

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ETIOLOGIA DO CANCRO DA TECA E  
CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE  
*Lasiodiplodia theobromae*.**

**RAFAELA CRISTINA FERREIRA BORGES**

**Brasília-DF**

**2014**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ETIOLOGIA DO CANCRO DA TECA E**  
**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE**  
*Lasiodiplodia theobromae.*

**RAFAELA CRISTINA FERREIRA BORGES**

**ORIENTADORA: SUELI CORRÊA MARQUES MELLO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.**

**Brasília-DF**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Rafaela Cristina Ferreira.

Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae*.

Borges.

Brasília, 2014 p 86.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Tectona grandis*, *Lasiodiplodia theobromae*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT

II. Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae*.

Dissertação de mestrado realizada junto ao programa de pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Dr<sup>a</sup> Sueli Corrêa Marques Mello. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e Embrapa Hortaliças e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior.

**ETIOLOGIA DO CANCRO DA TECA E  
CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE  
*Lasiodiplodia theobromae*.**

**RAFAELA CRISTINA FERREIRA BORGES**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/03/2014 por:

**Banca Examinadora:**

---

**Sueli Corrêa Marques Mello (Orientadora)**

Universidade de Brasília (UnB)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

---

**José Carmine Dianese**

Universidade de Brasília (UnB)

---

**Maria Esther de Noronha Fonseca**

Embrapa Hortaliças (CNPB)

**Ao Mestre Sublime Jesus e a todos os espíritos de Luz,**  
Que me auxiliaram dando a energia necessária.

Aos meus pais, Lucélia e Roberto por tudo que tenho,  
Ao meu padrasto Newton pelo incentivo, a minha querida tia Vaina  
pelo carinho e apoio, a Helena e Bárbara pela grande amizade, ao meu irmão Hélio  
Gustavo, ao Sr.Edson pela amizade e carinho.  
Aos anjos da Família, Thalles Rogério e Thauã Gustavo.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Divino Mestre, ao pai João e Irmã Maria do Carmo e todos os espíritos de luz, por dar-me sabedoria, paciência e persistência.

Ao programa de pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos através do Edital Embrapa/Capes.

A Dra. Sueli Corrêa Marques Mello, que foi como uma mãe, serei eternamente grata pela oportunidade, pela imensa ajuda e, pelas eternas conversas nos momentos difíceis.

Ao Leonardo Boiteux e Maria Esther por disponibilizarem seu laboratório e serem fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho, além dos preciosos ensinamentos transmitidos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UnB, em especial ao Professor Adalberto Café Filho por contribuir significativamente durante o desenvolvimento deste trabalho, com suas valiosas sugestões e sanando minhas dúvidas.

À Embrapa (CENARGEN) por fornecer a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

A empresa Floresteca por todo o apoio concedido para a realização desse trabalho.

A empresa Vale do Araguaia pelas coletas realizadas em suas áreas. Agradeço a contribuição do Dadvan e Flávio e em especial José da Guia pelos ensinamentos de campo.

Ao Clésio e Irene do projeto Sacoman pelas coletas realizadas em sua área.

Ao senhor Antônio do projeto Teca no Cerrado por deixar realizar coleta em suas áreas de plantios de teca.

A Syngenta por fornecer os produtos químicos avaliados no experimento, em especial ao Daniel Dias Rosa.

Ao Sami Jorge Michereff da Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter cedido alguns isolados para o estudo.

A minha família de Brasília, tia Vaina, Helena e Babi pela compreensão e carinho.

A Mônica Macedo por estar sempre presente nesse momento difícil, auxiliando na minha evolução pessoal e intelectual e sem dúvida teve uma grande importância para a realização desse trabalho.

A minha querida amiga Dra. Mônica Neves, que mesmo distante, sempre esteve presente, sempre me incentivando o caminho da pesquisa.

Ao meu grande amigo Dr. Daniel Dias Rosa pelos ensinamentos, sugestões e principalmente pela grande visão de vida.

Ao meu grande amigo Pedro Paulo Ephifânio Diniz pela confiança e ensinamentos.

Ao Jozébio Esteves Gomes por todo o conhecimento transmitido durante a graduação e o incentivo a trabalhar com a Teca.

A minha querida amiga Marcella Teles que demonstrou o carinho de uma irmã, ouvindo minhas reclamações e me auxiliando nos momentos mais difíceis.

A Maria do Desterro a quem sempre serei grata por suas contribuições e amizade.

A Zuleide por todo o carinho e ensinamentos.

As minhas amigas Cuiabanas Rosalva e Izabelle, que durante o meu mestrado sempre ouviam minhas lamentações, dando-me força para seguir em frente.

Aos meus amigos Cléia (Pipoco), Elenice, Rayane, Ícaro, Pedro, Josiane, Josefa, Maria, Érica, William, Eliane, Samara, Geisiane, Nancy e todos os colegas da pós graduação com quem tive o prazer do convívio.

A professora Mariza Sanches curadora da coleção de Micologia pelos ensinamentos de pesquisa e da vida.

A todos os meus colegas e amigos da Embrapa (CENARGEN), Marcella, Laura, Mariana, Débora Brito, Débora Mesquita, Magno, Thainá e Éder.

A todos os funcionários da Embrapa (CENARGEN) do laboratório de Fitopatologia em especial Dr. João e Irene Martins por contribuírem para a execução do meu trabalho.

A todos os meus colegas da Embrapa Hortaliças (CNPH) Niday, Cléia, Amanda; em especial agradeço a Cléia e Niday por todo o auxílio com a parte de RAPD e amizade.

Aos funcionários da Embrapa Hortaliças (CNPH) em especial ao Chico Bucha e Getúlio pelos ensinamentos e paciência em auxiliar-me.

Aos funcionários da Floresteca em especial Fausto, Aline Nascimento, Luis Otávio, Neto, Izabelle. Meu agradecimento em especial a Aline pelo auxílio nas idas ao Mato Grosso e ao Neto por me acompanhar em todas as coletas.

Ao Joilson Silva Lima por ceder alguns isolados.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia: Arenildo Soares, Arlindo Epaminondas, Kamila Araújo, Maria Dias, Marivaldo Farias, Ribamar Frazão e em especial, José César de Castro, por proporcionarem condições favoráveis ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe que mesmo nos momentos em que sua saúde encontrava-se frágil, não cansou de demonstrar a sua admiração, dando-me o apoio necessário para vencer.

As minhas queridas avós pelo amor e carinho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a evolução do meu trabalho.

## Sumário

Índice de Tabelas.....	xii
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO .....	4
JUSTIFICATIVA.....	7
OBJETIVOS.....	7
Geral.....	7
Específicos .....	7
CAPÍTULO 1 .....	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
<i>Tectona grandis</i> L.f.....	9
Uso da espécie .....	11
Mercado da teca.....	11
Doenças na cultura da teca .....	12
Família Botryosphaeriaceae .....	13
O gênero <i>Lasiodiplodia</i> .....	15
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	15
Caracterização Molecular da espécie e <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	17
Diversidade Genética de <i>L. theobromae</i> empregando marcadores moleculares .....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	20
CAPÍTULO 2 .....	27
CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . .....	27
RESUMO .....	28
ABSTRACT .....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Coleta de amostras e isolamento de <i>L. theobromae</i> .....	31
Caracterização cultural dos isolados .....	34
Caracterização Morfológica dos isolados.....	35
Caracterização Molecular dos isolados .....	36
Análise das sequências .....	38
Análise filogenética.....	38
Patogenicidade dos isolados obtidos .....	39

Inoculação unidirecional .....	40
Resultados .....	42
Isolados obtidos .....	42
Caracterização cultural dos isolados .....	42
Caracterização Morfológica dos isolados .....	47
Caracterização Molecular dos isolados .....	50
Caracterização patogênica dos isolados obtidos.....	55
Inoculação unidirecional .....	57
Discussão.....	60
Conclusões .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
CAPÍTULO 3 .....	68
DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	68
RESUMO .....	69
ABSTRACT .....	70
Introdução.....	71
Material e Métodos.....	72
Coleta de material e isolamento de <i>L. theobromae</i> .....	72
Extração de DNA .....	74
Reações de RAPD .....	75
Análises de bioinformática .....	76
Resultados .....	77
Discussão.....	81
Conclusões .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
Conclusões Gerais .....	86

## Índice de Figuras

Figura 1 - Área de ocorrência natural da teca ( <i>Tectona grandis</i> L.f.). (Fonte: Gradual et al., 1999). 9	9
Figura 2 - Estrutura do cluster gênico que codifica DNA ribossômico (Fonte: Fungaro, 2000). .... 18	18
Figura 3 - (A) Disco de madeira de teca com sintomas de <i>L. theobromae</i> ; (B) fragmento de teca em Ágar-Água; (C) Estroma ..... 31	31
Figura 4 - Incisão no caule da planta, contendo disco de BDA com micélio do fungo, recoberto com algodão umedecido com água destilada e vedado com filme de PVC. .... 39	39
Figura 5- Velocidade de crescimento micelial de isolados de <i>L. theobromae</i> em meio MEA, V8, BDA, AVEIA e CA..... 43	43
Figura 6- Velocidade do crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> e interação (meio x isolado x temperatura) ..... 45	45
Figura 7- Povoamentos de <i>Tectona grandis</i> (A), tronco com sintomas, desprendimento da casca e rachaduras (B), disco com cancro e escurecimento dos vasos (C). Coloração da colônia e picnídios (D), células conidiogênicas (E,F, G, K e L). Conídios imaturos com parede dupla e sem septos (H). Conídios em transição e maduros ( I). Lóculos mostrando a disposição das células conidiogênicas e conídios imaturos ( K e L). Lóculos mostrando a textura (M). ..... 49	49
Figura 8- Dendograma filogenético máxima parcimônia da região ITS – 5.8S rDNA de 12 isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do GeneBank. .... 50	50
Figura 9- Dendograma filogenético máxima verossimilhança da região ITS – 5.8S rDNA de 12 isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do GeneBank. .... 51	51
Figura 10- Dendograma máxima parcimônia da região EF1- $\alpha$ de 12 isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do GeneBank..... 52	52

Figura 11- Dendograma filogenético máxima verossimilhança da região EF1- $\alpha$ de 12 isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do GeneBank. ....	53
Figura 12- Dendograma filogenético máxima verossimilhança das regiões ITS – 5.8S rDNA e EF1- $\alpha$ de 12 isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> provenientes do GeneBank. ....	54
Figura 13- Povoamentos de <i>Tectona grandis</i> (A), fuste com sintomas, desprendimento da casca e rachaduras (B e C). Coloração da colônia e picnídios (D), células conidiogênicas (E,F). Conídios em transição e maduros (G). Testemunha sem sintomas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . ....	55
Figura 14- Severidade da doença cancro em plantas de teca inoculadas com onze isolados de <i>L. theobromae</i> oriundos de hospedeiras distintas inoculados no clone A de Teca. ....	58
Figura 15- Sintomas causados por <i>L. theobromae</i> em teca. Testemunha (A), Desprendimento do caule (B), Gomose (C), escurecimento dos vasos e cancro (D), escurecimento dos vasos e cancro (E), escurecimento dos vasos e cancro (F), escurecimento dos vasos e cancro (G), escurecimento dos vasos e cancro (H). ....	59
Figura 16- Mapa de distribuição dos estados em que foram coletados os isolados de <i>L. theobromae</i> .....	73
Figura 17- Perfil de amplicons RAPD de isolados de <i>L. theobromae</i> , obtido por meio dos seguintes primers (Operon Technologies, EUA): (A) OPA1; (B) OPA2 (C) OPA4; (D) OPA5; (E) OPA9 e (E) OPA10. Os nomes na vertical correspondem aos isolados avaliados e a letra “M” indica o marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Invitrogen™). ....	77
Figura 18- Dendrograma de 21 isolados de <i>L. theobromae</i> , com base nos dados de RAPD, utilizando o método de UPGMA. Dendrograma baseado nos valores de similaridade obtidos. ....	78

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Relação de isolados de <i>L. theobromae</i> de diversos hospedeiros usados neste estudo.....	33
Tabela 2- Medidas de comprimento e largura de conídios de isolados de <i>L. theobromae</i> .....	47
Tabela 3- Valores médios de notas de severidade de doença induzida por dois isolados de <i>L. theobromae</i> em três clones de teca, de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % .....	56
Tabela 4- Desdobramento da interação significativa da análise de variância referente a três clones de teca (A, B e C) testados e dois isolados (RB01 e RB05) de <i>L. theobromae</i> , de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % .....	57
Tabela 5- Sequência dos primers testados nas reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de <i>L. theobromae</i> .....	76

## RESUMO

A teca (*Tectona grandis*) é uma espécie florestal nativa do subcontinente Índico e do Sudeste Asiático que foi introduzida no Centro-Oeste Brasileiro a partir da década de 1970. Essa espécie possui alto valor comercial por apresentar madeira de alta durabilidade e resistência. A madeira pode ser usada para a confecção de móveis finos, esquadrias, pisos, construção naval e painéis. As duas principais doenças que afetam a cultura da teca são de etiologia fúngica: a ferrugem causada por (*Olivea tectonae*) e o cancro da teca. Nos últimos anos, o cancro da teca vem ganhando importância pelo grande número de árvores afetadas. Assim, considerando a importância desta doença, é necessária a busca de alternativas de controle, a partir de conhecimentos básicos sobre a enfermidade como: etiologia, variabilidade genética da população do patógeno e caracterização morfo-cultural, molecular e patogênica de isolados do fungo *L. theobromae*, identificado como o agente causal. Assim, discos de madeira com sintomas de escurecimento em povoamento de Teca foram coletados no estado do Mato Grosso, dos quais foram obtidos isolados de *L. theobromae*. As colônias fúngicas foram caracterizadas morfológicamente e a identificação de *L. theobromae* foi confirmada. Os isolados estudados foram caracterizados morfológicamente em culturais, avaliados quanto ao crescimento micelial em BDA, MEA, V8, Aveia-ágar e Cenoura-ágar, nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Para a caracterização molecular, realizou-se a extração do DNA de todos os isolados estudados através do método CTAB modificado. O DNA total foi submetido à reação de PCR para amplificação das regiões intergênicas do DNA ribossomal (regiões ITS1 e ITS2) e fator de alongação, a partir dos *primers* ITS1, ITS4 e TEF1-F, EF1-728F. A fim de comprovar a patogenicidade, mudas de teca foram inoculadas com dois isolados de *L. theobromae* (RB01) e (RB05) em três clones designados A, B e C. As inoculações foram unidirecionais quando se usou

isolados de outras hospedeiras no clone A de teca. Os isolados de *L. theobromae* cresceram melhor em BDA, MEA e V8 a partir de 25°C com temperatura ótima da 35°C. As análises de sequencia das regiões do fator de alongação da tradução e do DNA ribossomal confirmaram a classificação dos isolados de teca como *Lasiodiplodia theobromae*. De acordo com o teste de patogenicidade, verificou-se que os clones A, B e C mostraram-se susceptíveis aos dois isolados de *L. theobromae* estudados. O clone A, proveniente de plantas seminais foi o que apresentou maior susceptibilidade ao isolado de *L. theobromae*, seguido do clone B, enquanto o clone C apresentou maior resistência. Quando realizada a inoculação unidirecional no clone A, verificou-se que esse clone foi susceptível a todos os isolados estudados, independentemente de origem, diferindo apenas em nível de severidade. Os isolados originários de hospedeiras distintas de teca proporcionaram maiores níveis de doença. A diversidade genética dos isolados foi estudada usando-se marcadores moleculares RAPD (“*Random amplified polymorphic DNA*”), resultando em quatro grupos e quatorze subgrupos com alta variabilidade dentro dos subgrupos. A similaridade dos isolados variou de 50% a 100%, sendo que estes com 100% de similaridade são isolados obtidos de teca.

Palavras-Chaves: *Tectona grandis*, agente etiológico do cancro, diversidade, patogenicidade.

## **ABSTRACT**

Teak (*Tectona grandis*) is a forest species native to the Indian subcontinent and Southeast Asia, and it was introduced in Brazil's midwestern region in the 1970s. This species has a high commercial value, because its timber is highly durable and resistant. The wood may be used to make fine furniture, door and window frames, floors, naval constructions and panels. The two main diseases that affect teak plantations are of fungal etiology; they are rust caused by *Olivea tectonae* and teak canker. In recent years, teak canker has been increasingly important in that it affects a large number of trees. Thus, considering the importance of this disease, alternatives for its control need to be sought, using basic knowledge about the disease such as its etiology, the genetic variability of the pathogen population, and the morphocultural, molecular and pathogenic characterization of isolates of the fungus *L. theobromae*, identified as the causal agent. To this end, discs of wood with darkening symptoms were collected in a teak plantation in the state of Mato Grosso and, from these, isolates of *L. theobromae* were obtained. The fungal colonies were morphologically characterized, and the identification of *L. theobromae* was confirmed. The isolates studied were morphologically characterized in culture media and evaluated for mycelial growth in PDA, MEA, V8, oatmeal-agar and carrot-agar, at temperatures of 25, 30 and 35°C. For molecular characterization, extraction of DNA was carried out for all isolates studied, using the modified CTAB method. Total DNA was submitted to PCR for amplification of the intergene regions of ribosomal DNA (regions ITS1 and ITS2) and elongation factor, from the primers ITS1, ITS4 and TEF1-F, EF1-728F. To prove the pathogenicity, teak seedlings were inoculated with two isolates of *L. theobromae* (RB01) and (RB05) in three clones designated A, B and C. The inoculations were unidirectional when isolates were used from other hosts in clone A of teak. The isolates of *L. theobromae* grew better on PDA, MEA and V8 from 25°C upwards, with an optimum temperature of

35°C. The isolates studied were not clearly distinguished when only sequences of ITS and TEF were used. In accordance with the pathogenicity test, it was confirmed that clones A, B and C were susceptible to the two isolates of *L. theobromae* studied. Clone A from the seminal plants was the one that presented the greatest susceptibility to the isolate of *L. theobromae*, followed by clone B, while clone C presented greatest resistance. When unidirectional inoculation of clone A was done, it was confirmed that this clone was susceptible to all the isolates studied, independent of their origin, differing only in level of severity. The original isolates from non-teak hosts provided the highest disease levels. The genetic diversity of the isolates was studied using RAPD molecular markers (Random amplified polymorphic DNA), resulting in four groups and 14 subgroups with high variability within the subgroups. The similarity of the isolates varied from 50% to 100%, and those with 100% similarity were isolates obtained from teak.

Key words: *Tectona grandis*, etiological agent, diversity, pathogenicity.

## INTRODUÇÃO

*Tectona grandis* L.f., família Lamiaceae, popularmente conhecida como teca, é uma espécie arbórea natural do Subcontinente Índico e Sudeste Asiático. Há cerca de 100 anos a teca passou a ser cultivada, devido ao esgotamento das populações naturais, exploradas de forma extrativista. A partir do seu centro de origem, os plantios começaram a se expandir para outros países e continentes que apresentavam condições climáticas semelhantes, chegando a novas zonas tropicais, como a África Ocidental, América Latina e o Caribe (Figueiredo *et al.*, 2005).

No Brasil, a exploração dessa espécie vem sendo particularmente auspiciosa, pela elevada densidade, ciclo de produção mais curto, comparados aos praticados nos países de origem. Os primeiros reflorestamentos foram implantados na década de 1970, pela empresa Cáceres Florestal S.A., no município de Cáceres-MT, onde a espécie demonstrou alta adaptabilidade (Fazendas Florestas, 2014).

A teca apresenta características de durabilidade, estabilidade, resistência natural ao fogo e densidade média de 0,65 g/cm<sup>3</sup> (Goh, & Galiana, 2000). Tais características incentivaram a demanda no mercado internacional, merecendo com isto fortes estímulos aos investimentos em reflorestamentos de teca no Brasil.

Apesar das características favoráveis ao desenvolvimento da teca verificadas na maioria das áreas cultivadas do mundo e da notória resistência da cultura a uma gama de fatores bióticos e abióticos, problemas fitossanitários capazes de comprometer a produção vem se apresentando. Levantamentos preliminares realizados em toda península da Malásia mostraram baixa incidência de doenças de raiz, apesar da presença de doenças como o cancro da teca e doenças foliares, principalmente a ferrugem causada por *Olivea tectonae* (Maziah & Lee (1999)).

É importante ressaltar que, a ferrugem da teca foi relatada no Brasil em 2011 em plantios experimentais e comerciais (Pieri *et al.*, 2011).

