

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
CURSO DE AGRONOMIA**



ESTUDO FILOGENÉTICO DE POPULAÇÕES DE *Ceratobasidium noxium*, AGENTE CAUSAL DO MAL-DO-FIO DO CAQUI (*Diospyrus kaki*) E DO CHÁ (*Camellia sinensis*) NO ESTADO DE SÃO PAULO, PATOGENICIDADE CRUZADA E REAÇÃO DE VARIEDADES DE CAQUI AO PATÓGENO.

Elaine Costa Souza

Orientador: Profº. Drº. Paulo Cezar Ceresini

Co-orientador: Profº. Drº. Alcebíades Ribeiro Campos.

Trabalho apresentado à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Produção.

Ilha Solteira - SP

Julho de 2006

Dedico aos meus pais, *Elpídio Celestino de Souza*
e Agnésia Costa de Souza que me apoiaram a todo
o momento nessa jornada, e contribuíram
para minha formação profissional

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, por todos esses anos de Orientação, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Alcebiades Ribeiro Campos (Maranhão) e Prof^a. Dr^a. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva (Kitty), pela ajuda e auxílio concedido no decorrer do curso

A Maisa Boff Ciampi, pela ajuda concedida no desenvolvimento de uma parte deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório e funcionários, Vera, José Antonio, Toninha, Ângela, Domingos, Circélia e Juarez, pelo auxílio durante o curso e desenvolvimento desta pesquisa e amizade.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pela concessão do auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.(Processo 04/1980-0)

À CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado.

Aos Eng.s. Agr. Hélio Minoru Takada e Mauro Sakai do IAC, Prof Dr. Edson L. Furtado e Dr. Luadir Gasparoto, por nos disponibilizar isolados e/ou material infectado por *Ceratobasidium* sp., de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Aparecida Conceição Boliani, da FEIS UNESP, pela concessão de material vegetal de aqui para os experimentos de comportamento de variedades.

Aos meus amigos e companheiros de estágio e do curso de mestrado, Ana Paula da Silva Campos e Marco Antonio Basseto, pela amizade e ajuda no decorrer deste trabalho.

Aos meus amigos (as): Márcia Helena Scabora , Renata Moura, Flavia Cristina Delbem, Claudia Mara de Sá , Elaine Cristina de Almeida, Eliane da Silva, Andréia Ardel, Delzimary, Mércia Soares de Oliveira, Hérica Soares de Oliveira, Cleidna Dantas de Souza, Magda & Marcos Vinicius (Marcão), Rafaela & Glauber, pelo carinho, amizade e apoio no decorrer deste curso.

A todos os meninos da Republica B.O.: Danilo (Piqui), Gustavo (Babésia), José Aparecido (Russo), Marcelo (Motoki) pelo companheirismo no decorrer do curso.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A doença mal-do-fio.....	01
1.2 O patógeno.....	02
1.3 Posicionamento taxonômico do patógeno.....	03
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	06
2.1 Populações de isolados	06
2.2 Extração de DNA genômico.....	07
2.3 Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.....	07
2.4 Clonagem dos produtos de PCR.....	08
2.5. Análise de dados	09
2.5.1 Análise filogenética	09
2.5.2 Evolução intraespecífica de <i>Ceratobasidium</i> sp. do caqui e do chá, inferida por análises de reticulogramas de genes individuais.....	11
2.5.3. Teste de subdivisão populacional e análise de coalescência	11
2.6 Patogenicidade cruzada	12
2.7 Reação de variedades de caquizeiro a <i>Ceratobasidium noxium</i>	15

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1 Posicionamento filogenético global da população dos isolados de <i>Ceratobasidium</i> spp. de caqui e de chá.....	19
3.2 Composição e diversidade de haplótipos de <i>Ceratobasidium</i> spp.....	24
3.3 Análises filogenéticas por ML, MP e Bayesiana nas populações de isolados de <i>Ceratobasidium</i> spp. do caqui e do chá em relação as espécies descritas no mundo do gênero <i>Ceratobasidium</i>	25
3.4 Patogenicidade Cruzada.....	33
3.5 Reação de variedades de caquizeiro a <i>Ceratobasidium noxium</i>	39
4. CONCLUSÕES	42
5. GLOSSÁRIO.....	44
6. REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1. Haplótipos mundiais e brasileiros de <i>Ceratobasidium</i> spp. determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....	20
Tabela 2. Patogenicidade do fungo do mal-do-fio (<i>Ceratobasidium</i> sp. grupos <i>Diospyrus</i> e grupo <i>Camellia</i>) a sete variedades de caqui e patogenicidade cruzada a plantas de café, caqui, chá e citros.....	35
Tabela 3. Comportamento de oito variedades de caqui ao fungo do mal-do-fio (<i>Ceratobasidium</i> sp. grupo <i>Diospyrus</i>), sob condições de incubação em estufa biológica a 25°C, sete dias após a inoculação.....	40

