,5mM de dNTPs; 3,75mM de MgCl₂; e 0,5U da enzima Taq DNA polimerase. Em todas as reações foi realizado um controle negativo sem o DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Perkin-Elmer Gene Amp® PCR System 9700*) programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 62,5°C por 1 minuto, e posterior etapa de alongamento de 72°C durante 1 minuto, seguida de extensão final de 72°C durante 7 minutos. Após a amplificação, 5µL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, que foi corado com brometo de etídio, para visualização de um fragmento de aproximadamente 1500pb.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o Kit MOBIO (*Laboratories, Inc*) e seqüenciados no laboratório do Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ). As seqüências das bactérias foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]).

2.2.11 Compatibilidade vegetativa entre isolados de *Erythricium salmonicolor* e anastomose de hifas

Dois discos com os isolados foram inoculados a uma distância de 5cm um do outro sobre a mesma placa com meio de cultura BDA e, posteriormente, as placas foram incubadas a 28°C. Entre 7 e 30 dias após a inoculação dos isolados, os resultados foram analisados quanto à formação da zona de compatibilidade.

Posteriormente, foram inoculados os mesmos isolados em meio agar-água para verificar a fusão de hifas. Com o auxílio de um palito esterilizado, foram introduzidos dois inóculos, em extremidades opostas, a dois centímetros da borda da placa de Petri. Após 7 dias, foram adicionadas duas gotas do corante lactofenol - azul algodão na zona de encontro micelial para facilitar a visualização da fusão entre as hifas dos isolados.

2.2.12 Seleção de bactérias antagônicas ao fungo *Erythricium salmonicolor*

Em cada placa de Petri, contendo o meio de cultura BDA, foram inoculados em extremidades opostas, a 2cm de distância da borda da placa, o fungo *Erythricium salmonicolor* e uma bactéria endofítica. Este experimento foi conduzido com dois isolados de *Erythricium salmonicolor*, CsSC e IB14/02, testados contra 126 bactérias endofíticas, isoladas da cana-de-açúcar, com três repetições. As placas foram mantidas a 28°C e, após o crescimento do fungo controle, foi avaliado o efeito de inibição da bactéria endofítica sobre o crescimento micelial do fungo *Erythricium salmonicolor*. Para identificar a bactéria endofítica com maior potencial antagônico, foi medido o crescimento micelial do controle positivo do fungo e do mesmo na presença de uma bactéria endofítica. Este cálculo foi expresso em porcentagem considerando as três repetições realizadas.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Isolamento do fungo *Erythricium salmonicolor*

Utilizando a metodologia descrita, foram obtidos aproximadamente 900 isolados fúngicos. Entretanto, após identificação morfológica, somente um único isolado foi identificado como *Erythricium salmonicolor*. Tendo em vista que o isolamento foi realizado com tecido vegetal apresentando sintomas da rubelose, esta baixa frequência de isolamento se deve provavelmente ao crescimento muito lento deste fungo, o qual foi suprimido por outras espécies saprófitas de crescimento rápido.

As placas de isolamento foram incubadas em refrigerador, pois o fungo *Erythricium salmonicolor* cresce a baixa temperatura, porém os fungos contaminantes cresceram sobre toda a placa em poucos dias (aproximadamente 6 dias). Desta forma, não foi possível obter muitos isolados de *Erythricium salmonicolor*.

2.3.2 Variabilidade genética de *Erythricium salmonicolor* por RAPD

A análise da variabilidade genética de 19 isolados do fungo *Erythricium salmonicolor* foi realizada por meio do marcador molecular RAPD. Primeiramente, foram testadas várias concentrações de DNA e dos diferentes reagentes (Taq polimerase, *primer*, MgCl₂, tampão) para otimizar a amplificação com os *primers* AX17, C08, W04, AX10, G13, A02, P12 (*Operon Technologies*). De acordo com Williams et al. (1993), é muito importante otimizar a concentração de DNA na reação de RAPD, pois DNA em excesso gera um borrão (*background*) no gel fotodocumentado, dificultando a visualização das bandas. Já a concentração baixa de DNA leva a perda de bandas importantes.