Quanto ao cancro, há uma carência de estudos etiológicos. Sabe-se que, *Botryosphaeria* Ces. & De Not. (Botryosphaeraceae) inclui espécies patogênicas que causam cancos e seca de ponteiro (*dieback*) em uma ampla gama de hospedeiros lenhosos. Em regiões de clima temperado, *B. parva*, *B. ribis* e *B. dothidea* são as espécies mais comumente isoladas de cancos, enquanto nos trópicos *B. rhodina*, cuja fase anamórfica é *Lasiodiplodia theobromae*, é a espécie mais freqüente (Burgess *et al.*, 2006; Adetuji & Oloke, 2013).

Inspeções de coletas realizadas em plantações de teca na Região Centro-Oeste do Brasil deram início ao presente estudo, conduzido com intuito de elucidar a etiologia do cancro que afeta a teca, cujo agente está, também presente em outros hospedeiros e áreas geográficas do país. Finalmente, parte da experimentação será dirigida à produção de dados básicos visando o futuro desenvolvimento de medidas eficazes de controle.

## **JUSTIFICATIVA**

Considerando o potencial destrutivo do cancro da teca em plantações comerciais dessa espécie, são necessários estudos voltados ao esclarecimento da sua etiologia, conhecimento da variabilidade do patógeno e dados iniciais visando ao estabelecimento de estratégias de controle da doença.

## **OBJETIVOS**

### ***Geral***

Elucidar a etiologia da doença Cancro da Teca, determinar a variabilidade e relações filogenéticas entre isolados do agente causal, e gerar dados que servirão de base para o estabelecimento de estratégias de controle da enfermidade.

### ***Específicos***

- a. Esclarecer a etiologia da doença cancro da teca.
- b. Caracterizar o patógeno por critérios morfológicos, culturais e patogênicos.
- c. Caracterizar os isolados do patógeno com base nas sequencias das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e do gene do fator de alongamento da tradução alfa 1.
- d. Confirmado o fungo *L. theobromae* como agente causal, realizar estudos filogenéticos, utilizando isolados de teca, abacateiro, ciriguela, cajaneira, mamoeiro, mangueira, algodão, milho, cajueiro e determinar a variabilidade do agente, utilizando marcador RAPD.
- e. Realizar estudos de patogenicidade de isolados de *L. theobromae* em teca.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## ***Tectona grandis* L.f.**

*Tectona grandis* Linn. F., conhecida popularmente no Brasil como teca, pertence à família Lamiaceae de acordo com a nova classificação do sistema APG II (Souza & Lorenzi, 2008). O centro de origem da teca é controverso (Figura 1), porém a maioria dos estudos mostra que a ocorrência natural se dê apenas na Índia, Myanmar, Tailândia, Laos e Indonésia com distribuição descontínua entre 10 e 25° N e entre 0 e 10° S, e altitude de 0 a 1300 m (Gradual, 1999).

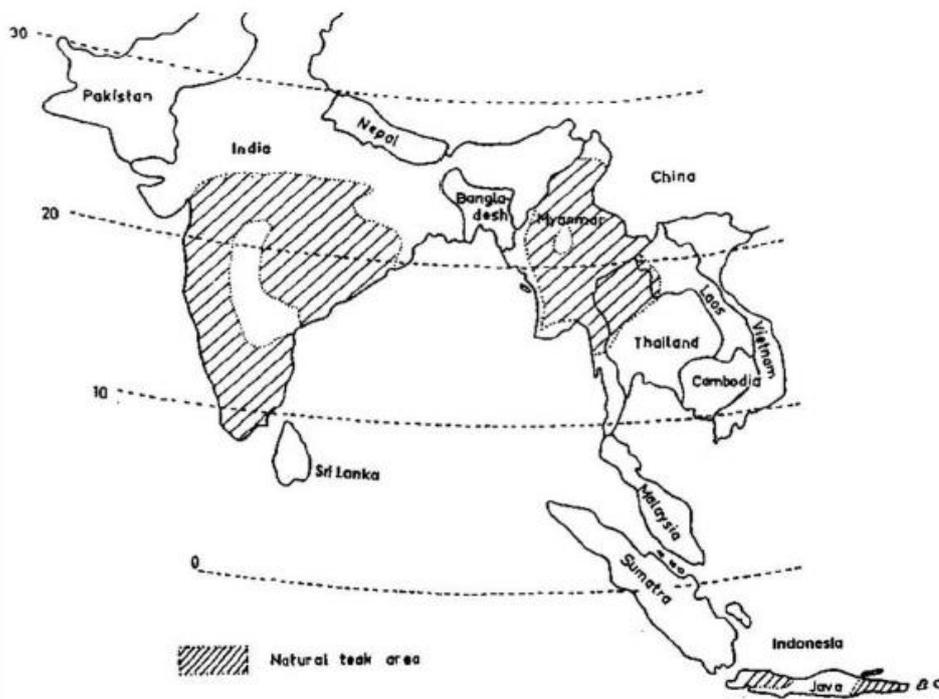


Figura 1 - Área de ocorrência natural da teca (*Tectona grandis* L.f.). (Fonte: Gradual *et al.*, 1999).

Trata-se de uma espécie pioneira, heliófita, caducifólia podendo alcançar até 50 metros de altura. O tronco é geralmente cilíndrico, podendo chegar a 2.5 metros de diâmetro quando em condições favoráveis. A casca atinge 15 mm de espessura, o que permite maior resistência ao fogo. As folhas são de disposição oposta em pares, coriáceas e possuem comprimento de 30 a 60 cm e larguras entre 20 e 35 cm. Os limbos são elípticos, pilosos e verruculosos na face abaxial (Veit, 2000).

Com o esgotamento das populações naturais, os plantios começaram a se expandir para países com características similares às do centro de origem (Figueiredo *et al.*, 2005). No Brasil, os plantios de teca foram iniciados na década de 1970, implantados pela empresa Cáceres Florestal S.A., no município de Cáceres- Mato Grosso, onde as condições edafoclimáticas são adequadas ao desenvolvimento da espécie (Matricardi, 1989). O ciclo de produção da teca nos países originários, por processo seminal, varia de 60 a 100 anos, enquanto na região de Cáceres-MT, devido às condições edafoclimáticas, o ciclo de corte reduz-se para 25 anos (Ipef, 2003). Além das condições climáticas favoráveis, o solo de melhor fertilidade e tratos silviculturais mais adequados e mais intensos contribuem para a redução no ciclo produtivo da planta (Ugalde & Pérez, 2001).

A área plantada com teca no Brasil, que em 1996 não atingia onze mil hectares, alcançou 42.496 hectares em 2006 e totalizou 58.810 ha em 2008. No ano de 2011, essa área, já era de 67.693 ha, sendo o Estado do Mato Grosso responsável por 90% da área cultivada (Abraf, 2011). Atualmente, os povoamentos de teca têm se expandido em direção a Amazônia, onde se concentram nos estados do Acre, Pará, Rondônia (Figueiredo, 2001; Vieira *et al.*, 2001). Recentemente, nos estados de Minas Gerais e Goiás, pequenos e médios produtores começaram, também, a investir em povoamentos de teca.

## **Uso da espécie**

A teca produz madeira de excelente qualidade, resistente ao sol, ao calor, e à água das chuvas e do mar. Por isso é uma espécie muito utilizada na indústria naval, confecção de móveis finos e peças de uso nobre, inclusive obras de arte (Rondon Neto *et al.*, 1998).

A planta acumula antraquinonas e, tectoquinona, as quais possuem propriedades antifúngicas, bactericidas e repelentes ao ataque de alguns insetos, estando, portanto, associadas com a durabilidade natural da madeira quando exposta a rigores do tempo (Rudman, 1958; Thulasidas *et al.*, 2007). Outras substâncias também foram encontradas na teca, como o iapachol e uma naftoquinona-antraquinona, a tectograndona, que é um corante natural.

Sendo assim, além dos usos madeireiros, alguns estudos tem sido realizado para a utilização de produtos não madeireiros, como extratos de folhas com a finalidade de desenvolvimento de inseticida para o controle de cupins (Santos *et al.*, 2009). O uso de extrato de folha para tintura de tecidos é outro aspecto a ser explorado (Sacchetti, 2009).

## **Mercado da teca**

A madeira de teca é muito valorizada no exterior alcançando preços médios, de venda em leilões, acima de US\$ 1.500,00 por metro cúbico. O uso de madeiras de pequenas dimensões permite o aproveitamento daquelas provenientes do desbaste, possibilitando que a receita do reflorestamento seja antecipada (Abraf, 2011).

## Doenças na cultura da teca

Em plantios jovens de teca, o maior problema fitossanitário é a queima dos brotos causada por *Phomopsis* sp. A infecção inicia-se no meristema apical, deixando as folhas com uma coloração marrom escuro que evolui para uma necrose que pode levar à queda prematura de folhas. Períodos prolongados de alta umidade e temperatura facilitam a formação de picnídios (Macias *et al.*, 2002b).

Entretanto, entre as doenças que ocorrem nessa espécie silvícola, destaca-se a ferrugem, causada por *Olivea tectonae* (Pucciniales/Pucciniomycota). O fungo causa desfolha intensa, levando a uma redução da taxa fotossíntese, alterando o incremento médio anual e o incremento médio final dos plantios (Pieri *et al.*, 2011). Os sintomas podem ser identificados desde a fase de viveiro até a fase de campo, com algumas variações de acordo com a idade do hospedeiro. Em plantas na fase de enraizamento são observados pequenos pontos cloróticos nos cotilédones, além de pústulas alaranjadas (Sharma *et al.*, 1985). Em cultivos jovens, com plantas com menos de dois metros de altura, os danos são observados nas folhas expandidas (Arguedas *et al.*, 2004). Já em plantas adultas, as folhas infectadas são predominantemente as mais velhas (Sharma *et al.*, 1985). O patógeno foi relatado pela primeira vez na Ásia e, até recentemente, esta doença era circunscrita a essa região. Seu relato nas Américas pela primeira vez ocorreu em 2003 (Arguedas *et al.*, 2004), estando presente na Costa Rica, nas regiões de Atlántica, Huetar Norte e Huetar Central (Arguedas *et al.*, 2004), no Equador na zona central litorânea (Belezaca, 2004), no México nos Estados de Veracruz e Tabasco (Cibrián *et al.*, 2007). Finalmente em 2011 foi relatada em plantios comerciais e não comerciais do Brasil (Pieri *et al.*, 2011).

A Mancha de *Colletotrichum* é outra doença de ocorrência comum em plantios de teca, mostrando manchas em folhas maduras, de coloração marrom escuro, circundadas por uma margem pálida. Com a união dos pontos individuais, os sintomas progridem para

manchas maiores e irregulares, o que poderá proporcionar desfolha prematura (Sharma *et al.*, 1985).

Na região de Cáceres, Estado do Mato Grosso, (Brasil), foram encontradas plantas de teca com sintomas de murcha causada pelo o fungo *Ceratocystis fimbriata* (Firmino *et al.*, 2012).

Já no fuste são comumente encontrados vários tipos de cancro associados a *Nectria nauriticola*, *Dothiorella* sp. e *Botryosphaeria* sp.

O cancro causado por *Lasiodiplodia* sp. apresenta protuberância que varia de 3 a 20 cm de comprimento e de 2 a 23 cm de largura ao longo do caule e causa desprendimento da casca principalmente próximo dos locais de poda ( Arguedas *et al.*, 1994; Ordenez, 1999; Arguedas *et al.*, 2003; Macias *et al.*, 2002a). A ocorrência dessa enfermidade no Brasil merece estudos mais aprofundados pela prevalência com que vem ocorrendo nos últimos dois anos, em cultivos da Região Centro Oeste, e pelo potencial destrutivo que apresenta.

## **Família Botryosphaeriaceae**

A família Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Dothiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota) contem entre outros o gênero *Botryosphaeria*, inicialmente descrito por Cesati e De Notaris (1863), revisado por Saccardo em (1877), (Phillips *et al.*, 2005) e finalmente por Crous *et al.* (2006), que entre outros aspectos detalhou a filogenia molecular da família.

Assim, as técnicas morfológicas e moleculares devem ser utilizadas como ferramentas complementares para identificação e para definir as relações filogenéticas de

gêneros e espécies dentro das famílias de fungos em geral, inclusive no caso específico dos membros Botryosphaeriaceae (Slippers *et al.*, 2004; Crous *et al.*, 2006).

Representantes do gênero *Botryosphaeria* apresentam ascos bitunicados em ascomas estromáticos, peritecióides, com ascósporos hialinos a marrom claros, unicelulares, fusoides, elipsoides a ovoides, tornando-se, em algumas espécies, marrons com 1 a 2 septos quando maduros (Phillips, 2004). Vários gêneros contem fase conidial de gêneros da família Botryosphaeriaceae, tais como: *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* Fr. in Mont., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda in Sturm, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc) Berl. & Voglino, *Phyllosticta* Pers. e *Sphaeropsis* Sacc. (Jacobs *et al.*, 1998; Slippers *et al.*, 2004). Espécies de *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia* são claramente separadas de *Fusicoccum* pela espessura da parede dos conídios e também pela menor razão de comprimento e largura (Phillips *et al.*, 2005). Os conídios das espécies *Diplodia*, *Dothiorella* e *Lasiodiplodia*, quando maduros, apresentam-se de coloração marrom escura e são septados (Zhou & Stanosz, 2001). Apesar de mostrar tamanhos semelhantes, no geral, os de *Lasiodiplodia* são asseptados e hialinos quando jovens, tornando-se escuros, septados e na maturidade mostram parede estriada longitudinalmente (Burgess *et al.*, 2006). Conídios de *Dothiorella* tornam-se marrons e septados no seu estágio jovem, antes mesmo de serem liberados da célula conidiogênica, enquanto conídios em *Diplodia* são hialinos e tornam-se escuros e septados com o amadurecimento (Phillips *et al.*, 2005).

Entretanto, a identificação de espécies dentro da família, baseada apenas em características morfológicas, torna-se complexas, pois muitas vezes os caracteres morfológicos se sobrepõem (Mohali *et al.*, 2005).

## ***O gênero Lasiodiplodia***

### ***Lasiodiplodia theobromae***

A coloração do micélio varia de branco-acinzentado a preto, aspecto que depende das condições de crescimento do fungo. Os picnídios são simples ou compostos, muitas vezes agregados, estromáticos, ostiolados, podendo chegar até 5 mm de largura. Conidióforos são hialinos, simples, às vezes septados, cilíndricos e raramente ramificados, provenientes das camadas internas de células que revestem a cavidade de picnídios. Células conidiogênicas são hialinas, simples, holoblásticas, anelídicas. Paráfises quando presentes são hialinas, cilíndricas às vezes septadas, com até 50 µm de comprimento (Punithalingam, 1980). Quanto às características dos conídios, estes são inicialmente unicelular, hialino, lisos, subovóides para elipsóide-oblongos, de paredes espessas, tornando-se bicelulares com estrias longitudinais e podendo chegar a 20-30 µm comprimento e 10-15 µm de largura, septos transversais 1 a 2. Em geral, variam de 18 a 26 µm comprimento por 11-15µm de largura (Oliveira Lins *et al.*, 2010). Isolados obtidos de mangueira no Iran, quando cultivados em meio de cultura com acículas de *Pinus* sp., apresentam esporos com dimensões entre 22-24 x 12-14 µm (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

Trabalhos realizados com isolados de *L. theobromae* obtidos de mangueira com sintomas de morte descendente mostraram que os isolados em meio de cultura possuem as seguintes características culturais: micélio inicialmente branco, tornando-se cinza a preto, de aspecto cotonoso, cobrindo toda a superfície da placa em 48 horas. A coloração das colônias, velocidade do crescimento e produção de estruturas reprodutivas são características variáveis com o meio de cultura e com o isolado (Halfeld-Vieira *et al.*, 2007).

*Lasiodiplodia theobromae* apresenta crescimento micelial ótimo entre 24°C e 28°C, sendo que a temperatura de 28°C foi a que proporcionou o máximo crescimento médio (Vaz, 2008).

*Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno cosmopolita, polífago e oportunista, com pouca especialização patogênica, normalmente associada a distúrbios da planta relacionados a fatores abióticos, como deficiência nutricional e ferimentos provocados no decorrer das práticas de manejo (Lima *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 1994). Até a década de 1980 era considerado patógeno de importância secundária, porém nos últimos anos vem causando sérios prejuízos e impossibilitando a produção de numerosas espécies arbóreas cultivadas que possui valor econômico significativo (Pereira *et al.*, 2006).

O fungo causa “morte regressiva” do abacateiro (*Persea americana* Mill.), com seca dos tecidos afetados avançando do ápice dos galhos e fuste, o que resulta na queda de folhas, e, posteriormente morte da planta (Rondon & Guevara, 1984). Duas das principais doenças no cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no Nordeste do Brasil, podridão-preta-das-hastes e resinose são causadas por *L. theobromae* (Cardoso *et al.*, 2007). A resinose é comumente observada em plantas submetidas a estresses (Cardoso *et al.*, 2009b). Após a safra comercial do cajueiro, plantas entre 24 e 36 meses de idade começam a expressar tais sintomas (Cardoso & Freire, 2002). Deficiência nutricional, murcha, queda de folhas, seca dos ramos, formação de cancro nos ramos lenhosos e fuste, exsudação de goma e escurecimentos dos vasos condutores de seiva foram sintomas observados com o progresso da doença (Freire *et al.*, 2002).

Em plantios de Paricá no Município de Dom Eliseu, Estados do Pará, observaram-se plantas de mais de um ano com entumescimento da casca associado a fendilamentos longitudinais e escurecimento dos vasos. Os sintomas, atribuídos a *L. theobromae*, foram observados ao longo do tronco e variavam de acordo com a idade da planta. A

disseminação da doença foi predominante durante o período chuvoso (Tremacoldi *et al.*, 2009).

O fungo está também associado a cancos e *die-back*, em povoamentos de eucalipto em várias áreas do mundo (Sharma *et al.*, 1985; Sankaran *et al.*, 1995, Roux *et al.*, 2001), enquanto que em *Acácia mangium* causa podridão do cerne, mas o ressecamento de ponteiros são os sintomas mais visíveis (Ferreira, 1990). As perdas de produtividade no final do ciclo de produção podem chegar aos 63,8% em volume de madeira (Lee *et al.*, 1988).

Estudos realizados por Newsan *et al.* (1967) e Sujan *et al.* (1980) atribuíram a *L. theobromae* manchas em toras de seringueira recém-abatidas.

Em teca existe apenas um registro em Ghana (Apetorgbor, 2006), indicando perda de folhas e escurecimento vascular devido ataques de *L. theobromae*.

### **Caracterização Molecular da espécie e *Lasiodiplodia theobromae***

Estudos de diversidade e taxonomia de fungos foram, historicamente, realizados apenas descrevendo as características morfo-estruturais diretamente do substrato, ou em cultura, via microscopia de luz e eletrônica. No entanto, nas últimas décadas, verificou-se um aumento significativo no uso de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de fungos por meio de estudos do DNA ribossomal (rDNA). Essa região genômica consiste em uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS) (Figura 2). Estas regiões intergênicas acumulam muitas mutações durante o processo de evolução do organismo, podendo assim, ser útil para a diferenciação entre espécies e até mesmo para filogenia ao nível intraespecífico (Fungaro, 2000). O fato das regiões ITS serem relativamente pequenas (500

a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (Skouboe *et al.*, 1999; Leal-Junior, 2002).

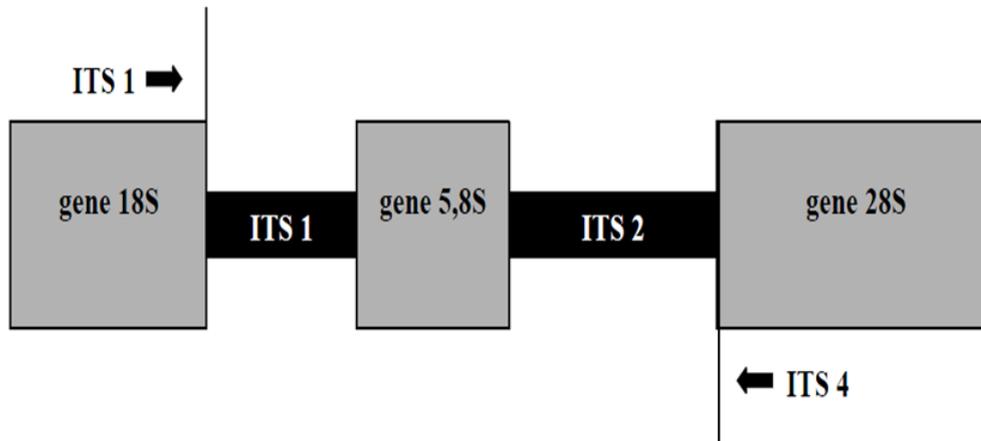


Figura 2 - Estrutura do cluster gênico que codifica DNA ribossômico (Fonte: Fungaro, 2000).