LISTA DE FIGURAS

 página
Figura 1. Arvore de máxima verossimilhança (ML) baseada no modelo GTR + G de evolução de bases de DNA	26
Figura 2. Rede de haplótipos brasileiros da região ITS-5.8S do rDNA de <i>Ceratobasidium</i> sp. (<i>C. noxium</i>) de caqui (Grupo <i>Diospyrus</i> = HDk) e de chá, graviola e mangueira (Grupo <i>Camellia</i> = Cs)	28
Figura 3. Genealogia gênica coalescente com a mais alta probabilidade mostrando a distribuição de mutações na região ITS-5.8S do rDNA em populações de <i>Ceratobasidium noxium</i> do caqui (grupo <i>Diospyrus</i>) e do chá (grupo <i>Camellia</i>).....	30
Figura 4. Escala de notas para avaliação da severidade da queima-do-fio (<i>Ceratobasidium noxium</i>) do caquizeiro.....	17
Figura 5. Colonização de órgãos aéreos de plantas de caqui (A), café (B), chá (C) e citros (D) por <i>Ceratobasidium</i> sp. grupo <i>Diospyrus</i> sob condições de casa de vegetação.....	36
Figura 6. Colonização de ramos destacados de plantas de caqui (A), café (B), chá (C) e citros (D) por <i>Ceratobasidium</i> sp. grupo <i>Diospyrus</i> sob condições de estufa incubadora biológica.....	37

ESTUDO FILOGENÉTICO DE POPULAÇÕES DE *Ceratobasidium noxium*, AGENTE CAUSAL DO MAL-DO-FIO DO CAQUI (*Diospyrus kaki*) E DO CHÁ (*Camellia sinensis*) NO ESTADO DE SÃO PAULO, PATOGENICIDADE CRUZADA E REAÇÃO DE VARIEDADES DE CAQUI AO PATÓGENO.

RESUMO

O mal-do-fio (ou queima-do-fio) é uma doença causada pelo fungo Basidiomiceto *Ceratobasidium* sp., que afeta diversas plantas frutíferas nativas ou cultivadas. A doença ocorre com mais frequência em zonas de alta precipitação e temperaturas elevadas, típicas de regiões de florestas tropicais como a Amazônia e a Mata Atlântica. Em São Paulo, recentemente detectou-se a ocorrência do mal-do-fio, em caquizeiro na região de Mogi das Cruzes. Essa doença pode-se tornar importante com a expansão do cultivo de fruteiras no Estado. A maioria das pesquisas sobre o patossistema focalizou a epidemiologia e o controle do fungo. Entretanto a etiologia do patógeno ainda não está totalmente definida, especialmente para populações do fungo infectando caqui e chá no Estado de São Paulo. Há também pouca informação sobre a divergência genética entre populações do patógeno de hospedeiros distintos como caqui e chá. O primeiro objetivo deste trabalho foi determinar o posicionamento filogenético global de populações de *Ceratobasidium* sp. do caqui e do chá, em relação a espécies de *Ceratobasidium* sp. descritas no mundo. Foram analisadas seqüências de DNA da região ITS-5.8S do rDNA, inferindo-se a história dos alelos ou haplótipos deste locus, por meio de métodos filogenéticos, cladísticos e coalescentes. Observou-se que uso de *C. noxium* é apropriado para denominar espécies associadas ao mal-do-fio em caqui e chá, apesar de *C. noxium* do caqui e do chá constituírem populações filogeneticamente independentes, as quais denominamos de Grupo *Diospyrus* e Grupo

Camellia. Este estudo trouxe uma contribuição importante para a compreensão das relações filogenéticas e biologia de populações de *C. noxium* em caqui e chá. Uma vez esclarecidas as questões filogenéticas, o segundo objetivo deste trabalho foi testar a patogenicidade cruzada de isolados de *Ceratobasidium noxium* de caqui e chá para ambas as culturas e também a outros hospedeiros como café e citros. Objetivou-se, também, determinar a reação de oito variedades de caqui a *C. noxium* do caqui em condições controladas. Muito embora considerados filogeneticamente distintos, observou-se que ambos os isolados de caqui e de chá são patogênicos para ambas as culturas, além de infectarem café e citros. Não houve indícios de reação de resistência entre oito das principais variedades de caquizeiro testadas.