A análise de todos os *primers* de RAPD revelou um total de 101 bandas (Figura 2), sendo que 79 (78%) foram polimórficas. De acordo com o dendrograma foi possível verificar a formação de 6 grupos distintos (A, B, C, D, E, F) (Figura 3). Os grupos A, B e D constituíram-se por isolados de citros, o grupo C por isolados de figueira e citros, o grupo E por um isolado de

macieira e o grupo F por isolados de araçazeiro e citros. Estes resultados indicam que não houve correlação dos grupos com os hospedeiros. No estudo de Huang; Cerenius; Soderhall (1994) também não foi constatada correlação entre três grandes grupos do fungo *Aphanomyces astaci* com as plantas hospedeiras. Entretanto, Tigano; Aljanabi (2000) observaram linhagens do fungo *Nomuraea rileyi* que eram adaptados a um determinado hospedeiro, encontrando, portanto, correlação entre os grupos formados com os respectivos hospedeiros. Esse resultado também foi encontrado no estudo de Vaillancourt; Hanau (1992) sobre a comparação genética de isolados de *Colletotrichum* de milho e sorgo por meio de RAPD.

Alguns pesquisadores (DÉLYE; CORIO-COSTET; DAIGRET, 1995; GOMES et al., 2001) relatam que linhagens originárias de uma mesma região provavelmente apresentam alta similaridade genética. Tal resultado não foi observado no presente estudo, onde encontrou-se variabilidade genética entre e dentro de municípios. Isolados com origem de Bebedouro foram encontrados nos grupos A, B, C e D e aqueles do município de Guaraci foram identificados nos grupos A e B, mostrando a não correlação dos grupos com os municípios. Foi constatada também variabilidade dentro de um mesmo pomar, pois as linhagens Cs16, Cs14, Cs15 e Cs6 foram isoladas a partir de galhos infectados da mesma fazenda São João (Bebedouro), porém esses isolados não foram observados no mesmo grupo. Os isolados Cs16, Cs14, e Cs6 foram identificados no grupo C, enquanto que o isolado Cs15 foi observado no grupo B. Esses resultados sugerem a importância dos processos de recombinações sexuais deste fungo, devido à variabilidade genética encontrada dentro do mesmo pomar. No trabalho de Tigano; Aljanabi (2000), também não foi encontrada a correlação de grupos com a origem geográfica dos isolados analisados por RAPD, pois linhagens isoladas de Oliveiros (Argentina) foram agrupadas com isolados obtidos de Sete Lagoas, Goiânia e Brasília (Brasil).

Os isolados CsPA e RWB190, que foram identificados no grupo F, apresentaram um perfil de bandas muito diferente dos outros isolados (Figura 2). Embora esses isolados apresentem um padrão de banda muito similar entre eles, o isolado CsPA é originário do Capitão Poço (Pará) e a linhagem RWB190 de Viçosa (Minas Gerais). Assim, não pertencem a uma mesma região e são ainda originários de plantas hospedeiras diferentes - a linhagem CsPA foi isolada de citros e a RWB190 de araçazeiro (Figura 3).

(a)

M Cs4 Cs8 IB14/02 Cs12A Cs12B Cs7 Cs15 CsSC Cs6 Cs14 IB16/02 CsL CsBH Cs13 Cs16 CsBR Cs3 RWB190 CsPA M

(b)

M Cs6 Cs14 Cs13 IB16/02 Cs3 CsL Cs7 Cs16 Cs12A Cs12B IB14/02 Cs4 Cs8 Cs15 CsBR CsBH CsSC RWB190 CsPA M

Figura 2 - Perfil de RAPD de 19 isolados do fungo *Erythricium salmonicolor*, utilizando os *primers*: a) AX10 b) C08. M representa o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen)