As ferramentas moleculares exercem um papel importante principalmente em estudos filogenéticos de espécies dentro do gênero *Lasiodiplodia*, sendo úteis também para a identificação das mesmas. Três novas espécies desse gênero foram desmembradas de *L. theobromae* após análise molecular, utilizando sequências das regiões ITS e do gene EF-1 $\alpha$ , além de caracteres morfológicos (Burgess *et al.*, 2006). Em estudos realizados com espécies obtidas de plantas do gênero *Prunus* na África do Sul, *L. plurivora* foi descrita como uma nova espécie. Esta espécie está estreitamente relacionada com *L. theobromae*, sendo ambas morfológicamente idênticas e não podendo ser distinguidas unicamente com base nas sequências ITS, embora tenham sido claramente separadas quando utilizadas sequências das regiões EF-1 $\alpha$  (Damm *et al.*, 2007). Portanto, as espécies reconhecidas não têm sido diferenciadas com base apenas em sequências da região ITS, sendo utilizado um fragmento do EF-1 $\alpha$ , que permitem claramente a separação das espécies (Alves *et al.*, 2008). Quatro novas espécies de *Lasiodiplodia* (*L. citricola*, *L. gilanensis*, *L. hormozganensis* e *L. iranensis*) foram descritas a partir de estudos realizados com

hospedeiros lenhosos no Irã. Tais espécies foram identificadas de acordo com as características morfológicas e filogenéticas (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

### **Diversidade Genética de *L. theobromae* empregando marcadores moleculares**

A técnica RAPD é baseada na amplificação de fragmentos de DNA ao acaso (*Random Amplified Polymorphic ADN*), onde a estratégia é utilizar um único oligonucleotídeo de 10-15 bases (Williams *et al.*, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1996). Os produtos da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são separados em gel de agarose, onde cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento no outro genótipo, que pode ser devido a diversos fatores como deleção, duplicação ou mutação no sítio de anelamento do *primer* ou internamente (Williams *et al.*, 1990). Esta é uma técnica rápida e eficiente para indicar a variabilidade intraespecífica, permitindo trabalhar com grandes números de isolados (Manners *et al.*, 1992).

Isolados de *Bipolaris sorokiniana*, coletados de diferentes regiões do Brasil, mostraram alto nível de variabilidade entre eles, usando-se RAPD (Oliveira & Costa, 2002). Estudo semelhante com *L. theobromae* realizados em Tamil Nadu-Índia, através de RAPD, mostraram a variabilidade molecular de dezoito 18 isolados de *L. theobromae*, coletados de plantas de pinhão-manso (Latha *et al.*, 2009).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI GOLTAPEH, E.; ZARE, R.; PHILLIPS, A.J. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011. 2012. Brasília, Brasil.

ADETUNJI, C.O.; OLOKE, J.K. 2013. Effect of Wild and Mutant Strain of *Lasiodiplodia Pseudotheobromae* Mass Produced on Rice Bran as a Potential Bioherbicide Agents for Weeds under Solid state Fermentation. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 1:18-23.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.

AMORIN, L. REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. 2011. Manual de Fitopatologia. 4ªed. Agronômica Ceres. Piracicaba. p.383-387.

APETORGBOR, M. M.; BOSU, P. P. 2006. An investigation of disease outbreak in a *Cedrela odorata* plantation at the Anhwiaso South Forest Reserve, Ghana. Report submitted to the Forest Services Division, Forestry Commission.

ARGUEDAS, M. 1994. La Corona de Agallas *Agrobacterium tumefaciens*. Serie Plagas y enfermedades forestales. Cartago, CR, Centro de Información Tecnológica del Instituto Tecnológico de Costa Rica. p.8.

ARGUEDAS, M. 2003. Problemas fitosanitarios en teca (*Tectona grandis* L.f.) em América Central: nuevos reportes. Seminario y grupo de discusión virtual. Teca (*Tectona grandis*). (disco compacto) (2003, Heredia, CR) Universidad Nacional, Heredia, CR. Disponível em: <http://www.una.ac.cr/inis/docs/teca/>. Consultado em 20/10/2013.

ARGUEDAS, M. 2004. La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica. Kurú: Revista Forestal 1:1-16.

BELEZACA, C. 2004. La Roya de la teca (*Tectona grandis* L.f.) presente en la zona central del litoral ecuatoriano. 2004. Disponível em: <http://www.uteq.edu.ec/produccion/madera/general.htm> Consultado em: 16/10/2013.

BURGESS, T.I.; BARBER, P.A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; DE BEER Z.W, WINGFIELD, M.J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423–435.

CARDOSO, J.E. VIANA, F.M.P.; CYSNE, A.Q.; FARIAS, F.C.; SOUSA, R.N.M.2007. Clone Embrapa 51: uma alternativa para resistência à resinose-do-cajueiro. Fortaleza: Embrapa-CNPAT. p3.

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

CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P.; BEZERRA, M.A.; SOUZA, T.R.M.; CYSNE, A.Q.; FARIAS, F.C. 2009b. Transmissão de *Lasiodiplodia*, agente da resinose, em propágulos de cajueiro. Fortaleza: Embrapa. p21.

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

CIBRIÁN, T.D.; GARCÍA DÍAZ S.E.; ALVARADO ROSALES, D. 2007. Roya de la teca Teak rust *Olivea tectonae*. *Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in Mexico*. Universidad Autónoma Chapingo, México, p.307-311.

CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O.; PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55:235-253.

DAMM, U.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. 2007. *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic Botryosphaeriaceae. *Fungal Diversity* 27:35-43.

ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z.; SILVA, A.C.F.2001. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural*, Santa Maria 31:885-857.

FARIAS, F.B. 2008. Detecção da Diversidade e associação de *Lasiodiplodia theobromae* com cajueiro utilizando marcadores microssatélites. Dissertação Mestrado Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil.

FERREIRA, F.A. 1990. Constatação da doença em espécies de eucalipto e acácias no Maranhão *Fitopatologia Brasileira*. 15:120.

FERREIRA, M.E. GRATTAPAGLIA, D.1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa/Cenargen. p220.

FIGUEIREDO, E.O. 2001. Reflorestamento com teca (*Tectona grandis*) no estado do Acre. Rio Branco: Embrapa p28.

FIGUEIREDO, E.O.; Oliveira, L.C.; Barbosa, L.K.F. 2005. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro empreendedor Florestal. Embrapa Acre. p87.

FIRMINO, A.C.; TOZZE JR,H.J.; FURTADO,E.L. 2012. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. New Disease Reports 25- 24.

FUNGARO, M.H.P. 2000. PCR na micologia. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 14:12-16.

GOH, D.K. S, GALIANA, A. 2000. Vegetative propagation of teak. Jircas Working Report, Tsukuba 16:35-43.

GRADUAL, L.; KJAER, E.D.; SUANGTHO, V.; SAARDAVUT, P.; KAOSA-ARD, A. 1999. Conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. In: Linn, F. DFSC Series of Technical Notes. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre p38.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<<http://www.indefungorum.org/namesrecord.asp?RecordID-121037>. Consultado em:12/12/2013.

INSTITUTO DE PESQUISA FLORESTAL. Disponível em:  
<http://www.ipef.br/identificação/tectona.grandis.asp>. Consultado em: 17/12/2013.

JACOBS, K.A.; REHNER, A.S. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. Mycologia, New York 90:601-610.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. 1995. Manual de Fitopatologia. 3ª ed Agronômica Ceres. São Paulo. 46-95.

LATHA,P.; PRAKASAM,V.; KAMALAKANNAN,A.; GOPALAKRISHNAN, C.; RAGUCHANDER, T.; PARAMATHMA, M.; SAMIYAPPAN, R. 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. Australasian Plant Dis. Notes, 4, 19-20.

LEAL JUNIOR, G.A. 2002. Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso*, em tecidos de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e sorológica de isolados coletados de vários hospedeiros. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo. Piracicaba Brasil.

LEE, S.S.; TENG, S.Y.; LIM, M.T.; RAZALI, A.K.1988. Discoloration and heart rot of *Acacia mangium* Willd.: some preliminary results. Journal of Tropical Forest Science.170-177.

LIMA, J.S.; CARDOSO, E.C; MOREIRA, R.C; ALVES, E.S; MELO, J. G. M. 2012. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 6: 16.

LISBOA, B.B.; BOCHESE, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A.M.R. 2007. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. Ciência Rural 37:1255-1260.

MACÍAS, J.; ARGUEDAS, M.; HILJE, L. 2002a. Plagas Forestales Neotropicales (Boletín 5. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 63:88-89.

MACÍAS, J.; ARGUEDAS, M.; ZANUNCIO, J.C.; HILJE, L. 2002b. Plagas Forestales Neotropicales (Boletín 7. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 65:116-117.

MANNERS, J.M.; MASEL, A.M.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G. 1992. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Strylosanthes* spp. Pathology and control. CAB International, Oxford, UK.

MATRICARDI, W.A.T. 1989. Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis*) cultivada em Grande Cárceres- Mato Grosso. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil.

MAZIAH, Z.; LEE, S.S. 1999. Diseases and Disorders of Teak (*Tectona grandis*) in Peninsular Malaysia. Proceedings of the 5th International Conference on Plant Protection in the Tropics. Kuala Lumpur. p. 158 - 163.

MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. 2005. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. Mycological Research, Cambridge 10:405-413.

NEWSAN, A.; KOHN, K. P.; RAO, B. B.1967. Decay of rubber wood in a replanting and its effect on root disease. Journal of the Rubber Wood Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur 20:1-7.

OLIVEIRA LINS, S.R.; ALVES, E.; OLIVEIRA, S.M.A. 2010. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira caracterização morfológica de isolados do patógeno. Acta Microscopica 19:221-231.

OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J.L.S. 2002. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f.sp *phaseoli* de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Fitopatologia Brasileira. 27:631-634.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. 2006. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Fitopatologia Brasileira 31: 572-578.

PÉREZ, M.; LÓPEZ, M.O.; MARTÍ, O. 2009. *Olivea tectonae*, leaf rust of teak, occurs in Cuba. Plant Pathology, UK, 58:397.

PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. 2004. *Botryosphaeria*. Portugal: Universidade Nova Lisboa. Disponível em: [http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria\\_sites/genus\\_concept.htm](http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_sites/genus_concept.htm). Consultado em: 25/08/2013.

PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97:513-529.

PIERI, C.; PASSADOR, M.M.; FURTADO, E.L, CARVALHO JUNIOR, A.A. 2011. Ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*): novas ocorrências no Brasil e revisão do nome específico. Summa phytopathologica 37:4.

PINHO, M. 2008. A Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. Journal of Coloproctology. 28:1.

PUNITHALINGAM, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI.Description of Pathogenic Fungi and bactéria. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England p3.

PUNITHALINGAM, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. Vaduz: Pat. J. Cramer p123.

RONDON NETO, R.M.; MACEDO, R.L.G.; TSUKAMOTO FILHO, A.A.1998. Formação de povoamentos florestais com *Tectona grandis* L.f. (Teca). Boletim Técnico, Lavras 7:1-29.

RONDON, A.; GUEVARA, Y. 1984. Algunos aspectos relacionados com la muerte regressiva del aguate (*Persea americana* Mill). Agronomia Tropical 34: 119-129.

ROUX, J.; COUTINHO, T.A.; MUJUNI BYABASHAIJA, D.; WINGFIELD, M.J. 2001. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. South African Journal of Science 97: 16-18.

RUDMAN, P.; DA COSTA, E.W.B. 1958. Relationship of tectoquinone to durability in *Tectona grandis*.

SACCHETTI, M.J. 2009. Os têxteis de Timor-Leste. Disponível em: <http://www.turismotimorleste.com/pt/sobre/tais> Acesso em: 05/12/2013.

SAHA, A.; MANDAL, S. P. 2008. Dasgupta and D. Saha: Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. J. Environ. Biol., 29: 407-410.

SANKARAN, K.V.; SUTTON, B.C.; MINTER, D.W. 1995. A checklist of fungi recorded on *Eucalyptus*. Mycological Papers 170: 1-376.

SANTOS, A.A.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F. das C.O. 2000. Fungos associados a sementes de gravioleira e de ateira no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 33:11.

SANTOS, M.N.; TEIXEIRA, M.L.F.; PEREIRA, M.B.; MENEZES, E.B. 2009. Potential insecticidal effects of aqueous tree leaf extracts against subterranean termite *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology, California 53:719-728.

SHARMA, J.K.; MOHANAN, C.; Florence, E.J.M. 1985. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown in Kerala. Kerala, IN. Kerala Forest Res. Inst. p275.

SKOUBE, P.; FRISVAD, J.C.; TAYLOR, J.W.; LAURITSEN, D.; BOYSEN, M.; ROSSEN, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of *Penicillium terveticillate* species. Mycological Research, Cambridge 103:873-881.

SLIPPERS, B.; CROUS, P.W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia 96: 83-101.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21: 90-106.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2008. Botânica Sistemática guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ªed. Nova Odessa. Instituto Plantarum.

SUJAN, A.; TAN, A. G.; STEVENS, M.1980. Some studies on fungal deterioration of rubber wood (*Hevea brasiliensis*). Stockholm: International Research Group on Wood Preservation 6p.

TREMACOLDI, C.R.; LUNZ, A.M.; COSTA, F.R.S. 2009. Cancro em paricá (*Schizolobium parahyba var amazonicum*) no Estado do Pará. Nota Científica. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo 59: 69-73.

UGALDE, L.; Pérez, O. 2001. Mean annual volume increment of selected industrial forest. FAO, working paper FP/1. Disponível em : <http://www.fao.org>>. Consultado em: 22/12/2013.

VAZ, A.T.A. 2008. Doenças causadas por fungos Botryosphaeriaceae em videiras: caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas. Dissertação Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

VEIT, L.F. 2000. Dinheiro não cresce em árvores. Revista Silvicultura 83:38-39.

VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENOS, P.L.L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M.G. 2001. Técnicas de produção de sementes florestais. Rio Branco: Embrapa 1-4.

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

WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Path* 56:128–139.

ZHOU, S.; STANOSZ, G.R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* Species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia*, New York 93:516-527.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL, MOLECULAR E PATOGENICA DE ISOLADOS DE *Lasiodiplodia theobromae*.**

## RESUMO

O cancro da teca (*Tectona grandis*) causado por *Lasiodiplodia theobromae* tem sido frequentemente constatado em povoamentos de teca, em anos recentes. Pouco ainda se conhece sobre a diversidade de isolados de *L. theobromae* obtidos de teca bem como sobre o perfil de virulência e agressividade em teca de isolados obtidos de outras espécies hospedeiras. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfo-cultural, molecular e patogênica de isolados desse fungo. O desenvolvimento das colônias dos isolados de *L. theobromae* foi avaliado em cinco diferentes tipos de meios de cultura, os que apresentaram maior eficiência no crescimento do fungo foram os meios V8, MEA e BDA. Quanto à temperatura, o melhor desenvolvimento do fungo foi verificado entre 30°C e 35°C. Estudos filogenéticos basearam-se nas sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e na sequência parcial do gene fator de alongamento da tradução (EF-1 $\alpha$ ). A análise dos fragmentos dos genes ITS e EF-1 $\alpha$  e a comparação com isolados caracterizados do GenBank permitiram confirmar a identificação dos isolados como *Lasiodiplodia theobromae*. Isolados advindos de teca foram testados quanto à patogenicidade, juntamente com isolados de outras hospedeiras e, nesse aspecto, todos os isolados obtidos de teca mostraram ser patogênicos a essa espécie. Alguns isolados, dependendo da origem de propagação da planta hospedeira, induziram maior intensidade de doença, o mesmo se verificando com isolados oriundos de outras hospedeiras diferentes de teca. Estudos adicionais de caracterização se fazem necessários para entender o complexo da biologia do patógeno, a fim de auxiliar no estabelecimento de estratégias eficientes de controle bem como para guiar os programas de melhoramento em busca de clones com resistência estável e durável contra esse patógeno.

## **ABSTRACT**

Canker of teak (*Tectona grandis*) caused by *Lasiodiplodia theobromae* has been frequently noted in teak plantations in recent years. As yet, little is known about the diversity of isolates of *L. theobromae* obtained from teak, or about the profile of its virulence and aggressiveness in teak from isolates obtained from other host species. The present work aimed to carry out morphocultural, molecular and pathogenic characterization of isolates from this fungus. Colony development in isolates of *L. theobromae* was evaluated in five different types of culture medium, and those that presented the greatest efficiency in fungal growth were V8, MEA and PDA cultures. As regards temperature, the best development of fungi was verified between 30°C and 35°C. Phylogenetic studies were based on the sequences in regions ITS1-5.8S-ITS2 rDNA and on the partial sequence of the elongation factor gene (EF-1 $\alpha$ ). The genes ITS and EF-1 $\alpha$  were not sufficient to separate the isolates of *Lasiodiplodia* at species level in a conclusive manner, indicating the need for studies with at least one more gene. Isolates from teak were tested for pathogenicity, together with isolates from other hosts and, in this respect, all the isolates from teak were shown to be pathogenic to this species. Some isolates, depending on the origin of the propagation material, were more aggressive. Furthermore, isolates from other hosts presented high indices of virulence. Additional characterization studies are necessary to understand the pathogen's biological complex, so as to help establish efficient control strategies and orient breeding programs toward finding clones with stable and durable resistance to this pathogen.

## Introdução

A teca (*Tectona grandis*) é uma espécie florestal nativa do Subcontinente Índico e do Sudeste Asiático (Figueiredo *et al.*, 2005), foi introduzida no Brasil a partir da década de 1970 inicialmente no Centro-Oeste do país. Essa espécie possui alto valor comercial por apresentar durabilidade e resistência. A madeira pode ser usada para a confecção de móveis finos, esquadrias, pisos, construção naval e painéis (Goh & Monteuiis, 2005). As principais doenças que afetam a cultura são, ferrugem causada por *Olivea tectonae* (Arguedas, 2004), foram encontradas plantas com sintomas de murcha causada pelo o fungo *Ceratocystis fimbriata* (Firmino *et al.*, 2012), e nos principais países produtores de Teca o cancro causado, que pode ser causado por distintos patógenos, frequentemente tem sido associado a *L. theobromae*.

Esse fungo era considerado patógeno de pouca importância, mas, atualmente devido a relatos de danos causado em diversas culturas vem ganhando destaque (Cardoso *et al.*, 1998). Além da teca, *L. theobromae* ataca várias espécies perenes, como manga, cacau, eucalipto e seringueira causando sintomas de murcha, cancro, podridão basal de frutos e do tronco, secamento, morte dos ramos e morte da planta (Cardoso *et al.*, 1998).

Este capítulo aborda os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de caracterizar isolados do fungo *L. theobromae* quanto aos aspectos morfocultural, molecular e patogênico.

## Material e Métodos

### Coleta de amostras e isolamento de *L. theobromae*

Foram efetuadas coletas em plantios de teca nas localidades de Rosário Oeste, Cáceres e Água Boa, no Mato Grosso, em Unaí, Noroeste de Minas Gerais e em Morrinhos, Sul de Goiás. A partir de árvores com sintomas externos de desprendimento da casca, rachadura ao longo do caule e gomose, foram coletados discos de madeira mostrando escurecimento vascular, dos quais as amostras foram isoladas.

Para, tanto, partes do material coletado foram submetidas a uma desinfestação seriada com álcool 70% durante 1 minuto, seguido de submersão em hipoclorito de sódio a 2% durante 1 minuto e dupla lavagem em água destilada por 1 minuto. Os fragmentos desinfestados foram secos em papel de filtro estéril e depositados sobre placas de Petri contendo meio ágar-água (AA) 2%, e mantidos durante três dias à temperatura de 25°C ( $\pm$  1°C) com fotoperíodo 12h. Assim que os primeiros sinais de micélio apareceram, discos de ágar (0,5 mm de diâmetro), contendo estruturas fúngicas, foram transferidos para placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA), incubadas nas mesmas condições acima descritas. A Figura 3 ilustra esta etapa do trabalho.