ABSTRACT**PHYLOGENETIC STUDY OF POPULATIONS OF *Ceratobasidium noxium*, CAUSAL AGENT OF THE WHITE-THREAD ON THE KAKI (*Diospyrus kaki*) AND TEA (*Camellia sinensis*) IN SÃO PAULO STATE, CROSS PATHOGENICITY AND REACTION OF KAKI VARIETIES TO THE PATHOGEN.**

The white-thread blight is a disease caused by the Basidiomycete fungus *Ceratobasidium* sp. that affects several native or cropped tree fruits. This disease frequently occurs in zones of high precipitation and high temperatures typical of the tropical forest regions such as the Amazon and the Atlantic Forest. In São Paulo, the occurrence of the white-thread blight was detected only recently on kaki orchards closer to Mogi das Cruzes. That disease can become important with the expansion of the fruit trees cropping areas in the State. Most of the researches about the pathosystem has focused on the epidemiology and control of fungus. However the etiology of the pathogen is not totally defined yet, especially for the fungus populations infecting kaki and tea in São Paulo State. There is also little information available about the biological and genetic divergence between pathogen populations from distinct hosts, such as kaki and tea. The first objective of this research was to determine the global phylogenetic placement of populations of *Ceratobasidium* from kaki and tea, considering the species of *Ceratobasidium* described throughout the world. Sequences of the ITS-5.8S region of the rDNA were analyzed, inferring the alleles or haplotypes history for this locus, by phylogenetics, cladistic and coalescent methods. We observed that the use of *C. noxium* is appropriate to denominate the fungus species associate with the white-thread blight on kaki and tea, despite the fact that *C. noxium* from kaki and tea constitutes phylogenetically independent populations, which we denominate *Diospyrus* and *Camellia* groups. This study

brought an important contribution for the understanding of the phylogenetics and population biology of *C. noxium* infecting kaki and tea. Once the phylogenetics subjects have been cleared, the second objective of this work was to test the cross-pathogenicity of *Ceratobasidium* sp. isolates from kaki and tea for both host plants and also for other hosts such as coffee and citrus. We also aimed to determine the reaction of local varieties of kaki to *C. noxium* isolates from kaki under controlled conditions. Although phylogenetically distinct, both isolates from kaki and tea were cross-pathogenic for both hosts, besides infecting coffee and citrus. There was no indication of resistance reaction among the eight main varieties of kaki cultivated in São Paulo State.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença mal-do-fio

As doenças constituem grande problema para a cultura do caquizeiro (*Diospyrus kaki* L.), podendo reduzir drasticamente a sua produção (CAVALCANTE & SALES, 2001). Entre as doenças relatadas, a queima-do-fio, também conhecida como mal-do-fio, tem adquirido importância. O patógeno já foi relatado afetando uma série de culturas no mundo, com distribuição na maioria dos continentes. Na América é relatado na Argentina, no Brasil, na Colômbia, na Venezuela, nas Guianas, em vários países da América Central, no México e nos EUA (CABI Crop Protection Compendium 2003; TIMS et al., 1954). Esta doença é bem conhecida na região Amazônica, podendo afetar um grande número de plantas frutíferas (LOURD & ALVES, 1987; GASPAROTTO & SILVA, 1999).

O primeiro relato de um patógeno semelhante no Brasil data de 1978, quando se observou a ocorrência de um fungo causando sintomas parecidos à queima-do-fio em ramos verdes de plantas de pomelo de um pomar no estado do Amazonas. O fungo foi isolado em cultura pura no Instituto Biológico (IB) de São Paulo e quando comparado com o material de herbário do IB foi classificado como *Pellicularia koleroga* (ROSSETI et al., 1982). Em 1987, vinte e sete espécies de plantas haviam sido relatadas como hospedeiras do patógeno na região Amazônica (LOURD & ALVES, 1987). Em 1999, outras 18 espécies de plantas fruteiras nativas da Amazônia foram descritas como hospedeiras de *P. koleroga* (*Koleroga noxia*) (GASPAROTO & SILVA, 1999). A doença já foi descrita afetando culturas como graviola (*Anona muricata* L.), pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), cacau (*Theobroma cacao* L.), *Citrus* sp., café (*Coffea arabica* L.), manga (*Mangifera indica* L.), seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de