Figura 3 - Dendrograma construído pelo método de UPGMA. Os termos à direita representam o nome, a procedência, o haplótipo e o hospedeiro das linhagens analisadas por meio de RAPD

O dendrograma mostra também que isolados de *Erythricium salmonicolor* geneticamente semelhantes colonizam plantas cítricas cultivadas em diferentes municípios. Isto pode ser observado com o agrupamento dos isolados IB1402 e Cs12B, que apresentam o mesmo padrão de bandas, porém são originários de Conchal e Bebedouro, respectivamente. Esse resultado sugere a possibilidade de ocorrer uma disseminação clonal do fungo *Erythricium salmonicolor*. No estudo de Colauto et al. (2002), os pesquisadores caracterizaram geneticamente 5 isolados do basidiomiceto *Agaricus blazei* por RAPD, verificando que, embora os mesmos apresentassem

origens diferentes, não possuíam divergência genética entre si. Esse resultado pode revelar a origem em comum dos isolados.

O dendrograma revela a diferença entre os isolados, principalmente, devido à presença de dois grandes grupos diferentes que apresentam coeficiente de similaridade próximo de 35%. Essa variabilidade encontrada sugere a importância de futuros estudos sobre a recombinação genética deste fungo fitopatogênico.

A rubelose está crescendo em importância econômica e não há relatos prévios na literatura sobre o estudo da variabilidade genética do fungo *Erythricium salmonicolor*. Dessa forma, a realização do presente estudo representa um passo inicial na obtenção de mais informações sobre o agente causal da rubelose. Entretanto, um estudo mais completo deverá pesquisar um número maior de linhagens.

2.3.3 Teste de compatibilidade vegetativa

O teste de compatibilidade vegetativa foi realizado com linhagens de *Erythricium salmonicolor* pertencentes a mesmos e diferentes haplótipos como descrito no item 2.2.11. Foram feitos 25 cruzamentos independentes, entre as linhagens Cs4, IB14/02, Cs15, Cs14, CsL, CsBH, CsSC, CsPA, IB16/02, Cs7, Cs12B com três repetições cada (Tabela 2).

Em todos esses cruzamentos, foi visualizado o encontro das hifas entre 7 a 30 dias, após inoculação das linhagens (Figura 4). Assis (2003) observou o encontro micelial de isolados do fungo *Erythricium salmonicolor*. Entretanto, a pesquisadora encontrou também a formação de um halo nítido de incompatibilidade entre os isolados Cs7 e Cs16, os quais são diferentes geneticamente - conforme o dendrograma, o isolado Cs7 encontra-se no grupo B e a linhagem Cs16 no grupo C (Figura 3).

A região de encontro das hifas foi observada ao microscópio óptico (Figura 5). Dos 25 cruzamentos analisados 21 apresentaram anastomose entre as hifas dos isolados estudados, ou seja, em 84% dos cruzamentos foi observada a fusão entre hifas. A fusão ocorria entre hifas principais e secundárias e foi observada tanto entre hifas paralelas, formando a estrutura tipo H, como também entre uma extremidade hifal e a parede lateral de outra hifa. Foi visualizada também fusão entre extremidades de hifas diferentes (Figura 5). Já no estudo de Assis (2003), não

foi verificada, em nenhum dos cruzamentos, a fusão entre hifas do fungo *Erythricium salmonicolor*.

Os cruzamentos compatíveis e incompatíveis ocorreram tanto entre linhagens pertencentes a diferentes haplótipos, quanto entre isolados que apresentavam o mesmo perfil de bandas no RAPD. Desta maneira, não ocorreu a correlação entre grupos de compatibilidade e haplótipos. Esses resultados sugerem que não há *mating-type* nesse fungo fitopatogênico ou, ainda, que o marcador RAPD não foi suficiente para detectar a divergência genética entre as linhagens estudadas.

