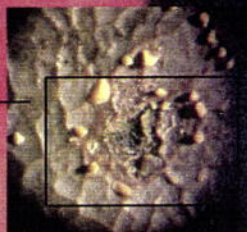


ESTUDOS DA BIODIVERSIDADE DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM spp., QUE AFECTAM A CULTURA DO CAJUEIRO, NO NORDESTE BRASILEIRO, POR TÉCNICAS BIOMOLECULARES.



Autor: Matilde Cristina Cardeira Piteira

Orientador: Prof. Catedrática Maria Ivone Esteves da Clara

Co-Orientador: Dr. José Emilson Cardoso



“Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

Évora - 2008

ESTUDOS DA BIODIVERSIDADE DE ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM spp., QUE AFECTAM A CULTURA DO CAJUEIRO, NO NORDESTE BRASILEIRO, POR TÉCNICAS BIOMOLECULARES.

Autor: Matilde Cristina Carneira Piteira

Orientador: Prof. Catedrática Maria Ivone Esteves da Clara

Co-Orientador: Prof. Dr. José Emilson Cardoso



U.E Serviços Académicos	N. <u>GD/24363</u>
<u>12/11/08</u>	Sector:
<u>Filomena</u>	<u>DEPE</u>

168 663

“Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

Évora - 2008

AGRADECIMENTOS

Naturalmente, que no decurso de todos os anos de trabalho, que permitiram chegar ao final deste estudo, muitas são as pessoas e Instituições a quem devo os meus agradecimentos.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar, a orientação, empenho, incentivo, amizade e paciência que sempre recebi dos orientadores desta tese, Prof^a Catedrática Maria Ivone Esteves da Clara e Dr^o José Emilson Cardoso. A eles devo não só a aprendizagem de várias técnicas e metodologias, aplicadas neste trabalho, como também, o estímulo à perseverança necessária para não desistir da procura contínua de resultados válidos.

Agradeço à Universidade de Évora por ter aceite a minha proposta para realização dos trabalhos conducentes a esta Tese. Ao ICAM por ter contribuído, na cedência das instalações dos Laboratório de Sanidade Vegetal e de Micologia, e em participações de eventos científicos para apresentação de resultados do presente trabalho.

À Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil, a toda a sua equipa, e em especial, aos do Laboratório de Fitopatologia, agradeço por durante estes anos, sempre me terem acolhido com grande espírito científico e de amizade, dando-me a possibilidade de concretizar parte do meu trabalho nas suas instalações, e de me cederem sempre todo o material necessário. Agradeço igualmente a colaboração prestada na análise estatística dos índices de severidade, nomeadamente, ao Dr. Emilson e Alex Cysne.

Ao IICT/ CIFC, agradeço a disponibilidade de parte dos isolados de *Colletotrichum* spp. que integram este estudo e o estímulo inicial para a realização deste trabalho. À Dr^a Maria do Céu Silva pelo seu estímulo e sugestões.

Ao Dr^o Pedro Talhinhas, do Instituto Superior de Agronomia, por ter cedido um isolado de *C. acutatum*, como isolado de referência. À Prof^a Catedrática Helena de Oliveira pelas sua análise crítica e sugestões.

A toda a equipa do Laboratório de Sanidade Vegetal e Microbiologia do solo, da Universidade de Évora/ ICAM, pelo estímulo e ajuda que sempre me disponibilizaram, nomeadamente, à Rosarinho, José Manuel, Joana, Carla, Marta e Ana.

Finalmente, gostaria de agradecer e dedicar, à minha família, em especial, aos meus pais e ao meu filho, bem como, a todos os meus amigos que sempre estiveram presentes e me deram a compreensão e estímulo necessário para chegar até ao final deste trabalho.

Agradeço o financiamento concedido pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia sob a forma de bolsa de doutoramento com a referência SFRH/ BD/ 3181/ 2000.

INDÍCE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Objectivos	2
PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1- Estabelecimento e manutenção de uma colecção de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	16
2.2- Patogenicidade e estudos da interacção parasita-hospedeiro	19
2.2.1- Repicagem dos isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> sp.	19
2.2.2- Preparação do material vegetativo	20
2.2.3- Obtenção de conídios para inoculação	22
2.2.4- Inoculação de plantas de cajueiro	22
2.2.5- Inoculação de folhas destacadas	23
2.2.6- Inoculação cruzada de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	24
2.2.7- Cálculos e análise estatística	24
2.3- Análise isoenzimática	25
2.3.1- Condições de crescimento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. ...	26
2.3.1.1- Determinação da concentração de proteínas	27
2.3.1.2- Preparação da amostra micelial	27
2.3.1.3.- Preparação do gel de poliacrilamida (PAGE) e electroforese	28
2.3.2- Detecção de isoenzimas	29
2.4- Estudo de reacções serológicas com anticorpos específicos para <i>C. acutatum</i> pela técnica PTA- ELISA	35
2.5- Caracterização molecular dos isolados	37
2.5.1- Extracção e quantificação de DNA dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	37
2.5.2- Polymerase Chain Reaction (PCR) -Teste de diagnóstico para diferenciar espécies	41
3 – RESULTADOS	43
3.1- Patogenicidade e estudos da interacção parasita-hospedeiro	43

3.1.1- Patogenicidade em plantas	44
3.1.2- Patogenicidade em folhas destacadas	50
3.1.3- Patogenicidade de <i>Colletotrichum</i> spp. proveniente de cajueiro em azeitonas	55
3.2- Análise isoenzimática dos isolados	58
3.3- Reacções serológicas pela técnica PTA- ELISA de isolados de <i>Colletotrichum</i> com anticorpos específicos para <i>C. acutatum</i>	71
3.4- Caracterização molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	73
3.4.1- Polymerase Chain Reaction (PCR)- Teste de diagnóstico para diferenciar espécies	73
4 – DISCUSSÃO DE RESULTADOS	77
5 – CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AEVC	Angola-Évora Cashew
APS	Amoniumperoxodisulfat
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino
BCAI	“Brazilian Cashew Anthracnose Isolate”
BEVC	“Brazilian-Évora Cashew”
CAP	Cajueiro Anão Precoce
CCP	Clone de Cajueiro Precoce
CE	Ceará
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	qualquer Desoxirribonucleótido Trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ICAM	Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas
IICT/ CIFC ..	Instituto de Investigação Científica Tropical/ Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
ITS	Espaçador Internamente Transcrito
G6PDH	D-glucose-6-fosfato desidrogenase
Mab	“Monoclonal antibody”
MEVC	“Mozambique-Évora Cashew”
MTT	“Dimethyl thiazol- diphenyl tetrazolium bromide”
NADP	“ β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”
NBT	“Nitro Blue Tetrazolium”
PAGE	“Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
pb	pares de base
PBST	“Phosphate Buffered Saline”
PCR	“Polimerase Chain Reaction”
PDA	“Potato Dextrose Agar”
PMS	“Phenasine methosulfate”
PTA-ELISA	“Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
<i>Taq</i>	<i>“Thermus aquaticus”</i>
TBE	Tampão Tris Borate
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
UPGMA	Método de Agrupamento em Pares Não-balanceados usando Médias Aritméticas
UV	Ultra Violeta
VCG	“Vegetative Compatibility Group”

RESUMO

Este trabalho pretendeu avaliar a biodiversidade do agente causal da antracnose (*Colletotrichum* spp.) no cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), cultivado no Brasil, de modo a contribuir para o delineamento de estratégias de optimização do controlo da doença, quer a nível de resistência da planta hospedeira, quer a nível epidemiológico no campo.

Para atingir aquele objectivo recorreu-se a testes de patogenicidade para avaliar a interacção patógeno- hospedeiro, e a análises isoenzimáticas, serológicas e moleculares para estudo de 18 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cajueiro.

No estudo da interacção patogénio-hospedeiro, os testes de patogenicidade diferenciaram os isolados por índices de agressividade em relação à maior ou menor susceptibilidade dos clones de cajueiro utilizados. As inoculações cruzadas entre isolados de *Colletotrichum*, provenientes de cajueiro e inoculados em frutos de oliveira, e isolados de *Colletotrichum* provenientes de oliveira e inoculados em folhas de cajueiro, revelaram não haver especificidade destes isolados relativamente aos hospedeiros utilizados (cajueiro e oliveira). Todos os isolados se mostraram patogénicos. A análise isoenzimática permitiu verificar a diversidade existente entre os isolados, relativamente a dez enzimas (esterase-EST, fosfatase ácida-ACP, fosfatase alcalina-AKP, fosfoglucomutase-PGM, fosfoglucoisomerase-PGI, 6-fosfogluconato desidrogenase-PGDH, hexoquinase-HK, isocitrato desidrogenase-IDH, malato desidrogenase-MDH e superóxido dismutase-SOD), tendo-se identificado dois grandes grupos, um constituído maioritariamente por *C. gloeosporioides* e outro por *C. acutatum*. A análise serológica dos isolados de *Colletotrichum* spp., pela técnica PTA – ELISA (Plate trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay) aplicando anticorpos monoclonais específicos para *C. acutatum*, permitiu identificar, pela primeira vez, isolados de *C. acutatum* obtidos de tecidos do cajueiro com sintomas de antracnose. A caracterização molecular dos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, utilizando iniciadores específicos, veio confirmar e clarificar os resultados obtidos pelos testes acima descritos, permitindo uma identificação interespecífica dentro da colecção de isolados de *Colletotrichum* submetida a análise neste trabalho.

ABSTRACT

This work was to evaluate the biodiversity of the causal agent of the anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in the cashew tree (*Anacardium occidentale* L.), farmed in Brazil, so as to contribute for the strategy delineation of the optimisation of control of the disease, whether at the resistance level of the host-plant, whether at epidemiologic level in the field.

In order to achieve that objective, we used pathogenicity to evaluate the host-pathogen interaction and isoenzymatic, serological and molecular analysis to study 18 isolates of the *Colletotrichum* sp. obtained from the cashew tree.

In the host-pathogenic interaction study, the pathogenicity tests differentiated the isolates by its aggressiveness in relation to susceptibility of the cashew tree clones used. The crossed-inoculations between the *Colletotrichum* isolates, from the cashew tree and inoculated in the olive fruits and *Colletotrichum* isolates from the olive tree and inoculated in cashew leaves, revealed non-specificity of these isolates in relation to the hosts used (cashew and olive). All the isolates showed to be pathogenic. The isoenzymatic analysis enabled to verify the existing diversity among the isolates, in relation to ten enzymes (esterase-EST, acid phosphatase-ACP, alkaline phosphatase-AKP, phosphoglucomutase-PGM, phosphoglucoisomerase-PGI, 6-phosphogluconate dehydrogenase-PGDH, hexokinase-HK, isocitrate dehydrogenase-IDH, malate dehydrogenase-MDH and superoxide dismutase-SOD), two big groups were identified, one mainly made up by *C. gloeosporioides* and another mainly by *C. acutatum*. The serological analysis of the isolates of the *Colletotrichum* sp., through the PTA – ELISA technique (Plate trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay) applied specific monoclonal antibodies for *C. acutatum*, identified, for the first time *C. acutatum* isolates from cashew tree tissues with anthracnose symptoms. The molecular characterization of the *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* isolates, using specific primers, confirmed and clarified the results obtained through the above mentioned tests, allowing an inter-specific identification within the *Colletotrichum* isolates collection submitted to analysis in this work.

1-INTRODUÇÃO

A capacidade de identificar o organismo específico, responsável pela doença em determinada planta, é fundamental para entender a patologia e adoptar as medidas de controlo mais apropriadas. É, portanto, de todo o interesse fazer um bom diagnóstico da doença e do seu agente causal.

Os métodos convencionais para identificação de fungos patogénicos em plantas assentam na interpretação de observações de sintomas e/ou em isolamentos de patogénios cultivados e identificados em laboratório. Estes diagnósticos requerem larga experiência por parte de quem os faz, e algum tempo para obter resultados, o que por vezes pode tornar-se impraticável, quando estes são requeridos com rapidez. Novos métodos têm vindo a ser utilizados, incluindo métodos imunológicos, marcadores moleculares e a amplificação de sequências de ácidos nucleicos por PCR (Polymerase Chain Reaction / reacção em cadeia da polimerase). Estas técnicas têm um potencial de vantagens muito superior aos métodos de diagnóstico convencionais, são mais exactas, mais rápidas e podem ser utilizadas por pessoas com pouca experiência em patologia de plantas.

Colletotrichum sp. é um dos mais importantes géneros de fungos patogénicos que afecta as plantas, em especial nas regiões Subtropicais e Tropicais, provocando prejuízos economicamente significantes. Os sintomas associados à infecção por *Colletotrichum* são comumente conhecidos por antracnose, e incluem típicas lesões castanhas em depressão, ficando negras com a idade. De entre as plantas afectadas, destaca-se o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), que é uma fruteira originária do nordeste brasileiro e que se encontra dispersa na faixa Subtropical e Tropical.

O cajueiro é cultivado, fundamentalmente, pela sua elevada importância alimentar e pelo facto desta planta representar uma relevante actividade sócio-económica para os países produtores, como fonte geradora de emprego e de divisas para esses países. No entanto, a antracnose tem sido uma das doenças causadoras da baixa produtividade na cultura do caju. O fungo ataca folhas, ramos, inflorescências, pedúnculos e frutos, causando maior prejuízo na época das chuvas e quando existe a emissão de novas folhas.

A identificação taxonómica de *Colletotrichum* spp. tem sido baseada principalmente em critérios morfológicos e culturais, tornando-se por vezes difícil a separação das espécies. Em estudos mais recentes tem-se vindo a dar mais ênfase à caracterização serológica, bioquímica e molecular, recorrendo a testes ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), isoenzimáticos e PCR. Existindo poucos estudos realizados na área da antracnose do cajueiro, torna-se importante o conhecimento da biodiversidade deste agente patogénico, de modo a contribuir para o delineamento de estratégias que conduzam ao adequado controlo da doença.

1.1- OBJECTIVOS

Deste modo, delineou-se como objectivo geral para este trabalho avaliar a diversidade genética da colecção dos isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de lesões de antracnose no cajueiro (16 deles com origem no Brasil, um de Angola e outro de Moçambique), contribuindo para a caracterização e o esclarecimento da taxonomia do agente causal desta doença nesta planta. Para o presente estudo recorreu-se à utilização de técnicas isoenzimáticas, serológicas e moleculares para análise dos vários isolados e a testes de patogenicidade para estudar a interacção patogénio- hospedeiro, recorrendo igualmente a inoculações cruzadas entre isolados de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose em cajueiro, inoculados em frutos de oliveira e isolados de *Colletotrichum acutatum* de lesões de azeitonas, inoculados em folhas de cajueiro. Parte deste trabalho foi realizado em parceria e em instalações da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil.

2- PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pertence à família Anacardiaceae, ordem Sapindales, é originário da América Tropical, muito provavelmente do nordeste brasileiro. A expansão da cultura do cajueiro foi realizada a partir do século XVI, pelos navegadores e missionários portugueses tendo sido introduzido, posteriormente, em vários países de África e Ásia, tais como, Índia, Vietname, Moçambique, Guiné-Bissau, Quênia, entre outros. Com a exploração mais ou menos intensiva da cultura, esta passou a representar um papel fundamental para o mundo rural intertropical, constituindo um produto de elevada importância sócio-económica. (Barros *et al.*, 1984; Pimentel *et al.*, 1993; Leite, 1994; Milheiro *et al.*, 1994; Araújo *et al.*, 1995; Ferrão, 1995; Piteira, 1996; Pessoa, 2000).

A cultura do cajueiro foi-se expandindo, dando lugar a mono cultivos implantados pelo Homem, que quebraram o equilíbrio biológico existente entre a planta hospedeira e os seus parasitas (Barros *et al.*, 1984; Piteira, 1995).

No centro de origem, a antracnose é a doença com maior relevância, seja pela sua ocorrência epifitótica nas várias regiões produtoras, seja pelos prejuízos económicos que provoca, as quais podem atingir cerca de 30 a 50% da produção, para além de apreciável redução da qualidade do fruto e pseudo-fruto. Esta doença é, ainda, destacada por alguns, como sendo a que maiores prejuízos causa em viveiros, na fase de formação de porta-enxertos. Pode-se dizer que está difundida praticamente por todo o mundo da cajucultura (Ponte, 1984; Cardoso *et al.*, 1994; Piteira, 1996; Freire *et al.*, 2003).

Antracnose é o nome que vulgarmente se dá à doença provocada por várias espécies do fungo filamentoso do género *Colletotrichum* Corda 1831 (família *Glomerellaceae*; ordem *Incertae sedis*; classe *Sordariomycetes*; Filo *Ascomycota*; reino *Fungi*), forma imperfeita do fungo *Glomerella*, classificação baseada na 9ª Edição da obra de Ainsworth & Bisby's "Dictionary of Fungi" (CABI Databases). É o fungo patogénico que maiores prejuízos causa a culturas, em regiões tropicais sub-tropicais e temperadas, espalhadas por todo o mundo. Pode afectar variadíssimas plantas tais como cereais,

herbáceas, legumes, ornamentais, vegetais, e árvores de fruto, normalmente ataca a parte aérea da planta, mas certas espécies podem atacar órgãos subterrâneos, tais como raízes e tubérculos. As plantas ficam sujeitas à doença em todas as fases de desenvolvimento podendo o patógeno ser disseminado por agentes aéreos ou por sementes. Neste último caso, a transmissão para as plântulas induz sintomas de damping-off de pré e pós-emergência. A antracnose tem também uma importância relevante nas perdas do pós-colheita em frutos tropicais e subtropicais, tais como, banana (*Musa* spp.), papaia (*Carica papaya*), manga (*Mangífera indica*), e abacate (*Persea americana*) (Barros *et al.*, 1984; Correa *et al.*, 1992; Sutton, in Bailey & Jeger, 1992; Araújo *et al.*, 1995; Piteira, 1996; Freeman *et al.*, 1998; Buddie *et al.*, 1999; Lardner *et al.*, 1999; ^aFreeman, 2000; Latunde-Dada, 2001; Menezes *et al.*, 1996; Freire *et al.*, 2002; Menezes, 2002; Freire *et al.*, 2003; Lima Filho *et al.*, 2003).

No cajueiro, a doença tem maior incidência no período coincidente com a emissão de novos rebentos, agravando-se em anos de maior pluviosidade, por ocasião da floração, quando o ataque às inflorescências reduz a produção. A temperatura e humidade elevada são favoráveis à propagação do patógeno, pois a germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou de elevada humidade relativa (100%). A chuva e o vento contribuem para a disseminação do agente patogénico, o que coincide com a descrição realizada para outras culturas, relativamente ao ataque das espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Ponte, 1971; Nair *et al.*, 1979; Barros *et al.*, 1984; Ferrão, 1995; Piteira, 1996; ^aFreeman *et al.*, 2001; Menezes, 2002; Denoyes-Rothan *et al.*, 2003; Wharton *et al.*, 2004).

A infecção por espécies de *Colletotrichum* spp. incluem várias fases: adesão de esporos e germinação, formação do tubo germinativo e apressório, e desenvolvimento biotrófico e necrotrófico da hifa (Silva *et al.*, 2004, Wharton *et al.*, 2004).

Os sintomas típicos manifestam-se por lesões necróticas nas folhas, irregulares que inicialmente têm coloração pardo-púrpura, dispostas em qualquer parte do limbo, de tamanho variável, isoladas ou confluentes, afectando as folhas jovens. À medida que as folhas envelhecem as manchas escurecem em tons avermelhados, secam e rasgam-se com facilidade. Quando os sintomas são severos, a folhagem fica retorcida e deformada, assemelhando-se à queima. Na superfície das lesões aparecem as frutificações do fungo,

acérvulos, dispostas irregularmente ou segundo linhas concêntricas na forma de pequenos pontos de cor negra ou salmão. Após duas semanas as folhas atingem a sua maturação e o número de lesões estabiliza-se. Nos ramos surgem depressões alongadas e escuras, quando localizadas no eixo das inflorescências, por vezes podem causar exsudações de gotículas de goma. Os tecidos necrosados impedem a livre circulação da seiva, causando murchidão e posteriormente a morte da inflorescência. No fruto aparecem áreas negras, de tamanho variável podendo prejudicar o seu aproveitamento, ou chegar mesmo à completa mumificação. No pseudo-fruto, o ataque do fungo provoca extensas áreas necróticas, as quais com o tempo podem evoluir para o aparecimento de fendas. (Ponte, 1971; Araújo, 1976; Barros *et al.*, 1984; Ponte, 1984; Teixeira *et al.*, 1991; Milheiro *et al.*, 1994; Araújo *et al.*, 1995; Ferrão, 1995; Piteira, 1995; Piteira, 1996; Timmer *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 2000; Uchoa *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2003).

A literatura disponível acerca da antracnose no cajueiro refere que o agente etiológico da doença é *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., (Barros *et al.*, 1984; Correa *et al.*, 1992; Araújo *et al.*, 1995; Piteira, 1996; Menezes *et al.*, 1996; Freire *et al.*, 2002; Menezes, 2002; Freire *et al.*, 2003).

Muitos dos isolados da espécie actualmente conhecida como *Colletotrichum acutatum* eram incluídos na espécie *C. gloeosporioides* ou *Gloeosporium* (von Arx). A espécie *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds é um fungo filamentoso, *Ascomycota* na forma teleomórfica, género *Glomerella acutata* na forma anamórfica, geralmente considerado como saprófita para a grande maioria das plantas, tem vindo a emergir como um patógeno agressivo causando antracnose em várias plantas, ganhando maior importância, devido a inúmeras referências da doença provocada por esta espécie, nomeadamente em amêndoas, abacate, pêssago, mirtilo, laranja, manga, oliveira, e morango. Foi descrito pela primeira vez por Simmonds como sendo uma espécie causadora de antracnose (Martin *et al.*, 1999; ^aFreeman, S., 2000; ^bFreeman *et al.*, 2001; Agosteo *et al.*, 2002; Wharton *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005).

Os fungos *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, são referenciados pela literatura, como os dois membros do género, mais associado a podridões de frutos podendo atacar simultaneamente várias culturas. Existem resultados que demonstram infecções cruzadas com ambas as espécies a partir de isolamentos provenientes de diferentes

culturas como citrinos, amendoeiras, macieiras, mangueiras, abacateiros e papaieiras, infectando maçãs, mangas, nectarinas amêndoas entre muitas outras. As duas espécies são morfológicamente muito semelhantes, têm hospedeiros comuns, e apresentam uma ampla variabilidade quando mantidos em cultura. Estas razões têm contribuído para a grande dificuldade em separá-los por métodos de taxonomia tradicionais (Freeman *et al.*, 1998; ^aFreeman, 2000; ^aFreeman *et al.*, 2001; Lardner *et al.*, 1999; Wharton *et al.*, 2004; Kulik, *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005).

Colletotrichum acutatum tem surgido como um dos mais importantes patógenos de fruteiras, causando significativos prejuízos económicos em culturas, desde regiões temperadas, subtropicais, e tropicais. Contudo, até recentemente, poucos eram os estudos dedicados à caracterização deste fungo, devido essencialmente ao facto de este ser usualmente identificado, erradamente, como *C. gloeosporioides*. A separação efectiva destas duas espécies só foi possível com a introdução de técnicas moleculares para efectuar estudos taxonómicos (Wharton *et al.*, 2004).

Colletotrichum spp. têm sido correntemente identificados usando critérios taxonómicos recorrendo a caracteres morfológicos, i.e., cor das colónias, forma e tamanho dos conídios, morfologia e tamanho dos apressórios, morfologia das hifas e taxa de crescimento em Potato dextrose agar (PDA) a diferentes temperaturas. Contudo, devido à plasticidade fenotípica apresentada pelas espécies do género *Colletotrichum*, a identificação e classificação, tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos, apresentam limitações. Em estudos realizados, com patógenos causadores de antracnose em amêndoas, utilizando critérios morfotaxonómicos, os resultados obtidos não pareceram ser muito aceitáveis para discriminar espécies de *Colletotrichum* spp. (Freeman *et al.*, 1998; Förster & Adaskaveg, 1999; ^bFreeman *et al.*, 2000; ^aFreeman *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2002; Menezes, 2002 ; Denoyes-Rothan *et al.*, 2003; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005).

Morfológicamente, os isolados de cada espécie costumam ser diferenciados pela forma dos conídios, com as extremidades arredondadas são identificados como *C. gloeosporioides*, enquanto com ambas as extremidades pontiagudas, ou apenas uma, são identificados como *C. acutatum*. Outro caractere associado à diferenciação é a morfologia das colónias. A cor das colónias de *C. gloeosporioides* é usualmente de

aparência cinzenta e as de *C. acutatum*, de cor rosa ou laranja. Em termos de crescimento a temperatura óptima de crescimento para *C. acutatum* é de 25° C e de 30° C para *C. gloeosporioides*, sendo a taxa de crescimento menor para *C. acutatum* (Adaskaveg *et al.*, 1997; Buddie, *et al.*, 1999; Lardner *et al.*, 1999; ^bTalhinhas *et al.*, 2002; Wharton *et al.*, 2004). Contudo, existem registos de que a taxa de crescimento de isolados de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum* nem sempre consegue separar estas duas espécies (Freeman *et al.*, 1998; Piteira *et al.*, 1998). A cor da colónia e a forma dos conídios também é referido por alguns como um método insatisfatório para identificação de espécies, devido em grande parte à diversidade destas características em *C. gloeosporioides*, a qual é indicativa da sua heterogeneidade (Adaskaveg *et al.*, 1997; Freeman *et al.* 1998).

Patogenicamente pode-se recorrer à realização de inoculações cruzadas em diversos hospedeiros, de forma a tentar diferenciar os isolados. Estes testes são usados como forma de caracterização patogénica entre os isolados, os quais visam demonstrar a especificidade ou a gama de hospedeiros dos isolados ou espécies distintas (Lima Filho *et al.*, 2003)

Outro método usualmente utilizado no passado era a avaliação à sensibilidade ao fungicida benomil. Em geral os isolados de *C. gloeosporioides* eram considerados altamente sensíveis ao benomil, enquanto os isolados de *C. acutatum* eram relativamente insensíveis (Freeman *et al.*, 1998; ^bFreeman *et al.*, 2000; Elmer *et al.*, 2001).

A taxonomia do género *Colletotrichum* tem sido confusa, muita dessa confusão deve-se ao conceito de *C. gloeosporioides* em 1884 descreveu os conídios desta espécie como rectos e cilíndricos com as extremidades arredondadas. Em, 1957, von Arx reduz o número de espécies de *Colletotrichum* de mais de 100, para 11 com 12 formas, baseado na morfologia e patogenicidade. Sutton, 1992, aceitou 39 espécies, baseado no critério taxonómico pelas características e morfologia dos conídios e apressórios, e patogenicidade. Contudo, como estas características são simples e por vezes incertas, este critério é muitas das vezes ambíguo. Sutton refere, ainda, que a variação de *C. gloeosporioides* é tão grande que a espécie pode não estar circunscrita. (^aBonde *et al.*,

1991; Sutton, 1992; Menezes *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2000; Moriwaki *et al.*, 2002).

A confusão continua e O'Neill *et al.* (1997) refere que diferentes guias taxonômicos indicam que o número de espécies está entre 11 ou mais de 700, mas que Farr *et al.*, indica 49, e que mais recentemente, considerando a especificidade do hospedeiro, foram descritas 38 espécies.

Vários são os autores que fazem referência às duas espécies de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, as quais incluem vários grupos de raças e biótipos, como sendo de difícil discriminação por métodos tradicionais baseados na morfologia e preferência do hospedeiro. O uso das características morfológicas é complicado, por um lado, porque os conceitos morfológicos são de difícil definição e limitados, usando somente pequenos grupos de caracteres, principalmente tamanho e forma dos conídios e configuração dos apressórios, por outro, devido a influências ambientais nestas características e à existência de formas intermédias. (Freeman *et al.*, 1998; Förster *et al.*, 1999; Lardner *et al.*, 1999; Cannon *et al.*, 2000 ; Freeman, 2000; Prusky *et al.*, 2000 ; ^bTalhinhas *et al.*, 2002; Wharton *et al.*, 2004; Kulik *et al.*, 2005).

Assim, muito trabalho tem vindo a ser desenvolvido para determinar com maior exactidão a complexidade de isolados que infectam frutos tropicais e subtropicais. O uso de técnicas moleculares, bioquímicas e imunológicas, tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de patogénios, para discriminar várias espécies de *Colletotrichum* ou para estudar a diversidade genética entre *Colletotrichum* spp. (Freeman *et al.*, 1998; Förster & Adaskaveg, 1999; ^bFreeman *et al.*, 2000; ^aFreeman *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2002; Menezes, 2002 ; Denoyes-Rothan *et al.*, 2003; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005).

Um dos métodos não convencionais utilizado é o recurso ao diagnóstico por técnicas imunológicas. Estas técnicas assentam no reconhecimento, por anticorpos, de antígenos específicos presentes na superfície do patogénio ou secretado por ele. Na sua maioria são métodos usando a tecnologia ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Esta

metodologia é relativamente barata, simples, consegue-se obter uma boa análise, e pode-se quantificar o patogénio alvo, assim como, detectá-lo (McCartney *et al.*, 2003).

A tecnologia ELISA é largamente usada para a detecção de vírus em plantas. Clark e Adams (1977) referem que as técnicas serológicas convencionais, para detectar vírus em plantas, têm algumas limitações quando as concentrações de vírus são pequenas, ou a morfologia das partículas desadequadas, ou ainda devido à presença de inibidores. No entanto, estas limitações podem ser largamente vencidas utilizando o método ELISA em vez das técnicas convencionais.