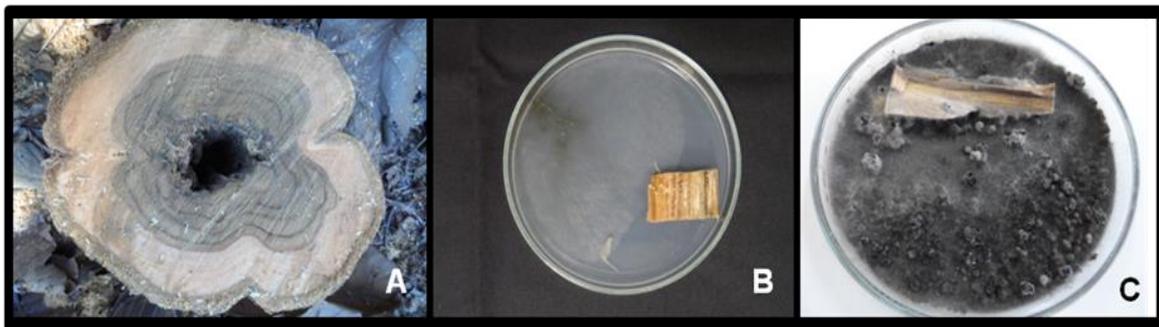


Figura 3 - (A) Disco de madeira de teca com sintomas de *L. theobromae*; (B) fragmento de teca em Ágar-Água; (C) Estroma

Para o cultivo monospórico, esporos foram coletados por lavagem das colônias com 10 mL de solução salina (500 mL de água destilada + 4,25 g de NaCl) previamente autoclavada, e a seguir alíquotas de 1 mL dessa suspensão obtida, foram transferidas para tubos contendo 9 mL de solução salina. A partir desta realizaram-se diluições seriadas de forma que as concentrações finais foram padronizadas para  $10^2$  esporos/mL. Alíquotas de 0,1 mL dessa suspensão de esporos foram transferidas para placas com o meio BDA acrescido de 0,005% de cloranfenicol. Com o auxílio de um microscópio com o aumento total de 40 vezes, os esporos germinados foram individualmente transferidos para novas placas com BDA, obtendo-se assim as culturas monospóricas.

Os isolados de outros hospedeiros foram cedidos pela Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal de Ceará, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de isolados de *L. theobromae* de diversos hospedeiros usados neste estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Ano</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Substrato</b>
<b>CMM-2177</b>	2006	São José do Mapitu-RN	Mamão	<i>Carica papaya</i>	Fruto
<b>CMM-2326</b>	2007	Juazeiro-BA	Mamão	<i>Carica papaya</i>	Fruto
<b>CMM-4039</b>	2010	Ipanguaçu-RN	Manga	<i>Mangifera indica</i>	Caule
<b>CMM-4042</b>	2010	Petrolina-PE	Manga	<i>Mangifera indica</i>	Caule
<b>L01</b>	2010	Fortaleza-CE	Cajaraneira	<i>Spondias cytherea</i> Sonn.	Caule
<b>L16</b>	2010	Ipueiras-CE	Ciriguela	<i>Spondias purpurea</i>	Caule
<b>L193</b>	2010	Pio IX-PI	Abacateiro	<i>Persea americana</i>	Caule
<b>RB01</b>	2012	Jangada-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB02</b>	2012	Quatro Marcos-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB03</b>	2012	Cáceres	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB04</b>	2012	Cáceres	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB05</b>	2012	Jangada-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB06</b>	2012	Quatro Marcos-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB07</b>	2013	Porto Esperidião-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB08</b>	2013	Porto Esperidião-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB09</b>	2013	Cáceres	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB10</b>	2013	Porto Esperidião-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB11</b>	2013	Rosário Oeste-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB12</b>	2013	Rosário Oeste-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB13</b>	2013	Rosário Oeste-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB14</b>	2013	Cáceres	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB15</b>	2013	Unaí-MG	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB16</b>	2013	Morrinhos-GO	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB17</b>	2013	Água Boa-MT	Teca	<i>Tectona grandis</i>	Caule
<b>RB18</b>	2012		Algodão	<i>Gossypium herbaceum</i>	
<b>RB19</b>	2012		Milho	<i>Zea mays</i>	

## Caracterização cultural dos isolados

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), com isolados descritos na Tabela 2. Para cada isolado, disco de micélio/ágar (6 mm de diâmetro), retirados de colônia cultivada por 12 dias em meio BDA, foram individualmente transferidos para o centro de placas contendo os meios testados. A incubação ocorreu nas mesmas condições anteriores.

Os meios de cultura testados foram: 1) BDA (água do cozimento de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar para 1000 mL de água destilada); 2) MEA(extrato de malte 20 g e 20 g de ágar, em 1000 mL de água destilada); 3) Suco V8-ágar, no qual o suco foi constituído de concentrado de tomate, cenoura, aipo, beterraba, alface, espinafre, salsa, e agrião, além de conter sal e vitamina C (ácido ascórbico (Suco V8200 mL,  $\text{CaCO}_3$ , 3g e ágar, 20g em 1000mL de água destilada); 4) Aveia-ágar 60g de farinha de aveia e ágar 12g em 1000mL de água destilada); 5) Cenoura-ágar (extrato de cenoura (20g/400mL), ágar 20g e 1000mL de água destilada).

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição de diâmetro de colônias tomadas com o auxílio de uma régua milimétrica, em dois sentidos perpendiculares, a cada 24 horas. As leituras foram concluídas quando o crescimento nas testemunhas atingiu toda a superfície da placa de 90 mm de diâmetro. Os dados obtidos foram utilizados no cálculo da velocidade do crescimento, dada pela fórmula,  $IVCM = \Sigma(D - D_a) / N$ , onde, IVCM= Velocidade do Crescimento Micelial; D= Diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$ = Diâmetro Médio da Colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação (Maguire, 1962).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 13x5 (isolado x meios de cultura), com quatro repetições, onde cada parcela foi representada por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Realizou-se a

análise de variância (ANOVA), seguida de aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5 % para a comparação das médias. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR v. 5.0 para análise dos dados (Ferreira, 2007).

Após a definição dos melhores meios para o crescimento de *L. theobromae*, os mesmos isolados foram submetidos a diferentes temperaturas de crescimento (25°C, 30°C, 35°C), em meios BDA, MEA e V8.

Para este segundo experimento usou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo, sendo 13x3x3 (isolado x meio de cultura x temperatura), com \*quatro repetições, onde cada parcela foi representada por uma placa de petri de 90 mm de diâmetro.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada como descrito no ensaio anterior e os dados obtidos foram utilizados no cálculo da velocidade do crescimento micelial, segundo Maguire, (1962).

## **Caracterização morfológica dos isolados**

Culturas puras dos fungos isolados de disco de madeira de teca foram examinadas ao microscópio de luz (Leica DM 2500) e as estruturas fotodocumentadas com câmera fotográfica (Leica DFC 490) acoplada ao computador. Análises morfométricas foram feitas com o auxílio do programa Leica QWin-Plus. As dimensões dos conídios e das células conidiogênicas (comprimento e largura) e a septação das mesmas estruturas foram medidas após vinte e cinco dias de cultivo, com cinquenta repetições, sendo anotadas as dimensões extremas e as de maior frequência mostradas.

## Caracterização molecular dos isolados

Foi utilizado o método de extração CTAB e solventes orgânicos essencialmente como descrito por Boiteux *et al.* (1999). Amostras de micélio obtidas de culturas puras foram maceradas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 750µl de Tampão CTAB (2% de CATB; 100mM de Tris-HCl; pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol). A maceração foi realizada em dois ciclos de 30 seg a 2000 rpm em agitador (Precellys – Bertin Technologies) e a seguir os tubos foram incubados a temperatura de 65°C por 10 min, sendo então retirados do banho-maria e deixado ao ar livre por 3 minutos. Em seguida foram adicionados 750 µl de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (em vórtex). Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 9.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 300µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 min para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400µl de etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 200µl TE (Tampão de extração), sendo então deixado por 12 horas em um refrigerador com temperatura em torno de 5°C.

A concentração de DNA contido nas preparações foi determinada com a utilização de um espectrofotômetro (NANODROP®) e, então, ajustada para 50 ng/µl. A amplificação das sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR, com o uso de iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). As reações apresentaram um volume final de 25 µL contendo 4 µl de DNA (100 ng/µl), 2,5 de tampão 0,5 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM de cada), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de cada um dos

oligonucleotídeos iniciadores ITS1(10 mM) e ITS4 (10 mM), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (5u/µl *Invitrogen® Life Technologies*) e água ultrapura para completar o volume final da reação. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems), respeitando-se a seguinte sequência: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos) seguida de 39 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C por 60 segundos), uma etapa de anelamento de (58°C por 60 segundos) e extensão de (72°C durante 60 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C por 8 minutos. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4°C.

Para o gene EF-1 $\alpha$ , utilizaram-se os iniciadores TEF1-F(5'-AACTTGCAGGCAATGTGG3') e EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (Carbone & Kohn, 1999). As reações de PCR apresentam um volume final de 25 µL contendo 4 µl de DNA (100 ng/µl), 2,5 de tampão 0,5 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM de cada), 0,5 µL de DMSO, 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores TEF1-F (10 mM) e EF1-728F (10 mM), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (5u/µl *Invitrogen® Life Technologies*) e água ultrapura para completar o volume final da reação. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems), respeitando-se a seguinte sequência: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos) seguida de 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C por 60 segundos), uma etapa de anelamento de (60°C por 60 segundos) e extensão de (72°C durante 60 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C por 8 minutos. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4°C.

Amostras dos produtos das reações de PCR (5 µL) da reação foram aplicados em gel de agarose a 1%, utilizando marcador de peso molecular 1Kb *DNA ladder* (*Invitrogen® Life Technologies*), em cuba de voltagem de 100V. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, durante 20 minutos e as bandas, foram

visualizadas em transiluminador de luz UV, sendo o gel fotodocumentado. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul). Os iniciadores utilizados para a reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente para as reações da PCR.

### **Análise das sequências**

A qualidade das sequências foi avaliada com o uso do programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI). As sequências correspondentes ao fragmento do genoma dos diferentes isolados foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso, também com o auxílio do programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI). Foram realizadas pesquisas para a verificação da autenticidade de todas as sequências nucleotídicas, sendo comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank, na página eletrônica do National Center for Biotechnology Information – NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e analisadas para níveis de identidade, usando o algoritmo BLASTn. O alinhamento múltiplo das sequências obtidas neste trabalho e as disponíveis no GenBank foi realizado por meio do software Megalign (Lasergene, Madison, WI), utilizando-se o método Clustal W. Este alinhamento permitiu também o cálculo da identidade entre as várias sequências analisadas.

### **Análise filogenética**

As sequências dos ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e EF-1 $\alpha$ , foram analisadas pelos métodos da máxima parsimônia (MP), ponderada (reponderação progressiva) e não ponderada e máxima verossimilhança utilizando o programa Mega 6.0, através da busca heurística. Foi utilizado o índice de suporte bootstrap com 1000 repetições.

## Patogenicidade dos isolados obtidos

Os ensaios de patogenicidade foram conduzidos em casa de vegetação, (temperatura variando de 18 a 30°C e umidade relativa na faixa de 70%). Foram utilizados dois isolados do patógeno identificados como RB01 e RB05 e três clones de teca (A, B e C). A metodologia adotada para inoculação foi baseada na utilizada por Pereira *et al.* (2006) com adaptações. Foram usadas plantas com cento e oitenta dias de idade, obtidas de viveiro. O inóculo foi depositado entre a casca e o lenho através de uma incisão, de aproximadamente 2 cm de comprimento feita no caule, com o auxílio de um estilete, 5 cm acima do colo. Em cada orifício foi depositado um disco (2 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio do fungo. O ferimento foi coberto com algodão umedecido e vedado com filme de PVC, como ilustrado na (Figura 4), para evitar ressecamento e a entrada de outros microrganismos. Plantas saudias receberam disco de BDA sem micélio, como controle.



Figura 4 - Incisão no caule da planta, contendo disco de BDA com micélio do fungo, recoberto com algodão umedecido com água destilada e vedado com filme de PVC.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por nove tratamentos e quatro repetições com parcelas constituídas por cinco mudas de cada um dos três clones por repetição. Estas, além do tratamento testemunha receberam individualmente inoculações com culturas dos isolados RB01 e RB05.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada 90 dias após a inoculação, através de uma escala de notas adaptada de Pereira *et al.* (2006). Esta escala varia de 0 a 4, determinada com base na severidade da doença: (**Nota 0**) = mudas sem lesão visível (**altamente resistente**); (**Nota 1**) = lesão com até 3 cm de comprimento (**resistente**); (**Nota 2**) = lesão com até 6 cm de comprimento (**mediamente resistente**); (**Nota 3**) = lesão de comprimento superior 6 cm (**suscetível**) e (**Nota 4**) = mudas com lesão profunda, escurecimento dos vasos (**Figura 3**), mostrando queda de folhas e morte (**altamente suscetível**). Após a avaliação do comprimento das lesões, realizou-se o reisolamento do fungo em BDA (Figura 11 K), a partir das lesões avaliadas, cumprindo assim os Postulados de Koch.

O grau de severidade dos dois isolados de *L. theobromae* nos três clones de teca foi obtido, aplicando-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % para a comparação das médias. Nessas análises utilizou-se o programa estatístico SISVAR v. 5.0 para análise dos dados (Ferreira, 2007).

### **Inoculação unidirecional**

Foram realizados também testes de patogenicidade unidirecional, nos quais os isolados de *L. theobromae* obtidos de uma gama de distintas hospedeiras foram inoculados em plantas de teca. Os isolados avaliados nesses ensaios estão descritos na (Tabela 1).

O experimento foi conduzido com o Clone A empregado no experimento anterior, em delineamento inteiramente casualizado composto por onze tratamentos e cinco repetições, com parcelas constituídas por cinco mudas por repetição.

Após 90 dias da inoculação, a patogenicidade dos isolados foi avaliada com o auxílio da escala de notas adaptada de Pereira *et al.* (2006) .

O grau de severidade de *L. theobromae* no clone de teca estudado foi obtido, aplicando-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % para a comparação das médias. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR v. 5.0 para análise dos dados (Ferreira, 2007).

## Resultados

### Isolados obtidos

No total foram obtidos neste trabalho 28 isolados de *Lasiodiplodia*, sendo 17 obtidos de povoamentos de teca. Os demais foram de diversas procedências, conforme Tabela 1. Em todas as áreas de teca em que foi detectada a ocorrência de *L. theobromae*, observaram-se os sintomas de morte-descendente, e cancro no fuste, a diferentes distâncias do solo (Figura 7 C), geralmente acompanhados de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos. Em alguns casos, as árvores de 17 a 20 anos, embora apresentassem copa intacta sem queda de folhagem, exibiam os sintomas de cancro. Aparentemente a presença do fungo é favorecida pelas operações de poda e desbaste e, também, pela presença de umidade elevada, já que após tais operações e período de chuva, notou-se o aumento do índice da doença, em todos os plantios avaliados.

### Caracterização cultural dos isolados

Os meios BDA, MEA e V8 proporcionaram melhores taxas do crescimento micelial para os isolados de *L. theobromae* estudados (Figura 5). MEA proporcionou melhor taxa de crescimento para 12 dos 13 isolados de *L. theobromae*, ao passo que, com meio V8, 11 dos 13 isolados foram favorecidos. Já BDA, favoreceu o desenvolvimento de seis isolados, seguido do meio Aveia que também proporcionou o melhor desenvolvimento para seis dos 13 isolados. Com CA, foram obtidos índices de crescimento micelial comparativamente mais baixos que os anteriores, possibilitando melhor desenvolvimento de três dos 13 isolados.

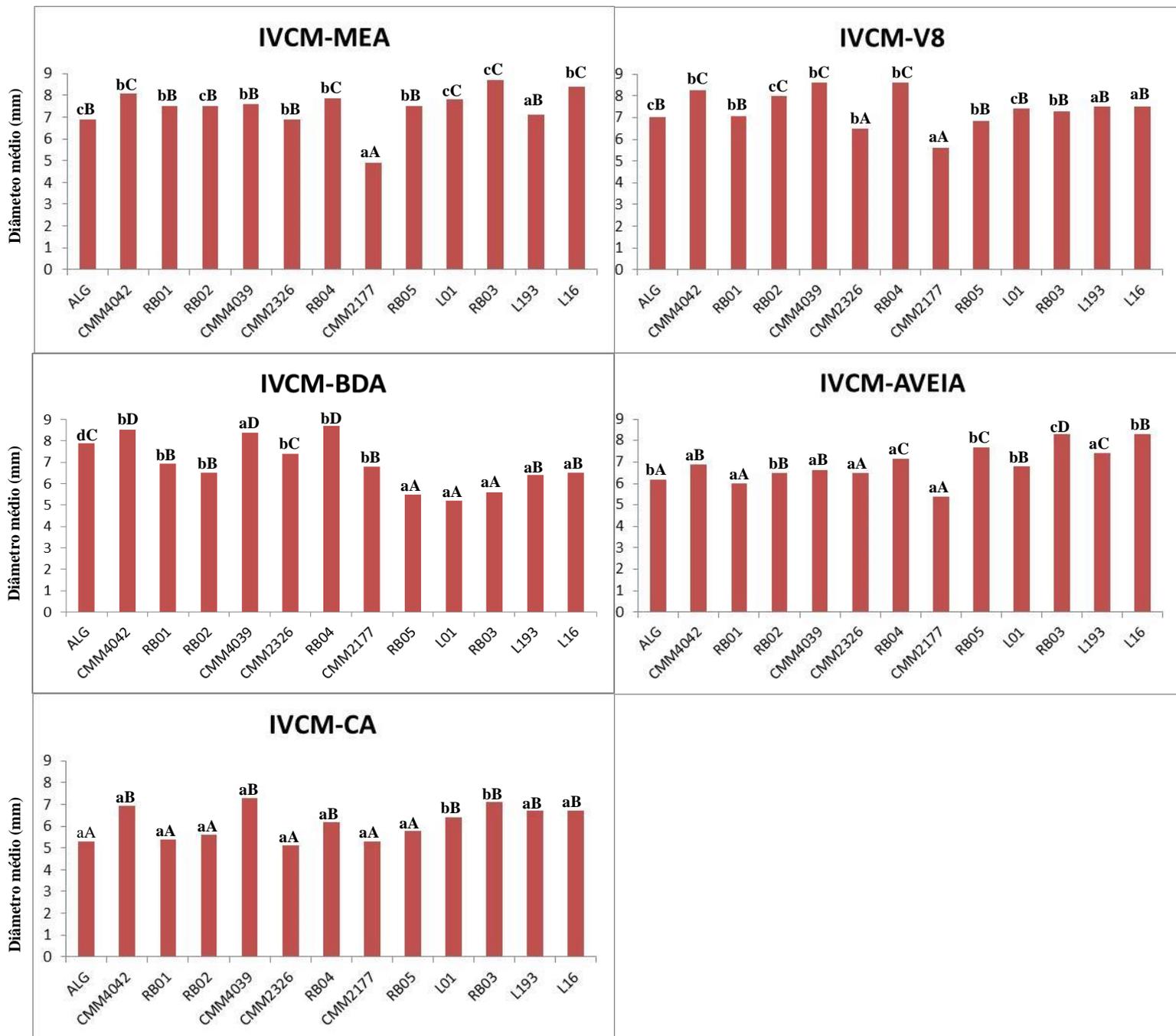


Figura 5- Velocidade de crescimento micelial de isolados de *L. theobromae* em meio MEA, V8, BDA, AVEIA e CA.

Quando os isolados foram cultivados em meio MEA, apenas o isolado CMM2177 apresentou menor taxa de crescimento.

Já, em V8 os isolados ALG, CMM4042, RB01, RB02, CMM4039, RB04, RB05, L01, RB03, L193 e L16 apresentaram a melhor taxa de crescimento micelial quando comparada com a de outros meios. Em meio BDA os isolados que apresentaram melhor crescimento foram, ALG, CMM4042, CMM4039, CMM2326, RB01 e RB04. No meio aveia os isolados CMM4042, RB04, RB05, RB03, L193 e L16.

Os isolados CMM4042, CMM4039 e RB03 apresentaram a maior taxa de crescimento micelial em meio CA.

De modo geral, quando analisada a interação entre isolados de *L. theobromae*, meios e temperaturas, observa-se que as melhores taxas de crescimento foram obtidas nos meios BDA e V8 na temperatura de 35°C, diferindo estatisticamente das demais (Figura 6).