Os cruzamentos que não apresentaram anastomoses entre hifas foram IB14/02-CsPA, Cs15-CsL, Cs15-CsPA, IB16/02-Cs14. Os isolados que estavam mais envolvidos em cruzamentos incompatíveis são CsPA, de Capitão Poço, e Cs15, de Bebedouro. Não foi verificado, ainda, o cruzamento entre essas duas linhagens.

Muitos pesquisadores afirmam que um fungo filamentosos é limitado para formar um heterocário com outro fungo de constituição genética similar (WORRAL et al., 1997, DEBETS, 1998; JACOBSON; BEURKENS; KEOMPARENS, 1998). No presente estudo, os isolados cruzados IB16/02-Cs14 apresentaram constituição genética semelhante, de acordo com o dendrograma analisado. Esses isolados cruzados apresentaram encontros das hifas, porém sem fusão entre elas - conseqüentemente, não houve a formação de heterocário. Entretanto, neste mesmo estudo foi observada a fusão entre as hifas dos isolados IB14/02-Cs12B, que apresentaram o mesmo padrão de bandas no RAPD.

Outra importante característica observada em cruzamentos entre fungos filamentosos incompatíveis é a fusão (anastomose) imperfeita, que é caracterizado por granulação citoplasmática nas hifas fusionadas (AIMI; YOTSUTANI; MORINAGA, 2002; GÓMEZ; CHET; HERRERA-ESTRELA, 1997). No fungo basidiomiceto filamentosos, *Rhizoctonia solani*, ocorre a granulação citoplasmática, em fusões entre hifas incompatíveis, resultando em morte celular. Porém, no presente estudo, não foram constatados estes grânulos localizados no citoplasma das hifas que apresentaram fusão celular. Essa granulação citoplasmática não ocorre somente em fungos basidiomicetos, sendo encontrada, também, em fungos ascomicetos (AIMI; YOTSUTANI; MORINAGA, 2002).

Os resultados sobre a variabilidade genética e anastomose de hifas encontradas nesse trabalho evidenciam a importância de futuros estudos sobre a fase sexual do fungo *Erythricium*

salmonicolor, uma vez que a fusão de hifas precede a formação de heterocário, estrutura na qual ocorrem os processos de recombinações sexuais e parassexuais, responsáveis pela variabilidade genética em fungos filamentosos. São interessantes os trabalhos sobre a variabilidade genética de patógenos, pois está associada ao aparecimento de isolados resistentes a fungicidas, bem como novos genótipos capazes de quebrar a resistência de plantas (AYYADURAI et al., 2005; JIMÉNEZ-GASCO; NAVAS-CORTES; JIMENES-DIAS, 2004; YORINORI; KIIHL, 2001).

Tabela 2 - Isolados selecionados para o teste de compatibilidade vegetativa e fusão de hifas

Linhagens cruzadas	Encontro de hifas	Fusão de hifas
IB14/02 - Cs4	+	+
IB14/02 - Cs15	+	+
IB14/02 - CsL	+	+
IB14/02 - CsBH	+	+
IB14/02 - CsSC	+	+
IB14/02 - CsPA	+	-
IB14/02 - Cs12B	+	+
IB14/02 - IB16/02	+	+
Cs15 - Cs7	+	+
Cs15 - CsL	+	-
Cs15 - CsBH	+	+
Cs15 - CsSC	+	+
Cs15 - CsPA	+	-
CsL - CsBH	+	+
CsL - CsSC	+	+
CsL - CsPA	+	+
CsBH - CsSC	+	+
CsBH - CsPA	+	+
CsSC - CsPA	+	+
IB16/02 - Cs14	+	-
IB16/02 - CsSC	+	+
IB16/02 - CsBH	+	+
IB16/02 - Cs15	+	+
IB16/02 - CsL	+	+
IB16/02 - CsPA	+	+

Figura 4 - Encontro de hifas do fungo *Erythricium salmonicolor*. Cruzamento dos isolados a) Cs4-IB1402, b) IB1402-CsSC e c) CsBH-IB1402

Figura 5 - Fusão de hifas nos seguintes cruzamentos: a) IB16/02-Cs15, b) IB16/02-IB14/02, c) CsSC-CsBH e d) IB16/02-CsBH. As setas indicam o ponto de encontro entre as hifas do fungo *Erythricium salmonicolor*

2.3.4 Controle Biológico

As bactérias utilizadas no teste de controle biológico do fungo *Erythricium salmonicolor* pertencem à coleção de microrganismos endofíticos de cana-de-açúcar do Laboratório de Genética de Microrganismos, ESALQ-USP.