Boscia *et al.* (1992) concluíram que a utilização de anticorpos monoclonais podem eliminar alguns problemas de baixa concentração de vírus, que aparecem com alguma frequência aquando do uso de anticorpos policlonais.

Embora, o desenvolvimento de anticorpos de vírus de plantas seja, geralmente, muito bem sucedido, os trabalhos abordando organismos mais complexos como os fungos não têm resultados tão bons. Este facto pode comprometer, para alguns fungos, a utilidade deste métodos para o seu diagnóstico (McCartney *et al.*, 2003).

Otten *et al.* (1997) referem a utilização do método PTA-ELISA (plate trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay) na quantificação de antígenos de fungos no solo, com anticorpos monoclonais e Miller *et al.* (1997) consideram o teste ELISA como um método efectivo e rápido para detecção de espécies de *Phytophthora* no solo.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento recorriam a genes associados a caracteres morfológicos, os quais necessitam do indivíduo. A alteração deste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos e mais tarde com o advento das modernas técnicas de biologia molecular, surgindo assim diversos métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA. Estes marcadores bioquímicos e moleculares como as isoenzimas ou fragmentos de DNA, podem ser utilizados para caracterizar o genótipo dum indivíduo a partir de amostras de tecidos ou de células (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A análise isoenzimática é uma forte técnica bioquímica com numerosas aplicações na micologia e patologia das plantas, com grande potencial informativo para resolver problemas de taxonomia, identificar isolados de fungos desconhecidos, analisar a variação genética numa determinada população, ajudar a traçar as origens geográficas dos patogénios, determinar os vários níveis de ploidia nas variadas fases do ciclo de vida do fungo, ou para traçar o “fingerprint” padrão, para cada isolado de fungo. As isoenzimas podem ser usadas como marcadores, e assim estimar-se a variabilidade de populações ou espécies (Micales *et al.*, 1988; ^bBonde *et al.*, 1991 ; Bonde *et al.*, 1993 ; Micales *et al.*, in Alfenas, 1998).

O número de bandas pode reflectir o número de alelos presentes no sistema, o qual depende da condição do sistema (mono ou heterocariótico), do nível de ploidia (haplóide ou diplóide), da constituição genética do organismo (homozigoto ou heterozigoto) e, da estrutura quaternária da enzima, para além de outros factores (Lima & Menezes, 2002).

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre numa espécie, como resultado da presença de mais de um gene, codificando cada uma das formas da enzima. Estas formas têm usualmente propriedades enzimáticas similares ou mesmo idênticas, mas ligeiramente diferente na sequência dos aminoácidos. Podem ocorrer dentro de um mesmo indivíduo ou entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Todas as técnicas electroforéticas consistem numa fonte eléctrica, numa matriz de suporte e num tampão iónico. A sua detecção envolve basicamente três passos: a extracção de proteínas do tecido vegetal, a separação destas através de electroforese e a coloração histoquímica do gel, a qual permite a visualização do produto da reacção enzimática na forma de bandas coradas. É uma técnica relativamente barata e acessível. A sua maior desvantagem em relação a técnicas imunológicas e de PCR's é a necessidade de ter presente grandes quantidades do organismo, o que poderá ser limitativo no caso de patogénios obrigatórios. (Bonde *et al.*, 1993 ; Hillis *et al.*, 1996 ; Micales *et al.*, in Alfenas, 1998; Ferreira *et al.*, 1998).

Muitos são os trabalhos que têm demonstrado o sucesso da aplicação da técnica isoenzimática, para estudar a diversidade genética, taxonomia e evolução. No entanto, quando usada para diferenciar espécies patogénicas a análise isoenzimática obtém maior

sucesso se as espécies pertencerem a um mesmo género (Hellman, *et al.*, 1991; Chamberlain, J.R., 1998; Siva *et al.*, 2005).

Somente as isoenzimas que tenham na sua composição aminoácidos de carga diferente, ou que resultem de grandes diferenças na forma da enzima, podem ser diferenciadas por electroforese. A análise isoenzimática é portanto uma técnica que proporciona uma estimativa conservada acerca da variação dentro do genoma (Bonde *et al.*, 1993; Micales *et al.*, in Alfenas, 1998; Lima *et al.* 2002). As melhores estimativas de polimorfismo são obtidas quando grande número de isolados e isoenzimas são utilizados (Micales *et al.*, in Alfenas, 1998).

O meio de cultura utilizado para propagação do fungo deve permitir um rápido crescimento, pois culturas de crescimento lento, têm normalmente menor actividade enzimática, e podem produzir artefactos ou conduzir a alterações das enzimas (Bonde *et al.*, 1993; Micales *et al.* in Alfenas, 1998). Por outro lado, as condições de cultura deverão ser inibitórias da esporulação, pois quando se analisa uma mistura de diferentes órgãos (conídios e micélio), os resultados não são facilmente interpretáveis e/ ou comparáveis (Micales *et al.* in Alfenas, 1998).

Kaufmann *et al.* (1996) referem que vários métodos moleculares e genéticos têm sido usados para diferenciar isolados de *C. gloeosporioides* patogénicos para diferentes plantas hospedeiras, mas até ao momento poucos estudos isoenzimáticos têm sido dirigidos para a diferenciação de isolados desta espécie a partir de hospedeiros específicos. Também, Assunção *et al.* (1999) abordam a escassa existência de estudos efectuados utilizando a análise electroforética para diferenciação de isolados de *C. gloeosporioides*. Furtado *et al.* (1999) falam do desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas bioquímicas e moleculares as quais têm vindo a permitir diferenciar espécies de *Colletotrichum*. A electroforese é uma dessas técnicas, demonstrando grande utilidade na distinção de espécies com pequenas diferenças morfológicas, através do perfil electroforético que detecta a variação de isoenzimas, as quais actuam como marcadores bioquímicos.

^aBonde *et al.* (1991) usaram com sucesso a análise isoenzimática para estudarem a variação de *Colletotrichum* na infecção de morangueiros, demonstrando ser um método

efectivo para distinção dentro desta espécie. Para este caso, a enzima MDH (malato desidrogenase), foi a que teve resultados mais difíceis de interpretar.

Para estudarem a variação entre isolados de *C. graminicola*, Horvath *et al.* (2004) também recorreram à análise isoenzimática obtendo sucesso nos seus resultados. Eles referem que a análise isoenzimática proporciona uma perspectiva alargada na variação genética, mais do que na análise com DNA, porque vai examinar diferenças de mobilidade activa de proteínas metabólicas e, não diferenças de tamanho de fragmentos de DNA.

Ramos *et al.* (2000) concluíram que para diferenciar espécies do género *Saccobolus* (Ascomycetes, Peziales) as esterases eram as únicas que permitiam diferenciar alguns isolados de diferentes áreas geográficas.

O estudo efectuado por Zeller *et al.* (2000) caracterizou 48 isolados de *Cephalosporium maydis*. Foram testadas oito isoenzimas, mas só cinco delas (fosfatase ácida, fumerase, glucose – 4 – fosfato isomerase, isocitrato desidrogenase, e malato desidrogenase) produziram bandas identificáveis e todas as cinco enzimas mostraram-se monomórficas.

Ali *et al.* (1999) utilizando a electroforese por gel de poliacrilamida, referem que os fenótipos isoenzimáticos de esterases não específicas caracterizam 15 isolados de *Aphelenchus avenae*. A análise de “cluster” mostra não haver correlação entre a distribuição geográfica e hospedeiro/ temperatura óptima.

Cheng *et al.* (2000) do estudo realizado entre dois tipos morfológicos de *Fomes fomentarius*, concluíram que o intervalo de diversidade fenotípica das isoenzimas não foi significativamente diferente, sugerindo que existe sincronismo nas suas origens.

Também McCallum *et al.* (1999) analisando a virulência, e usando as técnicas isoenzimáticas e *random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers*, não conseguiram observar uma clara distinção entre os isolados de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* provenientes do sul da América, do norte da América e da Europa, levantando a hipótese destas populações possuírem uma origem comum.

Indu-Sharma *et al.* (1998) em estudos realizados para identificação da variabilidade em *Neovossia indica* em 14 isolados recolhidos de diferentes áreas geográficas do Punjab, concluíram que os isolados são agrupados em grupos distintos quando comparados por testes de patogenicidade, mas puderam ser agrupados em duas categorias, quando se analisaram as isoenzimas, esterase e fosfatase ácida.

Dorrance *et al.* (1999) indicam que de 23 isoenzimas testadas, apenas com três, nomeadamente “ α -esterase, hexoquinase e malato desidrogenase”, detectaram polimorfismos em isolados de *Stenocarpella maydis*.

Agosteo *et al.* (2002) utilizaram isolados monoconidiais de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*, obtidos em diferentes regiões, para caracterizar o agente causal da antracnose da oliveira no sul de Itália. Recorreram a várias técnicas, entre elas, a electroforese de isoenzimas, das quais foram testadas a fosfatase ácida, glucose desidrogenase, isomerase glucose-6-fosfato, e superóxido dismutase, e por outro lado através de PCR's com os iniciadores específicos para *C. acutatum* (CaInt-1 e CaInt-2) e *C. gloeosporioides* (CgInt) e por RAPD- PCR usando 16 iniciadores 10-mer universais (Operon Technologies Inc., Alameda, CA) para estudar a estrutura da população. A electroforese de isoenzimas revelaram uma considerável variabilidade genética entre cada um dos dois grupos de *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* e *C. acutatum*), indicando que estas são espécies complexas.

A utilização da técnica PCR de diagnóstico com iniciadores específicos para cada uma das espécies é uma das alternativas à análise isoenzimática (Freeman *et al.*, 1998; Förster *et al.*, 1999; Lardner *et al.*, 1999; Freeman, 2000; Agosteo *et al.*, 2002; Talhinhos, 2002; Wharton *et al.*, 2004; Kulik *et al.*, 2005). Sreenivasaprasad *et al.* (1996) utilizando os iniciadores CaInt2 e ITS4, dizem ter obtido amplificações de fragmentos a 490 bp a partir de vários isolados de *C. acutatum*, mas não a partir de outros membros do género *Colletotrichum*. No entanto, Agosteo *et al.* (2002) verificaram, que os iniciadores CaInt poderão ser menos específicos do que Sreenivasaprasad *et al.* (1996) e Förster & Adaskaveg (1999), tinham indicado, uma vez que podem aparecer produtos de PCR, aplicando estes iniciadores na amplificação genómica de *C. gloeosporioides*.

^aFreeman *et al.* (2001) também sugerem haver menos especificidade com o iniciador específico *CaInt2* para *C. acutatum*, que em conjunção com o iniciador ITS 4, amplificam fragmentos de 490 bp de DNA genómico dos isolados de *C. acutatum* e de outros *Colletotrichum* spp. Em contraste, o iniciador específico *CgInt* para *C. gloeosporioides* em conjunção com o iniciador ITS 4 apenas amplifica fragmentos de DNA genómico de isolados de *C. gloeosporioides* a 450 bp.

Os produtos de PCR obtidos com o iniciador específico *CaInt2* e ITS4 são habitualmente referenciados nos 490 bp e para o iniciador específico *CgInt* e ITS4 nos 450 bp (^bTalhinhas *et al.*, 2002; Weeds *et al.*, 2003; ^bFreeman *et al.*, 2000; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). No entanto, existem registos onde se obtiveram os produtos de PCR, utilizando o iniciador *CaInt2*, específico para *C. acutatum* e ITS4, aproximadamente nos 500 bp (Adaskaveg *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 2005).

A aplicação de marcadores moleculares na taxonomia de fungos trouxe uma nova esperança para clarificar as relações genéticas dos grupos de fungos fitopatogénicos. Esta técnica é ainda mais importante no caso do *Colletotrichum* spp., do qual não se consegue uma diferenciação clara pela sua morfologia (O'Neill *et al.*, 1997). A técnica de PCR consiste numa reacção em cadeia em que a enzima DNA polimerase, na presença de oligonucleotídeos, iniciadores, faz cópias de um ácido desoxirribonucléico (DNA). Por cada ciclo o número de cópias do DNA é duplicado, havendo um aumento exponencial do mesmo (Edel, in: Bridge, 1998).

Para realizar o diagnóstico por PCR, geralmente, podem ser usadas duas formas para seleccionar a sequência de DNA alvo: uma utilizando regiões conhecidas de genes conservados, e que é comum a todos os fungos, tirando proveito da sua variação sequencial; outra examinando, ao acaso, partes do genoma do fungo para encontrar regiões que nos mostrem a especificidade requerida (McCartney *et al.*, 2003).

A região nuclear do rDNA (DNA ribossomal) é organizada como uma unidade a qual é repetida várias vezes. Cada unidade inclui três genes rRNA (RNA ribossomal): um gene de pequena subunidade (18S), o gene 5.8S e um gene de subunidade extensa (28S). Dentro de cada unidade os genes são separados por espaçadores internamente transcritos “internal transcribed spacer” (ITS). A sequência do rDNA contém regiões

conservadas e outras variáveis, como as regiões de extensão e mitocondrial do rDNA, que são sempre variáveis dentro das espécies (Edel, in Bridge, 1998; McCartney *et al.*, 2003).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* responsáveis pelas doenças epidémicas é vital para o desenvolvimento e implementação de estratégias de controlo efectivo, assim como para uma melhor compreensão da própria epidemiologia (Freeman, 2000).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DE UMA COLECÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

A colecção de germoplasma de *Colletotrichum* spp. foi obtida a partir de lesões de antracnose provenientes da planta do cajueiro. Para além de se terem utilizado 10 isolados pertencentes à colecção do IICT/ CIFIC (Instituto de Investigação Científica Tropical/ Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro), foram mantidos contactos com a Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Brasil), no sentido de se conseguirem isolados das várias regiões produtoras de cajueiro, no Brasil. Desta parceria obtiveram-se mais seis isolados. Aos 16 isolados juntaram-se mais dois, de material vegetativo de cajueiro, afectado com antracnose, proveniente de Moçambique e Angola e dois isolados a partir de frutos de oliveira (*Olea europaea* L.), com lesões de antracnose, provenientes de Portugal. Mais tarde, fruto de contactos com o Instituto Superior de Agronomia, foi obtido um outro isolado o qual tinha sido caracterizado, como *C. acutatum*, proveniente de morango (*Fragaria ananassa*), e que passou a integrar a colecção como isolado de referência (Talhinhas *et al.*, 2002).

No âmbito dos estágios técnico-científicos, realizados na Embrapa, em Fortaleza, Brasil, foram feitas várias visitas ao campo, colhendo-se folhas de cajueiro naturalmente infectadas com antracnose. Colheram-se folhas em vários estádios de crescimento e com diferente evolução da doença. Em laboratório, este material foi preparado para se observar a esporulação. As folhas foram incubadas 24h em placas de Petri, contendo papel de filtro húmido, para se obter câmara húmida. Após este tempo fizeram-se as observações com o auxílio de uma lupa. Foi possível observar acérvulos com massas conidiais de coloração esbranquiçada, rosada ou preta.

Depois de realizadas as observações à lupa fizeram-se isolamentos do fungo. Retiraram-se fragmentos de tecido vegetal de 3 a 4 mm, procedeu-se à desinfecção superficial durante 1 minuto em solução aquosa de álcool etílico a 70%, seguida de duas lavagens em água destilada esterilizada. Após eliminar o excesso de líquido, colocaram-se quatro fragmentos por placa de Petri de vidro contendo PDA (agar de batata dextrosada) a

3,5%. Todas estas tarefas foram realizadas em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar vertical. No final, as placas foram incubadas à temperatura ambiente (25° a 30°C) para posterior avaliação e repicagem. Estes isolados foram mais tarde inoculados mostrando-se patogénicos para o cajueiro estabelecendo-se, assim, os postulados de Koch.

Para o estabelecimento de culturas monospóricas tomaram-se cerca de 10 mL de água destilada esterilizada e com o auxílio de uma agulha de ponta curva esterilizada à chama, fez-se a lavagem das placas referentes a cada um dos isolados e colonizadas com o fungo. Da suspensão de esporos, assim obtida, foram retiradas algumas gotas, utilizando uma micropipeta com pontas esterilizadas, as quais foram colocadas numa placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo cerca de 10 mL de PDA a 3,5%. Essas gotas foram depois espalhadas, na superfície do agar, com o auxílio da agulha de ponta curva, esterilizada à chama. De seguida, as placas foram mantidas à temperatura ambiente, durante 24h. Após o período de incubação as placas foram observadas ao microscópio óptico, marcando-se com marcador, no verso da placa, os esporos que se encontravam germinados e isolados. Pequenos blocos de agar, contendo os esporos únicos, foram depois colocados em placas de Petri com 20 mL de meio de cultivo de PDA.

A manutenção da colecção (Quadro 2.1) tomou duas vertentes, a de mais ou menos curto prazo, a qual foi mantida em placas de Petri com meio de cultura de PDA (3,5%) de forma a permitir a disponibilidade de colónias jovens sempre prontas a serem utilizadas, e a de longo prazo. Para a manutenção mais prolongada, vários anos, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo PDA como meio de crescimento, ao fim de cerca de 8-10 dias quando o fungo ocupava a placa, foram retirados pequenos pedaços de agar colonizado, auxiliados por um fura rolhas, e colocados dentro de eppendorffs com cerca de 1 mL de glicerol. Esta solução vai prevenir a desidratação do fungo, o qual foi de seguida colocado a -80° C. Esta técnica permite preservar o fungo por vários anos, sendo uma das utilizadas no laboratório de micologia do Instituto de Medicina Tropical (Lisboa, Portugal - informação pessoal). Xiao *et al.* (2004) referenciam, igualmente, a manutenção dos isolados, em cultura monospórica, em 20% de glicerol a -80°C.

QUADRO 2.1- Coleção de isolados de *Colletotrichum* spp provenientes de lesões da planta de cajueiro, oliveira e morangueiro.

ISOLADOS	Proveniência geográfica	Ano de colheita	
		do isolado	Origem do isolado
BCAI 2N	Brasil- Bahia	1994	Fruto
BCAI 3L	Brasil- Bahia	1994	Folha
BCAI 7L	Brasil- Sergipe	1994	Folha
BCAI 16L	Brasil-Ceará (Fortaleza)	1994	Folha
BCAI 17S	Brasil-Alagoas	1995	Ramo
BCAI 18L	Brasil-Ceará (Fortaleza)	1995	Folha
BCAI 19L	Brasil-Alagoas	1995	Folha
BCAI 20	Brasil-Pernambuco	1995	desconhecido
BCAI 21L	Brasil-Ceará (Pacajus)	1999	Folha
BCAI 22L	Brasil-Ceará (Pacajus)	1999	Folha
BEVC 1	Brasil-Ceará (Pacajus)	2000	Folha
BEVC 2	Brasil- Piauí (Pio IX)	2001	Folha
BEVC 3	Brasil- Gravatá	2002	Folha
BEVC 4	Brasil- Buique	2002	Folha
BEVC 5	Brasil-Pernambuco (Pesqueira)	2002	Folha
BEVC 6	Brasil- Mato Grosso	2002	Folha
AEVC 1	Angola	2001	Folha
MEVC 1	Moçambique	2001	Fruto
PE II	Portugal	2001	Fruto-oliveira
PE I9	Portugal	2001	Fruto-oliveira
CA 397	USA	desconhecido	Fragaria x ananassa

Em trabalho realizado anteriormente, recorrendo a estudos morfoculturais com alguns destes isolados, Piteira *et al.* (1998) constataram diferenças significativas entre eles, nomeadamente, nos resultados obtidos do crescimento a diferentes temperaturas. Mais tarde, em estudos de “vegetative compatibility group” (VCG), também, observaram grande variabilidade genética (Piteira *et al.*, 2000). Para esclarecer esta variabilidade foi desenvolvido o presente trabalho.

2.2- PATOGENICIDADE E ESTUDOS DA INTERACÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

A tentativa de manter uma colecção de germoplasma de cajueiro, em Portugal, para estudos de patogenicidade não teve sucesso. Assim, tendo morrido todas as plantas transferidas para o nosso país, por impossibilidade de dispor de estufas climatizadas apropriadas, todos os trabalhos que envolveram material vegetativo da planta do cajueiro foram desenvolvidos na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-Brasil. De destacar, ainda, as inoculações cruzadas efectuadas com *Colletotrichum* spp. de origem em lesões de antracnose provenientes de cajueiro e de oliveira, inoculados em folhas de cajueiro e azeitonas. Várias são as referências da potencial infecção cruzada entre diferentes espécies de *Colletotrichum* e provenientes de diferentes plantas cultivadas (Freeman *et al.*, 1998; ^aFreeman *et al.*, 2001; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2005).

2.2.1- REPICAGEM DOS ISOLADOS DO FUNGO *Colletotrichum* sp.

Neste estudo foi utilizada uma população de 20 isolados do fungo *Colletotrichum* sp, representativos de várias regiões brasileiras e africanas, com isolamentos feitos a partir de plantas de cajueiro e dois isolados de frutos de oliveira, oriundos de Portugal.

Procedeu-se à realização do meio de cultivo, PDA a 3,5%, o qual foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Para cada isolado estudado, foi retirado das margens de colónias, com cerca de 8 dias de cultura, um pequeno fragmento de agar de PDA contendo o fungo. Estes blocos de agar foram depois transferidos para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro e incubadas na sala de micoteca onde cresceram durante oito dias, à temperatura ambiente de 25°C a 30°C sob 12h de iluminação. Foram realizadas cinco repetições para cada isolado.

2.2.2- PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETATIVO

Nos viveiros do Campo Experimental de Pacajus, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical, situado a cerca de 60 Km da cidade de Fortaleza, no litoral leste do Estado do Ceará, foram atempadamente realizadas enxertias em cajueiro anão com plantas pertencentes a três clones com reacções conhecidas, em campo, de resistência (CAP-14), susceptibilidade (CAP-04) e intermédia (CCP-76). Foram utilizadas 100 plantas de cada clone, com cerca de 3 meses após a enxertia. Para tal, o material foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, situado na sede, em Fortaleza, onde foram estabelecidas as condições necessárias à realização do ensaio na sala de recepção de material, no Laboratório de Fitopatologia.

Para o efeito, os tubetes com as plantas a serem inoculadas, foram colocados em suportes. Cerca de 60 plantas de cada clone, CAP-14, CCP-76, CAP-04, foram distribuídas por nove caixas (figura 2.1). Para cada caixa foi feita uma armação, a qual foi posteriormente revestida com plástico transparente, fechando por completo todo o ambiente interior onde estavam colocadas as plantas. Conseguiu-se deste modo improvisar uma câmara húmida em cada caixa utilizada. A temperatura da sala era de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma humidade relativa de 85%, e no interior das caixas a temperatura máxima atingida foi de $29,9^{\circ}\text{C}$ e a temperatura mínima de $27,9^{\circ}\text{C}$. A humidade relativa máxima alcançada foi muita alta rondando os 100% enquanto a mínima foi de 75%, valores que estão de acordo com bibliografia consultada (^aFreeman *et al.*, 2001; Denoyes-Rothan *et al.*, 2003).

Paralelamente, prepararam-se os tabuleiros para realizar as inoculações em folhas destacadas, aproveitando-se as plantas restantes das 100 iniciais. Executaram-se alguns quadros feitos em madeira e tela, para colocar as folhas, de modo a que estas não ficassem em contacto directo com a água.

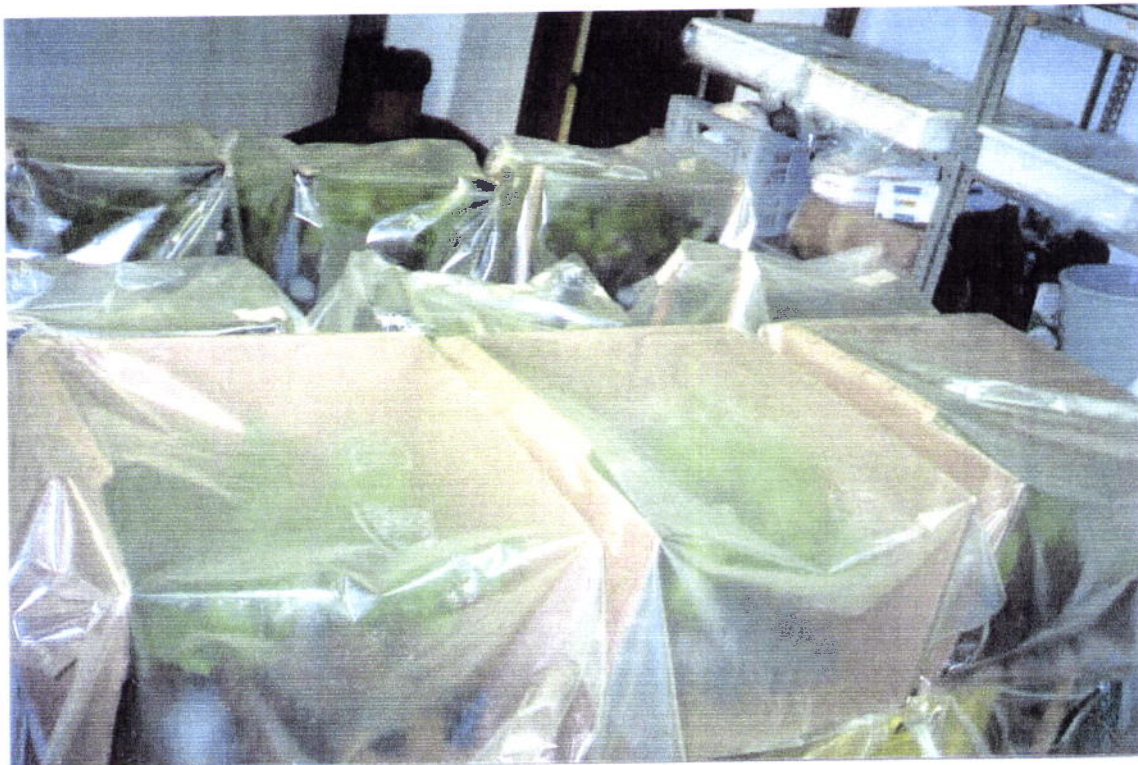


Figura 2.1- Aspecto geral do ensaio de patogenicidade com isolados de *Colletotrichum* spp. em cerca de 60 plantas de cada clone de cajueiro.

As folhas destacadas, pelo menos em número de 12 por ensaio, foram colocadas em cima da tela (figura 2.2), distribuídas por seis tabuleiros de plástico contendo camadas de papel embebido em água, sendo de seguida postos dentro de sacos de plástico humedecidos e atados, de forma a criar uma câmara húmida.

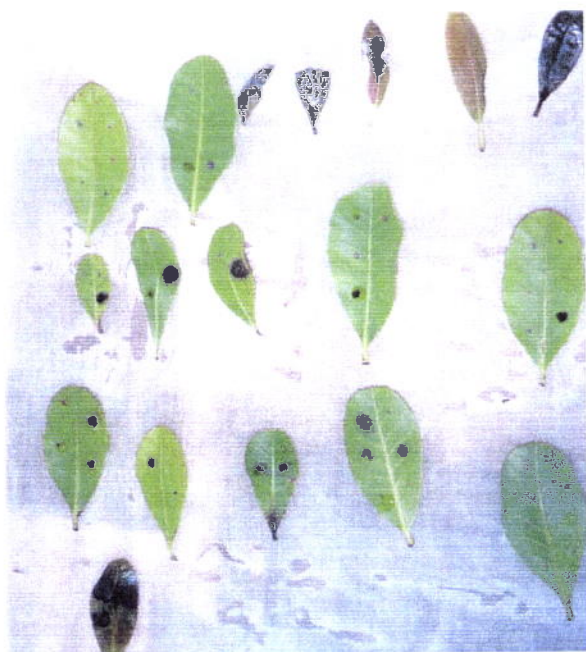


Figura 2.2- Folhas de cajueiro destacadas dispostas no tabuleiro, e inoculadas com os vários isolados de *Colletotrichum* spp.

2.2.3- OBTENÇÃO DE CONÍDIOS PARA INOCULAÇÃO

Das placas de Petri, previamente inoculadas com cada um dos isolados de *Colletotrichum* sp. em estudo, foram obtidos os conídios a partir da lavagem, com água destilada e esterilizada, da superfície de colônias com 8 dias de idade, feita com o auxílio de uma ança esterilizada à chama. Esta suspensão de esporos foi filtrada através de gaze esterilizada e dobrada em três, para dentro de um copo de vidro e a concentração de inóculo ajustada para 2×10^6 esporos/ mL com o auxílio de hemacitômetro. Procedeu-se a esta contagem para cada isolado em estudo.

2.2.4- INOCULAÇÃO DE PLANTAS DE CAJUEIRO

As inoculações realizaram-se em folhas jovens, escolhidas até à 3ª folha a partir do gomo apical, pois estudos realizados por Cardoso *et al.* (2000) revelaram que à medida que as folhas envelhecem estas tornam-se mais resistentes à infecção. Uma vez que as folhas na planta adoptam posições quase verticais, fizeram-se pequenos receptáculos com vaselina esterilizada (Figura 2.3) para colocar uma gota de 10 μ L de volume da suspensão de 2×10^6 esporos/ mL de conídios. Deste modo evitava-se o escorrimento da gota e a perda do inóculo. Em simultâneo, algumas plantas foram inoculadas por nebulização das folhas com suspensão conidial. As repetições foram casualizadas em blocos de três plantas por clone para cada isolado, recorrendo-se, no mínimo, a cinco pontos de inoculação em cada planta. As inoculações foram faseadas no tempo, ao longo de dois dias. As observações foram realizadas diariamente até ao 5º dia e nessa altura foram medidas as lesões em dois sentidos diferentes para posteriormente fazer-se a média das duas.