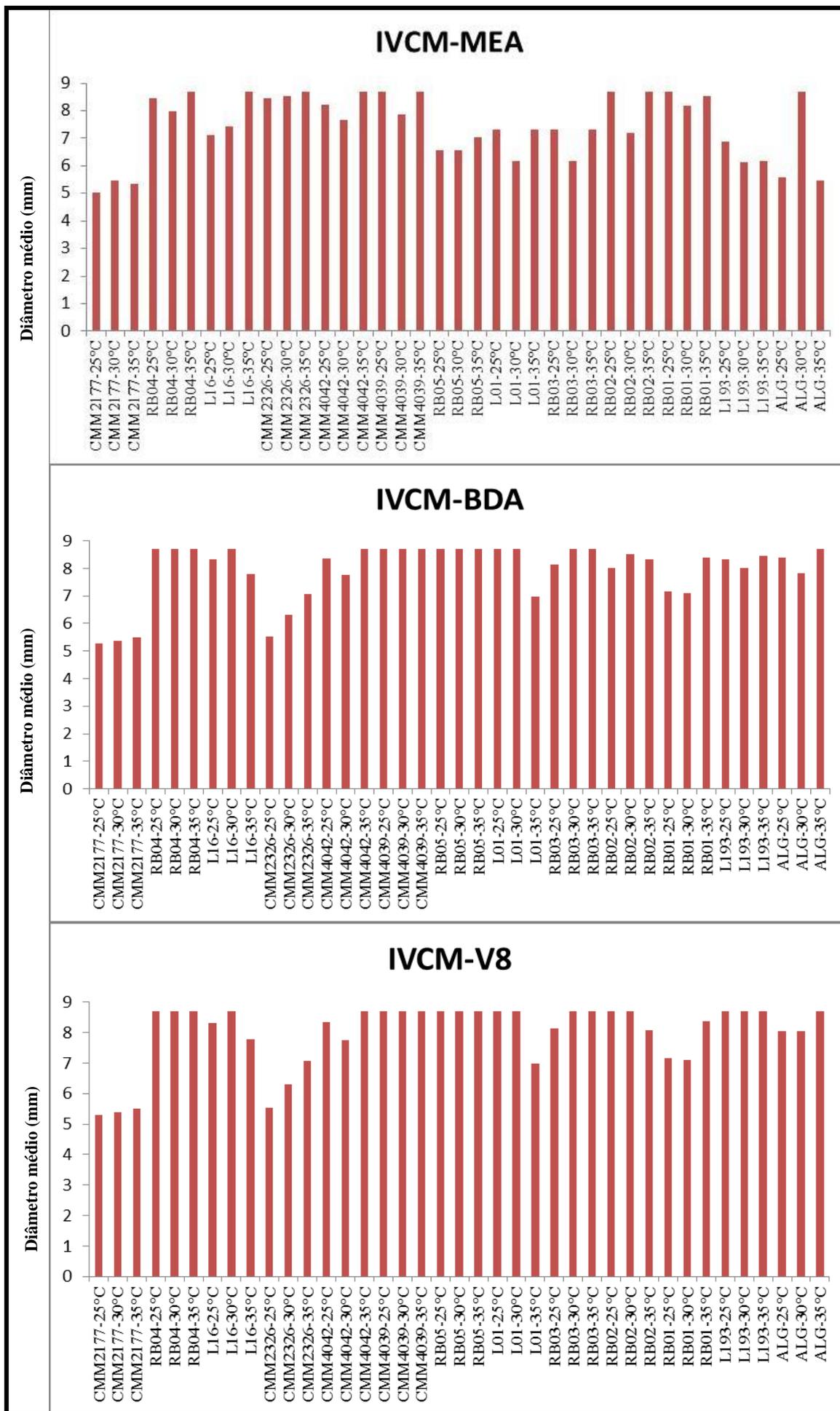


Figura 6- Velocidade do crescimento micelial de *L. theobromae* e interação (meio x isolado x temperatura)

O meio MEA foi o que proporcionou melhor crescimento para o isolado RB01, nas temperaturas 25 e 30°C, como também para o isolado CMM2326 quando submetidos a três temperaturas estudadas.

Os isolados RB04 e CMM2326 quando cultivados em meio MEA apresentaram maior crescimento nas três temperaturas estudadas seguido dos isolados ALG na temperatura 30°C e L16 na temperatura de 35°C. Os demais isolados apresentaram valores médios de diâmetro de colônias similares, não diferindo significativamente entre si.

Para os meios BDA e V8, os isolados que apresentaram mais baixa taxa de crescimento micelial foram CMM2326 e CMM2177 respectivamente, nas três temperaturas estudadas seguido do RB01 na temperatura de 25°C e 30°C e L01 na temperatura de 35°C.

Na temperatura de 30°C, em relação aos meios BDA e V8 os isolados RB04, L16, CMM4039, RB05, L01, RB03, RB02 e L193 não diferiram significativamente entre si. Por último, a temperatura de 35°C, não houve diferença estatística para os isolados RB04, CMM4042, CMM4039, RB05, RB03, RB02, RB01 e ALG apresentando alta taxa de crescimento

## Caracterização Morfológica dos isolados

As dimensões de conídios maduros dos isolados de *L. theobromae* estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Medidas de comprimento e largura de conídios de isolados de *L. theobromae*

<b>Isolado</b>	<b>Comprimento x Largura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>RB01</b>	22,23-25,77 x 11,89-13,88
<b>RB02</b>	21,18-24,9 x 11,8-14,07
<b>RB03</b>	22,61-25,56 x 11,8-14,07
<b>RB04</b>	21,13-24,39 x 12,06-15,73
<b>RB05</b>	23,34-26,04 x 11,73-15,13
<b>L01</b>	19,05-22,05 x 11,52-14,32
<b>L16</b>	20-24,37 x 11,1-12,88
<b>L193</b>	21,3-24,32 x 11,34-14,08
<b>CMM2326</b>	21,1-24,49 x 11,52-13,3
<b>CMM2177</b>	22,3-27,8 x 11,7-14,1
<b>CMM4042</b>	21,3-25,2 x 12-14,79
<b>CMM4039</b>	21-25 x 12-14,1
<b>Algodão</b>	23,65-27,65 x 13,46-17,92

Os isolados obtidos de teca RB01, RB02, RB03, RB04 e RB05 apresentaram conídios com dimensão média variando entre (21,13-26,04) x (11,8-15,73)  $\mu\text{m}$ .

O isolado L01 (cajaneira) apresentou menores valores para relação comprimento/ largura (1,65)  $\mu\text{m}$ , contudo não diferindo significativamente essas duas dimensões. A dimensão média variou entre (19,05 x 11,53)  $\mu\text{m}$ . Os conídios desse isolado também apresentam o formato ovóide (LIMA, 2011).

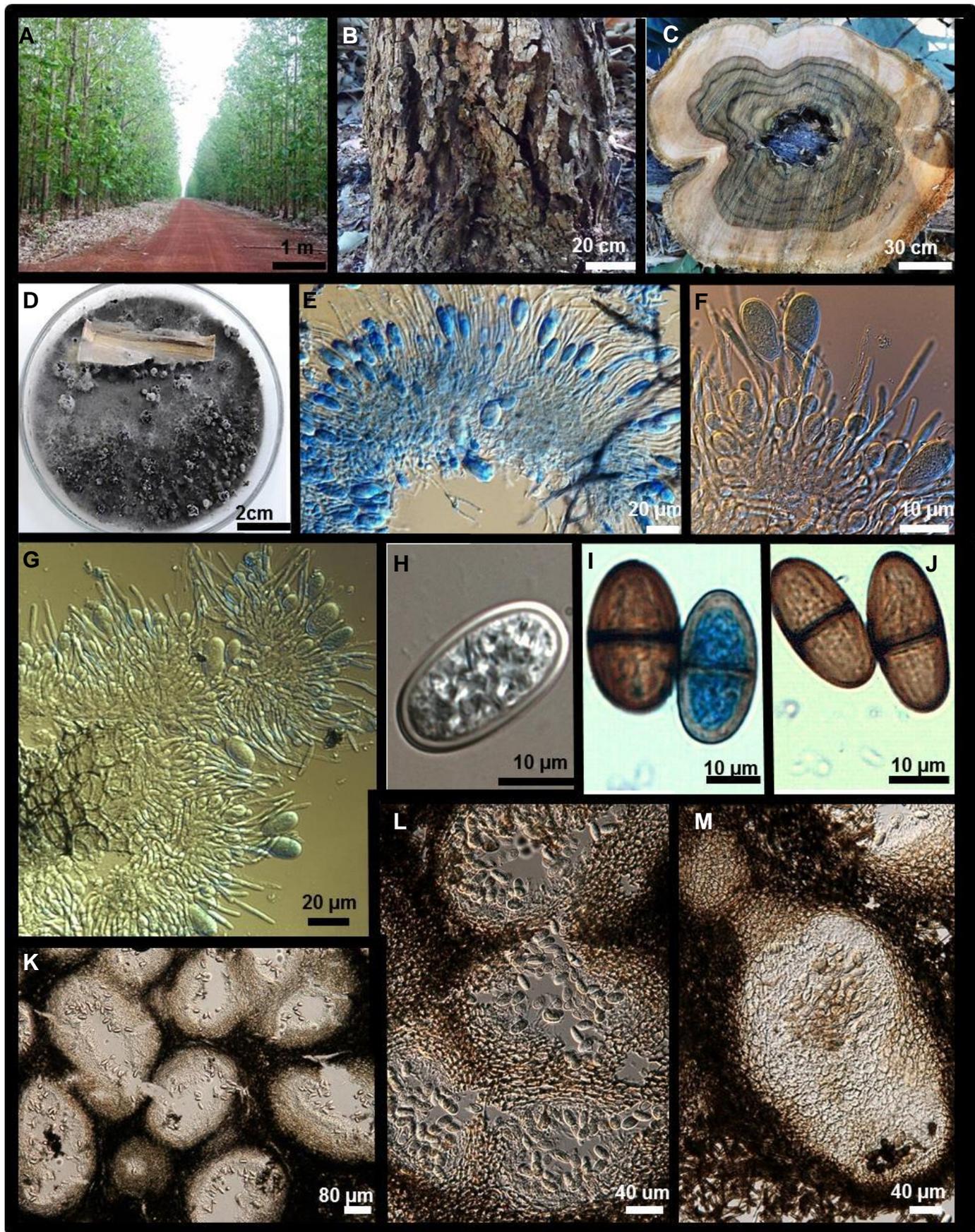
O isolado L16 (ciriguela) apresentou valores médios de dimensão de conídios superiores aos do isolados L01 (24,37 x 12,88)  $\mu\text{m}$ , também com valores maiores para a relação comprimento/ largura (1,73)  $\mu\text{m}$ .

O isolado L193 (abacateiro), procedente do Piauí, apresentou valores de dimensão de conídios de (21,3 x 12,88)  $\mu\text{m}$ , sendo este obtido em geográfica diferente dos isolados L01 e L016 que são procedentes do Ceará. É importante destacar que este é também oriundo de uma planta da família Lauraceae, diferentemente dos outros dois, de plantas da família Anacardiaceae.

Os isolados CMM 2326 (mamão) e CMM2177 (mamão) apesar de pertencerem a mesma hospedeira, apresentaram medidas de comprimento dos conídios distintas, porém, de largura bem próximas, ou seja (21,1-24,49) x (11,52-13,3) para o primeiro e (22,3-27,8) x (11,7-14,1) para o segundo. Os isolados foram coletados em áreas geográficas distintas, sendo CMM2326 oriundo da Bahia e o CMM2177, do Rio Grande do Norte.

Os isolados obtidos de manga, CMM4039 e CMM4042, o primeiro coletado na Bahia e o segundo em Pernambuco, também apresentaram dimensões de conídios bem próximas (21,3-25,2) x (12-14,79) e (21-25) x (12-14,1), respectivamente.

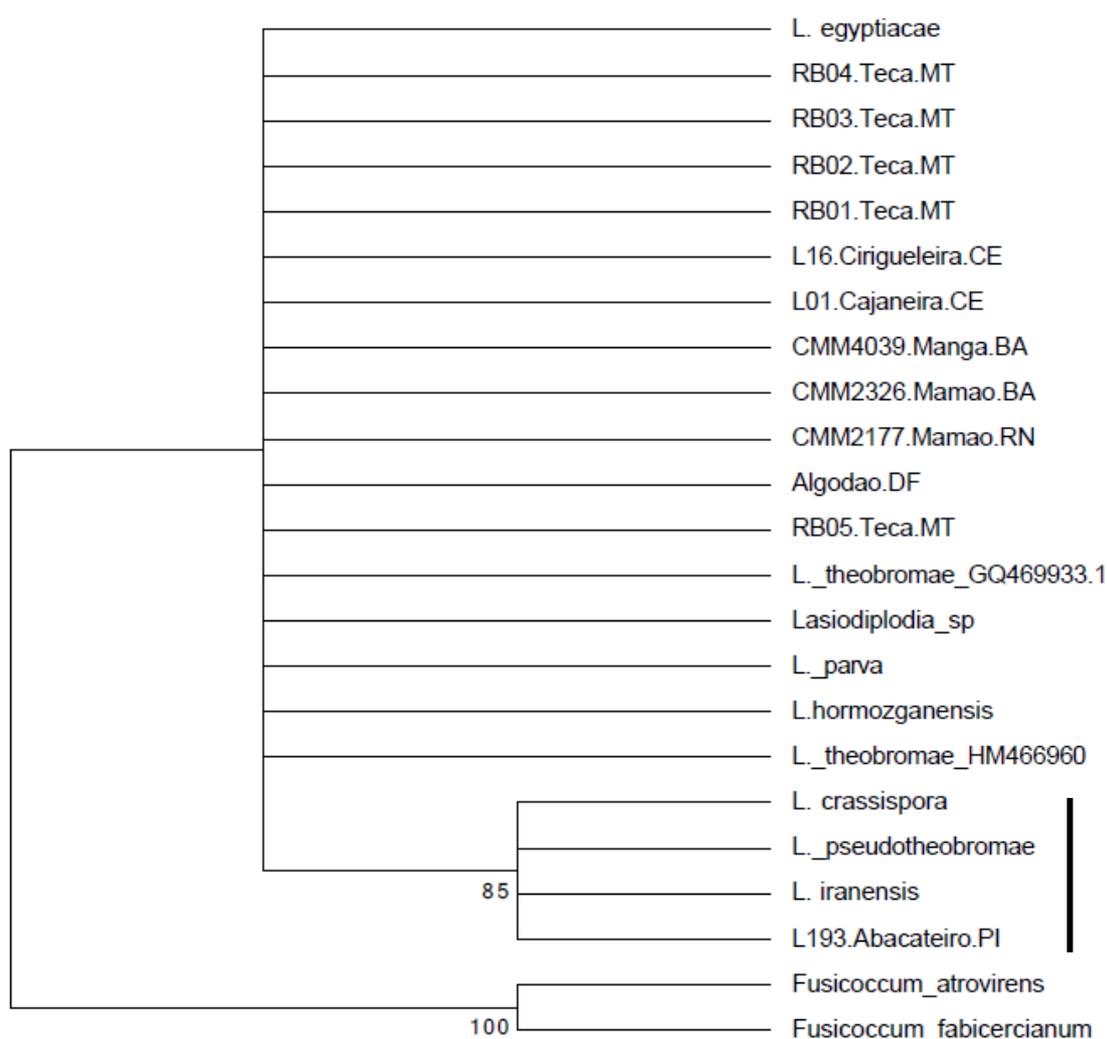
Apesar da maioria dos isolados de *L. theobromae* apresentarem dimensões de conídios distintas, todos inicialmente apresentaram-se hialinos e não septados (Figura 7. H), ovóides, paredes duplas, delgadas (Figura 7. H), tornando-se de coloração marrom-escuro, 1-septo, com estrias longitudinais, e paredes espessas na maturidade (Figura 7. I e J) e células conidiogênicas hialinas (Figura 7. E, F, G, K e L), ampuliformes a lageniformes.



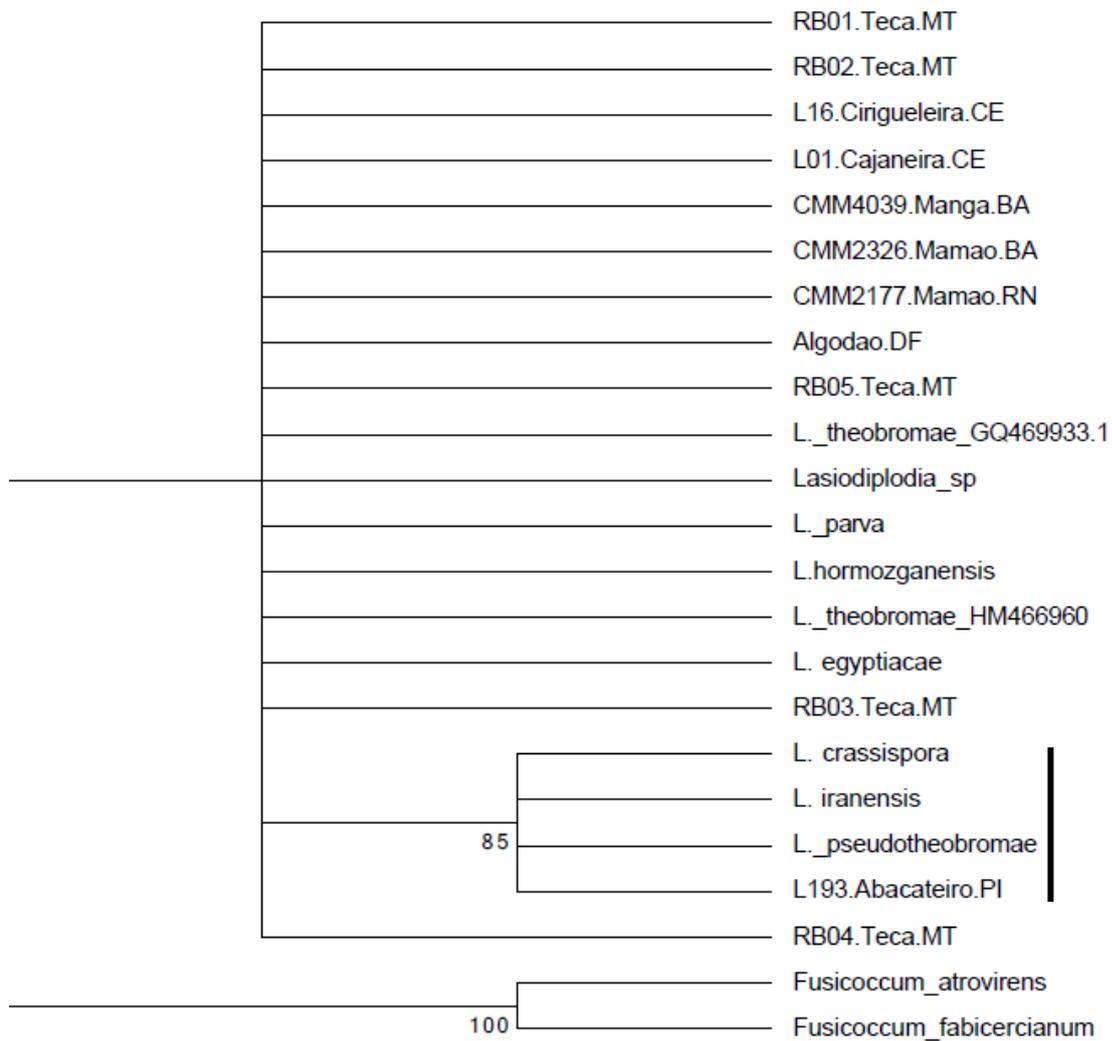
**Figura 7-** Povoamentos de *Tectona grandis* (A), tronco com sintomas, desprendimento da casca e rachaduras (B), disco com cancro e escurecimento dos vasos (C). Coloração da colônia e picnídios (D), células conidiogênicas (E,F, G, K e L). Conídios imaturos com parede dupla e sem septos (H). Conídios em transição e maduros (I). Lóculos mostrando a disposição das células conidiogênicas e conídios imaturos (K e L). Lóculos mostrando a textura (M).