Esse teste foi conduzido com três repetições utilizando 126 bactérias endofíticas, das quais 8 (6,35%) apresentaram potencial antagônico por inibir o crescimento micelial das linhagens CsSC e IB1402 (Figura 6). O critério utilizado para a seleção das bactérias antagônicas foi a formação de zona de inibição, já para a seleção do agente etiológico *Erythricium salmonicolor* foram utilizados isolados de diferentes haplótipos para confirmar a divergência genética entre eles. Os resultados sobre o cálculo do potencial antagônico variaram entre 43,11% e 22,22%. A bactéria endofítica com maior potencial antagônico apresentou o resultado de 22,22%.

Figura 6 - Teste de antagonismo com bactérias endofíticas. a) Controle do fungo IB14/02; b e c) inibição do crescimento micelial do fungo IB14/02; d) controle do fungo CsSC; e), f), g), h), i), j) inibição do crescimento micelial do fungo CsSC

O potencial antagônico de bactérias endofíticas tem sido muito estudado por vários autores. Essas bactérias são fortes candidatas como agentes de biocontrole por produzirem substâncias antagônicas como enzimas, surfactantes e antibióticos e por colonizarem o mesmo nicho ecológico dos microrganismos fitopatógenos (ARAÚJO et al., 2002; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004; KRECHEL et al., 2002; DOWNING; THOMSON, 2000; CAO et al., 2005; HALLMANN et al., 1997).

Neste estudo, foi verificado que oito bactérias endofíticas de cana-de-açúcar apresentaram potencial antagônico no controle biológico de *Erythricium salmonicolor*. As bactérias que inibiram a linhagem IB14/02 não foram as mesmas que inibiram o isolado CsSC. Isso indica a variabilidade genética entre esses isolados que pertencem a haplótipos diferentes (Figura 3).

Os trabalhos nesta linha de pesquisa devem ser realizados para a descoberta de novos agentes de biocontrole. Desta maneira, são interessantes futuros estudos sobre os metabólitos secundários produzidos pelas bactérias que controlaram o fungo *Erythricium salmonicolor*, a genética desses microrganismos produtores, resistência a fatores ambientais estressantes e instabilidade genética dos agentes de biocontrole. Além disso, os testes *in vitro* devem ser confirmados por estudos em campo, para atingir pleno sucesso do controle biológico em condições naturais.

Os estudos sobre controle biológico de fitopatógenos são muito importantes, pois permitem a identificação de novas substâncias antagônicas, que poderão substituir os produtos agroquímicos, os quais apresentam alta toxicidade, custo e agressividade ao meio ambiente. Além disso, essas biomoléculas descobertas também podem ser utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, que necessitam de novos antibióticos devido ao problema de resistência apresentado pelos microrganismos.

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a) Foi verificada variabilidade genética entre e dentro de município, indicando a importância de futuros estudos sobre a recombinação genética deste patógeno;
- b) Os grupos não mostraram correlação com municípios e hospedeiros;
- c) É alta a porcentagem de fusão de hifas (84%) entre as linhagens cruzadas, contribuindo para o aumento da variabilidade do patógeno;
- d) Não ocorreu a correlação entre grupos de compatibilidade e haplótipos, sugerindo a ausência de *mating-type* nesta espécie fitopatológica;
- e) Oito bactérias endofíticas apresentaram *in vitro* potencial antagônico no controle do fungo *Erythricium salmonicolor*. As bactérias que controlaram o fungo CsSC são diferentes das que inibiram o crescimento micelial do isolado IB14/02, indicando a divergência genética entre esses fungos pertencentes a diferentes haplótipos.