Figura 2.3- Planta de cajueiro do clone CAP-14 inoculado com o isolado BEVC 1 de *Colletotrichum* spp., onde se podem observar os receptáculos de vaselina realizados para conterem as gotas do inóculo.

2.2.5- INOCULAÇÃO DE FOLHAS DESTACADAS

Paralelamente às inoculações realizadas em plantas jovens, fizeram-se inoculações em folha destacada. Para o efeito foram utilizadas folhas jovens, em número de pelo menos cinco, por clone, retiradas das plantas dos três clones de cajueiro CAP-14, CCP-76 e CAP-04. As folhas destacadas foram inoculadas com gotas de 10 μ L de volume contendo a suspensão de esporos de cada um dos 20 isolados de *Colletotrichum* sp., e com gotas de água destilada e esterilizada para testemunha. Realizaram-se observações diárias, até ao 5º dia, e as lesões foram medidas em dois sentidos diferentes para posteriormente fazer-se a média das duas.

2.2.6- INOCULAÇÃO CRUZADA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

Oito dos isolados da nossa colecção de *Colletotrichum* spp. BCAA 7L, BCAA 20, BCAA 21, BEVC 1, BEVC 5, AEVC 1, PE 11, PE 19 foram inoculados em azeitonas, no Laboratório de Sanidade Vegetal (ICAM/ Universidade de Évora, Portugal. Procedeu-se à repicagem dos isolados, deixando-os crescer durante 8-10 dias a 25°C. A obtenção da suspensão de esporos a inocular nos frutos, foi feita como já descrito anteriormente.

Após as inoculações os frutos foram mantidos a duas temperaturas diferentes, 17°C ±1°C e 24°C±1°C. As repetições foram casualizadas inoculando-se 4 frutos por isolado, no primeiro caso, e 8 no segundo caso. As gotas de inóculo depositadas nos frutos tinham 2x 10⁶ esporos/ mL de concentração, e 30 µL de volume, sendo as testemunhas inoculadas com gotas de água destilada esterilizada. A avaliação dos sintomas foi realizada ao fim de 5 dias, sendo utilizada a escala de sintomas e o tratamento de resultados referido de seguida.

2.2.7- CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os sintomas, medidos em (cm), foram submetidos a uma escala utilizada para avaliação da severidade da doença:

Notação	Diâmetro médio da lesão (cm)
0-	0
1-	0,10 – 0,50
2-	0,51 – 1,00
3-	1,01 – 2,00
4-	2,01 – 3,00
5-	3,01 – 4,00

Os resultados obtidos foram mais tarde submetidos a tratamento estatístico, utilizando para a sua transformação, o índice de severidade dado pela fórmula Cardoso *et al.* (1999):

$$IS = \frac{\sum (X)}{n}$$

X= Nota dada pela escala (0, 1, 2, 3, 4 ou 5)

n= número de observações

Para efeitos de ANOVA os valores sofreram depois uma transformação em $\sqrt{(x+0,5)}$.

Os isolados foram considerados pouco virulentos na escala de 0 – 1, moderadamente virulentos na escala 2 - 3 e muito virulentos os que causaram lesões na escala de 4 – 5.

Os resultados apresentados para este estudo, são-no sob a forma de médias \pm erro padrão da média. Recorreu-se ao teste de análise de variância ANOVA para os efeitos “clone”, “isolados” e “clone” x “isolados”. Para o efeito foi utilizado o programa estatístico SISVAR, programa desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (Minas Gerais - Brasil). Para as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey. A significância das diferenças entre médias foi testada pelo teste da diferença mínima (DMS) e estabelecida para a probabilidade igual ou inferior a 0,05.

2.3- ANÁLISE ISOENZIMÁTICA

Tem existido alguma ambiguidade na classificação de *Colletotrichum* spp. Muitos dos isolados agora conhecidos como *C. acutatum* eram com frequência denominados de *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* e *Gloeosporium* (von Arx) quando associados à antracnose, como por exemplo, no morango e na oliveira (Peres *et al.*, 2005). Para averiguar a variabilidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., pertencentes à colecção em estudo, procedemos à análise isoenzimática utilizando o sistema de Electroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) (LaemmLi, 1970).

2.3.1- CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

As várias culturas dos fungos foram submetidas a condições uniformes de luz, temperatura e nutrição, assim como a um período específico de crescimento, após o qual foi colhido o micélio.

As colónias dos isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp. foram repicadas, tirando um pequeno bloco de agar com fungo das margens de uma placa de Petri, o qual foi colocado no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo PDA a 3,5 %. Após oito dias em câmara de crescimento a 25° C e ausência de luz, foram retirados das margens das colónias, blocos de agar de cada isolado, com o auxílio de um fura rolhas, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, e esterilizado à chama. Estes blocos de agar foram depois transferidos para balões Erlenmeyer de 100 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio líquido (Alfenas & Brune, 1998; Assunção *et al.*, 1999), e incubados novamente na câmara de crescimento sob as condições acima descritas, durante sete dias. Foram utilizados cinco Erlenmeyers por isolado.

O meio líquido para a cultura do fungo é constituído pelos seguintes componentes: 10g de sacarose; 2g de L-asparagina; 2g de extracto de levedura; 1g de KH_2PO_4 ; 0,1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,44 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,48 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,36 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; perfazendo-se para 1000 mL de água destilada, e pH ajustado para 5,3. Distribuiu-se pelos Erlenmeyers de 100mL e, no final foi autoclavado, durante 20 minutos a 120°C .

Após o período de incubação e crescimento do micélio, em meio líquido, procedeu-se à sua colheita e pesagem. Em câmara de fluxo laminar vertical e com o auxílio de uma pinça e bisturi, previamente esterilizados à chama, retiraram-se os discos de massa micelial de dentro de cada um dos Erlenmeyers. Passaram-se por água destilada esterilizada, colocaram-se em papel de filtro esterilizado retirando-se o excesso de humidade (Assunção *et al.*, 1999; Denoyes-Rothan, *et al.*, 2003), e colocaram-se dentro de placas de Petri esterilizadas. Ainda dentro da câmara de fluxo laminar, efectuou-se a

pesagem do micélio utilizando-se cerca de 4 g de micélio de cada isolado para análise posterior.

2.3.1.1- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a determinação da concentração de proteínas foi utilizado o protocolo fornecido pela SIGMA – Bradford Reagent “Standard 3.1 mL Assay Protocol”. As leituras foram efectuadas no espectrofotómetro em valores de absorvância de A_{595} nm . A curva padrão foi traçada no programa StatView por uma recta de regressão e os valores de absorvância das amostras desconhecidas, transformados em valores de massa no programa Excell .

2.3.1.2- PREPARAÇÃO DA AMOSTRA MICELIAL

O micélio, depois de retirado o excesso de humidade, foi macerado na presença do tampão de extracção (0,625M Tris, 0,2M glicina com 10% de glicerol, pH 6,8) em almofariz de porcelana, previamente arrefecido no congelador, e mantido em banho de gelo durante a maceração, de modo a evitar reacções de oxidação ou desnaturação das proteínas, mudanças de pH, ou a formação de outros compostos celulares, que afectariam a actividade enzimática. Depois de bem macerado, adicionaram-se 10 μ L de mercaptoetanol e colocou-se em tubo eppendorf, e centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos, no rotor da centrífuga de bancada, previamente refrigerado.

Depois de centrifugadas as amostras, retiraram-se 20 μ L do sobrenadante, contendo extracto proteico de cada uma delas, para outro eppendorf, ao qual se juntou 5 μ L de tampão da amostra (25% de 0,5 M Tris HCl (pH 6,8); 40 % de glicerol; 20 % de β -mercaptoetanol; 5 % de água destilada e 10 % de azul de bromofenol a 1%).

2.3.1.3.- PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) E ELECTROFORESE

Os géis de poliacrilamida são formados por uma polimerização catalítica das formas monoméricas da acrilamida e bis-acrilamida. (Hillis, *et al.*, 1996). Estes géis permitem a obtenção controlada da dimensão dos poros e uma alta definição das bandas. Além disso apresenta a vantagem de ser transparente, permitindo a utilização de pequenas quantidades de proteína, contudo tem o inconveniente de ser neuro-tóxica (Dias, 1994). O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e bis-acrilamida, para separação de moléculas maiores, usam-se géis com menos quantidade de acrilamida (Alfenas *et al.*, in Alfenas, 1998).

Limparam-se, previamente, as placas de vidro, duas pequenas (7,25 x 10,25 cm) e duas grandes (8,25 x 10,25 cm), o pente e os separadores (0,75 mm de espessura), com álcool, retirando todos os vestígios de gordura. Para selar lateralmente as placas, aplicou-se silicone ou vaselina, com um palito sobre os separadores, colocando-os em seguida entre os dois vidros e apertando-os com molas. A base foi selada utilizando um vidro, no qual, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, foi colocada uma porção de agarose, previamente liquefeita ao calor. De seguida, as mini placas foram colocadas em cima da agarose, em posição vertical, o que permitiu uma deslocação ascendente da agarose que, após solidificar constituiu uma espécie de isolante.

Para a análise das isoenzimas, utilizaram-se inicialmente géis de poliacrilamida, contendo acrilamida a 12,5% e mais tarde utilizaram-se géis a 10% utilizando-se a composição do gel referida nas instruções da empresa fornecedora, GIBCOBRL. No caso do gel separador, o volume total utilizado para o mini gel é de 10,01 mL, enquanto para o gel grande é de 50,05 mL. A 12,5% a composição do gel foi a seguinte: 41,96% de acrilamida bis-acrilamida (29:1); 24,98% de 1,5 M Tris Cl (pH 8,8); 30,97% de água destilada; 1% de SDS (sulfato dodecil de sódio); 1% de APS (amoniumperoxodisulfat) 0,1g/ mL água; e 0,1% de TEMED (tetrametiletlenodiamina). Para os géis a 10% as quantidades devem ser: 32,97% de acrilamida bis-Acrilamida (29:1); 24,98% de 1,5 M Tris Cl (pH 8,8); 39,96% de água destilada; 1% de SDS (sulfato dodecil de sódio); 1% de APS (amoniumperoxodisulfat) 0,1g/ mL água; e 0,1% de TEMED (tetrametiletlenodiamina).

O gel concentrador, no caso de ser mini, mantém o volume de 10,01 mL, enquanto o gel grande passa a ter 30,03 mL. As quantidades, relativamente aos reagentes, devem ser de: 12,99% de acrilamida bis-acrilamida (29:1); 24,98% de 0,5 M Tris Cl (pH 6,8); 59,94% de água destilada; 1% de SDS (sulfato dodecil de sódio); 1% de APS (amoniumperoxodisulfat) 0,1g/ mL água; e 0,1% de TEMED (tetrametiletlenodiamina).

Depois de misturar todos os reagentes, com cuidado para evitar a introdução de bolhas de ar colocou-se a mistura do gel “separador” nas placas de vidro, até a uma marca previamente estabelecida, cerca de 0,5 cm abaixo da extremidade dos dentes do pente que delimitam os alvéolos para depósito de cada amostra. Em cima deste gel aplicou-se um pequeno volume de água saturada em butanol, para permitir uma superfície de polimerização completamente horizontal e impedir que o oxigénio do ar iniba a mesma. Após o gel polimerizar, retirou-se o butanol, lavou-se a superfície 5 vezes com água destilada e tampão do reservatório diluído (1/10).

Depois de completar o preenchimento das placas de vidro com o gel “concentrador”, colocou-se por cima um pente que permite a formação de alvéolos. Após a polimerização, as placas eram envolvidas em papel húmido absorvente e guardados a 4° C de temperatura, até ao dia seguinte.

Para a análise das isoenzimas, foi utilizado o sistema electroforético vertical denominado Mini-V 8.10, com uma capacidade de dez alvéolos, desprezando-se sempre os alvéolos das extremidades. Após a colocação das amostras, a electroforese realizou-se a 200 volts, à temperatura de 4°C ± 1°C durante 45 a 50 minutos.

2.3.2- DETECÇÃO DE ISOENZIMAS

Para a detecção de isoenzimas foram utilizadas as soluções adequadas a cada uma das enzimas estudadas. Depois de reveladas as bandas nos géis, foram feitas medições e anotadas as respectivas mobilidades relativas. O cálculo da mobilidade relativa das bandas foi efectuado pela fórmula descrita por Alfenas *et al.* (1998), ou seja:

$R_f = d / D$ (distância percorrida pela molécula/ Distância percorrida pela linha frontal).

As medições foram transformadas em matrizes de ausência (0), ou presença (1) de bandas, correspondentes às “formas” das enzimas e estes dados submetidos à análise estatística com o programa NTSYS-PC, produzido por UPGMA sobre matrizes de distância (Dice) calculadas a partir de 500 repetições criadas por “bootstrapping” dos dados originais. Os perfis electroforéticos foram repetidos pelo menos duas vezes, sendo utilizado como padrão o isolado BEVC 4. No Quadro 2.2, podemos observar as enzimas e o código respectivo.

A revelação dos géis foi feita consoante a enzima em estudo, procedendo-se, depois à sua fixação. Numa primeira fase, utilizou-se uma solução aquosa de glicerol a 10%, e, mais tarde, passámos a utilizar uma solução hidro - alcoólica a 50%, excepto para revelar a enzima SOD usando-se, neste caso, uma solução de ácido acético glacial a 10% e etanol a 50%. Imediatamente a seguir à fixação, fez-se a secagem dos géis, à temperatura de 70°C, sob vácuo, durante 45 a 60 minutos.

Quadro 2.2- Enzimas intramiceliais de *Colletotrichum* spp. analisadas em gel de poliacrilamida (PAGE), para determinação de polimorfismos isoenzimáticos.

Enzima	Nº EC ¹	Abreviatura
Esterase	3.1.1.1	EST
Fosfatase Ácida	3.1.3.2	ACP
Fosfatase Alcalina	3.1.3.1	AKP
Fosfoglucomutase	5.4.2.2	PGM
Fosfoglucoisomerase	5.3.1.9	PGI
6-Fosfogluconato Desidrogenase	1.1.1.44	PGDH
Hexoquinase/ Hexocinase	2.7.1.1	HK
Isocitrato Desidrogenase	1.1.1.42	IDH
Malato Desidrogenase	1.1.1.37	MDH
Superóxido Dismutase	1.15.1.1	SOD

¹Enzyme Commission (código da enzima)

ESTERASE (EST) - Para a revelação da esterase utilizou-se, numa primeira fase, o protocolo seguido por Dias (1994), depois o referido por Baaziz e Saaidi (1987) e mais tarde o método 1 referenciado por Brewer e Sing (1970) entre outros citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998). Este método foi ainda modificado nestes estudos, uma vez que se usou o tampão Tris, em vez do tampão borato, no tampão dos eléctrodos e tampão do gel. Este método foi o adoptado por ter sido o único que revelou a presença de bandas no gel.

Previamente foi feita uma solução de substrato, que iria integrar a solução de revelação, a sua composição foi a seguinte: 1g de α - naftil acetato, 1g de β - naftil acetato, 50 mL de acetona e água destilada até perfazer os 100 mL de volume total.

A solução de revelação consistiu em: 10% de Tampão Tris 0,5 M (pH 7,1); 3% da solução de substrato; 50 mg de Fast blue RR salt; e água destilada até perfazer os 50 mL de volume total.

Depois de terminada a electroforese, incubaram-se os géis dentro da solução de revelação, à temperatura ambiente, até que surgissem as bandas indicadoras da presença da enzima (cerca de 10 minutos). Os géis foram fixados em solução hidro - alcoólica a 50%.

FOSFATASE ÁCIDA (ACP) - Para a revelação da fosfatase ácida, utilizou-se inicialmente o protocolo seguido por Eiras – Dias (1994), depois o adoptado por Scandalos (1969) e Conkle *et al.* (1982), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998), e por último adoptámos o protocolo referenciado por Guedes (1988).

A solução consistia em 25 mL de Tampão acetato de sódio 0,1M ou 0,005M (pH 5,0), 25 mg de α - naftilfosfato ácido de sódio, e 25 mg de Fast Garnet GBC salt.

Os géis foram incubados no escuro a uma temperatura entre 37°C - 40°C, durante 1h a 3h, até que aparecessem as bandas, sendo de seguida fixados em solução hidro - alcoólica a 50%.

FOSFATASE ALCALINA (AKP) - O protocolo seguido para a revelação da fosfatase alcalina foi o adoptado por Boyer (1961) citado por Brune *et al.*, in Alfenas (1998), o qual era constituído por: 50 mL de Tampão Tris 50 mM (pH8,5); 0,5 mL de MgCl₂ 1M; 0,5 mL de MnCl₂ 1M; 50 mg de Fast Blue RR sal; e 1,5 mL de α -naftilfosfato de sódio 1% em acetona 50%. Primeiro foi dissolvido o sal diazónico (Fast Blue RR sal) na solução de naftilfosfato e, em seguida, adicionou-se a solução tampão e os demais componentes.

Os géis foram incubados no escuro a uma temperatura de 30°C, até que as bandas aparecessem. Depois da revelação das bandas foram fixados em solução hidro - alcoólica a 50%.

FOSFOGLUCOMUTASE (PGM) - A solução de revelação utilizada para a fosfoglucomutase foi a adoptada por Bergmeyer *et al.* (1970), entre outros, citados por Brune *et al.* in Alfenas (1998).

A solução de revelação utilizada para esta enzima foi a seguinte: 50 mL de Tampão Tris 0,2 M (pH 8,0); 300 mg de A – D – Glucose 1 phosphate disodium *hydrate; 16,75 mg de ácido etileno diamino tetra acético; 10 mg de β -nicotnamide adenine dinucleotide phosphate; 1 mL de Cloreto de magnésio (1%); 5 mg de phenazine methosulfate); 10 mg de (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio-brometo); e 50 Unidades de G6PDH (D-glucose-6-fosfato desidrogenase).

Depois de terminada a electroforese, incubaram-se os géis dentro da solução de revelação, no escuro e a 30°C, até que surgissem as bandas indicadoras da presença da enzima, sendo posteriormente fixados em solução hidro - alcoólica a 50%.

FOSFOGLUCOISOMERASE (PGI) - Para a revelação desta enzima utilizou-se a solução utilizada por Yeh e O'Malley (1980) e Widmer *et al.* (1986), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998), tendo a seguinte composição: 100 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 7,5); 80 mg de D-frutose-6-phosphate; 20 mg de β -nicotnamide adenine dinucleotide phosphate; 1 mL de cloreto de magnésio (1M); 4 mg de phenazine

methosulfate); 20 mg de (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio-brometo); e 20 Unidades de G6PDH (D-glucose-6-fosfato desidrogenase).

Os géis foram incubados, nesta solução, no escuro a 30°C, por 30 a 60 minutos. Depois da revelação das bandas os géis foram fixados em solução hidro - alcoólica a 50%.

6-FOSFOGLUCONATO DESIDROGENASE (PGDH) - Terminada a electroforese a actividade da enzima 6- fosfogluconato desidrogenase (PGDH), foi revelada seguindo o protocolo utilizado por Sing e Brewer (1969), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998).

A solução de revelação teve a seguinte composição: 50 mL de tampão Tris 0,1 M (pH 7,5); 10 mg de ácido 6-P- glucónico; 7,5 mg de NADP⁺; 2 mg de PMS; 10 mg de MTT; e 49 mg de MgCl₂.

No final, os géis foram incubados no escuro, a 30°C, por 15 a 30 minutos até que aparecessem as bandas. Depois de retirados da solução de revelação os géis foram fixados na solução hidro-alcoólica a 50%.

HEXOQUINASE (HK)- (HEXOCINASE) - Para a revelação da enzima hexoquinase foi seguido o protocolo referenciado em Darrow e Colowick (1962), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998). A solução de revelação consistiu em: 100 mL de tampão Tris 50 mM (pH 8,4); 2 mL de MgCl₂ 1M; 180 mg de Glucose; 130 mg de ATP Na₂ (Adenosine-5'-triphosphate); 15 mg de NADP⁺ (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); 4 mg de PMS (phenasine methosulfate); 20 mg de MTT (dimethyl thiazol – diphenyl tetrazolium bromide); e 25 Unidades de G6PDH (D-glucose-6-fosfato desidrogenase).

De seguida, os géis foram incubados nesta solução no escuro, a 30° C, durante 1 hora ou até que as bandas aparecessem e fixavam-se os géis em solução hidro-alcoólica a 50%.

ISOCITRATO DESIDROGENASE (IDH) - A actividade enzimática da isocitrato desidrogenase foi revelada utilizando o protocolo de Fine e Costello (1963), citados por

Brune *et al.*, in Alfenas (1998). A solução utilizada foi a seguinte: 50 mL de Tris- HCl a 0.1M (pH7.5); 50 mg de DL- isocitrato, Na₃; 7,5 mg de NADP⁺ (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); 0,5 mL de MnCl₂, 1M; 2 mg de PMS (phenasine methosulfate); e 10 mg de MTT ou NBT (Dimethyl thiazol –diphenyl tetrazolium bromide ou Nitro blue tetrazolium).

No final, os géis foram incubados no escuro, a 30° C durante 15 a 30 minutos, depois retirou-se a solução e fixaram-se os géis em solução hidro-alcoólica a 50%.

MALATO DESIDROGENASE (MDH) - A solução de revelação adoptada para a malato desidrogenase foi a seguida no protocolo referenciado em Fine e Costello (1963), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998), a qual tinha a seguinte composição: 50 mL de tampão Tris 0,1M, (pH 7,5); 1,5 mL de DL- malato 1M (pH 7,5); 15 mg de NAD⁺ (β-nicotinamide adenine dinucleotide); 2 mg de PMS (phenasine methosulfate); e 10 mg de MTT ou NBT (dimethyl thiazol –diphenyl tetrazolium bromide ou nitro blue tetrazolium). Ter em atenção que para este protocolo a amostra deve ser do dia.

Os géis foram incubados no escuro, a 30° C, por 15 a 30 minutos ou até que as bandas aparecessem. Retirou-se a solução e fixaram-se os géis em solução hidro-alcoólica a 50%..

SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) – Para a revelação desta enzima, inicialmente começou-se por utilizar o protocolo referenciado por McCord e Fridovich (1969), citados por Brune *et al.*, in Alfenas (1998). Posteriormente, foram utilizadas as soluções A e B indicadas por Flohé & Ötting (1984).

A solução de revelação para esta enzima decompõe-se em duas, sendo a solução A composta por: 100 mL de água destilada; 25 mg de NBT (nitro blue tetrazolium); e 10 mg de riboflavina. A solução B consistiu em 100 mL de água destilada; e 1 g de TEMED.

Os géis foram incubados, na solução A, no escuro a 30°C por 20 a 45 minutos, depois foram retirados desta solução e incubados na solução B, sob iluminação, por 15 minutos

ou até que as bandas acromáticas aparecessem e o background ficasse escurecido. Assim que as bandas eram visualizadas, procedia-se de imediato à sua fixação em uma solução de ácido acético glacial a 10% e etanol a 50%, de forma a não se perder o background.

2.4- ESTUDO DE REACÇÕES SEROLÓGICAS COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA *C. acutatum* PELA TÉCNICA PTA- ELISA

A técnica ELISA possui inúmeras vantagens em relação a outras, nomeadamente a elevada especificidade e sensibilidade, rapidez, facilidade de execução e a possibilidade de testar simultaneamente várias dezenas de amostras, o que nos levou a optar pela sua aplicação.

As reacções serológicas dos isolados de *Colletotrichum* spp. foram estudadas pela técnica PTA- ELISA “Plate trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay”, utilizando anticorpos monoclonais específicos para *Colletotrichum acutatum*, fornecidos pela empresa ADGEN - Agrifood Diagnostics, UK, seguindo o seu protocolo segundo uma modificação do procedimento descrito por Clark & Adams (1977).

Para os testes imunológicos repicaram-se os isolados, mantidos em cultura monospórica, e colocaram-se a crescer, em placas de Petri contendo PDA, a 25°C durante 8 a 10 dias. Após este tempo foram recolhidos os esporos de cada um dos isolados de *Colletotrichum* spp., 18 provenientes de cajueiro, mais dois de oliveira e um de morangueiro, este último conhecido previamente como *C. acutatum* (CA 397), caracterizado anteriormente por Talhinhos *et al.* (2002), sendo utilizado como controlo positivo. Para o controlo negativo, foram usados esporos de *Botrytis cinerea*.

De cada um dos isolados, foi retirado um pedaço de cerca de 0,5 mL de PDA da placa colonizada e com massa de esporos formada. Esses pedaços foram colocados dentro de tubos de eppendorf, os quais continham 1 mL de água destilada e esterilizada. De seguida, sujeitaram-se a agitação em vortex, ressuspensando-se os esporos. Das amostras e do controlo positivo e negativo, foram então aplicados 100 µL dentro dos

alvéolos das microplacas, as quais foram incubadas, em câmara húmida, à temperatura de 37°C por duas horas. Após este tempo procedeu-se a três lavagens com PBST (“phosphate buffered saline” + 0,05% Tween 20, pH 7,2 – 7,4) durante três minutos cada. De seguida, as placas foram invertidas de modo a remover o tampão por completo. Depois de bem secas, bloquearam-se as superfícies dos alvéolos juntando-se a cada um, 200 µL de PBST contendo 5% de leite magro (“blocking buffer”) e incubou-se, nas mesmas condições anteriormente descritas, por uma hora. Ao final desse tempo voltou-se a lavar a placa como descrito atrás. Entretanto, diluiu-se na proporção de 1/10, o anticorpo monoclonal (Mab- “ADGEN codes ending in” – 03/04) e o conjugado anti-rat IgG-AP (“ADGEN anti-ra”t 04-001/002/003) no tampão PBST contendo 0,2% de BSA (“bovine serum albumin”) e juntou-se 100 µL (“Mab/ conjugate dilution buffer”) a cada um dos poços da placa. Incubou-se, sempre nas mesmas condições por mais duas horas, após as quais se fizeram quatro lavagens. Finalmente, preparou-se o substrato imediatamente antes de usar, juntando-se “p-nitrophenyl phosphate” (1mg/mL) ao tampão do substrato (“diethanolamine buffer” 1 M – 9,7% C₄H₁₁NO₂, 0,02% MgCl₂ x 6 H₂O, pH 9,8). Adicionou-se 100 µL do substrato preparado a cada um dos alvéolos da placa e colocou-se a incubar, no escuro à temperatura ambiente por uma a duas horas.

No final, deste tempo identificou-se visualmente a coloração amarela (resultado positivo), que corresponde à presença da espécie *C. acutatum*, e incolor (resultado negativo). Foi também feita a leitura de absorvância do conteúdo dos alvéolos da placa a 405 nm, utilizando o espectrofotómetro da “BIO- RAD, Model 680, plate reader”.

Amostras com valores de absorvância superiores ao dobro da média de absorvância dos controlos negativos foram consideradas positivas, isto é, identificadas como sendo a espécie *C. acutatum*.

2.5- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

2.5.1- EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

Para a extracção de DNA as condições de crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp. foram idênticas às utilizadas para o estudo isoenzimático, utilizando-se o mesmo meio líquido para o crescimento do micélio. Depois de retirado o excesso de humidade dos discos de micélio, estes foram macerados, na presença de azoto líquido, em almofarizes de porcelana previamente arrefecidos, com a ajuda de um pilão. Depois de bem macerados e reduzidos a pó, colocaram-se 100 mg de micélio, de cada isolado, dentro de eppendorfs (1,5 mL de volume) devidamente identificados e conservaram-se a uma temperatura de 80°C negativos (Alfenas & Brune, 1998; Assunção *et al.*, 1999; Denoyes-Rothan, *et al.*, 2003).

Utilizaram-se dois métodos para a extracção do DNA do micélio dos isolados do fungo. Inicialmente, seguimos o protocolo de extracção de DNA utilizando fenol- clorofórmio, adaptado de Raeder & Broda, (1985). Utilizaram-se 100 mg de micélio macerado e conservado a 80°C negativos, o qual foi ressuscitado em 500 µL de tampão de extracção (200 mM Tris-HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, contendo 0,5 % SDS-sodium dodecyl sulfate), e homogeneizado por inversão, com muito cuidado para não danificar o DNA. Logo de seguida, foram adicionados 350 µL de fenol, homogeneizando-se, pipetando devagar, mas repetidamente e com cuidado, a emulsão resultante. Depois, adicionaram-se 150 µL duma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1), misturando-se por inversão e colocou-se a centrifugar por 15 minutos a 13 000 rpm no frio. Após a centrifugação recuperou-se a fase aquosa para um eppendorf, tendo o cuidado de medir o volume que se recuperou. À fase aquosa adicionaram-se 10 µL de RNase A (10 mg/ mL) e colocou-se a 37°C, por 30 minutos. Extraiu-se a parte proteica por adição de fenol mais uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), na proporção de 1:1. Misturou-se suavemente e foi a centrifugar durante 5- 10 minutos a 13 000 rpm no frio. Mais uma vez, recuperou-se a fase aquosa quantificando o volume obtido e adicionou-se o equivalente a 0,7 desse volume de isopropanol. Misturou-se por inversão para precipitar o DNA e levou-se a centrifugar

durante 5- 10 minutos a 13000 rpm em centrifuga de bancada, no frio. Retirou-se o isopropanol o melhor possível (verteu-se o conteúdo do eppendorf, fez-se uma centrifugação de 1 minuto e retirou-se o excedente do isopropanol, com auxílio de uma micropipeta). Quando seco adicionou-se à pellet, no eppendorf, 1000 µL de etanol a 70% e colocou-se a centrifugar durante 5- 10 minutos a 13 000 rpm no frio. Retirou-se o etanol e quando a pellet secou, incubou-se a 37°C por 5 minutos, com o eppendorf destapado. Quando se obteve a pellet completamente seca, adicionou-se 50 µL de água MQ para dissolver o DNA e guardar no congelador a - 20°C, ou a 4°C se for por pequenos períodos de tempo (Talhinhas, 2002).