## Caracterização Molecular dos isolados

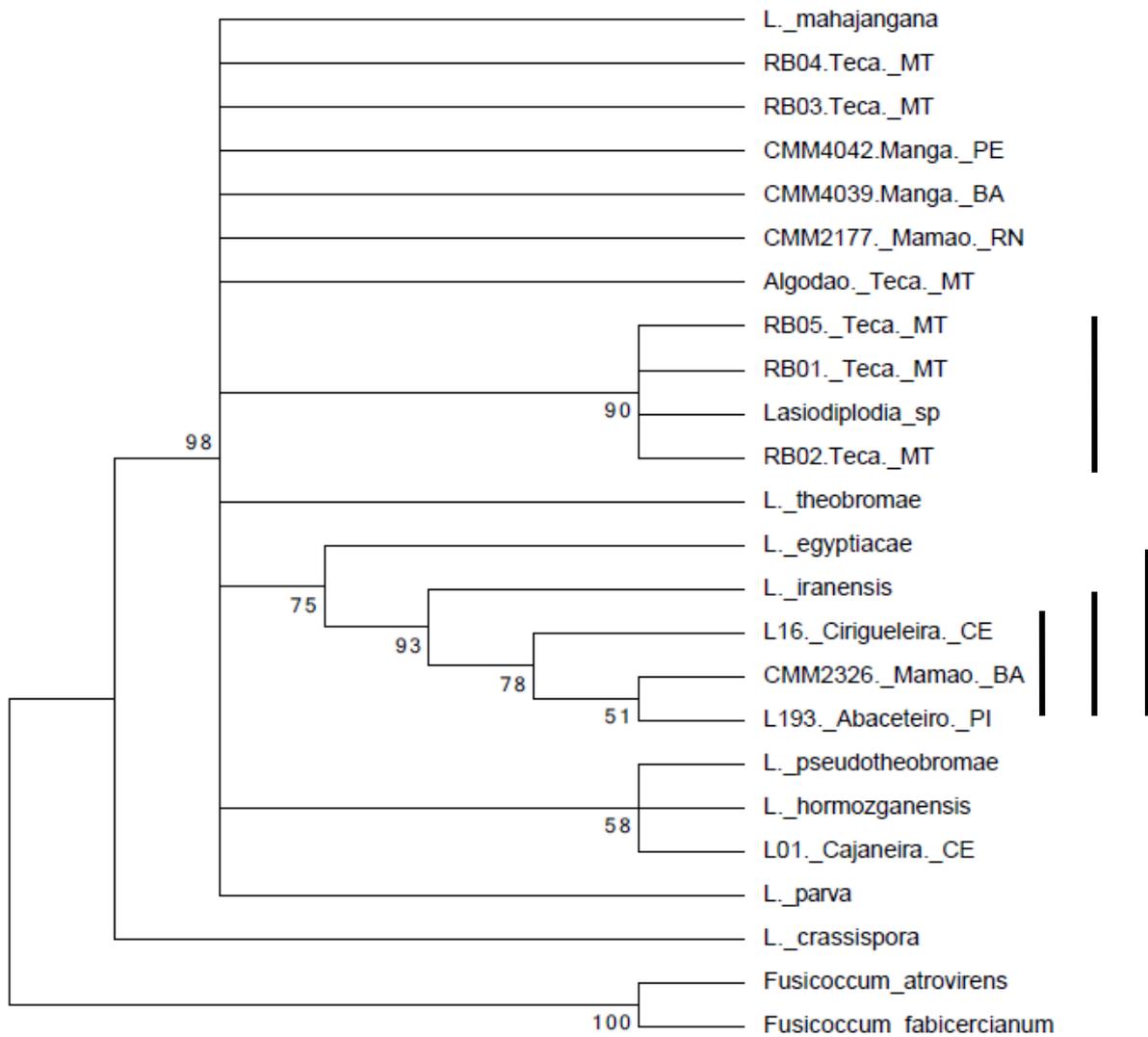
Os amplicons obtidos com os *primers* ITS1 e ITS4 produziram sequências de aproximadamente 500bp. Este segmento genômico foi alinhado com as sequências depositadas no GenBank. A análise de filogenia gerou uma árvore com apenas dois grupos (Figura 8). Os isolados de teca foram separados do grupo externo (*Fusicoccum atrovirens* e *F. fabicercianum*) com um valor de (100% bootstrap) e de *L. crassispora*, *L. pseudotheobromae*, *L. iranensis* e L193 com um valor de (85% bootstrap). A análise de parcimônia e máxima verossimilhança deixaram fora deste grupo os isolados de teca, *L. theobromae*, *L. viticola*, *L. parva* e *L. hormozganensis*.



**Figura 8-** Dendrograma filogenético máxima parcimônia da região ITS – 5.8S rDNA de 12 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do GeneBank.



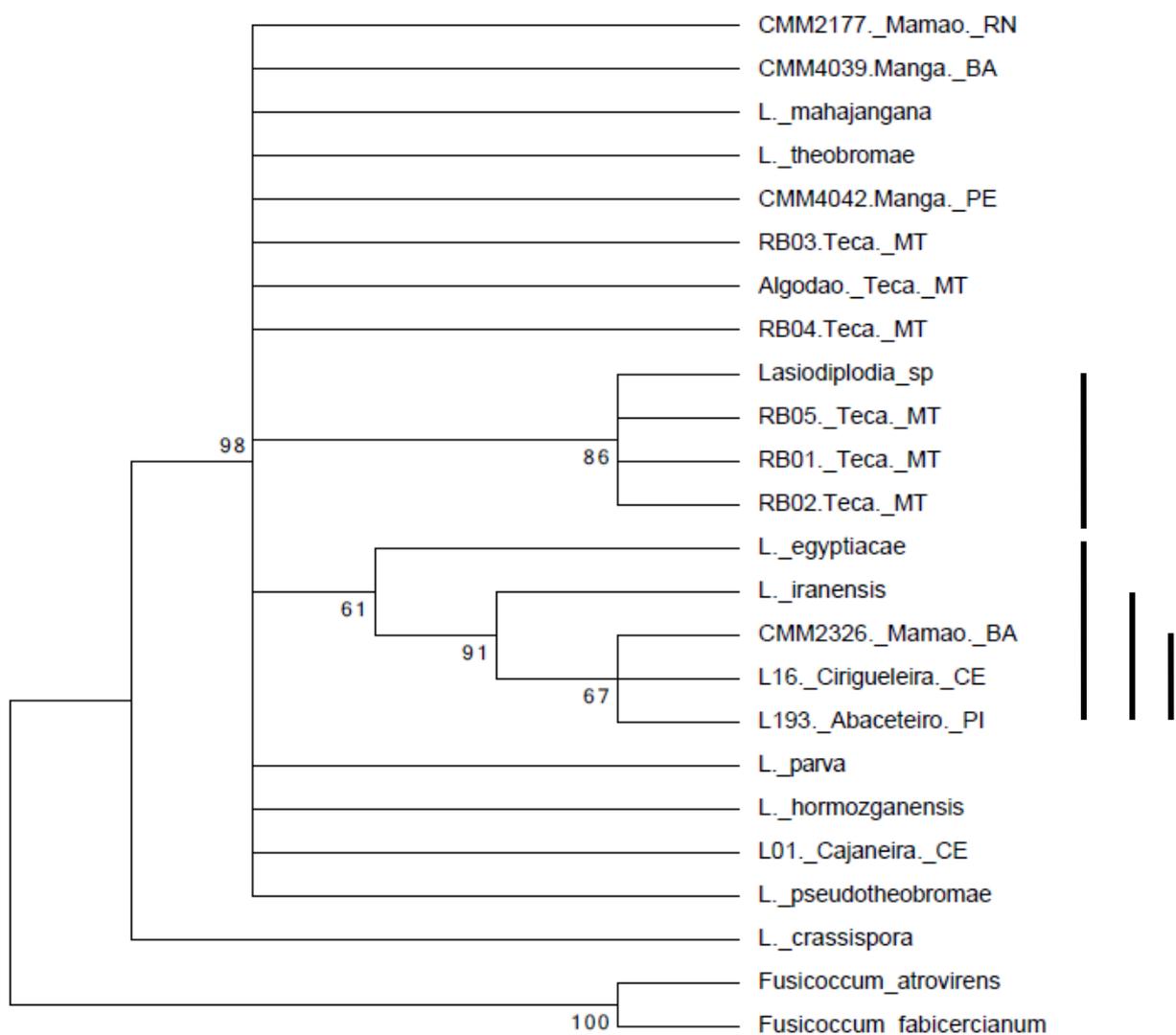
**Figura 9-** Dendograma filogenético máxima verossimilhança da região ITS – 5.8S rDNA de 12 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do GeneBank.



**Figura 10-** Dendograma máxima parcimônia da região EF1- $\alpha$  de 12 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do GeneBank.

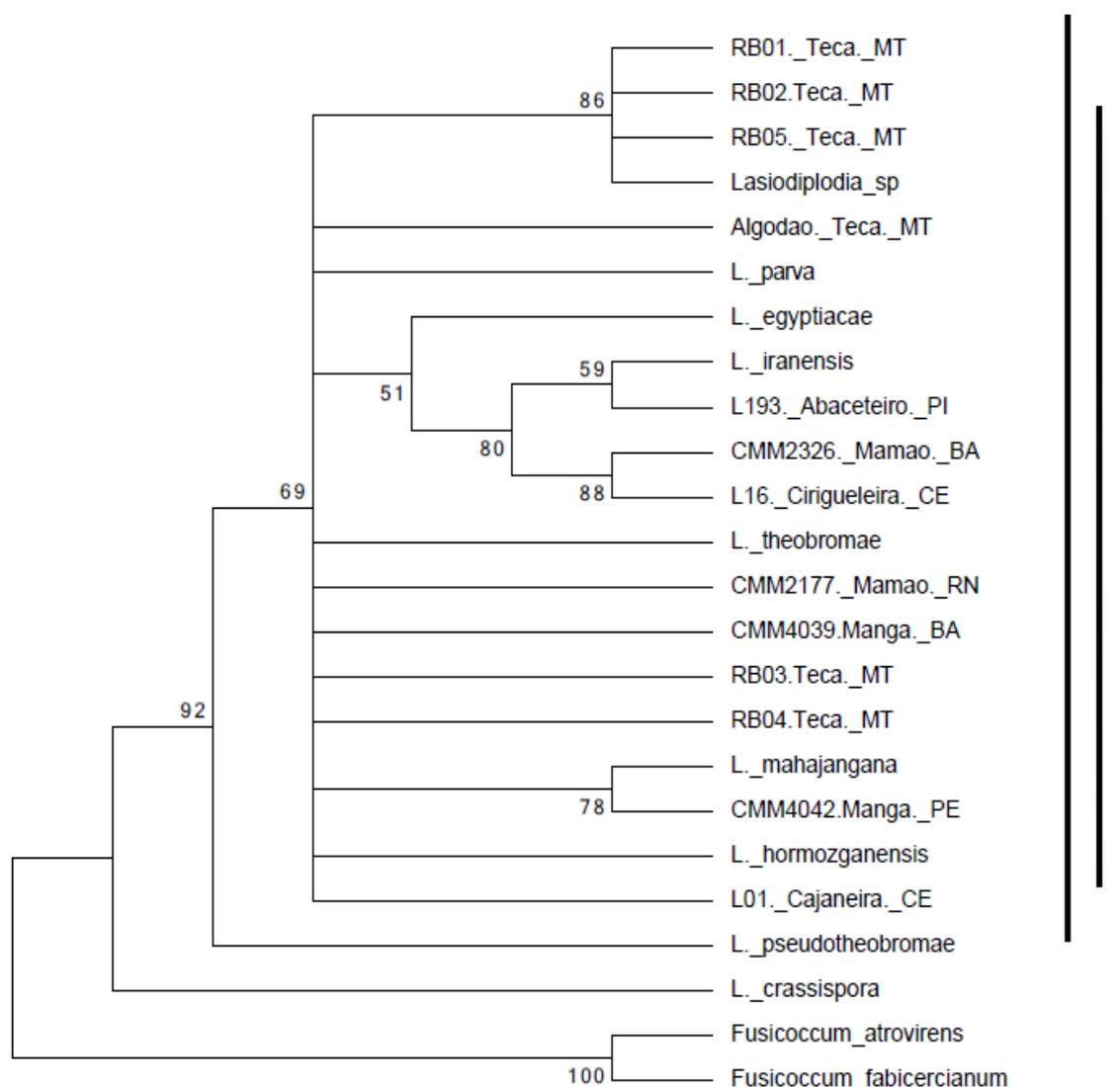
A análise do gene EF-1 $\alpha$  revelou-se mais informativa comparada à análise do gene ITS. De acordo com a figura 10, identificam 4 grupos. Os isolados RB05, RB01 e RB02 oriundos de teca, formado um grupo com (90% bootstrap) correspondente às sequências de *Lasiodiplodia* sp. O segundo (93% bootstrap), agrupando os isolados CMM2326, L16 e L193 correspondendo às seqüências *L. iranensis*.

De acordo com a Figura 9, identificam-se 3 grupos correspondentes, comparadas com sequências de espécies descritas e disponíveis no GenBank previamente identificadas. Os isolados RB05, RB01 e RB02 sendo estes oriundos de teca, formado um grupo com (86% *bootstrap*) correspondente às sequências de *Lasiodiplodia* sp. O segundo (91% *bootstrap*), agrupando os isolados CMM2326, L16 e L193 correspondendo às sequências *L. iranensis*. O terceiro (61% *bootstrap*), agrupando também os isolados CMM2326, L16 e L193 correspondendo às sequências *L. egyptiaceae* (93%). E por fim o quarto que agrupou os grupos externos do gênero *Fusicoccum* com (100% *bootstrap*).



**Figura 11-** Dendrograma filogenético máxima verossimilhança da região EF1- $\alpha$  de 12 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do Brasil, juntamente com sequências de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do GeneBank.

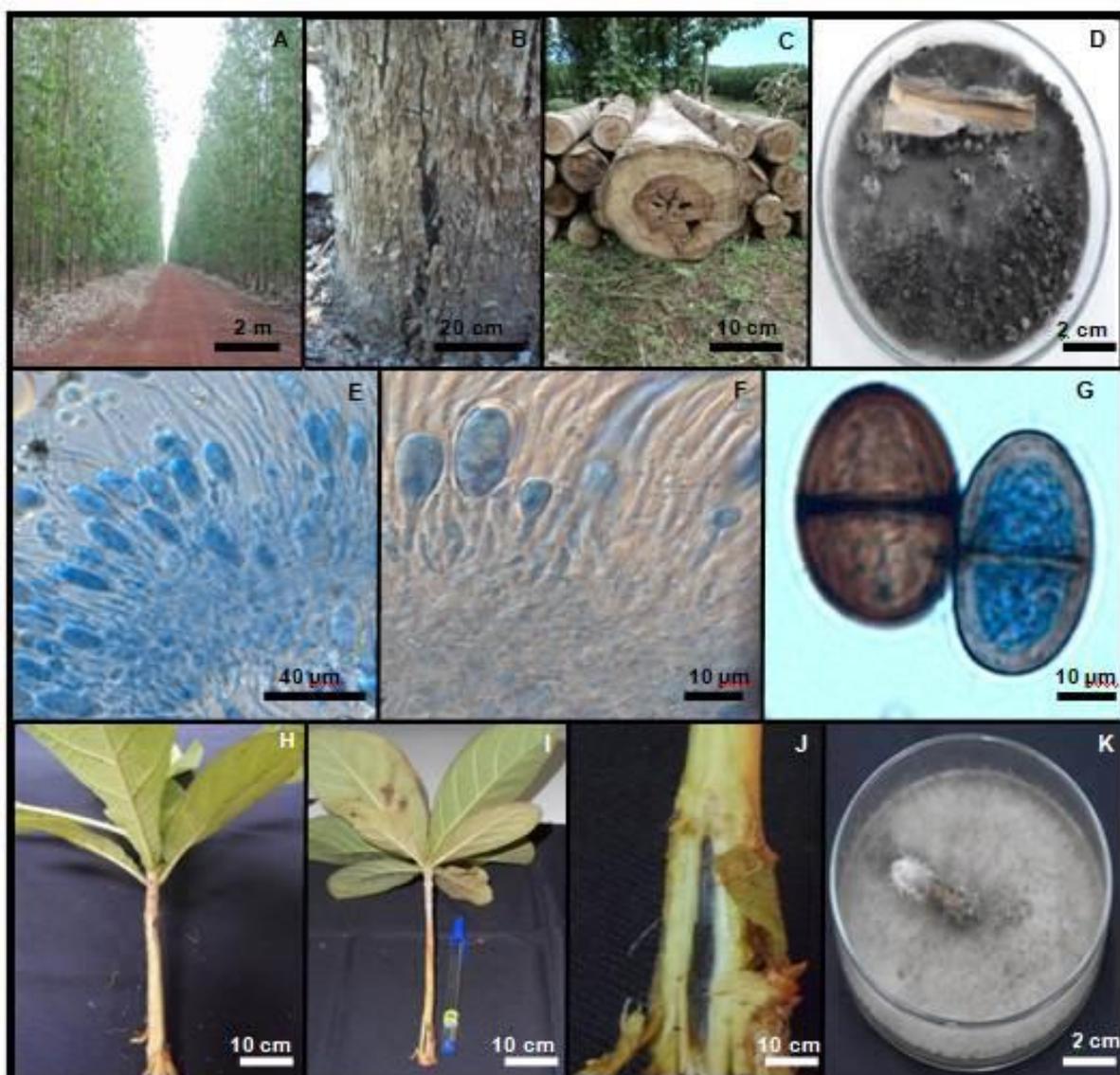
A análise dos dois conjuntos de dados concatenados gerou uma árvore mais consistente do que quando os dados são analisados isoladamente para o gene ITS e EF1- $\alpha$ , tanto para máxima parcimônia quanto para máxima verossimilhança. De acordo com a figura 10 as análises combinadas permitiu a locação de 4 grupos. Os isolados RB05, RB01 e RB02 sendo estes oriundos de teca, formado um grupo com (86% *bootstrap*) correspondente às sequências de *Lasiodiplodia* sp. O segundo (80% *bootstrap*), agrupando os isolados CMM2326, L16 e L193 correspondendo às sequências *L. iranensis*. O terceiro (51% *bootstrap*), agrupando também os isolados CMM2326, L16 e L193 correspondendo às sequências *L. egyptiaceae* (51%). E por fim o quarto que agrupou os grupos externos do gênero *Fusicoccum* com (100% *bootstrap*).



**Figura 12-** Dendrograma filogenético máxima verossimilhança das regiões ITS – 5.8S rDNA e EF1- $\alpha$  de 12 isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* provenientes do GeneBank.

## Caracterização patogênica dos isolados obtidos

Os isolados obtidos de fragmentos de tecido da madeira com sintomas de cancro cresceram em meio BDA, e apresentaram colônias com coloração acinzentada com formação de estromas (Figura 13 D). Os conidiomas estromáticos surgiram a partir do décimo segundo dia, com amadurecimento dos conídios após 25 dias. O fungo foi identificado como *L. theobromae* por apresentar as seguintes características: células conidiogênicas 4-7 x 1-2 µm hialinas (Figura 13 E, F e G), ampuliformes a lageniformes, anelídicas; conídios 23-29 x 13-15 µm, inicialmente hialinos, 0-septados (Figura 13 G), obovóides, parede dupla, delgada, tornando-se marrom-escuros, bicelulares, eusseptados, com parede espessa mostrando estrias longitudinais (Figura 13 G).



**Figura 13-** Povoamentos de *Tectona grandis* (A), fuste com sintomas, desprendimento da casca e rachaduras (B e C). Coloração da colônia e picnídios (D), células conidiogênicas (E,F). Conídios em transição e maduros (G). Testemunha sem sintomas de *Lasiodiplodia theobromae*.

Os resultados relativos à severidade da doença nos clones A, B e C inoculados com *L. theobromae* são apresentados na Tabela 3. Todos os clones inoculados com o fungo diferiram estatisticamente da testemunha, mostrando-se susceptíveis aos dois isolados estudados. O clone A, proveniente de plantas seminais, apresentou maior susceptibilidade aos dois isolados testados, seguido do clone B. O clone C, embora susceptível, foi o que apresentou menor grau de severidade de doença.

Os isolados RB01 e RB05 diferiram estatisticamente entre si, sendo que o primeiro, proveniente de material seminal, proporcionou maior severidade quando comparado ao isolado RB05.

Verificou-se interação significativa entre as variáveis clone e isolado, evidenciando assim, diferenças da severidade da doença (Tabela 4).

**Tabela 3-** Valores médios de notas de severidade de doença induzida por dois isolados de *L. theobromae* em três clones de teca, de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5 %

<b>Clones</b>			
<b>Testemunha</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
0.00 D	2.8 A	2.00 B	1.00 C
<b>Isolados</b>			
	<b>RB01</b>	<b>RB05</b>	
	1.75 A	1.18 B	

\* Médias seguidas pela mesma, não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 %

Todas as plantas de teca inoculadas com os isolados de *L. theobromae* mostraram sintomas claros da doença. O isolado RB01, proveniente de plantas seminais, proporcionou maior severidade aos dois clones testados (A e B). O isolado RB05 diferiu estatisticamente quando inoculado no clone A, apresentando-se mais

virulento a esse clone. Já o clone C mostrou-se mais resistente que os outros dois clones, independentemente do isolado inoculado.