REFERÊNCIAS

- AIMI, T.; YOSHIDA, R.; BAO, M.I.D.; KITAMOTO, Y. Identification and linkage mapping of the genes for the putative homeodomain protein (*hox1*) and the putative pheromone receptor protein homologue (*rcb1*) in a bipolar basidiomycete, *Pholiota nameko*. **Current Genetics**, New York, v.48, p.184-194, 2005.
- AIMI, T.; YOTSUTANI, Y., MORINAGA, T. Cytological analysis of anastomoses and vegetative incompatibility reactions in *Helicobasidium monpa*. **Current Microbiology**, New York, v.44, n.2, p.148-152, 2002.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr, W.; ELSAS, J.D.V, VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.4906-4914, 2002.
- ASSIS, R. **Estudos da rubelose em citros e do seu agente causal *Erythricium salmonicolor* (*Corticium salmonicolor*) (Berk. & Br.) Burdsall**. 2003. 67p. Tese de Doutorado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE CÍTRICOS. **Produção de Laranja**. Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <<http://abecitrus.com.br>>. Acesso em: 31 jan. 2006.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia : UFG, 1998. 490p.
- AYYADURAI, N.; KIRUBAKARAN, S.I.; SRISHA, S.; SAKTHIVEL, N. Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the Sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, New York, v.50, p.319-323, 2005.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. What is biological control? In: BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco: W. H. FREEMAN AND COMPANY, p.26-45, 1974.
- BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of New *Pseudomonas aeruginosa* Strain NJ-15 as a Potential Biocontrol Agent. **Current Microbiology**, New York, v.46, p.324-328, 2003.

BRISTON-JONES, H.R. Steam disease. **The disease and curing of cacao**. London: R & R Clarck, 1934. p.52-55.

BROW, A.J.; CASSELTON, L.A. Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.17, p.393-400, 2001.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *streptomyces* antagonists of *fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.247, p.147-152, 2005.

CASSELTON, L.A.; OLESNICKY, N.S. Molecular Genetics of Mating Recognition in Basidiomycete Fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, p.55-70, 1998.

CHO, S.J.; LEE, S.K.; CHA, B.J.; KIM, Y.H.; SHIN, K.S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.223, p.47-51, 2003.

COLAUTO, N.B.; DIAS, E.S.; GIMENES, M.A.; EIRA, A.F. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v.33 p.131-133, 2002.

COOK, R.J.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; FUGIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; KIM, D.S. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p.4197-4201, 1995.

DEBETS, A.J.M. Parasexuality in fungi: mechanisms and significance in wild populations. In: COUTEAUDIER, P.B.Y.; CLARKSON, J. **Molecular variability of fungal pathogens**. New York: CAB International, 1998. chap.3, p.41-53.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M.F.; LAIGRET, F. A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. **Experimental mycology**, New York, v.19, p.234-237, 1995.

DI PRIMO, P.; CARTIA, G.; KATAN, T. Vegetative compatibility and heterokaryon stability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* from Italy. **Plant Pathology**, Oxford, v.50, p.371-382, 2001.

DOWNING, K.J.; THOMSON, J.A. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.46, p.363-369, 2000.

DRAGONE, D.S.; AZEVEDO FILHO, A.; NEVES, E.M.; FERNANDES Jr, W.; MURARO, R.P.; SPREEN, T.H. Investment and production management arrangements within the Florida citrus Industry. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.19-36, 2002.

ELLIS, R.J.; TIMMS-WILSON, T.M.; BAILEY, M.J. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonas with antifungal activity. **Environmental Microbiology**, Oxford v.2, p.274-284, 2000.