Por este método ser moroso e utilizar reagentes muito tóxicos, utilizámos outro protocolo de extracção de DNA, o “Qiagen Dneasy Plant System Kit”, fornecido pela empresa Qiagen, o qual mostrou ser muito mais rápido e eficaz e sem tantos riscos inerentes à sua realização (Talhinhas, 2002; Talhinhas *et al.* 2002).

No primeiro passo deste protocolo, a presença do tampão incluído no kit provoca a ruptura mecânica e bioquímica das paredes e membranas celulares e a degradação de RNA, seguida de precipitação e separação de proteínas e polissacáridos. O DNA fica aderente a uma membrana de sílica – gel na presença de etanol e de uma solução salina otimizada para a adesão selectiva do DNA à membrana. Este processo permite a eliminação de hidratos de carbono, polifenóis e outros metabolitos. Baixas concentrações salinas e pH alcalino permitem ressolubilizar e recuperar o DNA purificado.

Os reagentes fornecidos no Kit são os seguintes:

- ▶ Tampão AP1
- ▶ Tampão AP2
- ▶ Tampão AP3
- ▶ Tampão AW (contém etanol a 70%)
- ▶ Tampão AE
- ▶ Rnase A (100 mg.cm⁻³)

Outros materiais fornecidos no Kit incluem:

- ▶ Colunas “QIAshreder”
- ▶ Colunas “DNeasy”
- ▶ Tubos de recolha de 2 cm³

Para a purificação de DNA utilizou-se o seguinte protocolo: foram adicionados 400 µL do tampão AP1 e 4 µL de RNase A (100 mg/ mL) ao eppendorf que continha 100 mg de material do fungo, previamente macerado em fresco, e que foi mantido a 80°C negativos. Agitou-se vigorosamente em vortex até que nenhum agregado fosse visível (quando necessário usou-se um pistão para desfazer os agregados). Para obter a lise das células e a degradação do RNA pela RNase, incubaram-se os tubos durante 10 minutos a 65°C, misturando-se por inversão duas a três vezes durante este período. De seguida, para precipitar os detergentes, proteínas e polissacáridos, adicionaram-se 130 µL de tampão AP2. Misturou-se e incubou-se durante cinco minutos a 4° C, em banho de gelo. Ao fim desse tempo foi a centrifugar durante cinco minutos a 13 000 rpm, por forma a separar o precipitado do sobrenadante. Após a recolha do sobrenadante, este foi aplicado à coluna de centrifugação “QIAshreder” colocada num tubo de recolha de 2 cm³ e levou-se a centrifugar por dois minutos a 13 000 rpm. Terminada a centrifugação transferiu-se o eluído para um novo tubo sem perturbar o precipitado que se possa ter formado, e medindo o volume de solução obtido (geralmente 450 µL). De seguida, adicionou-se metade do volume obtido de tampão AP3, e seguindo o protocolo fornecido, adicionaram-se 1,5 volumes de AP3 (que já contem etanol adicionado segundo informação vinda no frasco do tampão), misturando-se por pipetagem. Da mistura anterior aplicou-se 650 µL à coluna de centrifugação “DNeasy”, e colocou-se na centrifuga durante um minuto a 13 000 rpm. No final da centrifugação eliminou-se o eluído, recolocando a coluna no tubo de recolha, e repetindo o procedimento com o resto do volume da amostra (o DNA fica retido na membrana). Esta coluna foi colocada num novo tubo de recolha de 2 cm³, adicionou-se 500 µL de tampão AW e foi a centrifugar durante um minuto a 13 000 rpm. Eliminou-se o eluído, recolocando a coluna no tubo de recolha. Para lavagem do DNA adicionou-se 500 µL de tampão AW à coluna e centrifugou-se durante dois minutos a 13 000 rpm por forma a eliminar vestígios de etanol. Nesta fase, substituiu-se o tubo de recolha por um tubo eppendorf,

com tampa cortada, colocando-se a coluna onde foi recebido o DNA. Prosseguiu-se adicionando à coluna (directamente ao centro da membrana) 100 μL de tampão AE (previamente aquecido a 65° C) e, levou-se a incubar durante cinco minutos à temperatura ambiente (15° C – 25° C). No final deste tempo, centrifugou-se durante um minuto a 13 000 rpm. Menores quantidades de tampão podem ser usadas com vista a obter uma maior concentração do DNA, mas reduzindo a quantidade total obtida (processo para libertar o DNA da membrana e ficar eluído no tampão). O passo anterior foi repetido usando o mesmo tubo para a colheita do DNA, ou um tubo novo, evitando a diluição da primeira eluição com uma segunda menos concentrada.

As amostras resultantes das extracções de DNA foram posteriormente quantificadas por electroforese:

Preparou-se um gel de agarose 1% em Tampão TBE [0,5 X]. A solução de stock é concentrada [5X]: em cada 1000 mL, contém 54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico e 20 mL de (0,5 M) EDTA, pH 8,0.

De seguida prepararam-se as amostras para aplicar 10 μL em cada alvéolo. A 2,5 μL da amostra de DNA juntou-se 1 μL de “loading buffer” (0,25% de bromophenol blue e 15% de ficcol em água) e 6,5 μL de TBE [0,5X]. Para os marcadores de referência utilizou-se 1 μL de marcador (1Kb DNA ladder – GIBCOBRL- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a que se juntou 1 μL de “loading buffer” e 8 μL de tampão TBE [0,5X]. A electroforese decorreu a 80 volts durante uma hora, à temperatura ambiente.

Após a electroforese terminada, colocou-se o gel a corar numa solução de brometo de etídio [0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$] por 30 minutos. A visualização das bandas de DNA genómico fez-se num transiluminador sob radiação UV, a 312 nm e registou-se em fotografia.

A quantificação fez-se por comparação da intensidade das bandas das amostras, relativamente às apresentadas pelos marcadores.

2.5.2- POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA DIFERENCIAR ESPÉCIES

A utilização de técnicas baseadas em PCR contribuem para esclarecer aspectos de taxonomia, de diagnose e de epidemiologia, eventualmente permitindo a adopção de estratégias de controlo adequadas para os diferentes fitopatogénios. Nas espécies, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* é encontrada uma grande diversidade genética na região ITS “internal transcribed spacer” do rDNA (ribossomal DNA), a qual serve de base para os discriminar.

Foram analisados todos os isolados pertencentes à colecção, utilizando-se o CA 397 como controlo positivo para o *C. acutatum*. Como controlo negativo foi utilizada água MQ em vez do DNA.

Neste estudo utilizaram-se iniciadores de sequência 5'- 3' utilizado por diferentes autores (Brown *et al.*, 1996; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Adaskaveg *et al.*, 1997; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Talhinhos *et al.*, 2002; Kulik *et al.*, 2005), adquiridos à Invitrogen, Life technologies :

- Iniciador comum, o qual emparelha na região codificadora da sub-unidade 25 S do rDNA:

ITS₄ – TCCTCCGCTTATTGATATGC - (41,5 nmol) (White *et al.*, 1990)

- Iniciador's específicos, os quais emparelham na região ITS1:

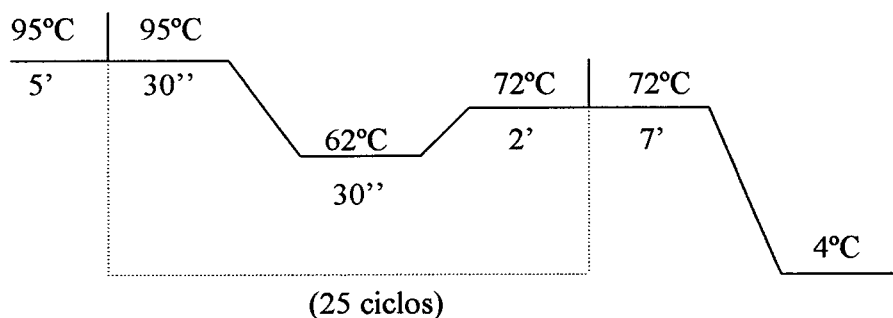
CaInt₂ – GGGGAAGCCTCTCGCGG - (51,5 nmol) (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996)

CgInt – GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG – (51,4 nmol) (Mills *et al.*, 1992)

Antes de utilizar os iniciadores procedeu-se à sua ressuspensão em água MQ e fizeram-se alíquotas diluídas num factor de 1: 100 (5pmol/ µL).

A mistura de PCR, com o volume total de 25 μL , continha 25 ng de DNA genómico, 2,5 μL de tampão *Taq* [10X], 1.5 mM de MgCl_2 [25 mM], 0,2 mM de dNTPs [10mM], 1 μM de cada par de iniciadores [5 μM], e 1U de *Taq* DNA polymerase [5U/ μL], perfazendo-se o restante volume com água MQ.

As reacções utilizando-se os iniciadores CaInt₂ e CgInt, realizaram-se em tempos diferentes, num termociclador (Biometra) programado para:



Uma fase de 5 min a 95°C – desnaturação do DNA inicial por acção do calor
 30 s a 95°C – desnaturação do DNA
 30 s a 62°C – emparelhamento ou ligação dos iniciadores (“annealing”)
 2 min a 72°C – extensão dos iniciadores (síntese do DNA)
 Uma fase de 7 min a 72°C – extensão final (término da síntese de DNA).

} 25 ciclos

Os produtos da reacção de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5%) submetido a 50 Volts por 2 h, corado em solução de brometo de etídio, por 15 a 30 minutos e visualizados com radiação UV. No final registou-se em fotografia o resultado obtido.

3 – RESULTADOS

3.1- PATOGENICIDADE E ESTUDOS DA INTERACÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

Os resultados obtidos a partir destes estudos permitiram inferir conclusões consideradas muito importantes para estudos futuros de epidemiologia da doença, bem como para estudos a realizar em laboratório.

Previamente foram observadas algumas características morfológicas dos isolados, que inferiam a possibilidade destes se diferenciarem significativamente uns dos outros. Em termos de morfologia das colónias, a cor rosa ou laranja atribuída, geralmente, a *C. acutatum*, não foi verificada para o isolado BCAI 20 de cor laranja, o qual revelou, no decorrer deste trabalho, pela técnica de PCR, ser *C. gloeosporioides*. No caso dos isolados BCAI 7L e BCAI 21, a cor cinzenta, usualmente atribuída a *C. gloeosporioides*, nesta colecção de isolados de *Colletotrichum* spp. revelou estar igualmente, associada a isolados de *C. acutatum*. Observe-se a figura 3.1.

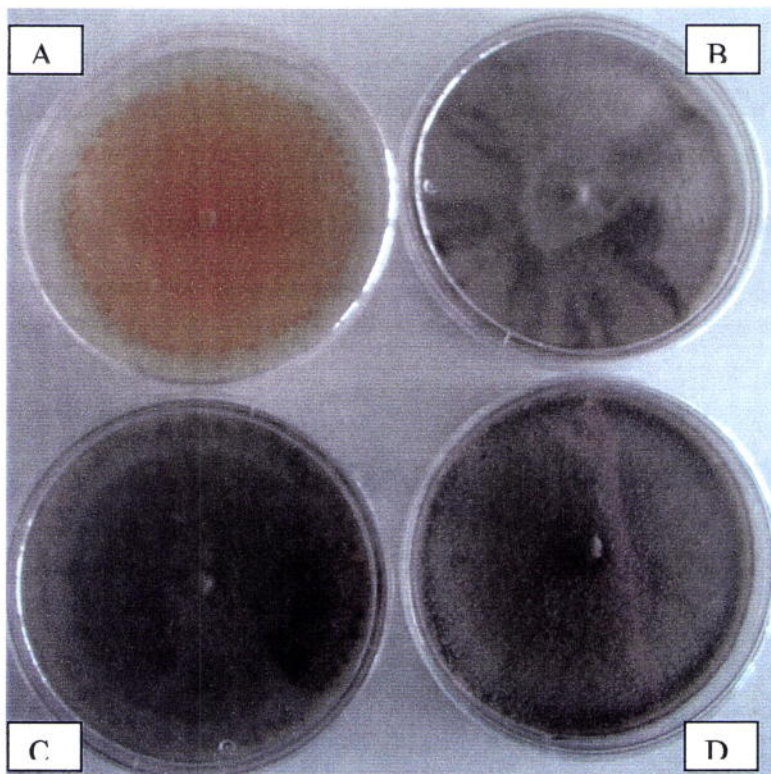


Figura 3.1 – Placas de Petri colonizadas com fungos *Colletotrichum* spp. isolados de lesões de antracnose de cajueiro. A- BCAI 20; B- BEVC 3; C- BCAI 21; D- BCAI 7L.

3.1.1- PATOGENICIDADE EM PLANTAS

Após o 5º dia de inoculações, era visível em alguns dos pontos inoculados a intensa massa de esporos produzida à superfície das folhas (observe-se figura 3.2).



Figura 3.2- Folha de cajueiro CAP – 04 (planta enxertada) inoculada com o isolado BEVC 1, onde se observam zonas de massa conidial amarelo/ alaranjado.

Os isolados de *Colletotrichum* em estudo mostraram ser moderadamente virulentos para as plantas enxertadas do cajueiro. O isolado BCAI 16L diferenciou-se dos isolados BCAI 3L, BCAI 18L, BCAI 20, BCAI 21 L, BCAI 22L, BEVC 3, BEVC 4, BEVC 5, BEVC 6 e AEVC 1. O isolado PEI 1 diferenciou-se de BCAI 3L, BCAI 18L, BCAI 21 L, BCAI 22L, BEVC 3, BEVC 5, BEVC 6 e AEVC 1. O isolado BCAI 19L mostrou-se significativamente diferente dos isolados BCAI 21L, BCAI 22L, BEVC 3, BEVC 5, BEVC 6 e AEVC 1. O isolado BEVC 1 diferenciou-se significativamente de BEVC 3, BEVC 5 e AEVC 1. O isolado BCAI 20 mostrou diferenças significativas em relação a BEVC 3, BEVC 5. Por fim, o isolado BEVC 3 diferenciou-se significativamente dos isolados, BCAI 3L, BCAI 7L, BCAI 16L, BCAI 17S, BCAI 19L, BCAI 20, BEVC 1, BEVC 4, MEVC 1 e PE II, tal como está representado nos quadros 3.1 e 3.2.

Os isolados BCAI 2N e BEVC 2 não foram avaliados por não terem produzido *in vitro* o número de conídios suficientes para a inoculação nas plantas. O isolado PE I9 apareceu contaminado não podendo, em tempo útil recuperá-lo para os testes de patogenicidade, os quais decorreram nas instalações da Embrapa, Brasil, tal como foi descrito anteriormente.

Quadro 3.1 – Resultado da ANOVA (95% de confiança) realizada sobre os dados referentes aos Índices de Severidade dos diversos isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por deposição de gota.

	GL	SQ	QM	F	Valor P
Planta	2	0,003575	0,001787	0,112	0,8940
Clone	2	0,240477	0,120239	7,548	0,0009
Isolado	16	3,066355	0,191647	12,030	0,0000
Clone x Isolado	32	2,145529	0,067048	4,209	0,0000
Erro	100	1,593069	0,015931		
Total corrigido	152	7,049005			

Quadro 3.2 – Comparação das médias $\pm 0,0420$ (erro padrão da média), dos índices de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., observados nos testes de patogenicidade realizados em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por deposição de gota.

Isolados	Médias	Resultados do teste
BCAI 16L	1,395955	a1
PE II	1,468288	a1 a2
BCAI 19L	1,501556	a1 a2 a3
BCAI 7L	1,523914	a1 a2 a3
BEVC 1	1,585659	a1 a2 a3 a4
MEVC 1	1,587492	a1 a2 a3 a4
BCAI 17S	1,591541	a1 a2 a3 a4
BCAI 20	1,630763	a2 a3 a4 a5
BEVC 4	1,674251	a2 a3 a4 a5 a6
BCAI 3L	1,690481	a3 a4 a5 a6
BCAI 18L	1,693827	a3 a4 a5 a6 a7
BCAI 21L	1,756322	a4 a5 a6 a7
BEVC 6	1,779530	a4 a5 a6 a7
BCAI 22L	1,780660	a4 a5 a6 a7
AEVC 1	1,831433	a5 a6 a7
BEVC 5	1,874514	a6 a7
BEVC 3	1,902105	a7
ANOVA	0,05	

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Em relação ao comportamento, dos três clones de cajueiro que apresentam susceptibilidade conhecida no campo, após termos submetido os resultados a análise estatística, o CAP-04 diferenciou-se significativamente dos CAP-14 e CCP-76, como podemos observar no quadro 3.3 e na figura 3.3 (os valores que serviram de base à construção dos gráficos encontram-se em Anexo 1).

Quadro 3.3 - Comparação das médias $\pm 0,0176$ (erro padrão da média) do comportamento das plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 observados nos testes de patogenicidade por deposição de gota.

Clones	Médias	Resultados do teste
CAP-14	1,631618	a1
CCP-76	1,638122	a1
CAP-04	1,718782	a2

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

O clone de cajueiro CAP 04 foi o que registou, o valor mais alto de índice de severidade, o qual correspondeu ao isolado de *Colletotrichum* spp., BCAI 21L, identificado como *C. acutatum* nos testes serológicos e PCR no decurso deste trabalho.

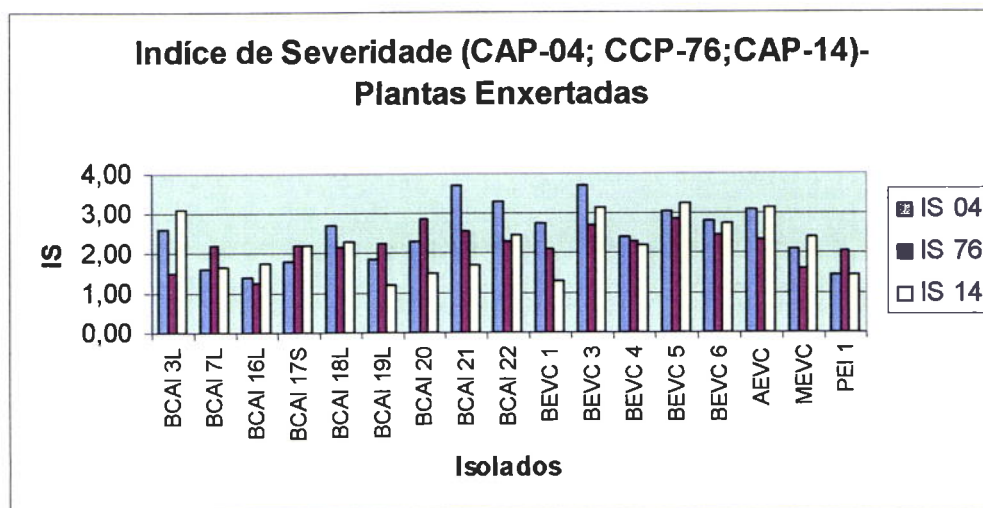


Figura 3.3 - Representação gráfica do índice de severidade dos isolados inoculados em plantas de cajueiro (CAP-04; CCP-76 e CAP-14) por deposição de gota.

Para o isolado BCAI 3L o clone de cajueiro CCP-76 diferenciou-se dos restantes. Para o isolado BCAI 19L o clone de cajueiro CAP-14 diferenciou-se do clone CCP-76, em relação aos isolados BCAI 20 e BEVC 1 o clone CAP-14 diferenciou-se dos outros dois clones de cajueiro. No caso do isolado BCAI 21L os três clones de cajueiro diferenciaram-se significativamente entre si. Em relação aos isolados BCAI 22L e BEVC 3 o clone de cajueiro CAP-04 diferenciou-se do clone CCP-76. Os resultados desta análise estatística encontram-se no Anexo 1.

O ensaio realizado, com a nebulização da suspensão de esporos dos isolados de *Colletotrichum* spp., nas folhas das plantas de cajueiro enxertadas, revelou índices de severidade mais baixos comparativamente ao ensaio anterior. Este facto, pode estar relacionado com a possível retenção de parte considerável dos esporos no mecanismo do nebulizador, para além das gotículas dispersas serem manifestamente pequenas. Para este estudo, apenas foram utilizados 9 dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Com esta técnica não se conseguiu diferenciar significativamente o comportamento dos clones de cajueiro relativamente à maior ou menor resistência. Em relação aos isolados BCAI 3L, BCAI 22 e AEVC 1 estes diferenciaram-se significativamente do isolado MEVC 1 (quadro 3.4 e 3.5, e figura 3.4).

Quadro 3.4 – Resultado da ANOVA (95% de confiança) realizada sobre os dados referentes aos Índices de Severidade dos diversos isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por nebulização.

	GL	SQ	QM	F	Valor P
Repetição	9	1,760655	0,195628	3,387	0,0006
Clone	2	0,114748	0,057374	0,993	0,3719
Isolado	8	1,505149	0,188144	3,258	0,0015
Clone x Isolado	16	2,482903	0,155181	2,687	0,0006
Erro	234	13,514233	0,057753		
Total corrigido	269	19,377689			

Quadro 3.5 - Comparação das médias $\pm 0,0253$ (erro padrão da média) do comportamento das plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 observados nos testes de patogenicidade por nebulização.

Clones	Médias	Resultados do teste
CCP-76	1,386625	a1
CAP-04	1,399490	a1
CAP-14	1,435347	a1

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Quadro 3.6 – Comparação das médias $\pm 0,0438$ (erro padrão da média), dos índices de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., observados nos testes de patogenicidade realizados em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por nebulização.

Isolados	Médias	Resultados do teste
BCAI 3L	1,313113	a1
BCAI 22L	1,324065	a1
AEVC 1	1,339096	a1
BCAI 20	1,377331	a1 a2
BEVC 1	1,384226	a1 a2
BCAI 21L	1,440125	a1 a2
PEI 1	1,467036	a1 a2
BEVC 5	1,473132	a1 a2
MEVC 1	1,546262	a2
ANOVA	0,05	

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Para o isolado BCAI 21L o clone de cajueiro CCP-76 diferenciou-se dos restantes. Para o isolado BEVC 5 o clone de cajueiro CAP-04 diferenciou-se do clone CCP-76, em relação ao isolado MEVC 1 o clone CCP-76 diferenciou-se do clone CAP-14. Os resultados desta análise estatística encontram-se no Anexo 1.

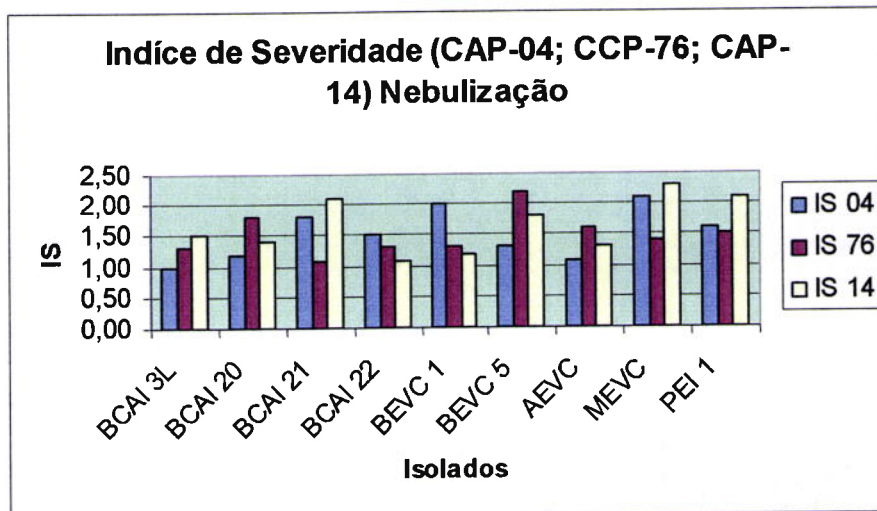


Figura 3.4 - Representação gráfica dos índices de severidade obtidos pela nebulização do inoculo de cada um dos isolados de fungo *Colletotrichum* spp. em plantas enxertadas de cajueiro por nebulização.

3.1.2- PATOGENICIDADE EM FOLHAS DESTACADAS

Embora os isolados de *Colletotrichum* spp. se tenham mantido moderadamente virulentos, para as folhas destacadas de cajueiro, o índice de severidade de uma forma geral foi superior em relação aos obtidos nos ensaios descritos anteriormente. Tal facto era esperado, uma vez que as folhas destacadas estão em maior stress ficando impedidas de mobilizar recursos para evitar danos resultantes do ataque do fungo havendo uma maior expressividade nas lesões apresentadas. Neste estudo não foi testado o isolado MEVC 1, uma vez que esporulou muito pouco. Realizada a análise, por testes de comparação das médias, os clones de cajueiro (CAP-04, CCP-76 e CAP-14) não se diferenciaram entre si. Quanto ao comportamento dos isolados, o PEI 1 mostrou diferenças significativas em relação aos isolados BCAI 17S, BCAI 18L, BCAI 20, BCAI 22L, BEVC 4, BEVC 5 e BEVC 6. Os isolados BCAI 7L, BCAI 16L e BCAI 21L diferenciaram-se dos isolados BEVC 4, BEVC 5, BEVC 6 e BCAI 17S. No caso do BCAI 3L diferenciou-se dos isolados BEVC 4 e BEVC 5. Por fim, o isolado BCAI 19L diferenciou-se do isolado BEVC 4. Estes resultados podem-se consultar nos quadros 3.7, 3.8 e 3.9 e figura 3.5. Toda a base estatística encontra-se no Anexo 1.

Quadro 3.7 – Resultado da ANOVA (95% de confiança) realizada sobre os dados referentes aos Índices de Severidade dos diversos isolados de *Colletotrichum* spp. em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por deposição de gotas em folhas destacadas.

	GL	SQ	QM	F	Valor P
Repetição	4	0,620794	0,155199	1,825	0,1257
Clone	2	0,084446	0,042223	0,496	0,6095
Isolado	15	7,671374	0,511425	6,014	0,0000
Clone x Isolado	30	8,016352	0,267212	3,142	0,0000
Erro	188	15,988262	0,085044		
Total corrigido	239	32,381228			

Quadro 3.8 - Comparação das médias $\pm 0,0326$ (erro padrão da média) do comportamento das plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 observados nos testes de patogenicidade por deposição de gotas em folhas destacadas.

Clones	Médias	Resultados do teste
CAP-04	1,689832	a1
CCP-76	1,696173	a1
CAP-14	1,732413	a1

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Quadro 3.9 – Comparação das médias $\pm 0,0752$ (erro padrão da média), dos índices de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., observados nos testes de patogenicidade realizados em plantas de cajueiro dos clones CAP-04, CCP-76 e CAP-14 por deposição de gotas em folhas destacadas.

Isolados	Médias	Resultados do teste
PEI 1	1,428402	a1
BCAI 21L	1,485012	a1 a2
BCAI 7L	1,494651	a1 a2
BCAI 16L	1,513964	a1 a2
BCAI 3L	1,551844	a1 a2 a3
BCAI 19L	1,593048	a1 a2 a3 a4
BEVC 1	1,616808	a1 a2 a3 a4 a5
AEVC 1	1,664361	a1 a2 a3 a4 a5
BEVC 3	1,717073	a1 a2 a3 a4 a5
BCAI 20	1,820722	a2 a3 a4 a5
BCAI 22L	1,841843	a2 a3 a4 a5
BCAI 18L	1,846290	a2 a3 a4 a5
BEVC 6	1,897228	a3 a4 a5
BCAI 17S	1,909540	a3 a4 a5
BEVC 5	1,941105	a4 a5
BEVC 4	1,976338	a5
ANOVA	0,05	

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Nos testes de patogenicidade realizados com inoculações dos isolados de *Colletotrichum* spp., por deposição de gotas em folhas destacadas, o maior índice de severidade foi registrado com a inoculação realizada com o isolado BEVC4 (proveniente de Buique-Brasil), no clone de cajueiro CAP 14 (figura 3.5).

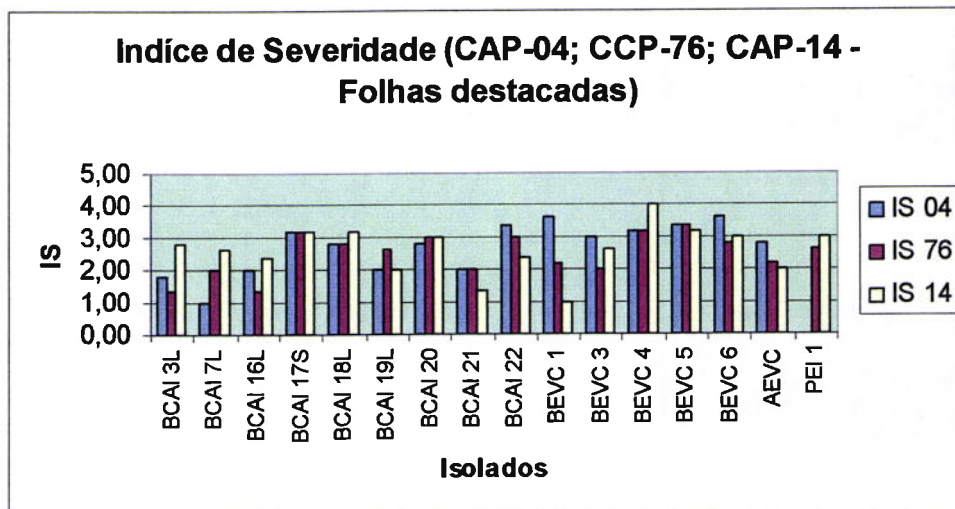


Figura 3.5 - Representação gráfica do índice de severidade dos isolados inoculados em folhas destacadas de plantas de cajueiro

Ao fim de 5 dias de inoculação era visível em alguns dos pontos inoculados a intensa massa de esporos produzida à superfície das folhas, observe-se a figura 3.6.