**Tabela 4-** Desdobramento da interação significativa da análise de variância referente a três clones de teca (A, B e C) testados e dois isolados (RB01 e RB05) de *L. theobromae*, de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5 %

Clones	Isolados	
	RB01	RB05
Testemunha	0.0 cA	0.0 cA
A	3.00 aA	3.00 aA
B	3.00 aA	1.00 bB
C	1.00 bA	1.00 bA

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ao nível de 5 %

### Inoculação unidirecional

Todos os isolados de *L. theobromae* inoculados em plantas de teca diferiram estatisticamente entre si, em termos de virulência. Os isolados de mamão (CMM2177) e manga (CMM4042) proporcionaram maior severidade de doença quando inoculados no clone A de teca. O clone A exibiu queda de folhas, quando inoculados os isolados com ambos os isolados, ocasionalmente chegando à morte da planta. Esses dois tratamentos (isolados) não diferiram estatisticamente entre si (Figura 14), seguidos dos isolados RB04, RB05 originários de teca, L01 e L193.

Apenas os isolados RB02, L16, CMM2326 e CMM4039 proporcionaram menor severidade quando inoculados no clone A, não diferindo estatisticamente entre si. O clone A de teca foi susceptível a todos os isolados estudados.

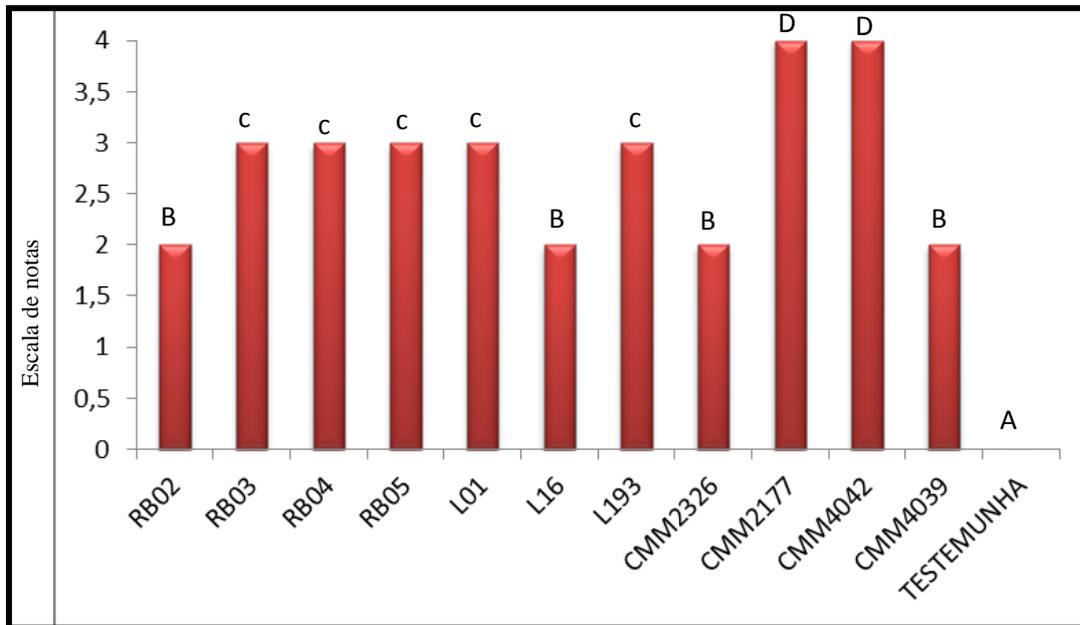


Figura 14- Severidade da doença cancro em plantas de teca inoculadas com onze isolados de *L. theobromae* oriundos de hospedeiras distintas inoculados no clone A de Teca.



Figura 15- Sintomas causados por *L. theobromae* em teca. Testemunha (A), Desprendimento do caule (B), Gomose (C), escurecimento dos vasos e cancro (D), escurecimento dos vasos e cancro (E), escurecimento dos vasos e cancro (F), escurecimento dos vasos e cancro (G), escurecimento dos vasos e cancro (H).

## Discussão

Povoamentos de teca foram visitados nas principais regiões produtoras do país, onde alguns indivíduos apresentavam sintomas de morte descendente e cancro no tronco, geralmente acompanhados de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos. Há relatos desses sintomas em teca e outras hospedeiras, associado ao fungo *L. theobromae*. Apesar de tal associação em outros países já ter sido mencionada na literatura, o agente causal do cancro da teca no Brasil era desconhecido. Após estudos morfoloculturais e moleculares este foi identificado, e sua ocorrência relatada em teca pela primeira vez no país.

O fungo foi identificado como *L. theobromae* por apresentar as seguintes características: células conidiogênicas 4-7 x 1-2 µm hialinas, ampuliformes a lageniformes, holoblásticas, às vezes com proliferação percorrente, portanto podendo ser anelídicas; conídios 23-29 x 13-15 µm, inicialmente hialinos, 0-septados, obovóides, parede dupla, delgada, tornando-se marrom-escuros, 1-septados, com estrias longitudinais e paredes espessas na maturidade.

A variação nas dimensões dos conídios de *L. theobromae* de isolados de teca é suportada por trabalhos realizados por Ribeiro (2003). Este autor observou que quando os isolados de *L. theobromae* são cultivados em meio BDA podem apresentar conídios medindo entre 18 e 30 µm de comprimento por 10 e 15 µm de largura.

As dimensões dos conídios de isolados de *L. theobromae* obtidos de mangueira estão de acordo com trabalho de Abdollahzadeh *et al.* (2010), cujos conídios apresentaram medidas variando entre (18-26) x (11-15) µm, como definido para a espécie.

Quando o isolado L193 (Abacateiro) foi comparado ao isolado L01 (Cajaraneira), o comprimento do isolado (L193) foi superior ao isolado de cajaraneira

(L01). Esse fato também pode ser observado no trabalho realizado por Melo *et al.* (2010), de acordo com o qual o isolado de mamoeiro (L198) apresentou dimensões superiores ao isolado de cajaraneira (L01).

Em relação às características culturais, observou-se que os meios que proporcionaram melhor crescimento micelial dos isolados do patógeno foram os meios V8, MEA e BDA. Embora o crescimento ótimo do patógeno tenha sido à temperatura de 35°C, o mesmo também se desenvolveu razoavelmente bem em temperaturas de 25 a 30°C. Estes resultados corroboram os obtidos por Oliveira *et al.* (2010), embora conduzido com meios diferentes, uma vez que foram observadas variações no crescimento micelial entre e até para um mesmo isolado de *L. theobromae*, ao serem submetidos a diferentes meios de cultura. Em relação à melhor temperatura de crescimento do patógeno, estes dados também corroboram os obtidos por Carvalho Dias *et al.* (1998), que verificaram que isolados desse patógeno foram favorecidos por temperatura entre 27 a 33°C. O fato de que altas temperaturas promoverem crescimento micelial de *L. theobromae* é muito significativo, considerando a localização dos plantios de teca quase sempre em regiões onde a maior parte do ano possui temperaturas elevadas. Os resultados obtidos neste trabalho trazem informações importantes em relação a fatores relacionados à epidemiologia da doença, a serem levados em conta principalmente na escolha de áreas desfavoráveis à doença para estabelecimento de cultivos de teca.

Embora todos os isolados estudados tenham sido identificados como *L. theobromae* de acordo com as características morfoculturais, quando os mesmo foram submetidos a análises filogenéticas das regiões ITS e EF1- $\alpha$  espécies diferentes foram sugeridas para o mesmo isolado com a mesma identidade de nucleotídeos. Por isso, a utilização dessas duas regiões para estudo filogenético de *L. theobromae* não foi

suficiente para agrupar corretamente os isolados, sendo necessária a utilização de outros genes menos conservados para obter a real identidade destes isolados. Algumas espécies fúngicas como *L. theobromae* apresentam grande dificuldade de distinção com alto grau de confiança, quando se considera apenas um gene, por isso a utilização de vários genes tem auxiliado na identificação dessas espécies (De wet *et al.*, 2003; Slippers *et al.*, 2004a; Alves *et al.*, 2008). De acordo com Pavlic *et al.* (2007) em estudos realizados com duas espécies da família Botryosphaeriaceae, não foi possível identificar as duas espécies com apenas com um gene e foi necessário então a utilização combinada das três regiões ITS, EF-1 $\alpha$  e  $\beta$ -tubulin, o que aumentou a confiabilidade dos resultados obtidos. Estudos realizados por Van Der Linde *et al.* (2011) corroboram com Pavlic, mostrando que análises filogenéticas de espécies de *Lasiodiplodia* associadas a *Euphorbia* utilizando as regiões ITS e TEF-1 $\alpha$ , apresentaram baixa resolução no clado. Assim, a análise das duas regiões revelou poucas diferenças entre os isolados, mais uma vez sendo necessária a inclusão de outras regiões do genoma para confirmação dos resultados.

Os resultados obtidos com o postulado de Koch confirmaram a patogenicidade de *L. theobromae*, portanto, este se confirma como agente causal do cancro da teca. Após inoculação de dois isolados da espécie em três clones houve diferença de susceptibilidade entre os mesmo e dois destes apresentaram alta susceptibilidade.

Verificou-se variação na severidade de doença, tanto com isolados coletados em teca como com aqueles provenientes de outras hospedeiras, nos estudos de patogenicidade. Estes últimos proporcionaram maior severidade de doença em clones de teca, que os de outras hospedeiras. Os resultados obtidos neste trabalho assemelham-se aos obtidos com isolados do mesmo patógeno, de diferentes hospedeiras e inoculados na mesma espécie vegetal, por Pereira *et al.* (2006) e Ram (1993). Tais diferenças entre

isolados do patógeno podem ser explicadas por fatores externos, como condições edafoclimáticas das regiões de procedência e forma de propagação da hospedeira, como também por fatores internos, relacionados às características genética da planta e do patógeno (Pereira *et al.*, 2006 & Ram 1993).

De fato, em estudos realizados por Mohali *et al.* (2005), com árvores tropicais, não foi verificada especificidade de *L. theobromae* com relação a espécie hospedeira. Pereira *et al.* (2006) observou com isolados de maracujazeiro, variação em níveis de patogenicidade em três isolados, mesmo estes sendo tendo sido coletados na mesma área de geográfica.

## Conclusões

O fungo *L. theobromae* é o agente causal do cancro da teca.

Os meios V8, MEA e BDA promovem o melhor crescimento micelial de *L. theobromae*.

O fungo *L. theobromae* é capaz de se desenvolver em temperaturas de 25°, 30 e 35°C, embora tenha seu crescimento favorecido na temperatura mais elevadas (35°C).

As regiões ITS e TEF não são suficientes para caracterizar molecularmente e identificar de forma precisa os isolados de *L. theobromae*.

Alguns isolados oriundos de distintas hospedeiras são mais agressivos em mudas de teca que isolados oriundo da própria espécie.

Os isolados de *L. theobromae* estudados apresentam ou isolados oriundos de materiais propagativos distintos, ou isolados oriundos de materiais propagativos distintos, variação patogênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI GOLTAPPEH, E.; ZARE, R.; Phillips, A.J. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- ALVES, A., CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.
- ARGUEDAS, M. 2004. La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica. *Kurú: Revista Forestal* 1:1-16.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-8.
- CARBONE I, KOHN, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O.; SÁ, F.T. 1998. Disseminação e controle de resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copa. *Fitopatologia Brasileira* 23:48-50.
- CARVALHO DIAS, M. S.; CHALFOUN DE SOUZA, S. M.; PEREIRA, A. F.1998. Principais doenças da videira. *Inf. Agropecuário. Belo Horizonte* 19:76 - 84.
- DE WET, J., BURGESS, T., SLIPPERS, B., PREISIG, O., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycol. Res.* 107, 557–566.
- FERREIRA, D.F. 2007. Sisvar versão 5.0. Departamento de Ciências Exatas. Ufla, Lavras-MG.
- FIGUEIREDO, E.O.; Oliveira, L.C.; Barbosa, L.K.F.2005. Teca (*Tectona grandis* L.f.): Principais Perguntas do Futuro empreendedor Florestal. Embrapa Acre p87.
- FIRMINO, A.C.; TOZZE JR H.J.; FURTADO, E.L. 2012. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. *New Disease Reports* 25, 24.

GOH, K.S.; MONTEUUIS, O. 2005. Rationale for developing intensive teak clonal plantations, with special reference to Sabah. Bois et Forêts des Tropiques, Nogent-Sur-Marne 285: 5-515.

MAGUIRE, J. D. 1962. Speed of germination-aido in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. Crop Science, Madison 2:176-177.

MELO, J.G.M.; LIMA, J.S.; CARDOSO, J.E. 2010. Morfologia de esporos de *Lasiodiplodia theobromae* associado a diferentes hospedeiros. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 6., 2010, DF. Anais. Brasília p238.

MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. 2005. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. Mycological Research, Cambridge 10:405-413.

OLIVEIRA LINS, S.R.; ALVES, E.; OLIVEIRA, S.M.A. 2010. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira caracterização morfológica de isolados do patógeno. Acta Microscopica 19:221-231.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J. 2007. *Botryosphaeriaceae* occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathology 56:624-636.

PEREIRA, A.L.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. 2006. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Fitopatologia Brasileira 31:572-578.

PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97:513-529.

RAM, C. 1993. Efeito de fungicidas aplicados em mistura sobre incidência da queimadasfolhas e produção do coqueiro. Fitopatologia Brasileira 18:264.

RIBEIRO, I.J.A. 2003. Doenças e pragas. IN: Pommer, CV Uva. Tecnologia de produção, Pós-colheita, Mercado. Porto Alegre 525-568.

SLIPPERS, B., CROUS, P.W., DENMAN, S., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia 96:83-101.

VAN DER LINDE, J. A.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. 2011. *Lasiodiplodia species* associated with dying *Euphorbia ingens* in South Africa, Southern Forests: a Journal of

Forest Science. 165-173

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal *RNA* genes for *phylogenetics*. In PCR Protocols : A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White). pp. 315-322.

ZHOU, S.; STANOSZ, G.R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* Species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia*, New York 93:516-527.

## **CAPÍTULO 3**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Lasiodiplodia theobromae*.**

## RESUMO

A cultura da teca vem se expandindo em relação a número de áreas plantadas no Brasil, principalmente nos estados do Mato Grosso e do Pará, onde estão localizadas os maiores plantios. Entretanto, a ocorrência do cancro da teca causado pelo o fungo *Lasiodiplodia theobromae* tem promovido grandes perdas nos povoamentos de teca. Os conhecimentos básicos da biologia populacional, constituição genética e interação patógeno-hospedeiro são de suma importância para tomadas de decisão sobre estratégias de controle. Esse estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de isolados de *L. theobromae* coletados em diferentes regiões do Brasil por meio do uso de marcadores moleculares do tipo (RAPD). Foram estudados 21 isolados de *L. theobromae*, sendo alguns oriundos de outros hospedeiros distintos da teca. Amostras de DNA extraído dos isolados foram submetidas à amplificação por PCR. Reações de RAPD foram realizadas utilizando-se *primers* randômicos. A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Com essa matriz, no ambiente estatístico R, calcularam-se as distâncias genéticas de Jaccard, a partir das quais foi gerado um dendrograma, utilizando o método UPGMA. Formaram-se 4 grupos, e 14 subgrupos, demonstrando uma alta variabilidade dentro desses subgrupos analisados. A similaridade dos isolados variou de 50% a 100% de similaridade. Os isolados que apresentaram 100% de similaridade são os oriundos de teca.

## **ABSTRACT**

The teak crop has been expanding in terms of the number of areas planted in Brazil, especially in the states of Mato Grosso and Pará, where the largest plantations are situated. However, the occurrence of teak canker caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* has triggered major losses in teak-planting districts. Basic knowledge of the population biology, genetic constitution and pathogen-host interaction is of vital importance in taking decisions on control strategies. This study aimed to analyze the genetic diversity of isolates of *L. theobromae* collected in different regions of Brazil by means of RAPD molecular markers. Twenty-one isolates of *L. theobromae* were studied, of which some came from non-teak hosts. Samples of DNA extracted from the isolates were submitted to PCR amplification. RAPD reactions were carried out using random primers. From gel readings a binary matrix was constructed, in which the individuals were genotyped for presence (1) and absence (0) of bands. With this matrix, in the statistical environment R, the Jaccard genetic distances were calculated, and from these a dendrogram was generated using the UPGMA method. Four groups and 14 subgroups were formed, demonstrating high variability within the subgroups analyzed. The similarity between isolates varied from 50% to 100%. The isolates that presented 100% similarity originate from teak.

## Introdução

Diversas espécies de *Lasiodiplodia* infectam um grande número de hospedeiras em diferentes famílias botânicas. Trata-se de um fungo cosmopolita, polífago e oportunista, com reduzida especialização patogênica que ocorre em regiões tropicais e temperadas, causando os mais variados sintomas (Punithalingam, 1980). A crescente expansão das doenças causadas por espécies desse gênero provoca perdas inestimáveis, representando uma ameaça a inúmeras culturas. O estudo da variabilidade genética do patógeno pode subsidiar em programas de melhoramento genético visando ao controle da enfermidade.

O uso de marcadores RAPD constitui-se em técnica amplamente utilizada na caracterização da diversidade genética de diferentes tipos de organismos, inclusive fungos fitopatogênicos (Goodwin *et al.*, 2003), sendo úteis também em estudos de populações e mapeamento de genes (Kumar *et al.*, 2006; Collard & Mackill, 2008).

A técnica de marcadores RAPD envolve a amplificação de regiões análogas dispersas pelo genoma, com a utilização de *primer* curto capaz de se anelar em diferentes locais no DNA genômico, gerando grande quantidade de fragmentos polimórficos (Fungaro, 2000). Essa técnica é simples e rápida na obtenção dos resultados se comparada com outras técnicas usadas com o mesmo objetivo, como é RFLP, baseada na hibridização de DNA.

Resultados satisfatórios envolvendo RAPD de fungos são comuns na literatura, principalmente para espécies de *Fusarium*. Essa técnica foi eficientemente utilizada para estimar a variabilidade genética de *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (Kuramae & Souza 2002). Poucos trabalhos de diversidade genética têm sido realizados com *L. theobromae*, e alguns resultados com *Botryosphaeria* spp. e seus anamorfos

(Barnes *et al.*, 2001;. Zhou *et al.*, 2001;. Burgess *et al.*, 2003) foram obtidos, pelo uso de marcador molecular RAPD (Mohali *et al.*, 2005).

Face ao que foi dito, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética de isolados de *L. theobromae* coletados em diferentes regiões do Brasil pelo uso de marcadores moleculares do tipo RAPD.

## **Material e Métodos**

### **Coleta de material e isolamento de *L. theobromae***

Foram realizadas coletas de isolado em plantios de teca nos Estados de Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás. Plantas com sintomas de cancro foram derrubadas, e coletados discos de madeira apresentado escurecimento vascular. Também foram utilizados, neste estudo, isolados procedentes de outras áreas geográficas e de outras hospedeiras (Figura 16). Os pontos de coleta dos isolados estão citados na Tabela 1.



**Figura 16-** Mapa de distribuição dos estados em que foram coletados os isolados de *L. theobromae*

Para isolamento do patógeno, fragmentos do material coletado foram submetidos a uma desinfestação seriada com álcool 70% durante 1 minuto, seguido de submersão em hipoclorito de sódio a 2% durante 1 minuto e dupla lavagem em água destilada por 1 minuto. Os fragmentos assim desinfestados foram secos em papel de filtro estéril e depositados sobre placas de Petri, contendo meio ágar-água 2% (AA), e mantidos durante 3 dias sob fotoperíodo de 12h a  $\pm 25$  °C. Assim que os primeiros sinais de micélio apareceram, discos de colônias 0,5 mm foram transferidos para placas

de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram mantidas, também nas mesmas condições de incubação.