FAGBOLA, O.; ABANG, M.M. Colletotrichum circinans and Colletotrichum coccodes can be distinguished by DGGE analysis of PCR-amplified 18S rDNA fragments. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, p.195-198, 2004.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, cap.25, 1997. p.288-289

FEIO, S.S.; BARBOSA, A.; CABRITA, M.; NUNES, L.; ESTEVES, A.; ROSEIRO, J.C.; CURTO, M.J.M. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Houndmills, v.31, p.199-203, 2004.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v.14, p.12-16, 2000.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 205-227.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v.28, p.303-310, 2002.

GEZAHGNE, A.; ROUX, J.; WINGFIELD, M.J. Diseases of exotic *Eucalyptus* and *Pinus* species in Ethiopian plantations. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v.99, p.29-33, 2003.

GLASS, N.L.; JACOBSON, D.J.; PATRICK, K.T.S. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.34, p.165-186, 2000.

GOMES, R.C.; SÊMEDO, L.T.A.S.; SOARES, R.M.A.; LINHARES, L.F.; ULHOA, C.J.; ALVIANO, C.S. COELHO, R.R.R. Purification of thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.653-661, 2001.

GÓMEZ, I.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.256, p.127-135, 1997.

GRINYER, J.; HUNT, S.; HERBERT, M.M.B.R.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, New York, v.47, p.381-388, 2005.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A.B.C.; GILBERTSON, R.L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, p.37-42, 1999.

HALLMANN, J.M.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma spp.*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.1890-1898, 2000.

HILTON, R.N. Pink disease of *Hevea* caused by *Corticium salmonicolor* Berk. & Br. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v.15, p.275-295, 1958.

HOLLIDAY, P. **Fungus disease of tropical crops**. Canada: Courier Dover Publications, 1995. 624p.

HUANG, T.S.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v.126, p.1-10, 1994.

HUFFAKER, C.B.; DAHLSTEN, D.L. Scope and Significance of Biological Control. In: BELLOWS, T.S.; FISHER, T.W. **Handbook of Biological Control**. San Diego: Academic Press, 1999. p.1-16.

IRAM, S.; AHMAD, I. Analysis of variation in *Alternaria alternata* by pathogenicity and RAPD study. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v.54, p.13-19, 2005.

JACOBSON, D.J.; BEURKENS, K.; KLOMPARENS, K.L. Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at *het* loci in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.23, p.45-56, 1998.

JAMES, T.Y.; LIOU, S.R.; VILGALYS, R. The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.41, p.813-825, 2004.

JAMIL, F.F.; SARWAR, N.; SARWAR, M.; KHAN, J.A.; GEISTLINGER, J.; KAHAL, G. Genetic and pathogenic diversity with in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.) **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.57, p.243-254, 2000.

JIMÉNES-GASCO, M.M.; NAVAS-CORTES, J.A.; JIMENES-DIAS, R.M. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. **International Microbiology**, Barcelona, v.7, p.95-104, 2004.

JOHANNESSON, H.; STENLID, J. Nuclear reassortment between vegetative mycelia in natural populations of the basidiomycete *Heterobasidion annosum*. **Fungal Genetics**, Orlando, v.41, p.563-570, 2004.

KEANE, P.J. Canker Disease of Eucalypts. In: KEANE, P.J.; KILE, G.A.; PODGER, F.D.; BROWN, B.N. **Disease and Pathogens of Eucalypts**. Austrália: CSIRO Publishing, 2001. 576p.

KIM, P.I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y.T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.942-949, 2004.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.48, p.772-786, 2002.

KUMAR, R.S.; AYYADURAI, N.; PANDIARAJA, P.; REDDY, A.V.; VENKATESWARLU, Y.; PRAKASH, O.; SAKTHIVEL, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.98, p.145-154, 2005.

LACAVA, P.T.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI Jr., W.; AZEVEDO, J.L. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, p.302-306, 2001.

LARANJEIRA, F. F. Rubelose: Aspectos Gerais e Necessidades de Pesquisa. **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, p.233-250, 1994.

LASS, R.A. Diseases. In: WOOD, G.A.R.; LASS, R.A. **Cocoa**. Singapore: Longman Singapore Publishers, 1985. p.336-338.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.127-150, 1993.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; OLIVEIRA, A.V.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.56-60, 2002.