Figura 3.6 - Necrose folhear provocada pelo inóculo disposto à superfície de uma folha destacada do clone CAP-04, apresentando uma massa rosada de conídios de *Colletotrichum* spp. referente ao isolado BCAI 7L.

Na figura 3.7, podem-se observar alguns dos resultados obtidos, após inoculações efectuadas com os 16 isolados.

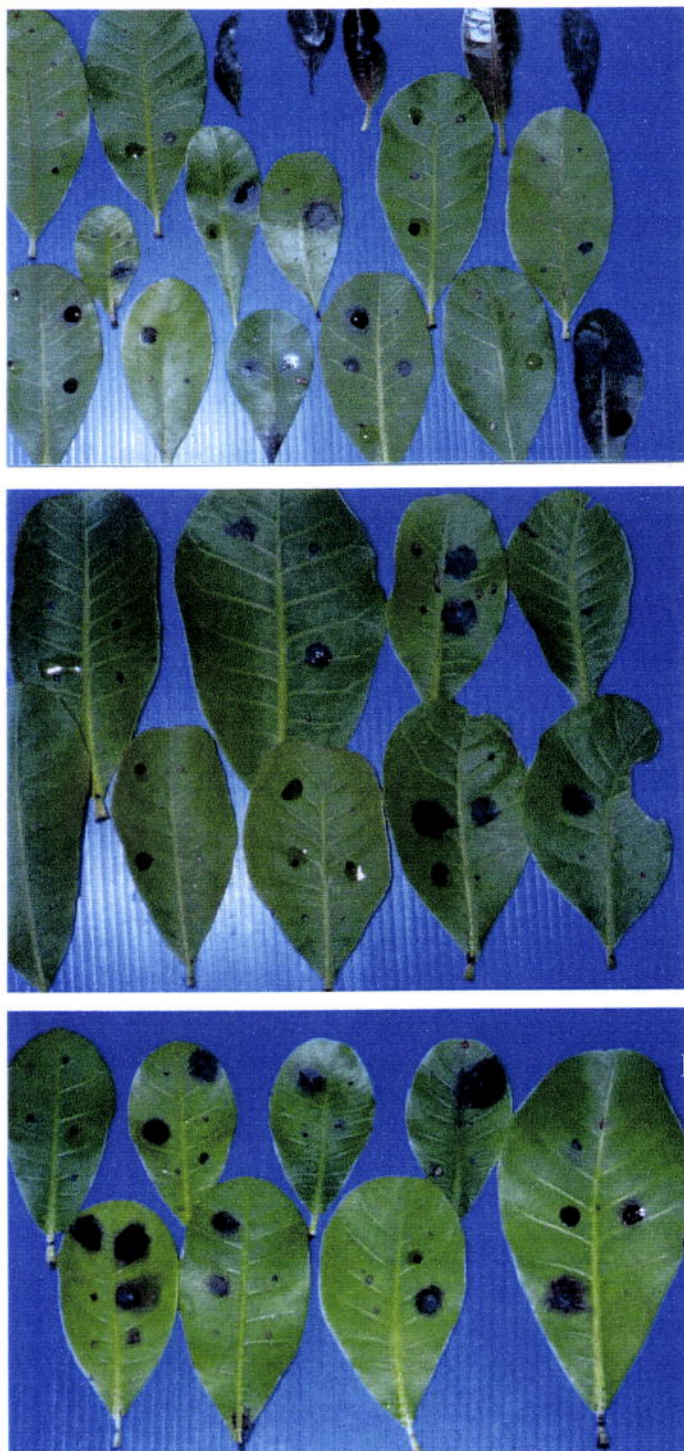


Figura 3.7 – Necroses resultantes das inoculações em folhas destacadas dos três clones de cajueiro: A- clone CAP 04; B- clone CAP 14; C- clone CCP 76.

Os testes de patogenicidade realizados mostraram que as folhas mais jovens, quando inoculadas, tinham respostas de maior susceptibilidade ao patógeno, indo de encontro aos resultados observados em campo (Uchoa *et al.*, 2002).

3.1.3- PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum* spp. PROVENIENTE DE CAJUEIRO EM AZEITONAS

Tal como a inoculação cruzada de isolados de *Colletotrichum acutatum*, proveniente de oliveira, e inoculados em folhas de cajueiro, também as inoculações de *Colletotrichum* spp. isolados de cajueiro e inoculados em azeitonas, quando sujeitos a duas temperaturas diferentes 17°C e 24°C, provocaram sintomas de antracnose.

Estatisticamente o isolado BCAI 20 diferenciou-se significativamente do BCAI 7L, BCAI 21L, BEVC 1, BEVC 5 e PEI 1. O isolado BCAI 7L proveniente da área geográfica de Sergipe-Brasil diferencia-se do isolado BEVC 1 proveniente da área geográfica de Pacajus-Brasil (sendo estes dois isolados identificados mais tarde como *C. acutatum*), tal como se pode observar no quadro 3.10 e 3.11.

Quadro 3.10 – Resultado da ANOVA (95% de confiança) realizada sobre os dados referentes aos Índices de Severidade dos diversos isolados de *Colletotrichum* spp. por deposição de gotas em azeitonas.

	GL	SQ	QM	F	Valor P
Repetição	7	1,507366	0,215338	1,234	0,2906
Fruto	1	5,392269	5,392269	30,913	0,0000
Isolado	7	13,041401	1,863057	10,681	0,0000
Fruto x Isolado	7	7,665746	1,095107	6,278	0,0000
Erro	105	18,315512	0,174433		
Total corrigido	127	45,922294			

Quadro 3.11 – Comparação das médias $\pm 0,1044$ (erro padrão da média), dos índices de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp., observados nos testes de patogenicidade realizados em azeitonas por deposição de gotas.

Isolados	Médias	Resultados do teste
BCAI 20	0,901221	a1
AEVC 1	1,030631	a1 a2
PEI 9	1,275386	a1 a2 a3
BCAI 7L	1,377000	a2 a3 a4
BEVC 5	1,503579	a3 a4 a5
PEI 1	1,555452	a3 a4 a5
BCAI 21L	1,824716	a4 a5
BEVC 1	1,847442	a5
ANOVA	0,05	

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

Em relação aos dois tratamentos (temperatura a 17°C e a 24°C), o índice de severidade, apresentou estatisticamente diferenças significativas, sendo superior para a temperatura de 24°C, observe-se o quadro 3.12 e a figura 3.8.

Quadro 3.12 - Comparação das médias $\pm 0,0522$ (erro padrão da média) do comportamento das temperaturas observadas nos testes de patogenicidade por deposição de gotas em azeitonas.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Temperatura 17°C	1,209179	a1
Temperatura 24°C	1,619677	a2

Nota: Isolados com um ou mais a(n) em comum não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

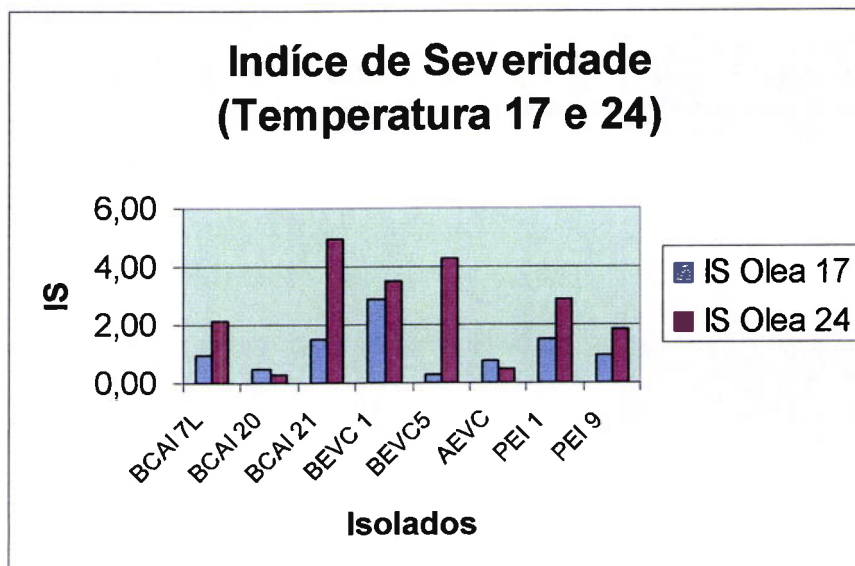


Figura 3.8 - Representação gráfica do índice de severidade dos isolados inoculados em azeitonas sujeitos a dois tratamentos de temperatura (17°C e 24°C).

Os isolados mostraram-se pouco virulentos, à temperatura de 17°C, e moderadamente virulentos à temperatura de 24°C. À temperatura de 17°C o isolado BEVC 1 diferenciou-se significativamente dos isolados BCAI 20, BEVC 5, AEVC 1 e PEI 9 (todos os isolados restantes foram identificados mais tarde como sendo *C. acutatum*, juntamente com os isolados BEVC 1 e PEI 9). À temperatura de 24°C, o isolado BCAI 20 diferenciou-se dos isolados BCAI 7L, BCAI 21L, BEVC 1, BEVC 5 e PEI 1. O isolado BCAI 21L diferenciou-se dos isolados BCAI 7L, BCAI 20, AEVC 1 e PEI 9. Destacam-se os isolados BCAI 21, BEVC 5 e BEVC 1, com índices de severidade mais elevados, e superior aos próprios isolados PE I1 e PE I9 provenientes de oliveira. Os isolados BCAI 21 e BEVC 1, foram identificados posteriormente, no decurso deste trabalho, como *C. acutatum*. Os isolados BCAI 21L e BEVC 5 foram os únicos que mostraram diferenças significativas relativamente ao comportamento com os dois tratamentos de temperatura. No Anexo 1 encontra-se todo o suporte estatístico.

Os resultados obtidos com as inoculações cruzadas demonstraram não haver especificidade de hospedeiros, relativamente aos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados.

3.2- ANÁLISE ISOENZIMÁTICA DOS ISOLADOS

O meio de cultura utilizado permitiu um rápido crescimento do fungo, obtendo-se ao fim dos sete dias de incubação uma grande massa micelial que cresce à superfície do meio, formando o aspecto de um disco com cerca de 2 mm de espessura. Dependendo do isolado, cada disco micelial atingia entre as 0,5 g e as 2 g de peso bruto (retirando-se unicamente o excesso de humidade em papel de filtro).

Realizaram-se observações ao microscópio óptico, para pesquisar a existência ou não de conídios e verificou-se que aos sete dias de incubação, a sua existência é nula ou muito escassa. Contudo, observações realizadas aos 10-12 dias indicam uma produção elevada de conídios, o que sugere a importância que há em utilizar colónias sempre com o mesmo período de incubação e que este não ultrapasse os sete dias, para que a análise dos isoenzimas incida sobre o micélio e não sobre os esporos.

No quadro 3.13, apresenta-se a quantificação da proteína micelial isolada das amostras de *Colletotrichum* spp. pelo protocolo fornecido pela SIGMA – “Bradford Reagent”.

Quadro 3.13 - Valores de absorvância e massa, obtidos para cada isolado de *Colletotrichum* spp., por comparação da leitura dos valores de absorvância relativos à quantidade de proteína presente em cada amostra.

ISOLADOS	Absorvância ($A_{595\text{ nm}}$)	Massa (g)
BCAI 2N	0,886	1,012717 **
BCAI 3L	0,343	0,260465 ***
BCAI 7L	0,387	0,311628 ***
BCAI 16L	0,776	0,761811 *
BCAI 17S	0,784	0,769685 *
BCAI 18L	1,219	1,197835 *

(Continuação)

Quadro 3.13 - Valores de absorvância e massa, obtidos para cada isolado de *Colletotrichum* spp., por comparação da leitura dos valores de absorvância relativos à quantidade de proteína presente em cada amostra.

ISOLADOS	Absorvância ($A_{595\text{ nm}}$)	Massa (g)
BCAI 19L	0,461	0,451772 *
BCAI 20	0,614	0,602362 *
BCAI 21L	0,411	0,402559 *
BCAI 22L	1,069	1,050197 *
BEVC 1	0,585	0,757493 ****
BEVC 2	0,560	0,635838 **
BEVC 3	1,453	1,668208 **
BEVC 4	0,766	0,873981 **
BEVC 5	0,541	0,613873 **
BEVC 6	0,200	0,219653 **
AEVC 1	1,004	1,149133 **
MEVC 1	0,421	0,412402 *
PE II	0,417	0,346512 ***
PE I9	0,583	0,539535 ***

Os valores aqui apresentados foram obtidos a partir da aplicação das seguintes rectas, calculadas para cada valor padrão referente a cada ensaio:

$$* x = (y - 0,002) / 1,016$$

$$** x = (y - 0,01) / 0,865$$

$$*** x = (y - 0,119) / 1,86$$

$$**** x = (y - 0,029) / 0,734$$

Os resultados desta quantificação permitiram-nos ter uma indicação da presença proteica nas amostras de *Colletotrichum* spp., utilizadas posteriormente na análise isoenzimática. Em cada um dos géis utilizou-se o BEVC 4 como padrão.

ESTERASE (EST)

Após electroforese para análise do padrão da enzima esterase (EST), com o protocolo de revelação seguido por Eiras - Dias e o de Baaziz e Saaidi (1987), não foi possível detectar actividade desta enzima. Quando utilizado o terceiro protocolo para revelação do gel, foi possível observar bandas indicadoras da presença da esterase, revelando grande polimorfismo. De seguida, apresentam-se as bandas electroforéticas desta isoenzima (figura 3.9).

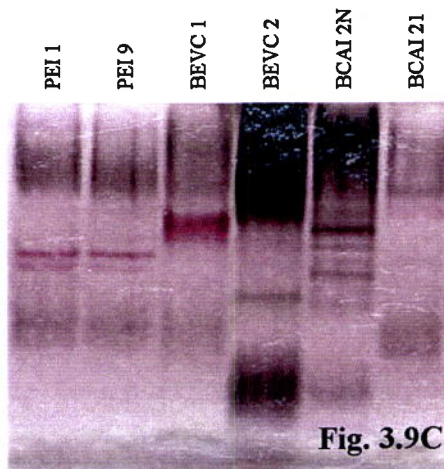
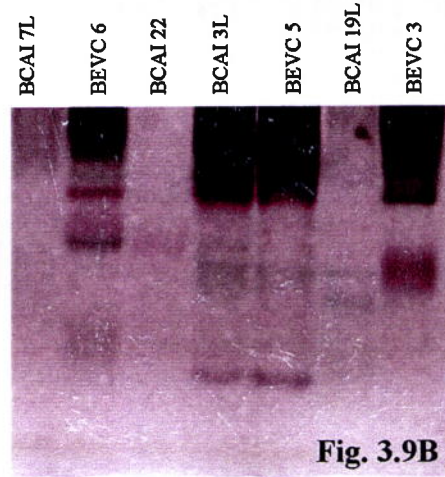
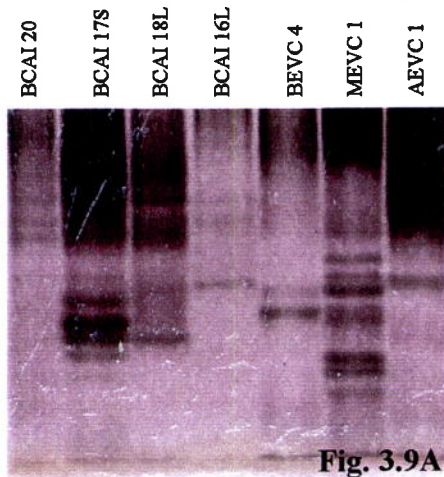


Figura 3.9 - Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima esterase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

FOSFATASE ÁCIDA (ACP)

Os dois primeiros protocolos seguidos por Eiras-Dias (1994) e o outro por Scandalo (1969) e Conkle *et al.* (1982) não se revelaram eficientes. Apenas quando utilizada a solução de revelação referenciada por Guedes (1988), foi possível observar bandas indicadoras da presença desta enzima. Estas podem-se observar na figura 3.10.

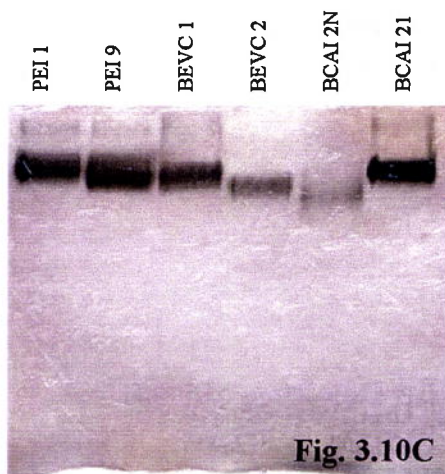
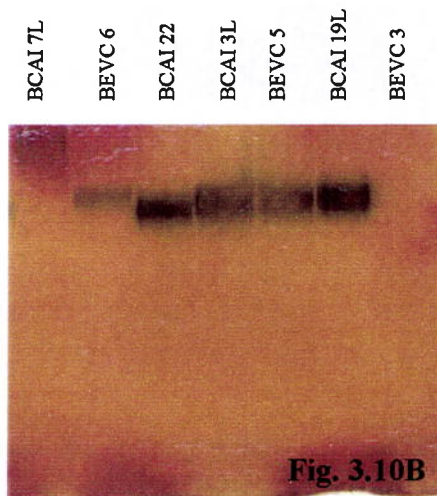
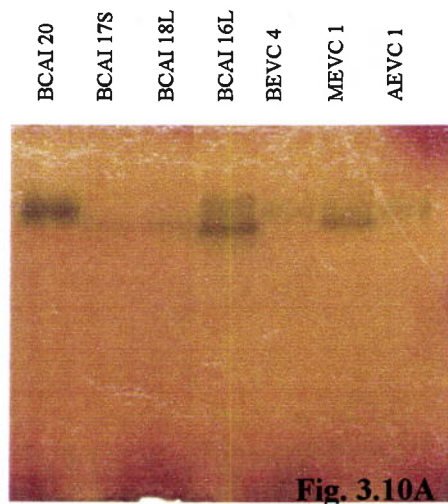


Figura 3.10- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima fosfatase àcida, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

FOSFATASE ALCALINA (AKP)

Após incubação do gel na solução apropriada, obteve-se a revelação da actividade da enzima fosfatase alcalina, tendo sido possível observar o padrão de bandas apresentadas na figura 3.11.

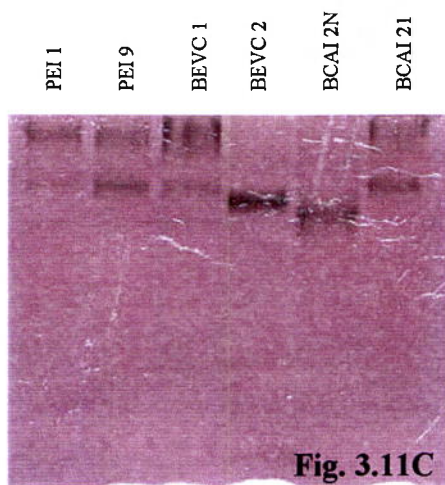
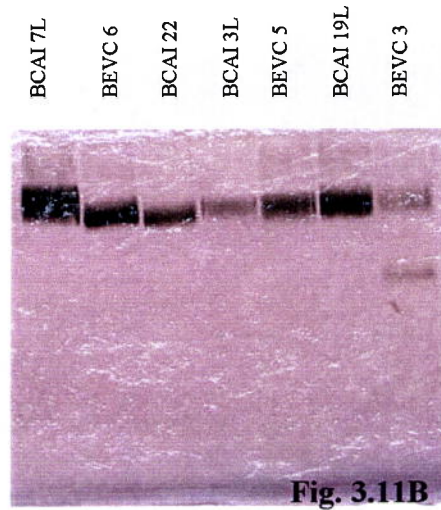
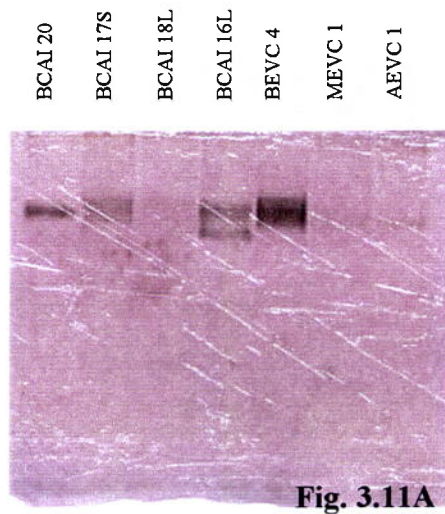


Figura 3.11- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima fosfatase alcalina, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

FOSFOGLUCOMUTASE (PGM)

Na revelação do gel, após electroforese para detecção da enzima fosfoglucomutase (PGM), foi possível observar bandas indicadoras da presença desta enzima, apresentando-se de seguida as bandas electroforéticas desta isoenzima (figura 3.12).

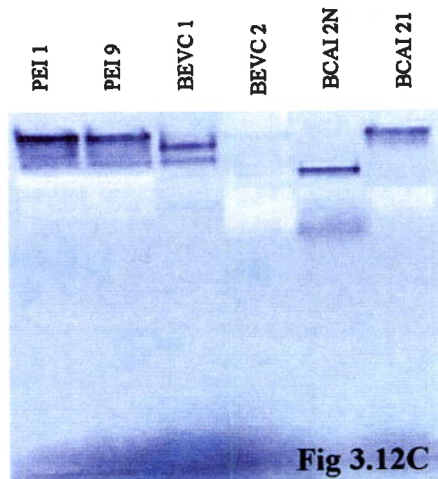
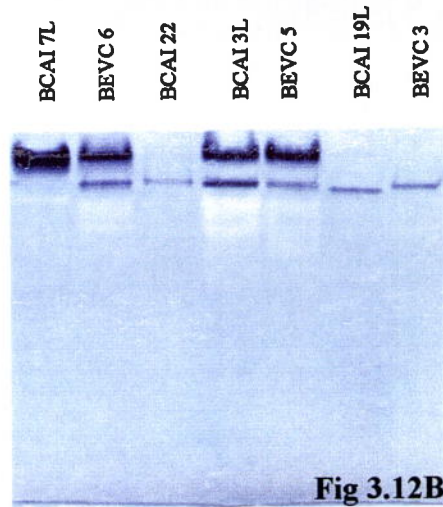
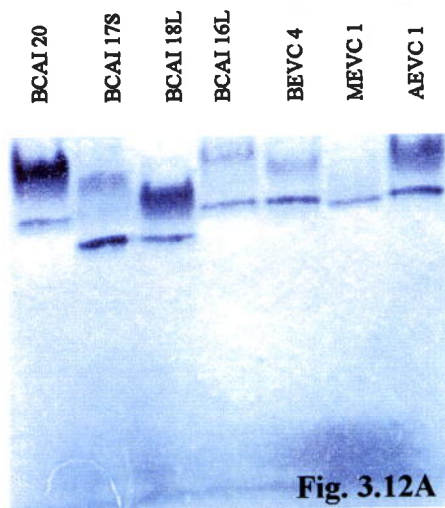


Figura 3.12- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima fosfoglucomutase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

FOSFOGLUCOISOMERASE (PGI)

Depois de otimizar o processo de revelação, foi possível visualizar bandas indicadoras da presença desta enzima, as quais se podem observar na figura 3.13.

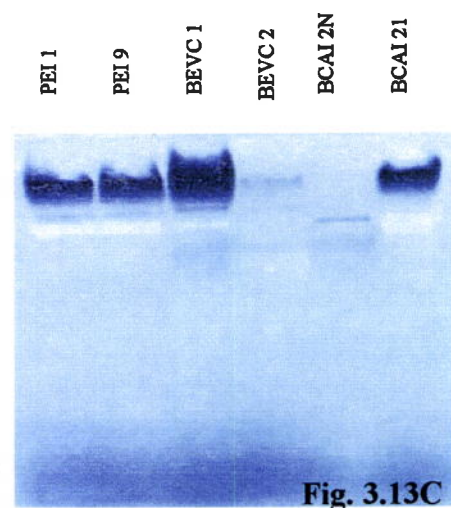
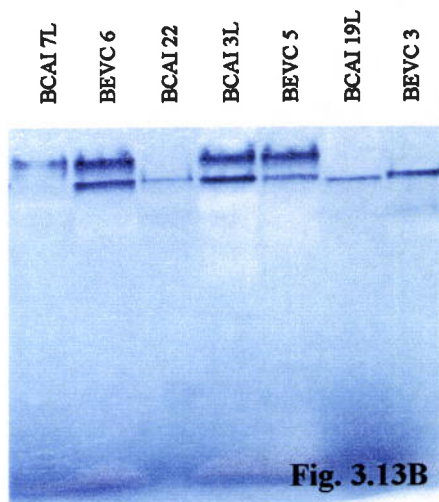
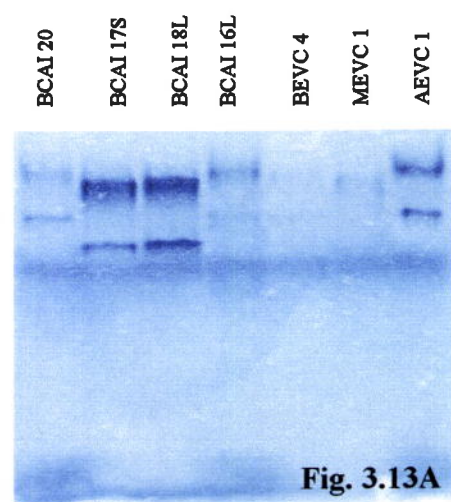


Figura 3.13- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima fosfoglucoisomerase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

FOSFOGLUCONATO DESIDROGENASE (PGDH)

Após incubação do gel na solução apropriada, obteve-se a revelação da actividade enzimática tendo sido possível observar o padrão de bandas apresentadas na figura 3.14.

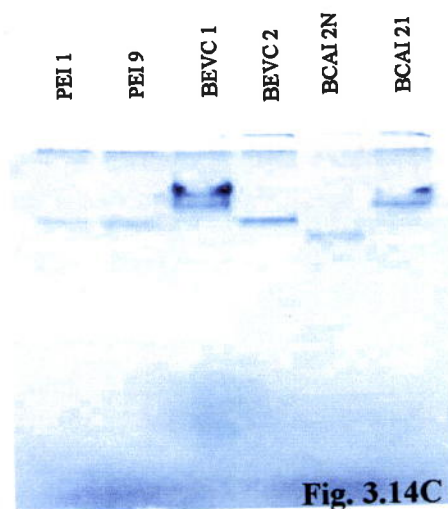
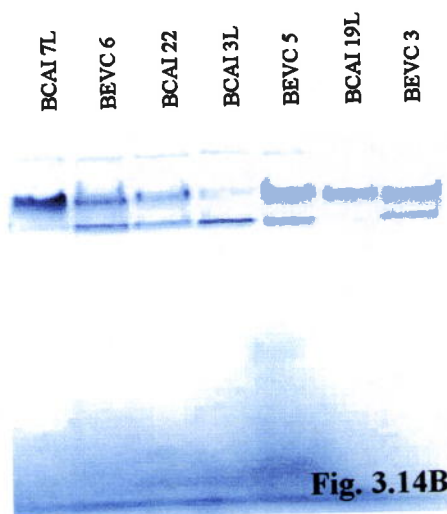
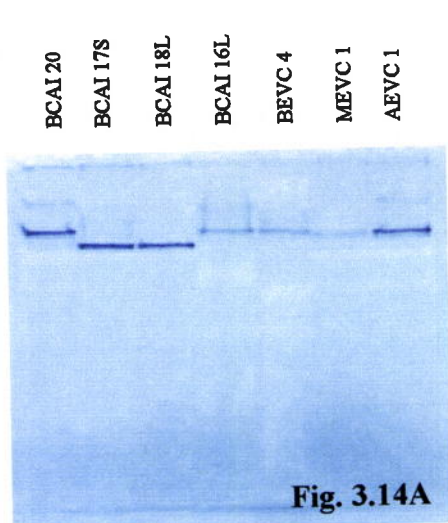


Figura 3.14- Padrões isoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima 6- fosfogluconato desidrogenase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

HEXOQUINASE (HK)

A revelação da enzima hexoquinase permitiu visualizar as bandas azuis no nosso gel as quais se podem observar na figura 3.15.