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas do isolamento foram lavadas com uma alíquota de 10 mL de solução salina (500 mL de água destilada + 4,25 g de NaCl) autoclavada, logo em seguida retirou-se uma alíquota de 1mL de suspensão de esporos, a qual foi transferida para tubos contendo 9 mL de solução salina, realizando-se “*a posteriori*” uma diluição seriada e as concentrações das suspensões de esporos foram padronizadas para aproximadamente  $10^2$  esporos/mL. Foi depositado 0,1 mL dessa suspensão de esporos em placas contendo o BDA acrescido de 0,005% de cloranfenicol. Através de visualização em lupa estereoscópica de 40 X, os esporos foram individualmente transferidos para BDA, visando com isso à obtenção de colônias monospóricas.

### **Extração de DNA**

Foi utilizado o método de extração CTAB com pH 11,0 (Boiteux *et al.* 1999). Pequena quantidade de micélio foi macerada em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 750µl de Tampão CTAB (2% de CATB; 100mM de Tris-HCl; pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol). A maceração foi realizada em dois ciclos de 30 seg a 2000 rpm em agitador (Precellys – Bertin Technologies). Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura de 65°C por 10 min e, então, retirados do banho Maria e deixados ao ar livre por 3 minutos. Adicionaram-se 750 µl de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) antes de se agitar vigorosamente em vórtex. Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 9.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foram adicionados 300µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 min para precipitação do DNA.

Após este período os tubos foram centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm para a precipitação do DNA genômico. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400µl de etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 200µl TE (Tampão de extração), permanecendo depois por cerca de 12 horas em refrigerador a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Após a extração do DNA genômico a concentração foi determinada com a utilização de um espectrofotômetro (NANODROP®) e a concentração ajustada para 50 ng/µl.

### **Reações de RAPD**

O DNA extraído foi utilizado nas reações de RAPD, seguindo Shah (2010) em seus estudos de diversidade genética de *L. theobromae*.

Nas reações de RAPD realizadas, utilizaram-se os *primers* randômicos de acordo com a Figura 17, provenientes dos *kits* da Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) mostrados na Tabela 5.

As reações apresentaram um volume final de 12,5 µL contendo 2 µl de DNA (90 ng/µL), 1,25 de tampão 10x 0,5 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM de cada), 0,6µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5u/µl *Invitrogen® Life Technologies*), e água ultrapura para completar o volume final da reação. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems), iniciando-se por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 37°C, 2 minutos a 72°C, com extensão final de 7 minutos a 72°C. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4°C.

**Tabela 5-** Sequência dos *primers* testados nas reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de *L. theobromae*.

Primer	Sequência do primer (5' para 3')	Temperatura de anelamento
OPA-01	CAGGCCCTTC	37°C
OPA-02	TGCCGAGCTG	37°C
OPA-4	AATCGGGCTG	37°C
OPA-5	AGGGGTCTTG	37°C
OPA-07	GAAACGGTG	37°C
OPA-08	GTGACGTAGG	37°C
OPA-9	GGGTAACGCC	37°C
OPA-10	GTGATCGCAG	37°C
S111	CTTTCCGCAGT	37°C
S116	TCTCAGCTGG	37°C

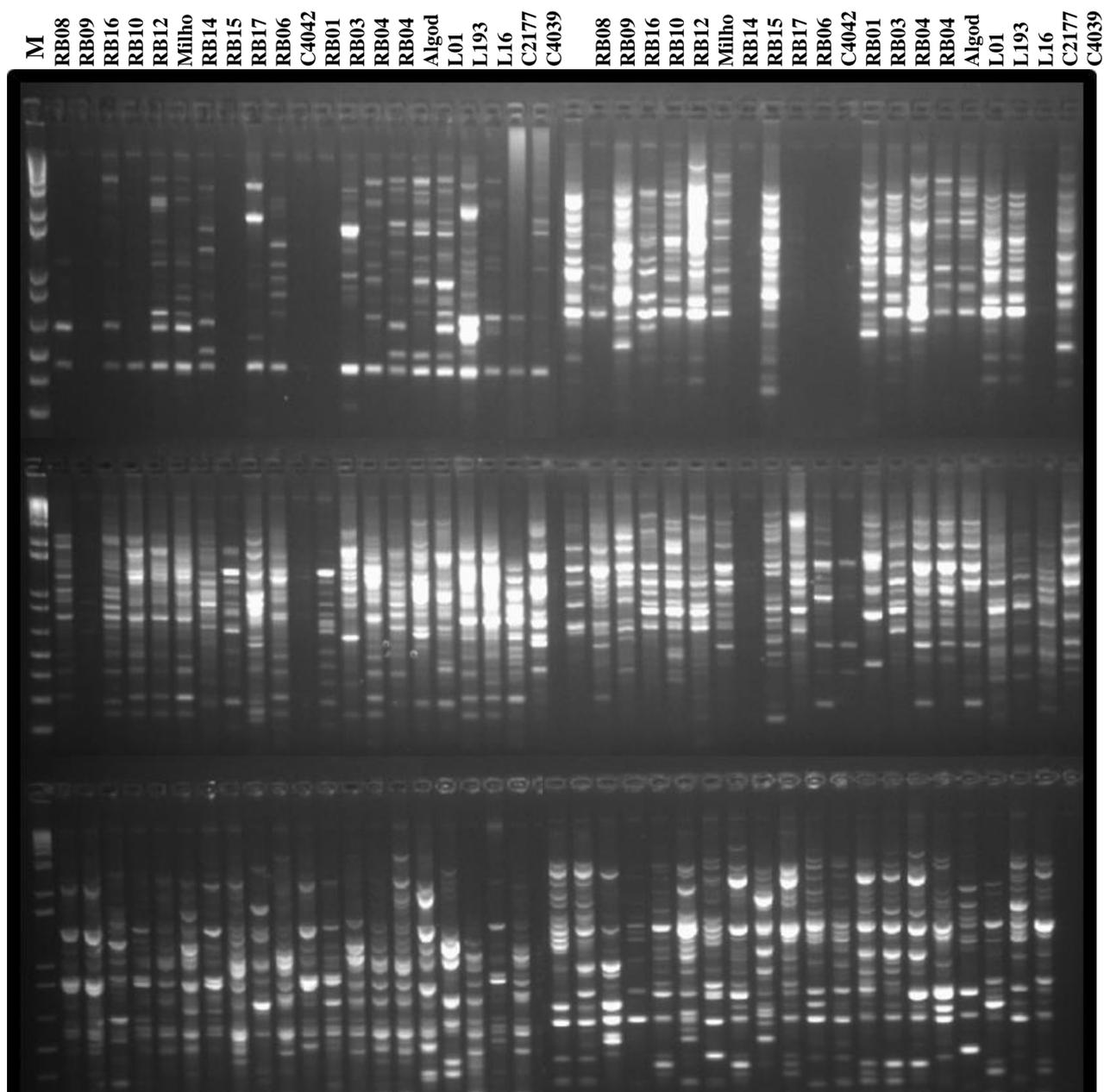
Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm) em sistema de vídeo Eagle Eye® (Stratagene).

### **Análises de bioinformática**

A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. Com essa matriz, no ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2012), calcularam-se as distâncias genéticas de Jaccard, em que valores mais próximos de zero (0) indicam indivíduos aparentados e, valores mais próximos de um (1), indicam indivíduos menos aparentados (Jacard, 1901). Com base nessa matriz de distâncias, foi produzido um dendrograma, utilizando o método UPGMA. Por fim, obteve-se a correlação entre a matriz e o dendrograma gerados.

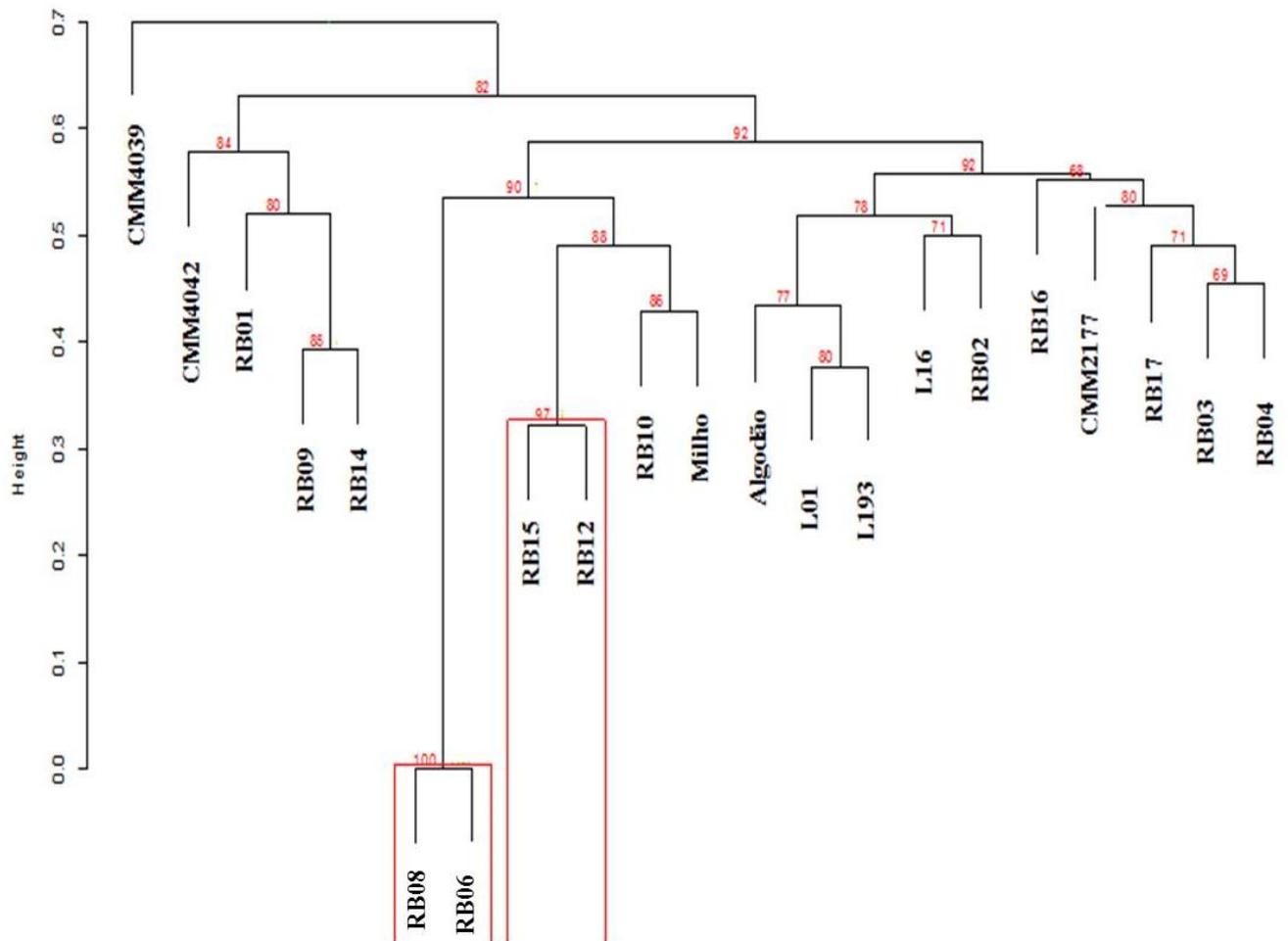
## Resultados

Com os dados moleculares obtidos através de marcadores RAPD, foi possível diferenciar os 21 isolados de *L. theobromae* em quatro grupos distintos (Figura 17).



**Figura 17-** Perfil de amplicons RAPD de isolados de *L. theobromae*, obtido por meio dos seguintes *primers* (Operon Technologies, EUA): (A) OPA1; (B) OPA2 (C) OPA4; (D) OPA5; (E) OPA9 e (E) OPA10. Os nomes na vertical correspondem aos isolados avaliados e a letra “M” indica o marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Invitrogen™).

No grupo I, constituído pelo isolado CMM4039 verificou-se maior distância genética em relação aos demais, não agrupando especificamente com nenhum outro isolado. A similaridade genética estimada do isolado do grupo I foi superior a 70%, sendo observada uma tendência de maior similaridade entre os isolados provenientes de locais mais próximos (Figura 18).



**Figura 18-** Dendrograma de 21 isolados de *L. theobromae*, com base nos dados de RAPD, utilizando o método de UPGMA. Dendrograma baseado nos valores de similaridade obtidos.

No grupo II, verificou-se a existência de três subgrupos, sendo que o isolado CMM4042 mostrou índice de similaridade de 60% em relação ao isolado CMM4039, apesar desses dois isolados terem sido coletados em estados diferentes, sendo o primeiro coletado no Estado da Bahia e o segundo em Pernambuco, ambos obtidos de mangueira. E os dois outros subgrupos apesar de ambos terem sido obtidos de teca, o isolado RB01 com índice de similaridade de 50% em relação a dois isolados mais próximos (RB09 e RB14), ficou como subgrupo separado. O isolado RB01 foi coletado no município de Jangada-MT e os outros dois isolados RB09 e RB14 que se agruparam em um terceiro subgrupo com índice de similaridade 40%, foram coletados na mesma região Cáceres-MT, porém em regiões diferentes dos outros isolados.

No grupo III, verificou-se a existência de três subgrupos, o primeiro contendo os isolados RB06 e RB08, coletados em regiões distintas (o primeiro coletado no município de Cáceres-MT e o outro no município de Jangada-MT), apesar de apresentarem 100% de similaridade indicando que eles são completamente iguais. Observa-se que o isolado RB06 é de origem vegetativa clonal e o RB08 é de origem vegetativa seminal. Os isolados RB12 e RB15 agruparam-se juntamente com 87% de similaridade, apesar de terem sido coletados em regiões completamente distantes (RB12 foi coletado em Rosário Oeste-MT e RB15 em Unaí-MG). Enfatiza-se que esses dois isolados apresentam semelhança quanto ao método de propagação da teca, que foi clonal. Finalmente, o terceiro subgrupo constituído pelos isolados RB10 e o de milho, com 45% de similaridade, apesar de seus hospedeiros distintos.

No grupo IV, com oito subgrupos, o isolado de algodão agrupou-se isoladamente, porém com 50% de similaridade em relação aos isolados L01 e L193. Esses três são oriundos de regiões e hospedeiras completamente diferentes (o de algodão é oriundo de Brasília-DF; L01, de cajaneira, de Fortaleza-CE; e L193 de

abacateiro, coletado em Pio IX-PI). O isolado L16 e RB02, apesar de serem completamente diferentes em termos de hospedeira e origem geográfica, agruparam-se juntos com 50% de similaridade. O isolado RB17, coletado em Água-Boa-MT (plantas de teca propagadas por sementes), agrupou-se sozinho com 60% de similaridade e, portanto, distante dos isolados RB03 e RB04, também de origem seminal. O isolado CMM2177 oriundo de mamão, coletado em São José do Mapitu-RN, também se agrupou sozinho com 60% de similaridade em relação ao RB17, da mesma forma que o isolado RB16 (coletado em Morrinhos-GO), em relação ao CMM2177, com 60% de similaridade. Os isolados RB03 e RB04 agruparam-se juntamente com 50% de similaridade em relação ao RB17. Apesar de terem sido coletados em regiões diferente do Estado do Mato Grosso, ambos são oriundos de plantas de teca propagadas de forma clonal.

## Discussão

A análise por meio de RAPD mostrou a alta diversidade dos isolados analisados. De acordo com os resultados obtidos pôde-se verificar que não ocorreu uma correlação geográfica, visto que isolados de uma mesma microrregião se posicionaram em grupos distintos, assim como isolados de regiões distintas se posicionaram dentro de um mesmo grupo. Da mesma forma, Castro (2007) estudando isolados de *Fusarium oxysporum* em helicônia não conseguiu relacionar os isolados com as áreas de coletas, atribuindo essa complexidade a alta diversidade apresentada pelo patógeno, podendo também ser este o caso.

A alta diversidade resultante dos dados encontrados nesse trabalho pode estar correlacionada com fatores de patogenicidade intrínscas aos isolados. Vale mencionar que aqueles oriundos de hospedeiros diferentes de teca apresentam sintomas diferentes, mostrando também diferenças em seu potencial patogênico. Estes resultados obtidos corroboram estudos realizados por diferentes autores com isolados de *L. theobromae* de diversos hospedeiros, nos quais é relatada a variabilidade entre os isolados quanto aos aspectos morfológicos e patogênicos (Sabalpara *et al.*, 1991;. Cedeno *et al.*, 1995;. Ko *et al.*, 2004;. Mali *et al.*, 2005). Já Burgues *et al.* (2003) trabalhando com isolados de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* spp. observaram que os hospedeiros são mais importantes do que a localização geográfica na determinação da diversidade genética de isolados de *L. theobromae*. Mohali *et al.* (2005), trabalhando obtiveram resultados semelhantes aos aqui relatados, ou seja, observaram uma baixa diversidade genética dos isolados em relação a origem, porém um fluxo de genes muito elevado quando os isolados de diferentes hospedeiros foram comparados.

A variação dos isolados dentro do mesmo ecossistema ou ecossistemas diferentes pode estar relacionada à dispersão da teca e dos outros hospedeiros estudados

a partir dos centros de origem. Esse fato decorrente da alteração de ambiente pode ser interpretado como uma co-evolução entre fungo e hospedeiro, influenciada pelas condições adversas do ambiente. De acordo com estudos realizados por Farias (2008), estudando a diversidade genética de isolados de *L. theobromae* em cajueiro, houve uma menor variação genética dos isolados advindos do ecossistema semi-árido (>50% de similaridade) em relação ao ecossistema cerrado <30% e litoral <20%, podendo ser consequência da transmigração do cajueiro cultivado, possivelmente no sentido sertão, cerrado e litoral.

## **Conclusões**

Em síntese, o sistema RAPD é eficaz para mostrar o relacionamento genético dos isolados de *L. theobromae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, I.; GAUR, A.; BURGESS, T.; ROUX, J. 2001. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Mol. Plant Pathol.* 2: 319-325.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-8.

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

CASTRO, N.R. Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética. 2007. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil.

CEDENO, L.; CARRERO, C.; MOHALI, S.; PALACIOS-PRU, E. 1995. Identification regressive death in perchita caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 8: 11-14.

COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. 2008. Marker assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc. Lond. Biol. Sci.* 363:557-572.

FARIAS, F.C. 2008. Detecção da Diversidade e Associação de *Lasiodiplodia theobromae* com cajueiro utilizando marcadores microssatélites. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.

FUNGARO, M.H.P. 2000. PCR na micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 14:12-16.

GOODWIN, P. H.; KIRKPATRICK, B. C.; DUNIWAY, J. M. Cloned DNA probes for the identification of *Phytophthora parasitica*. In: FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S. S. 2003. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 28:312-315.

JACCARD, P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura", *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37: 547-579.

- KO, W.H.; WANG, I.T.; ANN, P.J. 2004. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal agent of kumquat dieback in Taiwan. Plant Dis. 88: 1383.
- KUMAR, B.H.; SHANKAR, U.A.C.; KINI, R.K.; PRAKASH, S.H.; SHETTY, S.H. 2006. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense isolates based on random amplified polymorphic DNA and intergenic spacer. Archives of Phytopathology and Plant Protection 39:151-160.
- KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. 2002. Variabilidade genética entre formas especiais de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. Acta Scientiarum 24:1481-1485.
- MALI, B.L.; SHAH, R.; BHATNAGAR, M.K. 2005. A new host record of *Lasiodiplodia theobromae*. J. Mycol. Plant Pathol. 35: 70-72.
- MOHALI, S.; BURGESS, T.; WINGFIELD, M.J. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. Forest Path. 35: 385-396.
- PUNITHALINGAM, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. Vaduz: Pat. J. Cramer p123.
- R Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- SABALPARA, A.N.; VALA, D.G.; SOLANKY, K.U. 1991. Morphological variation in *Botryodiplodia theobromae* Pat. causing twig blight and dieback of mango. Acta Hort. 291: 312-316.
- ZHOU, S.; STANOSZ, G.R. 2001. Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. Mycol. Res. 105:1033-1044.

## Conclusões Gerais

- ✓ Em vista dos estudos morfológicos realizados, o fungo *L. theobromae* se confirma como agente causal do cancro da teca.
- ✓ O fungo *L. theobromae* apresenta comportamentos diferentes em relação ao seu crescimento micelial quando submetidos a diferentes temperaturas e meios de cultura.
- ✓ Os isolados do fungo *L. theobromae* apresentaram diferentes níveis de virulência quando inoculados em clones de Teca.
- ✓ Os polimorfismos revelados pelas análises moleculares das regiões ITS e TEF poderão ser utilizados para o agrupamento dos isolados com espécies reconhecidas de *Lasiodiplodia* em análises mais detalhadas destas regiões.
- ✓ O sistema RAPD é capaz de detectar polimorfismo nos isolados de *L. theobromae* estudados.