MCCABE, P.M., GALLAGHER, M.P.; DEACON, J.W. Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, p.487-490, 1999.

MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, p.448-453, 1997.

MELO, I.S. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.17-67, 1998.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science**, New York, v.88, p.828-982, 1991.

MOREIRA, C. S. **Planejamento de um pomar cítrico**. Piracicaba : A e C Ceres-Esalq, 1991. p.21-4.

MOUSSAIF, M.; JACQUES, P.; SCHAARWÄCHTER, P.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Cyclosporin C Is the Main Antifungal Compound Produced by *Acremonium luzulae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.1739-1743, 1997.

NAUTA, M.J.; HOEKSTRA, R.F. Vegetative incompatibility in Ascomycetes: highly polymorphic but selectively neutral? **Journal of Theoretical Biology**, London, v.183, p.67-73, 1996.

NEVES, E.M.; BOTEON, M. Impactos alocativos e distributivos na citricultura. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, n.132, p.3-6, 1998.

NEVES, E.M.; RODRIGUES, L.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S. Efeitos alocativos na citricultura: um comparativo entre anos de crise e euforia. **Laranja**, Cordeirópolis, v.24, n.1, p.1-15, 2003.

NOMI, C.; SATO, H.; KOBAYASHI, T. Occurrence and life-history of pink disease caused by *Erythricium salmonicolor* in northern Kanto, Hoonshu, Japan. **Journal of Agricultural Science Tokyo Nogyo Daigaku**, Tokyo, v.44, p.252-262, 2000.

OLD, K.M.; DAVISON, E.M. Canker diseases of eucalypts. In: OLD, K.M.; DAVISON, E.M.; KEANE, P.J.; KILE, G.A.; PODGER, F.D.; BROWN, B.N. **Disease and pathogens of eucalypts**. Austrália: CSIRO Publishing, 2000. p.241-257.

PLOETZ, R.C. Diseases of atemoya, cherimoya, sour sop, sugar apple and relates fruit crops. In: PLOETZ, R.C. **Disease of tropical fruit crops**. Florida: CABI Publishing, 2003. p.21-34.

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

RICARDO, A.; RODRIGUEZ, M. Patogenicidad de *Corticium salmonicolor* em cítricos y em el cafeto. **Agronomia Costarricense**, San José de Costa Rica, v.7, p.35-41, 1983.

RIOS, A.S.; PITMAN, W.D. **In tropical Forage Plants**. Boca Raton: Hardback, 2000. 391 p.

ROY, P.S.; GOLDSCHIMIDT, E.E. **Biology of citrus**. New York : Cambridge University Press, p.230, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.50, p.239-249, 2004.

SINCLAIR, W.B. **The orange**: its biochemistry and physiology. California: Division of Agricultural Sciences, 1961. 475p.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S. MORSHIDI, M.B.; MANSHARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for avaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p.697-701, 1993.

STRONGMAN, D.B.; MACKAY, R.M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia**, New York, v.85, p.65-70, 1993.

TAKO, M.; CSERNETICS, A. Genotypic analysis of variability in Zygomycetes. A mini-review. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v.56, p.345-357, 2005.

TAYLOR, E.; BATES, J.; KENYON, D.; MACCAFERRI, M.; THOMAS, J. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.83, p.75-81, 2001.

TIGANO, M.S.; ALJANABI, S. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.75, p.240-242, 2000.

VAILLANCOURT, L.J.; HANAU, R. M. Genetic and Morphological comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* isolates from maize and from sorghum. **Experimental Mycology**, New York, v.16, p.219-229, 1992.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v.218, p.706-740, 1993.

WORRALL, J.J. Somatic incompatibility in basidiomycetes. **Mycologia**, New York, v.89, p.24-36, 1997.

YORINORI, J.T.; KIIHL, R.A.S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos & Melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.715-736.