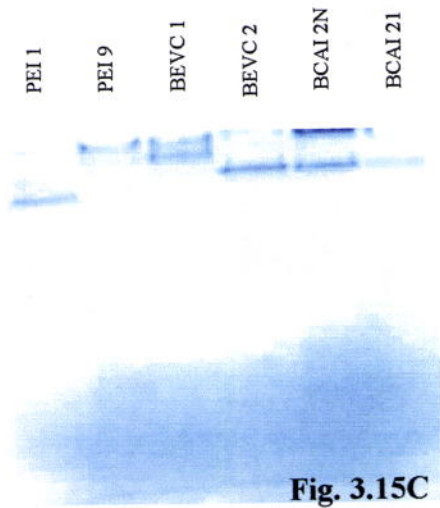
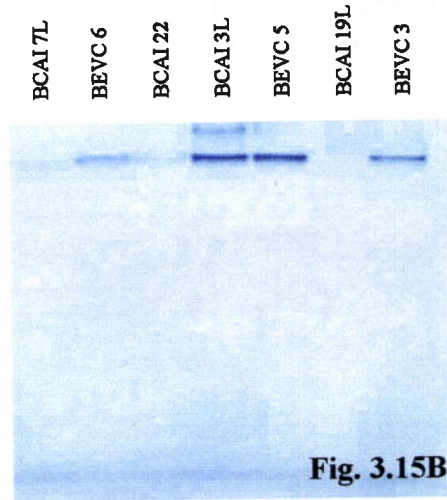
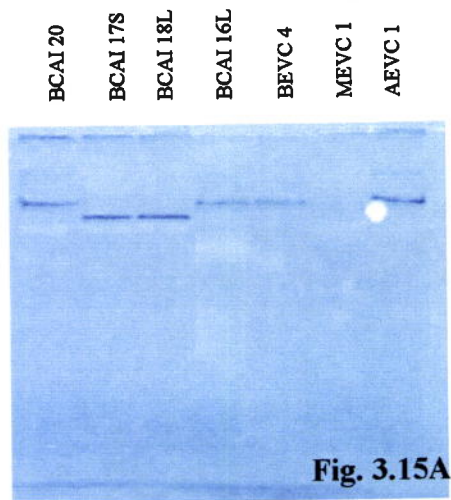


Figura 3.15- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima hexoquinase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

ISOCITRATO DESIDROGENASE (IDH)

Após a electroforese o gel foi incubado em solução apropriada, a qual permitiu visualizar os padrões enzimáticos que se mostram na figura 3.16.

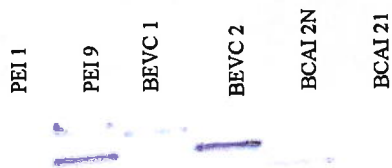
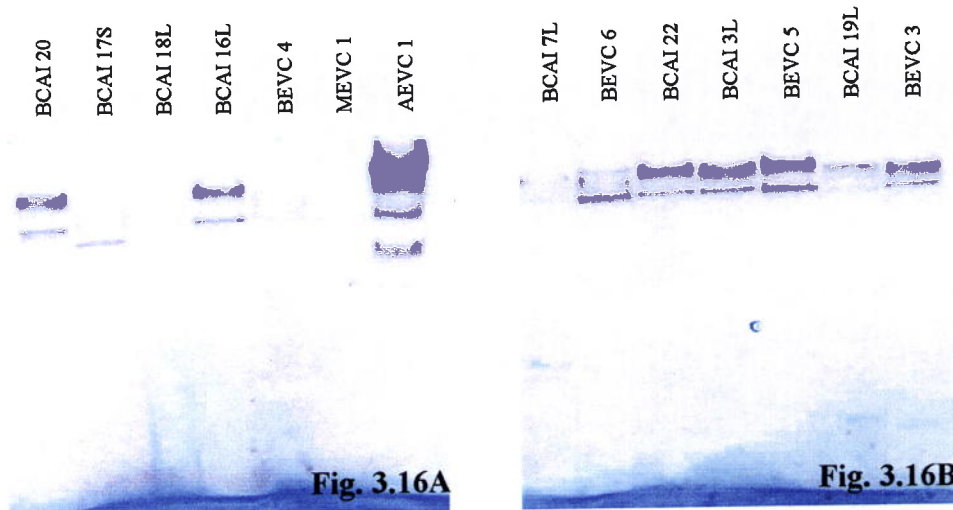


Fig. 3.16C

Figura 3.16- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima 6- isocitrato desidrogenase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

MALATO DESIDROGENASE (MDH)

A solução de revelação adotada permitiu visualizar as bandas enzimáticas da MDH, as quais se podem observar na figura 3.17.

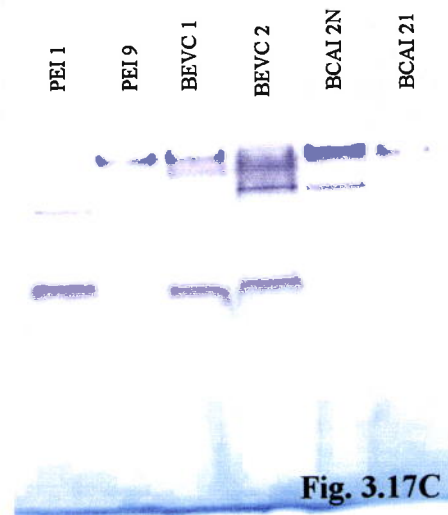
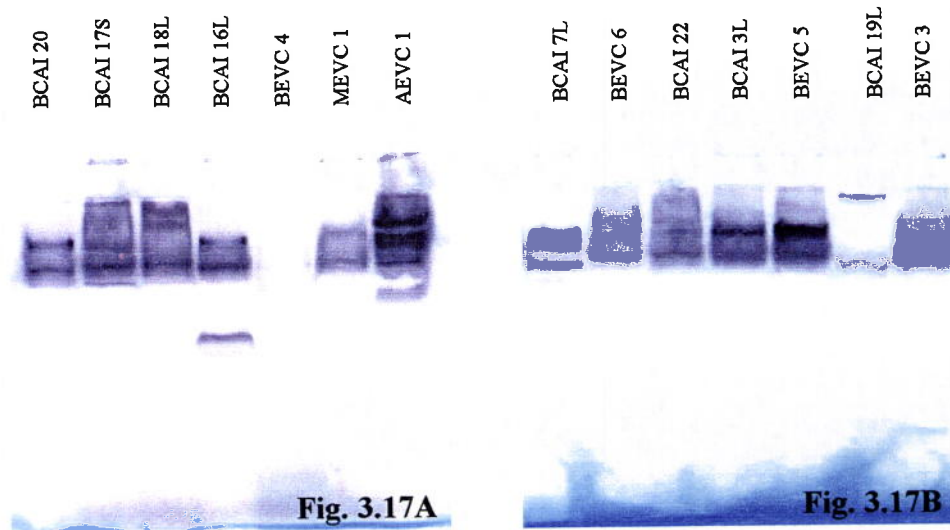


Figura 3.17- Padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima 6- - malato desidrogenase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Com o primeiro protocolo adoptado, não foi possível observar as bandas acromáticas. Adoptou-se em seguida o 2º protocolo usado por Flohé e Ötting (1984) e após a revelação foi possível visualizar os padrões enzimáticos. Como se torna difícil diferenciar as bandas acromáticas nas fotos, colocou-se uma como exemplo, apresentando-se em desenho todas as bandas obtidas para cada um dos isolados (figura 3.18).

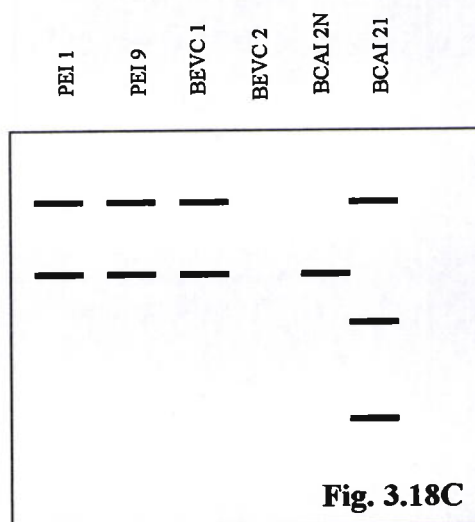
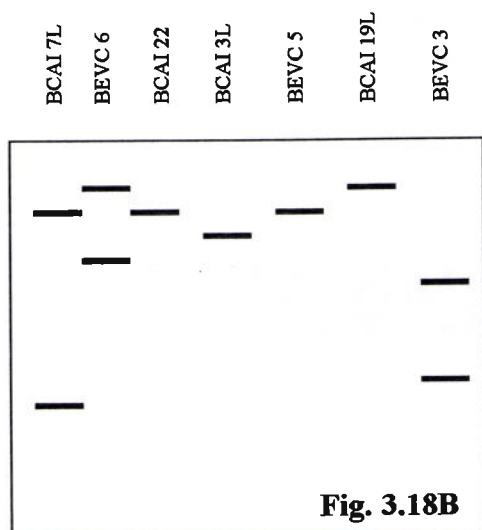
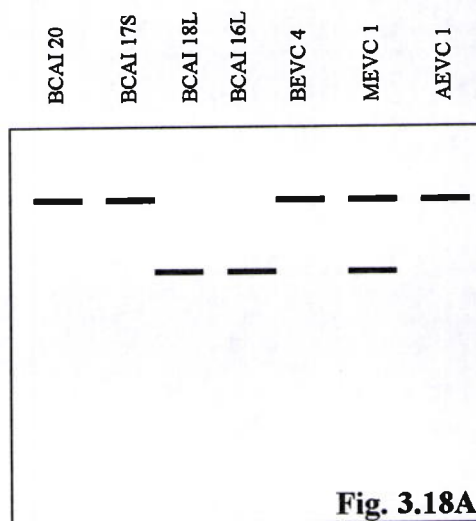
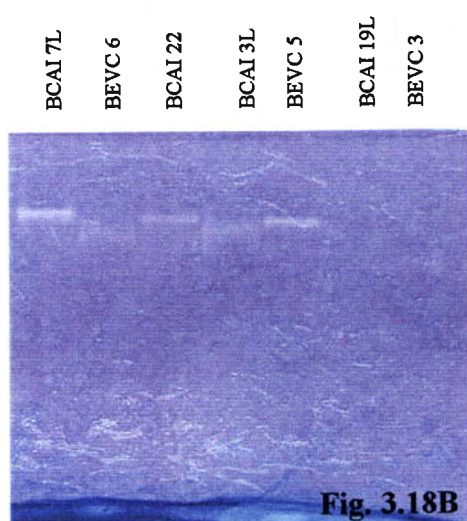
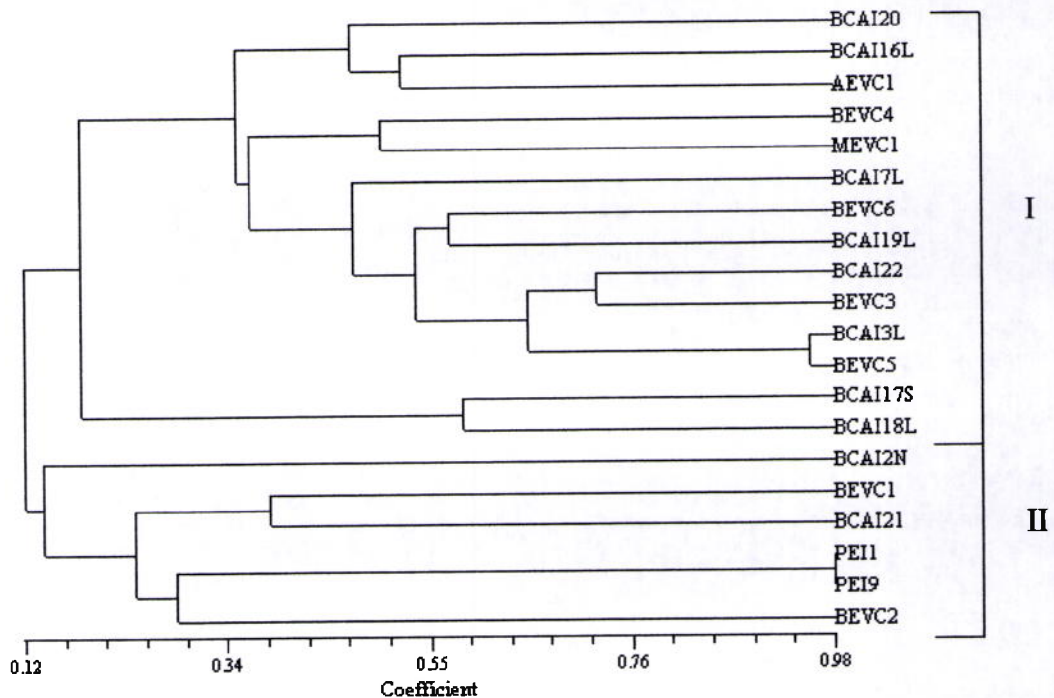


Figura 3.18- Foto e Desenhos dos padrões izoenzimáticos obtidos pelo sistema PAGE, revelados para a enzima superóxido dismutase, exibidos pelos isolados de *Colletotrichum* spp. usados neste estudo.

Depois de obtidos os padrões isoenzimáticos, referentes às dez enzimas utilizadas para estudar a diversidade dos vinte isolados, e à elaboração das matrizes de ausência (0), ou presença (1) de bandas (as quais se apresentam em anexo 2), procedeu-se ao tratamento de dados pelo programa NTSYS-PC, e da sua aplicação resultou o dendrograma, apresentado na figura 3.19:



$r = 0.92185$

Figura 3.19- Dendrograma resultante da análise isoenzimática produzido por UPGMA sobre matrizes de distância (Dice) calculadas a partir de 500 repetições criadas por “bootstrapping” dos dados originais

No dendrograma foram observados dois grandes grupos, designados por I e II. Os dados obtidos em relação à totalidade das enzimas estudadas permitiram-nos verificar a dissimilaridade existente em termos genéticos, entre os isolados BCAI 2N, BEVC 1, BCAI 21, PEI1, PEI9, BEVC 2 (grupo II), relativamente aos restantes (grupo I). Das isoenzimas estudadas a esterase foi a que se mostrou mais polimórfica, seguida das MDH, PGI, PGM e SOD. Também, Assunção *et al.* (1999) encontraram na EST maior polimorfismo seguido da SOD e PGM. Não foi possível diferenciar os isolamentos de diferentes áreas geográficas, nomeadamente os de proveniência do continente africano e

do sul americano, podendo indicar uma proveniência comum. Ali *et al.* (1999), Laday *et al.* (1999), Cheng *et al.* (2000), também eles não conseguiram diferenciar os isolados (*Fungivorous nematode*, *Fusarium graminearum*, *Fomes fomentarius*, respectivamente) por áreas geográficas de origem.

3.3- REACÇÕES SEROLÓGICAS PELA TÉCNICA PTA- ELISA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA *Colletotrichum acutatum*

No seguimento, da diferenciação dos isolados obtida a partir dos estudos isoenzimáticos, foram realizados testes serológicos, com o objectivo de esclarecer se estávamos na presença de mais que uma espécie de *Colletotrichum*.

Dos 18 isolados de *Colletotrichum* spp. em estudo, provenientes de cajueiro, 3 deles mostraram reacção positiva com os anticorpos específicos para *C. acutatum* e portanto foram identificados como *C. acutatum*, os 2 isolados de *Colletotrichum*, provenientes de oliveira, foram inicialmente utilizados como controlo positivo (experiência I). Mais tarde, realizamos mais um teste com o controlo positivo CA 397, o qual começou a ser o isolado de referência (experiência II), e que permitiu obter a confirmação dos controlos positivos provenientes de oliveira (PE I1 e PE I9) e a identificação dos isolados de cajueiro dados como *C. acutatum*, figura 3.20.

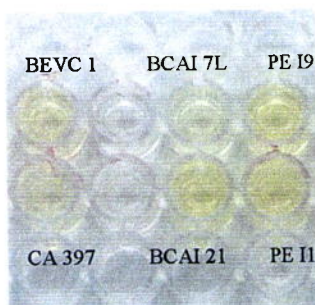


Figura 3.20 – Placa de microtítulo após o teste PTA-ELISA (experiência II) com alvéolos de coloração amarela, representando a reacção positiva do antígeno – anticorpo, que permitiu identificar os isolados de *Colletotrichum acutatum*.

Os valores médios de absorvância obtidos com a experiência I e II podem-se observar no quadro 3.14.

Quadro 3.14 - Valores médios de absorvância realizados no final das reacções dos testes ELISA-PTA e identificação da espécie *Colletotrichum acutatum*.

Experiência I			Experiência II	
Isolados	Absorvância (405 nm)	<i>C. acutatum</i>	Absorvância (405 nm)	<i>C. acutatum</i>
BCAI 2N	0,099	-	nt	nt
BCAI 3L	0,097	-	nt	nt
BCAI 7L	0,319	+	0,612	+
BCAI 16L	0,119	-	nt	nt
BCAI 17S	0,097	-	nt	nt
BCAI 18L	0,101	-	nt	nt
BCAI 19L	0,092	-	nt	nt
BCAI 20	0,160	-	nt	nt
BCAI 21	0,442	+	0,795	+
BCAI 22	0,101	-	nt	nt
BEVC 1	0,486	+	0,791	+
BEVC 2	0,090	-	nt	nt
BEVC 3	0,099	-	nt	nt
BEVC 4	0,100	-	nt	nt
BEVC 5	0,099	-	nt	nt
BEVC 6	0,103	-	nt	nt
MEVC 1	0,093	-	nt	nt
AEVC 1	0,117	-	nt	nt
PE I ₁ (+)	1,199	+	1,058	+
PE I ₉ (+)	1,06	+	1,062	+
CA 397 (+)	nt	nt	0,407	+
<i>B. cinerea</i>	0,185*	-	0,326*	-

- (*)Valor equivalente ao dobro da média de absorvância dos controlos negativos.
- nt – não trabalhado.

O resultado obtido com este estudo serológico foi de enorme importância, por ser a primeira vez que se identificou *C. acutatum*, associado a lesões de antracnose de cajueiro.

3.4- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

3.4.1- POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

TESTE DE DIAGNÓSTICO PARA DIFERENCIAR ESPÉCIES

Os isolados, quando analisados por PCR com iniciadores específicos para *C. acutatum* (CaInt2) e *C. gloeosporioides* (CgInt), originaram um produto amplificado da região ITS, visualizada após separação dos produtos, em gel de agarose corado em brometo de etídio. O fragmento amplificado por cada um dos iniciadores específicos tem cerca de 500bp, o que está de acordo com alguns autores (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Agosteo *et al.*, 2002; Kulik *et al.*, 2005). Na figura 3.21, apresenta-se o resultado de alguns dos isolados analisados por esta técnica, e no quadro 3.15 representam-se todos os resultados obtidos para cada um dos isolados. Na figura 3.21, os poços em branco representam produtos não amplificados correspondendo a espécie diferente do iniciador específico.

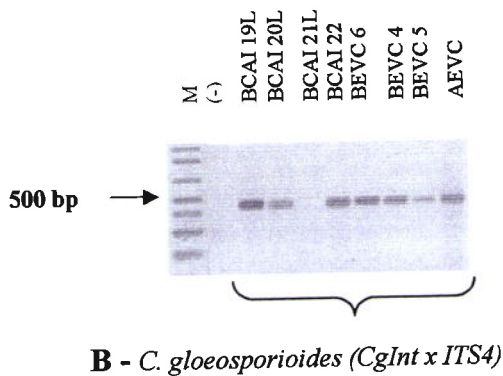
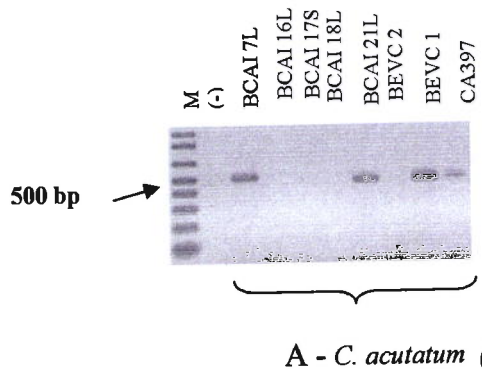


Figura 3.21 – Visualização em gel, da separação de produtos de amplificação obtidos por PCR, com iniciadores específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* de alguns dos isolados *Colletotrichum* spp. (-) corresponde ao controlo negativo; produtos não amplificados correspondem a espécie diferente do iniciador específico.

O produto amplificado com o iniciador específico para *C. acutatum*, em alguns dos casos obteve-se mais que uma banda, o que está de acordo com Agosteo *et al.*, 2002, os quais referem a pouca especificidade dos iniciadores, neste tipo de teste.

Quadro 3.15 – Indicação da presença de fragmentos de 500 bp amplificados por PCR, com os iniciadores específicos para as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, do DNA extraído de cada isolado da coleção de *Colletotrichum* spp.

Isolados	Amplificação por PCR com iniciadores específicos	
	CaInt2	CgInt
	<i>C. acutatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
BCAI 2N	-	+
BCAI 3L	-	+
BCAI 7L	+	-
BCAI 16L	-	+
BCAI 17S	-	+
BCAI 18L	-	+
BCAI 19L	-	+
BCAI 20	-	+
BCAI 21L	+	-
BCAI 22L	-	+
BEVC 1	+	-
BEVC 2	-	+
BEVC 3	-	+
BEVC 4	-	+
BEVC 5	-	+
BEVC 6	-	+
AEVC 1	-	+
MEVC 1	-	+
PE II	+	-
PE I9	+	-
CA 397	+	-

Com os resultados obtidos confirmaram-se, os já alcançados com os testes serológicos, os quais indicavam como *C. acutatum*, os isolados BCAI 7L, BCAI 21L, BEVC 1, e os controlos positivos PE 11, PE 19 e CA 397, permitindo identificar, igualmente os restantes isolados como *C. gloeosporioides*.

4 – DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os resultados obtidos pelo conjunto de estudos realizados no presente trabalho permitiu, pela primeira vez, identificar o *C. acutatum* como agente causal da antracnose do cajueiro. Até ao presente trabalho, a literatura disponível referenciava *C. gloeosporioides*, como único agente etiológico da antracnose no cajueiro (Barros *et al.*, 1984; Correa *et al.*, 1992 ; Araújo *et al.*, 1995; Piteira, 1996; Menezes *et al.*, 1996; Freire *et al.*, 2002; Menezes, 2002; Freire *et al.*, 2003).

Todos os isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados mostraram-se patogénicos para o cajueiro. Sempre que conseguida, a diferenciação dos isolados obtida pelos testes de patogenicidade, não mostrou qualquer relação com os resultados encontrados nos restantes testes isoenzimáticos, serológicos e PCR, realizados neste trabalho.

A não especificidade apresentada pelos isolados de *Colletotrichum* spp., em relação ao cajueiro, leva a que se deva dar mais importância aos potenciais focos do agente causal, em outras culturas, consociadas, ou próximas do cajueiro. Estes resultados vêm contrariar referências à especificidade apontada por alguns autores, relativamente ao *C. gloeosporioides* no cajueiro (Freire *et al.*, 2003).

Com os testes de patogenicidade podemos comprovar a maior susceptibilidade das folhas jovens ao ataque do *Colletotrichum* spp.. Com excepção do ensaio utilizando plantas enxertadas inoculadas por deposição de gota, em que o clone CAP-04 diferenciou-se dos outros dois clones (CCP-76 e CAP-14), confirmando a sua maior susceptibilidade, em nenhum outro ensaio foi possível diferenciar significativamente os clones de cajueiro, embora estes tivessem sensibilidade conhecida no campo (Cardoso *et al.*, 1994). Isto leva a pressupor que a resistência não se encontra a nível genético, mas sim em relação à maior ou menor precocidade de lançamento das folhas jovens. Consideram-se mais resistentes os que forem mais precoces, conseguindo deste modo, antecipar-se às primeiras chuvas e às condições óptimas de propagação do *Colletotrichum* spp.

Os perfis electroforéticos obtidos foram analisados para a totalidade das dez isoenzimas estudadas. Se a análise tivesse incidido em agrupamentos mais pequenos de isoenzimas,

ou individualizando, cada uma delas, os resultados poderiam fornecer-nos outra informação. No entanto, é aconselhado utilizar um variado número de enzimas, para contornar o problema de aparecerem níveis elevados de variação intraespecífica, o que tornaria impossível a distinção de espécies (Micales *et al.*, 1998). O elevado polimorfismo encontrado poderá dever-se, à provável reprodução sexual dos isolados, da qual Piteira *et al.* (2000), havia constatado quando recorreu a estudos de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV), para caracterizar alguns destes isolados, ou ser causado por um outro mecanismo de recombinação. Burdon *et al.* (1985), em estudos sobre o efeito da reprodução sexual ou assexual de populações de *P. graminis*, relata a existência de maior diversidade na população por reprodução sexual que na assexual. Em relação à presença de múltiplas bandas, também Kaufmann *et al.* (1996), utilizando isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obteve resultados similares e refere que Laroche *et al.* (1992), também os tinha obtido. É referido que tal facto poderá ser atribuído à heterocariose, ou como Laroche *et al.* (1992) explica, esta variedade de bandas pode ser atribuída a múltiplos loci ou à produção de isoenzimas secundárias por processos pós-transcrição. Ou seja, o polimorfismo isoenzimático pode dar-se por mutações ocorridas durante a síntese da enzima ou por modificações, após a sua síntese.

A análise isoenzimática permitiu diferenciar dois grandes grupos de isolados, onde por um lado se concentraram os isolados, mais tarde identificados por *C. gloeosporioides* e por outro os que vieram a ser identificados por *C. acutatum*. No entanto, não conseguimos diferenciar efectivamente três dos isolados estudados tendo um *C. acutatum* aparecido no grupo de *C. gloeosporioides* e dois *C. gloeosporioides* aparecido no grupo dos *C. acutatum*. Das isoenzimas estudadas a EST foi a que se mostrou mais polimórfica, seguida das MDH, PGM, PGI e SOD. Dos resultados obtidos, não podemos dizer que esta técnica pudesse ser uma opção isolada, para diferenciação de espécies *Colletotrichum* spp. da nossa colecção de isolados.

A partir dos estudos isoenzimáticos não foi possível diferenciar os isolamentos de diferentes áreas geográficas, nomeadamente os de proveniência do continente africano e do sul americano, podendo indicar uma proveniência comum. Estes resultados estão em consonância com outros já obtidos por vários trabalhos referidos na bibliografia (Cheng *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 1999; Laday *et al.*, 1999)

Com os testes serológicos, desenvolvidos pela técnica PTA- ELISA, identificaram-se, pela primeira vez, três isolados de *C. acutatum*, provenientes de lesões de antracnose de cajueiro. Estes resultados vieram confirmar a dissemelhança desses isolados, que já se tinha observado na análise dos padrões isoenzimáticos do micélio, e reflectido na respectiva análise estatística destes padrões.

No teste de diagnóstico por PCR utilizando iniciadores específicos para *C. acutatum* (CaInt2) e *C. gloeosporioides* (CgInt2), amplificando a região ITS do rDNA, permitiu identificar três isolados de *Colletotrichum*, provenientes de cajueiro, como *C. acutatum* e os restantes como *C. gloeosporioides*, confirmando os resultados obtidos com os testes serológicos e identificando os isolados de *C. gloeosporioides*.

Pode-se dizer que, para a identificação de espécies dos isolados aqui estudados, o método molecular baseado na técnica de PCR para detecção e identificação das espécies de *Colletotrichum*, e a utilização de técnicas serológicas por PTA-ELISA, usando anticorpos específicos, são mais fiáveis que as técnicas convencionais. A identificação tradicional não é tão directa devido à alta variabilidade dos isolados do fungo, causados por factores ambientais. Até porque, em termos de morfologia das colónias, a cor rosa ou laranja atribuída ao *C. acutatum*, e o cinza atribuído ao *C. gloeosporioides*, nem sempre corresponde à realidade, tal como oportunamente foi mostrado. Por outro lado, os testes de patogenicidade também não conseguiram diferenciar os isolados por espécies.

A diferenciação das espécies de *Colletotrihum* responsáveis pelas doenças epidémicas é vital para o desenvolvimento e implementação de estratégias efectivas de controlo, ainda mais, quando existem registos de alguns estudos que indicam a insensibilidade dos isolados de *C. acutatum* ao benomil (Freeman *et al.* 1998). Este fungicida foi o mais divulgado contra a antracnose, nomeadamente do cajueiro, e utilizado durante largos anos. Mesmo sabendo que desde final de 2002 a Decisão da Comissão de 26 de Novembro de 2002 relativa à não inclusão da substância activa benomil no anexo I da Directiva 91/414/CEE do Conselho e à revogação das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que a contenham (*Jornal Oficial n° L 322 de 27/11/2002 p. 0053* –

0054), deve-se ter em atenção o possível comportamento diferenciado das espécies em relação às substâncias activas dos fungicidas.

Dos resultados obtidos, para futuros estudos de epidemiologia e de resistência da planta à doença, deve-se ter em atenção a variabilidade dos isolados, e as características de precocidade da planta, em relação ao lançamento de jovens ramos e folhas, antes das condições atmosféricas serem favoráveis ao desenvolvimento da doença.

Por outro lado, os resultados alcançados permitem afirmar que a antracnose do cajueiro, é provocada por duas espécies distintas do género *Colletotrichum*, o *C. gloeosporioides* e o *C. acutatum*. Este último, identificado aqui, pela primeira vez, como espécie fitopatogénica, retirado de lesões de antracnose de cajueiro.

5 – CONCLUSÕES

Pela primeira vez, o fungo *C. acutatum* foi identificado associado à antracnose do cajueiro. Esta identificação foi confirmada por via serológica, utilizando anticorpos monoclonais específicos para *C. acutatum*, e por via de PCR de diagnóstico, utilizando iniciadores específicos para *C. acutatum*. A sua patogenicidade foi igualmente confirmada.

O PCR de diagnóstico, para além de identificar três isolados de *C. acutatum* provenientes de lesões de antracnose em cajueiro e dois provenientes de lesões de antracnose em frutos de oliveira permitiu, igualmente, identificar os restantes 15 isolados provenientes de lesões de antracnose em cajueiro como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*.

Os isolados de *Colletotrichum* spp., desta colecção proveniente de lesões de antracnose em cajueiro, não mostraram especificidade em relação ao hospedeiro.

Os clones de cajueiro CAP-14, CCP-76 e CAP-04 não se diferenciaram significativamente em relação à maior ou menor resistência relativamente ao índice de severidade dos isolados de *Colletotrichum* spp.

O melhoramento do cajueiro, em termos de resistência da planta ao ataque destas duas espécies de fungo *Colletotrichum* spp., deve ser direccionado para a sua precocidade no lançamento dos ramos e folhas jovens, antes de surgirem as primeiras chuvas, e que se reúnam as condições climáticas óptimas para a propagação do patógeno. Deste modo, a planta conseguirá criar barreiras fisiológicas ao ataque deste agente patogénico, estando numa fase de maturação vegetativa não propícia ao ataque do fungo.

A diferenciação das espécies de *Colletotrichum* responsáveis pelas doenças epidémicas é vital para o desenvolvimento e implementação de estratégias efectivas de controlo. Os resultados alcançados com este trabalho terão, com certeza, consequências nos estudos de epidemiologia da doença e de resistência dos clones de cajueiro em condições de campo, a decorrer na Embrapa, Fortaleza-Ceará-Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaskaveg, J.E. & Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytop* 87:979-987.

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytop* 93: 579-587.

Agosteo, G.E & Mangnamo di San Lio, G. 2002. Characterisation of the causal agent of olive anthracnose in southerne Italy. *Acta Hortic* 586: 713-716.

Alfenas, A.C. & Brune, W. 1998. Electroforese em gel de poliacrilamida. Ed. Acelino Couto Alfenas. Viçosa: UFV. 150-182 (574p).

Ali, M.R., Yamaguchi, Y & Ishibashi, N. 1999. Esterase isozyme phenotypes of 15 isolates of fungivorous nematode, *Aphelenchus avenae* Bastian 1865, from Kyushu and other districts of Japan. *Jap J of Nemat* 29: 35 – 41.

Araújo, F.E.de.1976. A cultura do cajueiro. Fortaleza: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. 17p.

Araújo, J.P.P. & Valderi, V.S.1995. Cajucultura: modernas técnicas de produção. Fortaleza. EMBRAPA/ CNPAT. 292p.

Assunção, I.P., Alfenas, A.C., Coelho, R.S.B. & Lima, G.S.de A. 1999. Análise isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose foliar da cebola. *Summa Phytopathol* 25: 293-298.

Bailey, J.A. & Jeger, M.J.1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International. Wallingford UK.

Barros, L.M., Araújo, F.E., Almeida, J.I.L. & Teixeira, L.M.S. 1984. A cultura do cajueiro anão. Fortaleza, EPACE. 66p. (EPACE, Documentos, 03).

Baaziz, M. & Saaidi, M. 1987. Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Can. J. Bot* 66: 89-93.

^bBonde, M.R., Peterson, G.L., Emmett, R.W. & Menge, J.A. 1991. Isozyme comparisons of *Septoria* isolates associated with citrus in Australia and United States. *Phytop* 81: 517-521.

^aBonde, M.R., Peterson, G.L. & Maas, J.L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytop* 81: 1523-1529.

Bonde, M.R., Micales, J.A. & Peterson, G.L. 1993. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. *Plant Dis* 77(10): 961-968.

Boscia, D., Aslouj, E., Elicio, V., Savino, V., Castellano, M.A. & Martelli, G.P. 1992. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to grapevine virus A. *Arch Virol* 127: 185-194.

Bridge, P.D. 1998. Applications of PCR in mycology. Ed. Bridge *et al.*- CAB INTERNATIONAL. 357p.

Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. & Timmer, W. 1996. Molecular characterisation of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytop* 86: 523-527.

Brune, W., Alfenas, A.C. & Junghans, T.G. 1998. Identificações específicas de enzimas em géis. Ed. Acelino Couto Alfenas. Viçosa: UFV. 201-328 (574p).

Buddie, A.G., Martinez-Culebras, P., Bridge, P.D., Garcia, M.D., Querol, A., Cannon, P.F. & Monte, E. 1999. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycol Res* 103: 385-394.

Burdon, J.J. & Roelfs, A.P. 1985. The effect of sexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytop* 75: 1068-1073.

CABI Databases, <http://www.idexfungorum.org/Names/fundic.asp>

Cannon, P.F., Bridge, P.D. & Monte, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In *Colletotrichum – host specificity, pathology, and host-pathogen interaction* (ed. Prusky, D., Freeman, S. & Dickman M.B.), pp 1-20.

Cardoso, J.E., Cavalcante, M.B., Cavalcanti, J.J.V. & Vieira, A.C.F. 1994. Identificação de fontes de resistência em clones de cajueiro anão precoce às principais doenças foliares. IN: XIII Congresso brasileiro de fruticultura. Resumos. 1: 297-298.

Cardoso, J.E., Cavalcanti, J.J.V., Cavalcante, M.J.B., Aragão, M.L. & Felipe, E.M. 1999. Genetic resistance of dwarf cashew (*Anacardium occidentale* L.) to anthracnose, black mold and angular leaf spot. *Crop Protection* 18: 23-27.

Cardoso, J.E., Vidal, J.C., Freire, F.C.O., Morais, M.H.B., Silva, M.C.L. & Santos, A.A. 2000. Progresso da antracnose em folhas de cajueiro anão no litoral do nordeste. IN: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatol bras Agosto. 25 (Suplemento): 457.

Chamberlain, J.R., 1998. Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): its implications for species delimitation and conservation. *American Journal of Botany*. January. 85(1). 10p.

Chakraborty, S., Fernandes, C.D., Charchar, M.J.d'A & Thomas, M.R. 2002. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. *Phytop* 92: 553-562.

Cheng, DS, Yanaguchi, T., Wang, ZJ & Pan, XR. 2000. Genetic differentiation between two morphological types of *Fomes fomentarius* based on isozyme analysis. *Mycosyst* 19: 81-86.

Clark, M.F., & Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483.

Correa. M.P.F., Almeida, J.I.L. & Melo, Q.M.S. 1992. Propagação vegetativa do cajueiro. Fortaleza. EMBRAPA/ CNPATca.

Denoyes-Rothan, B., Guérin, G., Délye, C., Smith, B., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. 2003. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytop* 93: 219-228.

Dias, J.E.J.E. 1994. O polimorfismo isoenzimático na identificação de cultivares de *Vitis vinifera* L. Tese Dout. Univ.Téc.Lisboa-Inst.Sup.Agron. 78p.

Dorrance, A.E., Miller, O.K. & Warren, H.L. 1999. Comparison of *Stenocarpella maydis* isolates for isozyme and cultural characteristics. *Plant Dis* 83: 675-680.

Edel, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: Applications of PCR in Mycology. Ed. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA & Elander, RP. CAB International, Wallingford, UK. 1-20 (357p).

Elmer, W.H., Yang, H.A. & Sweetingham, M.W. 2001. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from ornamental lupines in Connecticut. *Plant Dis* 85: 216-219.

Ferrão, J.E.M. 1995. O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Lisboa. Ministério do Planeamento e da Administração do Território – Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Instituto de Investigação Científica Tropical. 298p.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ªEd. Brasília: Embrapa – CENARGEN. 220p. (Embrapa-CENARGEN- Doc.20)

- Flohé & Ötting. (1984). IN: Methods in Enzymology. Academic Press vol 105: 93-105.
- Förster, H. & Adaskaveg, J.1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. Phytop 89: 1056-1065.
- Freeman, S., Katan, T. & Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Dis 82: 596-605.
- ^aFreeman, S. 2000. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In *Colletotrichum – host specificity, pathology, and host-pathogen interaction* (ed. Prusky, D., Freeman, S. & Dickman M.B.), pp 131-144.
- ^bFreeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., & Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. Phytop 90: 608-614.
- ^aFreeman, S., Horowitz, S. & Sharon, A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. Phytop 91: 986-992.
- ^bFreeman, S., Minz, D., Maymon, M., & Zveibil, A. 2001. Genetic Diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. Phytop 91: 586-592.
- Freire, F.C.O, Cardoso, J.E., Santos, A.A.dos & Viana, F.M.P. 2002. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. Crop Protection 21: 489-494.
- Freire, F.C.O, Cardoso, J.E. & Viana, F.M.P. 2003. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. EMBRAPA informação tecnológica. Brasília. 687p.
- Furtado, E.L., Bach, E.E., Kimati, H., Menten, J.O.M. & Silveira, A.P. da. 1999. Caracterização morfológica, patogénica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. Summa Phytop 25: 222-228.
- Guedes, M.E.M. 1988. Isoenzymes studies in compatible and incompatible *Coffea arabica*- *Hemileia vastatrix* interactions. Brotéria genética LX:83-92.

- Hellman, R. & Christ, B.J. 1991. Isozyme variation of physiologic races of *Ustilago hordei*. *Phytop* 81: 1536-1540.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B. K. 1996. *Molecular Systematics*. 2^aEd. 655p.
- Horvath, B.J. & Vargas, J.M., Jr. 2004. Genetic variation among *Colletotrichum graminicola* isolates from four hosts using isozyme analysis. *Plant Dis* 88: 402-406.
- Indu-Sharma, Nanda, G.S., Kaloty, P.K., Sharma, I. 1998. Variability in *Neovossia indica*: based on pathogenicity and isozyme analysis. *Trop Agric Research and Extension* 1: 159-161.
- Jornal Oficial n° L 322 de 27/11/2002 p. 0053 – 0054*. Disponível online:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32002D0928:PT:HTML>
- Kaufmann, P.J. & Weidemann, G.J. 1996. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. *Plant Dis* 80: 1289-1293.
- Kulik, T., Pszczółkowska, A., Olszewski, J., Fordonski, G., Plodzien, K. & Sawicka-Sienkiewicz, E. 2005. Identification of *Colletotrichum acutatum* from yellow and Andean lupin seeds using PCR assay. *Electronic Journal of Polish Agricult. Universt, Agronomy*. 8 (1). Disponível online: <http://ejpau.media.pl/volume8/issue1/art-02.html>
- Laday, M., Bagi, F., Mesterhazy, A. & Szecsi, A. 1999. Isozyme evidence for group 1 and group 2 of *Fusarium graminearum*. *Novenyvedelem*. 35: 375-379.
- Lardner, R., Johnston, P.R., Plummer, K.M. & Pearson, M.N. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycol Res* 103: 275-285.
- Latunde-Dada, A.O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molec Plant Pathol* 2: 187-198.

- Leite, L.A.S. 1994. A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e transformações económicas. Fortaleza: EMBRAPA/ CNPAT. 195p.
- Lima, M.L.F. & Menezes, M. 2002. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões proteicos e isoenzimáticos. Fitop Bras 27: 012-016.
- Lima Filho, R.M., Oliveira, S.M.A. & Menezes, M. 2003. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. Fitop Bras 28: 620-625.
- Martin, M.P. & Garcia-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. Europ J Plant Pathol 105: 733-741.
- McCallum, B.D., Roelfs, A.P., Szabo, L.J. & Groth, J.V. 1999. Comparison of *Puccinia graminis* f. sp. Tritici from South America and Europe. Plant Pathol 48: 574-581.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. & Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Manag Sci 59: 129-142. (online: 2003).
- Menezes, M. & Hanlin, R.T. 1996. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from northeastern Braz Rev Microb 27: 228-236.
- Menezes, M. 2002. Aspectos biológicos e taxonómico de espécies do género *Colletotrichum*. XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatol Bras. Agosto. 27(suplemento): S23.
- Micales, J.A., Bonde, M.R. & Peterson, G.L. 1988. Isozyme analysis and aminopeptidase activities within the genus *Peronosclerospora*. Phytop 78: 1396-1402.
- Micales, J.A., Alfenas, A.C. & Bonde, M.R. 1998. Isoenzimas na taxonomia e genética de fungos. In: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações

- em plantas e microrganismos. Ed. Acelino Couto Alfenas. Viçosa: UFV. 478-512: 574p.
- Milheiro, A.V & Evaristo, F.N. 1994. Manual do cajueiro. Porto. Cultivar-associação de técnicos de culturas tropicais. 204p.
- Miller, S.A., Madden, L.V. & Schmittener, A.F. 1997. Distribution of *Phytophthora* spp. in field soils determined by immunoassay. *Phytop* 87: 101-107.
- Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S. & Brown, A.E. (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microb Letters* 98: 137-144.
- Moriwaki, J., Tsukiboshi, T. & Sato, T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *J Gen Plant Pathol* 68: 307-320.
- Nair, M.K., Rao, E.V.V.B., Nambiar, K.K.N. & Nambier, M.C. 1979. Cashew (*Anacardium occidentale* L.). Kerala: Central Plantation Crops Research Institute. 151p.
- O'Neill, N.R., van Berkum, P., Lin, J.J., Kuo, J., Ude, G.N., Kenworthy, W. & Saunders, J.A. 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytop* 87: 745-750.
- Otten, W., Gilligan, C.A. & Thornton, C.R. 1997. Quantification of fungal antigens in soil with a monoclonal antibody-based ELISA: analysis and reduction of soil-specific Bias. *Phytop* 87: 730-736.
- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E. & Correll, J.C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis* 89: 784-796).
- Pessoa, P.F.A. de A. 2000. Viabilidade económica do cultivo do cajueiro irrigado. In: I curso de cajucultura irrigada, Fortaleza, Pacajus e Paraipaba. Minist. Agric. E do Abastec. Brasil.

Pimentel, C.R.M., Pessoa, P.F.A.P. & Lima, L.A.A. 1993. Análise estrutural e disponibilidade de tecnologia para a cajucultura brasileira. Fortaleza. EMBRAPA/CNPAT. 31p. (EMBRAPA/CNPAT, Documentos 8).

Piteira, M.C.C. 1995. Identificação e Controle da Micoflora em Sementes de Cajueiro Anão Precoce (*Anacardium occidentale* L.) para Obtenção de Porta – Enxertos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Brasil. 130p.

Piteira, M.C.C. 1996. Pragas e Doenças do Cajueiro. Matilde Cristina Cardeira Piteira. Escola Superior de Educação. 1ª Ed. Setúbal, Portugal. 60p.

Piteira, M.C.C. & Rodrigues Jr., C.J. 1998. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. de Cajueiro (*A. occidentale* L.). Estudos morfofoculturais e testes de patogenicidade com inoculações cruzadas em outras fruteiras tropicais. In: actas da 2ª Reunião Bienal da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. Lisboa, Portugal. Resumos, p. 64.

Piteira, M.C.C., Rodrigues Jr., C.J. & Várzea, V. 2000. Grupos de Compatibilidade Vegetativa entre Isolamentos de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de Cajueiro. IN: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura. Fortaleza, Brasil. Resumos, p.164.

Ponte, J.J. 1971. As doenças do cajueiro, *Anacardium occidentale* L., no nordeste do Brasil. Fortaleza. Ciênc Agron. 1: 139-144.

Ponte, J.J. 1984. Doenças do cajueiro no nordeste do Brasil. Brasília. EMBRAPA, departamento de difusão de tecnologia. 51p.

Prusky, Dov, Freeman, Stanley, & Dickman, Martin B. 2000. *Colletotrichum* – host specificity , pathology and host pathogen interaction. APS Press. Minnesota. 393p.

Raeder, V. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microb 1: 17-20.

Ramos, AM; Ranalli, ME; Forchiassin, F. & Saidman, BO. 2000. Isozyme analysis of different species of the genus *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Mycotaxon*. 74: 447-462.

Rodriguez, R.J. & Redman, R.S. 2000. *Colletotrichum* as a model system for defining the genetic basis of fungal symbiotic lifestyles. In *Colletotrichum – host specificity, pathology, and host-pathogen interaction* (ed. Prusky, D., Freeman, S. & Dickman M.B.), pp 114-130.

Siva, R., & Krishnamurthy, K.V. 2005. Isozyme diversity in *Cassia auriculata* L. *Afric J Biotechnol*. August. 4: 772-775.

Silva, A.F.C., Rodrigues, M.L., Farias, S.E., Almeida, I.C., Pinto, M.R. & Barreto-Bergter, E. 2004. Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. *Elsevier- FEBS*. 561: 137-143.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E. & Mills, P.R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol* 45: 650-655.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum – biology, pathology and control* (ed. Bailey, J.A. & Jeger, M.J.), pp 1-26. CAB International: Wallingford, U.K.

Talhinhas, M.V. 2002. Caracterização de germoplasma do género *Lupinus*, avaliação da resistência à antracnose e estudo da diversidade e taxonomia do agente causal (*Colletotrichum acutatum* Simmonds Ex Simmonds). Tese Dout. Univ.Téc.Lisboa-Inst Sup Agron. 242p.

Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. & Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. *Phytop* 92: 986-996.

- Teixeira, L.M.S., Melo, Q.M.S., Mesquita, A.L.M. & Freire, F.C.O. 1991. Recomendações para o controle de pragas e doenças do cajueiro. Fortaleza: Embrapa-CNPca. 5p. (Embrapa-CNPca, Comunicado Técnico).
- Timmer, L.W., Brown, G.E. & Zitko, S.E. 1998. The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Dis* 82: 415-418.
- Uchoa, C.N. & Cardoso, J.E. 2002. Progresso da antracnose em folhas de cajueiro anão susceptíveis e resistentes. XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatol Bras. Agosto. 27(suplemento): S173.
- Xiao, C.L., Mackenzie, S.J., & Legard, D.E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* from strawberry and noncultivated hosts. *Phytop* 94: 446-453.
- Weeds, P.L., Chakraborty, S., Fernandes, C.D., Charchar, M.J.d'A., Ramesh, C.R., Kexian, Y. & Kelemu, S. 2003. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. *Phytop* 93: 176-185.
- Wharton, P.S. & Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *An Jard Bot de Madrid*. 61(1)
- 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*. (Eds. Innis, M.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J. & White, T.J.). pp. 315-322. Acad Press, San Diego (CA), USA.
- Zeller, K.A., Jurgenson, J.E., El – Assiuty, E.M. & Leslie, J.F. 2000. Isozyme and amplified fragment length polymorphisms from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica* 28: 121 – 130; 47 ref.

ANEXO 1 – Valores de Estatística

ANEXO 1 – Valores de estatística

Valores de índice de severidade transformados segundo a fórmula:

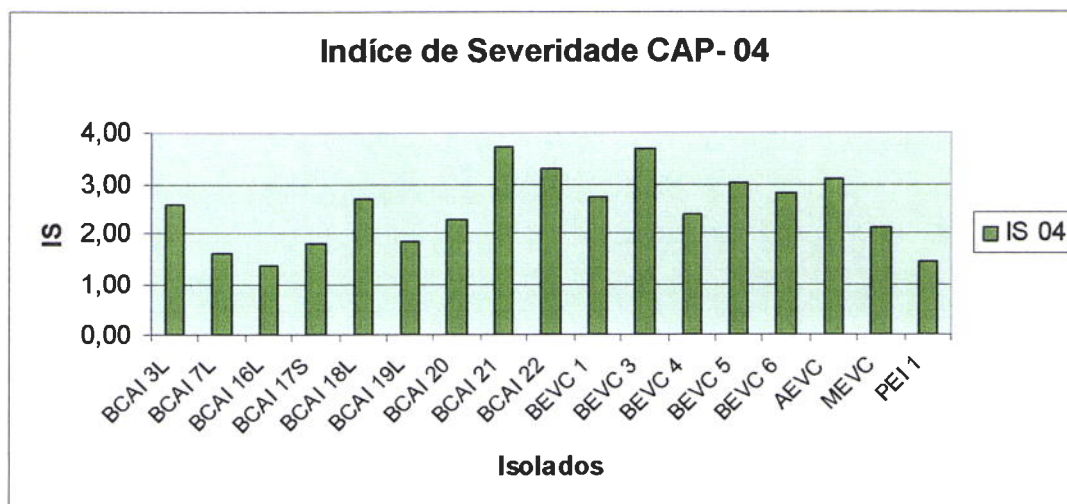
$$IS = \frac{\sum (X)}{n}$$

X= Nota dada pela escala (0, 1, 2, 3, 4 ou 5)

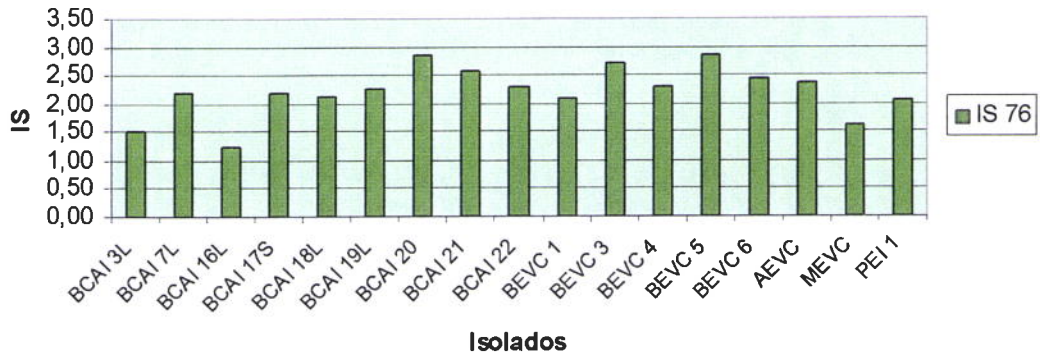
n= número de observações

Para efeitos de ANOVA os valores sofreram depois uma transformação em $\sqrt{(x+0,5)}$.

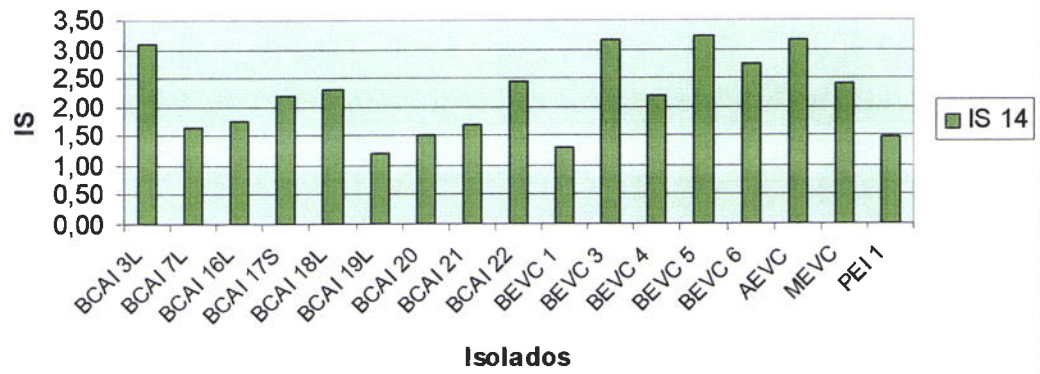
Representação gráfica dos índices de severidade obtidos pela deposição de gotas do inoculo de cada um dos isolados de fungo *Colletotrichum* spp. em plantas de cajueiro enxertadas:



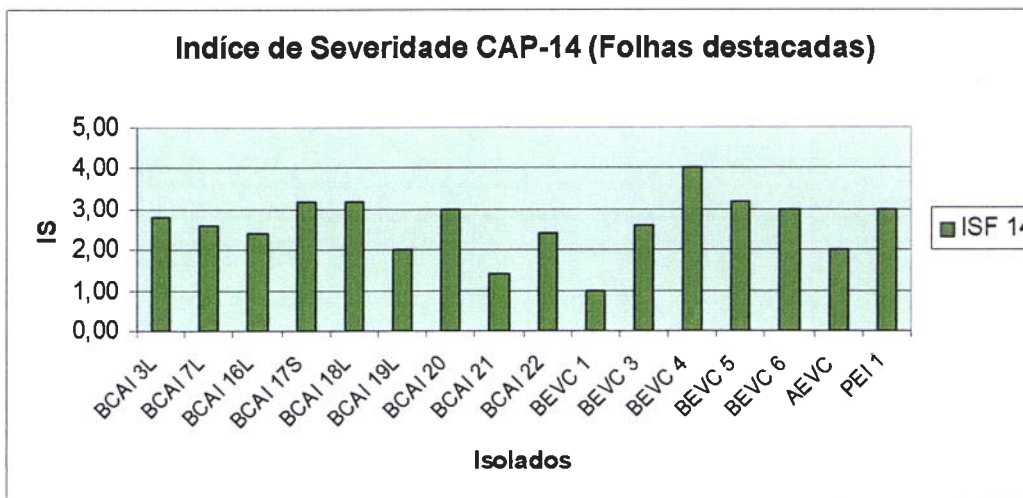
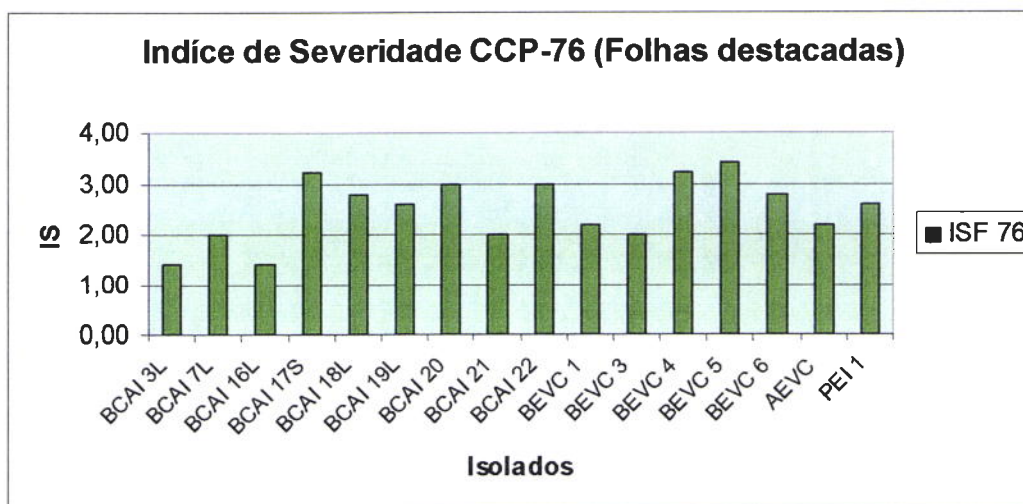
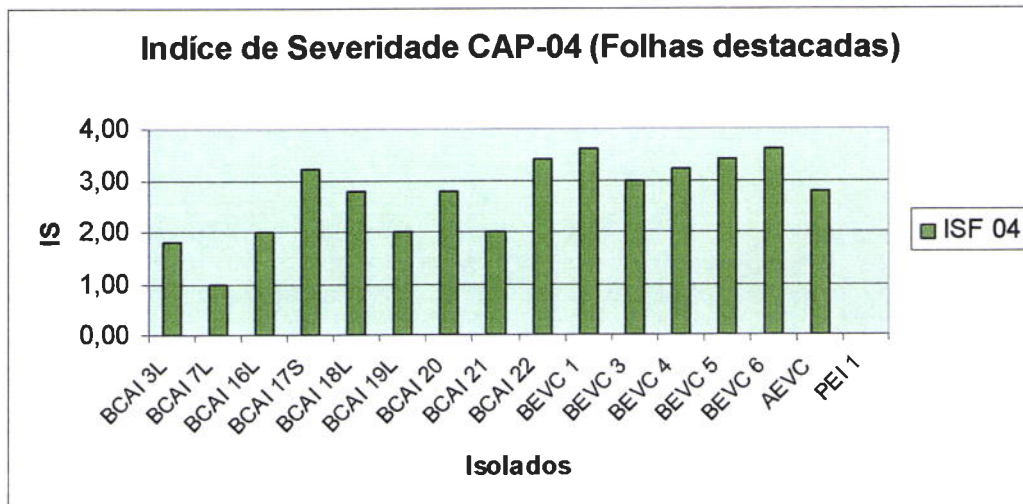
Índice de Severidade CCP- 76



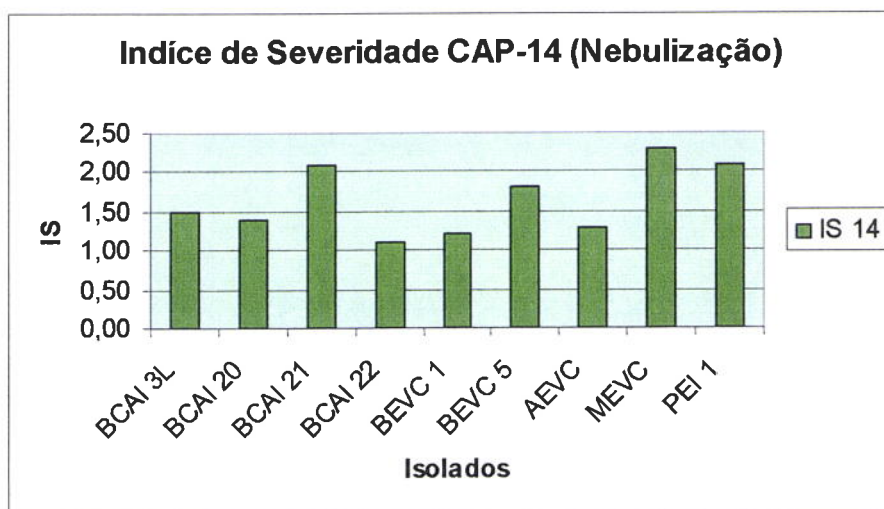
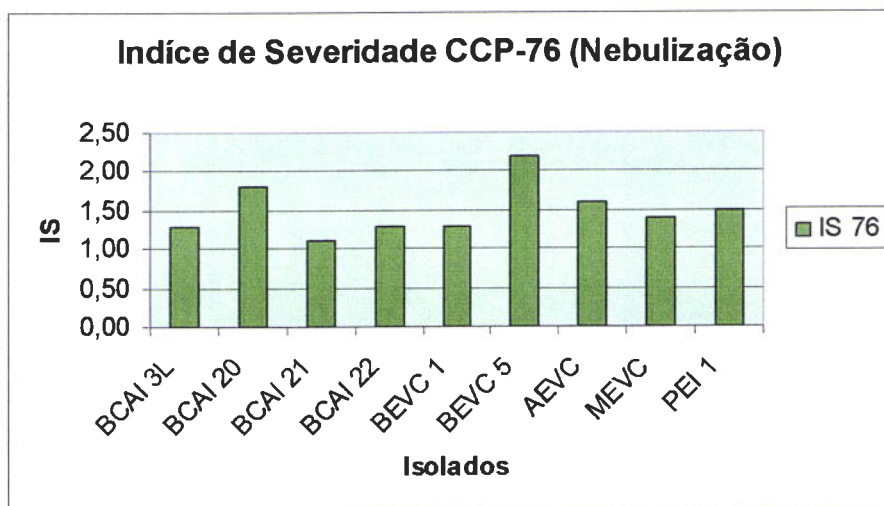
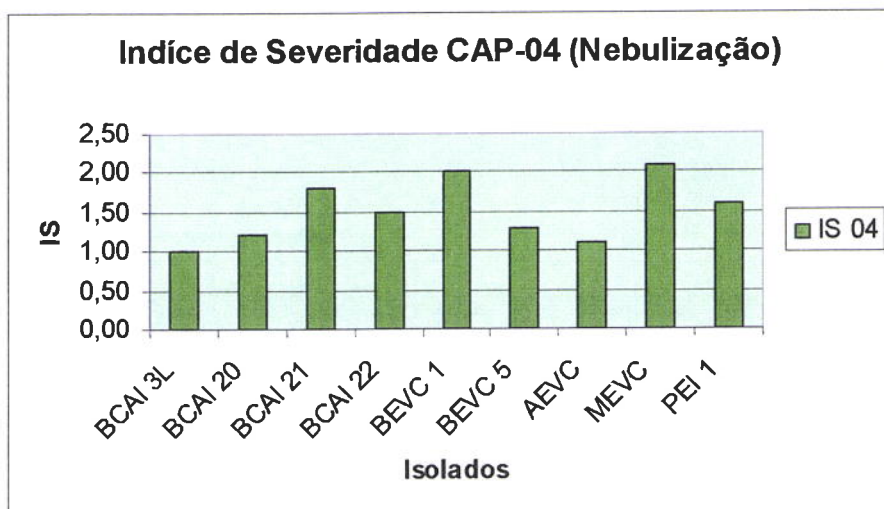
Índice de Severidade CAP- 14



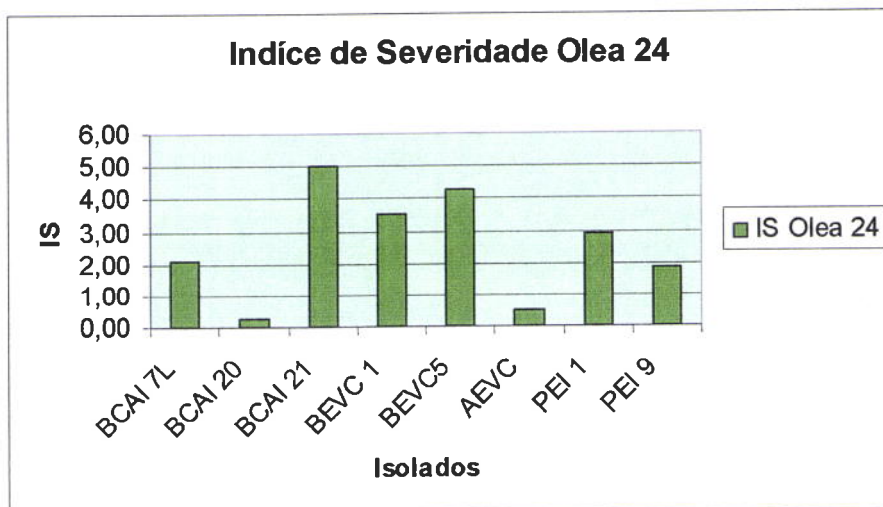
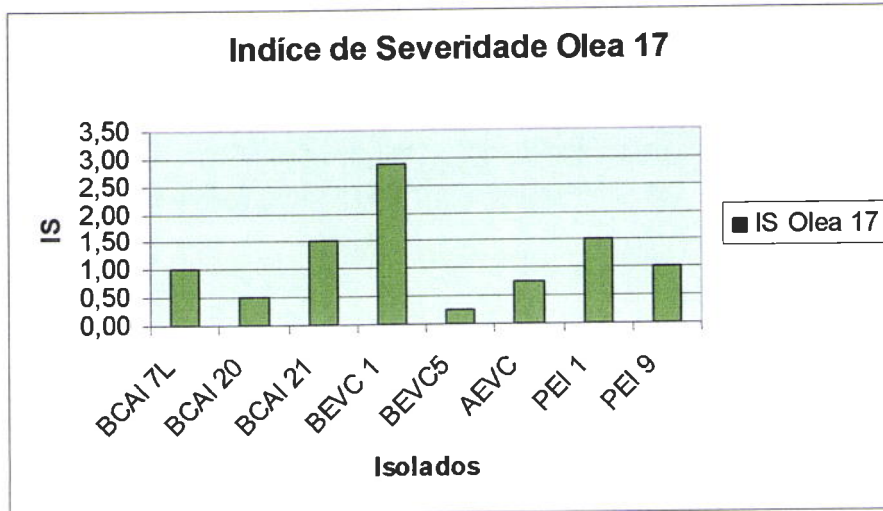
Representação gráfica dos índices de severidade obtidos pela deposição de gotas do inoculo de cada um dos isolados de fungo *Colletotrichum* spp. em folhas destacadas de plantas de cajueiro enxertadas:



Representação gráfica dos índices de severidade obtidos pela nebulização do inoculo de cada um dos isolados de fungo *Colletotrichum* spp. em plantas enxertadas de cajueiro



Representação gráfica dos índices de severidade obtidos pela deposição de gota do inoculo de cada um dos isolados de fungo *Colletotrichum* spp. em frutos de oliveira



De seguida são apresentados todos os cálculos estatísticos utilizados para a análise dos índices de severidade obtidos no estudo de patogenicidade pelo programa SISVAR.

FATORIAL PLANTA

Variável analisada: escala

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
planta	2	0.003575	0.001787	0.112	0.8940
clone	2	0.240477	0.120239	7.548	0.0009
isolado	16	3.066355	0.191647	12.030	0.0000
clone*isolado	32	2.145529	0.067048	4.209	0.0000
erro	100	1.593069	0.015931		
Total corrigido	152	7.049005			
CV (%) =	7.59				
Média geral:	1.6628407	Número de observações:	153		

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,0594803162245701 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 51

Erro padrão: 0,0176738904673966

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CAP 14	1.631618	a1
CCP 76	1.638122	a1
CAP 04	1.718782	a2

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,2112412706072 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,0420722746089396

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.395955	a1
17	1.468288	a1 a2
6	1.501556	a1 a2 a3
2	1.523914	a1 a2 a3
10	1.585659	a1 a2 a3 a4
16	1.587492	a1 a2 a3 a4
4	1.591541	a1 a2 a3 a4
7	1.630763	a2 a3 a4 a5
12	1.674251	a2 a3 a4 a5 a6
1	1.690481	a3 a4 a5 a6
5	1.693827	a3 a4 a5 a6 a7
8	1.756322	a4 a5 a6 a7
14	1.779530	a4 a5 a6 a7
9	1.780660	a4 a5 a6 a7
15	1.831433	a5 a6 a7
13	1.874514	a6 a7
11	1.902105	a7

 Análise do desdobramento de isolado dentro de cada nível de: clone

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
isolado	/1	16	2.213823	0.138364	8.685	0.0000
isolado	/2	16	2.104437	0.131527	8.256	0.0000
isolado	/3	16	0.893625	0.055852	3.506	0.0001
Resíduo		100	1.593069	0.015931		

Codificação usada para o desdobramento codificação: clone

CAP 04 = 1

CAP 14 = 2

CCP 76 = 3

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,365880613347076 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3 BCAI 16L	1.366150	a1
17 PEI 1	1.401982	a1 a2
2 BCAI 7L	1.461728	a1 a2 a3
4 BCAI 17S	1.506457	a1 a2 a3 a4
6 BCAI 19L	1.526985	a1 a2 a3 a4
16 MEVC	1.612452	a1 a2 a3 a4 a5
7 BCAI 20	1.662170	a1 a2 a3 a4 a5
12 BEVC 4	1.693066	a1 a2 a3 a4 a5 a6
1 BCAI 3L	1.760529	a2 a3 a4 a5 a6
5 BCAI 18L	1.787046	a3 a4 a5 a6
10 BEVC 1	1.805632	a3 a4 a5 a6
14 BEVC 6	1.825140	a3 a4 a5 a6
13 BEVC 5	1.865840	a4 a5 a6
15 AEVC	1.896995	a5 a6
9 BCAI 22	1.947919	a5 a6
11 BEVC 3	2.043100	a6
8 BCAI 21	2.056099	a6

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 2
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,365880613347076 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	1.340255	a1
6	1.340255	a1
17	1.401664	a1 a2
7	1.406699	a1 a2
2	1.458025	a1 a2 a3
8	1.461728	a1 a2 a3
3	1.508785	a1 a2 a3
4	1.640776	a1 a2 a3 a4
12	1.657645	a1 a2 a3 a4
5	1.662557	a1 a2 a3 a4
16	1.692719	a1 a2 a3 a4
9	1.722018	a2 a3 a4
14	1.804483	a3 a4
1	1.896995	a4
15	1.904913	a4
11	1.905851	a4
13	1.932145	a4

 Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 3
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,365880613347076 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.312931	a1
1	1.413919	a1 a2
16	1.457306	a1 a2
17	1.601217	a1 a2 a3
10	1.611090	a1 a2 a3
4	1.627392	a1 a2 a3
5	1.631878	a1 a2 a3
6	1.637427	a1 a2 a3
2	1.651990	a1 a2 a3
12	1.672043	a1 a2 a3
9	1.672043	a1 a2 a3
15	1.692390	a2 a3
14	1.708967	a2 a3
8	1.751138	a2 a3
11	1.757365	a2 a3
7	1.823421	a3
13	1.825557	a3



 Análise do desdobramento de clone dentro de cada nível de: isolado

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
clone	/1 2	0.372125	0.186062	11.679	0.0000
clone	/2 2	0.073836	0.036918	2.317	0.1017
clone	/3 2	0.061535	0.030768	1.931	0.1476
clone	/4 2	0.032846	0.016423	1.031	0.3566
clone	/5 2	0.040516	0.020258	1.272	0.2812
clone	/6 2	0.135377	0.067688	4.249	0.0165
clone	/7 2	0.264925	0.132462	8.315	0.0004
clone	/8 2	0.530036	0.265018	16.636	0.0000
clone	/9 2	0.129637	0.064818	4.069	0.0194
clone	/10 2	0.327774	0.163887	10.287	0.0001
clone	/11 2	0.122530	0.061265	3.846	0.0239
clone	/12 2	0.001904	0.000952	0.060	0.9437
clone	/13 2	0.017380	0.008690	0.545	0.5784
clone	/14 2	0.023046	0.011523	0.723	0.4842
clone	/15 2	0.087092	0.043546	2.733	0.0683
clone	/16 2	0.085932	0.042966	2.697	0.0707
clone	/17 2	0.079516	0.039758	2.496	0.0857
Resíduo	100	1.593069	0.015931		

Codificação usada para o desdobramento codificação: isolado

- BCAI 3L = 1
- BCAI 7L = 2
- BCAI 16L = 3
- BCAI 17S = 4
- BCAI 18L = 5
- BCAI 19L = 6
- BCAI 20 = 7
- BCAI 21 = 8
- BCAI 22 = 9
- BEVC 1 =10
- BEVC 3 =11
- BEVC 4 =12
- BEVC 5 =13
- BEVC 6 =14
- AEVC =15
- MEVC =16
- PEI 1 =17

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.413919	a1
1	1.760529	a2
2	1.896995	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.458025 a1	
1	1.461728 a1	
3	1.651990 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 3
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.312931 a1	
1	1.366150 a1	
2	1.508785 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 4
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.506457 a1	
3	1.627392 a1	
2	1.640776 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 5
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.631878 a1	
2	1.662557 a1	
1	1.787046 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 6
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.340255	a1
1	1.526985	a1 a2
3	1.637427	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 7
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.406699	a1
1	1.662170	a2
3	1.823421	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 8
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.461728	a1
3	1.751138	a2
1	2.056099	a3

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 9
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.672043	a1
2	1.722018	a1 a2
1	1.947919	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 10
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.340255	a1
3	1.611090	a2
1	1.805632	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 11
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.757365	a1
2	1.905851	a1 a2
1	2.043100	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 12
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.657645	a1
3	1.672043	a1
1	1.693066	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 13
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.825557	a1
1	1.865840	a1
2	1.932145	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 14
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.708967 a1	
2	1.804483 a1	
1	1.825140 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 15
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.692390 a1	
1	1.896995 a1	
2	1.904913 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 16
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.457306 a1	
1	1.612452 a1	
2	1.692719 a1	

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 17
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,245243626439042 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0728713172126734

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.401664 a1	
1	1.401982 a1	
3	1.601217 a1	

FATORIAL NEBULIZAÇÃO

Variável analisada: escala

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
repetição	9	1.760655	0.195628	3.387	0.0006
Clone	2	0.114748	0.057374	0.993	0.3719
isolado	8	1.505149	0.188144	3.258	0.0015
Clone*isolado	16	2.482903	0.155181	2.687	0.0006
erro	234	13.514233	0.057753		
<hr/>					
Total corrigido	269	19.377689			
<hr/>					
CV (%) =	17.08				
Média geral:	1.4071541	Número de observações:	270		

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,0845247316730682 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 90

Erro padrão: 0,0253318275784046

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CCP 76	1.386625	a1
CAP 04	1.399490	a1
CAP 14	1.435347	a1

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,194312762884849 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 30

Erro padrão: 0,0438760124143712

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1 BCAA 3L	1.313113	a1
4 BCAA 22	1.324065	a1
7 AEVC	1.339096	a1
2 BCAA 20	1.377331	a1 a2
5 BEVC 1	1.384226	a1 a2
3 BCAA 21	1.440125	a1 a2
9 PEI 1	1.467036	a1 a2
6 BEVC 5	1.473132	a1 a2
8 MEVC	1.546262	a2

Análise do desdobramento de isolado dentro de cada nível de: Clone

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
isolado /1	8	1.429709	0.178714	3.094	0.0024
isolado /2	8	1.634860	0.204358	3.538	0.0007
isolado /3	8	0.923483	0.115435	1.999	0.0474
Resíduo	234	13.514233	0.057753		

Codificação usada para o desdobramento codificação: Clone

CAP 04= 1

CAP 14= 2

CCP 76= 3

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,336559577875643 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.224745	a1
7	1.260384	a1
2	1.296024	a1 a2
6	1.331663	a1 a2
4	1.396271	a1 a2
9	1.425240	a1 a2
3	1.503190	a1 a2
5	1.547787	a1 a2
8	1.610108	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,336559577875643 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	1.260384	a1
5	1.296024	a1
7	1.324993	a1 a2
2	1.350042	a1 a2
1	1.389601	a1 a2
6	1.489849	a1 a2
3	1.572926	a1 a2
9	1.572926	a1 a2
8	1.661375	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,336559577875643 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.244260	a1
5	1.308868	a1 a2
4	1.315539	a1 a2
1	1.324993	a1 a2
8	1.367302	a1 a2
9	1.402942	a1 a2
7	1.431911	a1 a2
2	1.485929	a1 a2
6	1.597885	a2

Análise do desdobramento de Clone dentro de cada nível de: isolado

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Clone	/1	2	0.138005	0.069002	1.195	0.3010
Clone	/2	2	0.191491	0.095746	1.658	0.1898
Clone	/3	2	0.599764	0.299882	5.192	0.0060
Clone	/4	2	0.093417	0.046709	0.809	0.4431
Clone	/5	2	0.402106	0.201053	3.481	0.0316
Clone	/6	2	0.358563	0.179281	3.104	0.0456
Clone	/7	2	0.150090	0.075045	1.299	0.2711
Clone	/8	2	0.493539	0.246769	4.273	0.0146
Clone	/9	2	0.170676	0.085338	1.478	0.2270
Resíduo		234	13.514233	0.057753		

Codificação usada para o desdobramento codificação: isolado

BCAI 3L = 1
BCAI 20 = 2
BCAI 21 = 3
BCAI 22 = 4
BEVC 1 = 5
BEVC 5 = 6
AEVC = 7
MEVC = 8
PEI 1 = 9

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.224745	a1
3	1.324993	a1
2	1.389601	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10

Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.296024	a1
2	1.350042	a1
3	1.485929	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.244260	a1
1	1.503190	a2
2	1.572926	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 4
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.260384	a1
3	1.315539	a1
1	1.396271	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 5
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.296024	a1
3	1.308868	a1
1	1.547787	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 6
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.331663	a1
2	1.489849	a1 a2
3	1.597885	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 7
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.260384	a1
2	1.324993	a1
3	1.431911	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 8
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.367302	a1
1	1.610108	a1 a2
2	1.661375	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 9
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,253574195019205 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 10
Erro padrão: 0,0759954827352137

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.402942	a1
1	1.425240	a1
2	1.572926	a1

FATORIAL FOLHA

Variável analisada: escala

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT}(Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
repetição	4	0.620794	0.155199	1.825	0.1257
Clone	2	0.084446	0.042223	0.496	0.6095
isolado	15	7.671374	0.511425	6.014	0.0000
Clone*isolado	30	8.016352	0.267212	3.142	0.0000
erro	188	15.988262	0.085044		
Total corrigido	239	32.381228			
CV (%) =	17.09				
Média geral:	1.7061394	Número de observações:	240		

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,108960701682863 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 80

Erro padrão: 0,0326044368926848

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1 CAP 04	1.689832	a1
3 CCP 76	1.696173	a1
2 CAP 14	1.732413	a1

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,369896388570724 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 15

Erro padrão: 0,075296721667071

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
16 PEI 1	1.428402	a1
8 BCAI 21	1.485012	a1 a2
2 BCAI 7L	1.494651	a1 a2
3 BCAI 16L	1.513964	a1 a2
1 BCAI 3L	1.551844	a1 a2 a3
6 BCAI 19L	1.593048	a1 a2 a3 a4
10 BEVC 1	1.616808	a1 a2 a3 a4 a5
15 AEVC	1.664361	a1 a2 a3 a4 a5
11 BEVC 3	1.717073	a1 a2 a3 a4 a5
7 BCAI 20	1.820722	a2 a3 a4 a5
9 BCAI 22	1.841843	a2 a3 a4 a5
5 BCAI 18L	1.846290	a2 a3 a4 a5
14 BEVC 6	1.897228	a3 a4 a5
4 BCAI 17S	1.909540	a3 a4 a5
13 BEVC 5	1.941105	a4 a5
12 BEVC 4	1.976338	a5

Análise do desdobramento de isolado dentro de cada nível de: Clone

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Isolado	/1	15	9.109704	0.607314	7.141	0.0000
isolado	/2	15	3.873942	0.258263	3.037	0.0002
isolado	/3	15	2.704081	0.180272	2.120	0.0106
Resíduo		188	15.988262	0.085044		

Codificação usada para o desdobramento CODIFICAÇÃO: CLONE

CAP 04= 1

CAP 14= 2

CCP 76= 3

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: CCP 04

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,640679338540733 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
16	0.707107	a1
2	1.224745	a1 a2
1	1.475339	a2 a3
6	1.533277	a2 a3
8	1.533277	a2 a3
3	1.533277	a2 a3
7	1.783871	a2 a3
5	1.805051	a2 a3
15	1.812891	a2 a3
11	1.862989	a2 a3
12	1.913087	a3
4	1.913087	a3
13	1.931364	a3
9	1.971025	a3
14	2.015803	a3
10	2.021124	a3

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: CCP 14

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,640679338540733 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	1.224745	a1
8	1.367302	a1 a2
6	1.533277	a1 a2 a3
15	1.554457	a1 a2 a3
3	1.654654	a1 a2 a3
9	1.683674	a1 a2 a3
2	1.712592	a1 a2 a3
11	1.733772	a1 a2 a3
1	1.812891	a1 a2 a3
7	1.841809	a1 a2 a3
14	1.862989	a1 a2 a3
16	1.870829	a2 a3
4	1.907767	a2 a3
5	1.920927	a2 a3
13	1.920927	a2 a3
12	2.116000	a3

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: CCP 76

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,640679338540733 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5

Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.353962	a1
1	1.367302	a1
2	1.546618	a1
8	1.554457	a1
11	1.554457	a1
10	1.604556	a1
15	1.625736	a1
16	1.707271	a1
6	1.712592	a1
14	1.812891	a1
5	1.812891	a1
7	1.836488	a1
9	1.870829	a1
12	1.899927	a1
4	1.907767	a1
13	1.971025	a1

 Análise do desdobramento de Clone dentro de cada nível de: isolado

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Clone	/1 2	0.540270	0.270135	3.176	0.0430
Clone	/2 2	0.615240	0.307620	3.617	0.0280
Clone	/3 2	0.228837	0.114418	1.345	0.2595
Clone	/4 2	0.000094	0.000047	0.001	0.9995
Clone	/5 2	0.041934	0.020967	0.247	0.7815
Clone	/6 2	0.107180	0.053590	0.630	0.5305
Clone	/7 2	0.010256	0.005128	0.060	0.9433
Clone	/8 2	0.105038	0.052519	0.618	0.5373
Clone	/9 2	0.212728	0.106364	1.251	0.2851
Clone	/10 2	1.586674	0.793337	9.329	0.0001
Clone	/11 2	0.240071	0.120036	1.411	0.2430
Clone	/12 2	0.146723	0.073362	0.863	0.4200
Clone	/13 2	0.006986	0.003493	0.041	0.9615
Clone	/14 2	0.111725	0.055863	0.657	0.5164
Clone	/15 2	0.178159	0.089080	1.047	0.3491
Clone	/16 2	3.968880	1.984440	23.334	0.0000
Resíduo	188	15.988262	0.085044		

Codificação usada para o desdobramento codificação: isolado

- BCAI 3L = 1
- BCAI 7L = 2
- BCAI 16L = 3
- BCAI 17S = 4
- BCAI 18L = 5
- BCAI 19L = 6
- BCAI 20 = 7
- BCAI 21 = 8
- BCAI 22 = 9
- BEVC 1 = 10
- BEVC 3 = 11
- BEVC 4 = 12
- BEVC 5 = 13
- BEVC 6 = 14
- AEVC = 15
- PEI 1 = 16

 Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 1
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.367302	a1
1	1.475339	a1 a2
2	1.812891	a2

 Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 2
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.224745	a1
3	1.546618	a1 a2
2	1.712592	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 3
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.353962	a1
1	1.533277	a1
2	1.654654	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 4
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.907767	a1
2	1.907767	a1
1	1.913087	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 5
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.805051	a1
3	1.812891	a1
2	1.920927	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 6
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.533277	a1
1	1.533277	a1
3	1.712592	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 7
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.783871	a1
3	1.836488	a1
2	1.841809	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 8
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.367302	a1
1	1.533277	a1
3	1.554457	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 9
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.683674	a1
3	1.870829	a1
1	1.971025	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 10
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.224745	a1
3	1.604556	a1 a2
1	2.021124	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 11
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.554457	a1
2	1.733772	a1
1	1.862989	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 12
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.899927	a1
1	1.913087	a1
2	2.116000	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 13
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.920927	a1
1	1.931364	a1
3	1.971025	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 14
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	1.812891	a1
2	1.862989	a1
1	2.015803	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 15
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1.554457	a1
3	1.625736	a1
1	1.812891	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de Clone dentro da codificação: 16
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV Clone

DMS: 0,435842806731453 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 0,130417747570739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.707107	a1
3	1.707271	a2
2	1.870829	a2

FATORIAL OLIVEIRA

Variável analisada: escala

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
repetição	7	1.507366	0.215338	1.234	0.2906
clone	1	5.392269	5.392269	30.913	0.0000
isolado	7	13.041401	1.863057	10.681	0.0000
clone*isolado	7	7.665746	1.095107	6.278	0.0000
erro	105	18.315512	0.174433		
<hr/>					
Total corrigido	127	45.922294			
<hr/>					
CV (%) =	29.53				
Média geral:	1.4144282	Número de observações:	128		

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,146393617617686 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 64

Erro padrão: 0,0522065373955641

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1 Oleae 17	1.209179	a1
2 Oleae 24	1.619677	a2

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,456775176041934 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 16

Erro padrão: 0,104413074791128

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2 BCAI 20	0.901221	a1
6 AEVC	1.030631	a1 a2
8 PEI 9	1.275386	a1 a2 a3
1 BCAI 7L	1.377000	a2 a3 a4
5 BEVC 5	1.503579	a3 a4 a5
7 PEI 1	1.555452	a3 a4 a5
3 BCAI 21	1.824716	a4 a5
4 BEVC 1	1.847442	a5

Análise do desdobramento de isolado dentro de cada nível de: clone

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
isolado	/1	7	4.553873	0.650553	3.730	0.0012
isolado	/2	7	16.153274	2.307611	13.229	0.0000
Resíduo		105	18.315512	0.174433		

Codificação usada para o desdobramento codificação: clone

OLEAE 17 = 1

OLEAE 24 = 2

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,645977648913861 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8

Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.836516	a1
2	0.965926	a1
6	1.095335	a1
8	1.122547	a1
1	1.204589	a1 a2
3	1.304223	a1 a2
7	1.374448	a1 a2
4	1.769849	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de isolado dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV isolado

DMS: 0,645977648913861 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8

Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	0.836516	a1
6	0.965926	a1 a2
8	1.428226	a1 a2 a3
1	1.549410	a2 a3 a4
7	1.736455	a3 a4 a5
4	1.925034	a3 a4 a5
5	2.170641	a4 a5
3	2.345208	a5

 Análise do desdobramento de clone dentro de cada nível de: isolado

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
clone	/1 1	0.475605	0.475605	2.727	0.1017
clone	/2 1	0.066987	0.066987	0.384	0.5368
clone	/3 1	4.334594	4.334594	24.850	0.0000
clone	/4 1	0.096330	0.096330	0.552	0.4591
clone	/5 1	7.119557	7.119557	40.815	0.0000
clone	/6 1	0.066987	0.066987	0.384	0.5368
clone	/7 1	0.524197	0.524197	3.005	0.0859
clone	/8 1	0.373758	0.373758	2.143	0.1462
Resíduo	105	18.315512	0.174433		

Codificação usada para o desdobramento codificação: isolado

BCAI 7L = 1
 BCAI 20 = 2
 BCAI 21 = 3
 BEVC 1 = 4
 BEVC5 = 5
 AEVC = 6
 PEI 1 = 7
 PEI 9 = 8

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8

Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.204589	a1
2	1.549410	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8

Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	0.836516	a1
1	0.965926	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8

Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.304223	a1
2	2.345208	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 4
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8
 Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.769849	a1
2	1.925034	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 5
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8
 Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.836516	a1
2	2.170641	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 6
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8
 Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	0.965926	a1
1	1.095335	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 7
 Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8
 Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.374448	a1
2	1.736455	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de clone dentro da codificação: 8
Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV clone

DMS: 0,414063678959585 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 8
Erro padrão: 0,14766238645869

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.122547	a1
2	1.428226	a1

ANEXO 2 – Mobilidades Relativas transformadas em matrizes de ausência ou presença das isoenzimas

(CONTINUAÇÃO)

ANEXO 2- Mobilidades relativas transformadas em matrizes de ausência (0), ou presença (1) das isoenzimas (EST; PGI; PGM; PGDH; AKF; ACP; SOD; MDH; HK; IDH) para cada um dos isolados (BCAI 20; BCAI 17S; BCAI 18L; BCAI 16L; BEVC 4; MEVC 1; AEVC 1; BCAI 7L; BEVC 6; BCAI 22; BCAI 3L; BEVC 5; BCAI 19L; BEVC 3; PEI1; PEI9; BEVC 1; BEVC 2; BCAI 2N; BCAI 21)

IDH	BCAI 20	BCAI 17S	BCAI 18L	BCAI 16L	BEVC 4	MEVC 1	AEVC 1	BCAI 7L	BEVC 6	BCAI 22	BCAI 3L	BEVC 5	BCAI 19L	BEVC 3	PEI1	PEI9	BEVC 1	BEVC 2	BCAI 2N	BCAI 21
0.0961	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1346	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1538	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
0.1730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.2115	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0.25	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.2692	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3076	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0.4038	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mobilidade Relativa (Rf) = (d/D), Em que:

d= distância percorrida pela molécula

D= distância percorrida pela linha frontal - Fórmula descrita por Alfenas *et al.* (1998)