Juss.) Muell. & Arg.] e diversas outras árvores frutíferas do Amazonas (FAWCETT, 1914; FURTADO, 1997; PEREIRA et al., 2000; ROSSETI et al., 1982). Em São Paulo, a doença já foi também relatada afetando chá [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] no Vale do Ribeira (FURTADO, 1997). Recentemente, a ocorrência da queima-do-fio foi relatada afetando caquizeiro na região de Mogi das Cruzes, em São Paulo (PEREIRA et al., 2003).

A queima-do-fio é a doença mais freqüente em zonas de alta precipitação e temperaturas elevadas como nas florestas tropicais da Amazônia e da Mata Atlântica. Ela aparece e se desenvolve durante a estação chuvosa e os sintomas são visíveis principalmente nas folhas e também nos ramos e frutos novos. A infecção se inicia na parte inferior dos ramos e avança da base até o extremo do ramo em forma de cordões finos esbranquiçados. Logo se ramifica abundantemente pelas folhas, chegando a cobrir toda área foliar formando uma película branca e semitransparente que escurece com o tempo. As folhas tornam-se escuras, secam e ficam penduradas no ramo por um filamento branco (micélio do fungo) (CAVALCANTE & SALES, 2001).

1.2 O patógeno

A verdadeira identidade do patógeno da queima-do-fio estava sujeita à questionamento até recentemente. O patógeno já foi caracterizado como pertencente à espécie *P. koleroga*, mas poucas descrições das características morfológicas do fungo foram publicadas (LOURD & ALVES, 1987).

A primeira descrição da queima-do-fio foi realizada por Cooke em 1876, em cafeeiro, na Índia (TIMS et al., 1954). Cooke considerou o patógeno um Hyphomycete e o nomeou *Pellicularia koleroga* Cooke 1876 *sensu* Rogers 1931. Em 1910, Von Hoehnel, redescreveu o fungo dando-lhe o nome de *Corticium koleroga* Cook (Höhn)

1910 (TIMS et al., 1954). Entretanto, *Corticium koleroga* tem uma sinonímia muito ampla: *Corticium stevensii* Burt, *Pellicularia koleroga*, *Botryobasidium koleroga* (Cke.) Venkatarayan 1949, *Hyphocnus koleroga* Stevens & Hall, *Koleroga noxia* Donk 1958 e *Ceratobasidium noxium* (Donk) P. Roberts 1999 (INDEX FUNGORUM, 2004).

Historicamente, tentativas de melhor posicionamento taxonômico de espécies relacionadas com a queima-do-fio iniciaram com Rogers, em 1935, que transferiu (do complexo *Botryobasidium*) a espécie *Corticium cornigerum* Bourd, com esporos secundários e basídias de quatro esporos ao gênero *Ceratobasidium* Rogers (LANGER, 1994; LANGER, 2003). *Pellicularia koleroga* foi posicionada dentro de *Botryobasidium* Donk por Rogers, em 1943. Já Donk, em 1954, criou o gênero monotípico *Koleroga* Donk para *P. koleroga*. Posteriormente, Talbot, em 1965, considerou o gênero *Pellicularia* como sinônimo de *Ceratobasidium*. Outras espécies com esporos secundários foram transferidas de *Botryobasidium* para os gêneros *Thanatephorus* e *Uthatabasidium*. *T. cucumeris* é conhecido como fitopatógeno de diversas espécies vegetais (SNEH et al., 1991). Entretanto, o substrato favorito para o complexo *Botryobasidium* (que inclui *Botryohyphocnus* e *Uthatabasidium*) é madeira, e frequentemente apodrecida. Atualmente, as espécies causadoras da queima-do-fio, em diversas plantas arbóreas, estão agrupadas no gênero *Ceratobasidium*, mais precisamente *C. anceps*, *C. cornigerum* ou *C. noxium* (ROBERTS, 1999).

1.3 Posicionamento taxonômico do patógeno

Entretanto, o posicionamento filogenético de *Ceratobasidium* do caqui e do chá em relação às espécies de *Ceratobasidium* descritas no mundo ainda não foi definido. Da mesma forma, há pouca informação sobre a divergência genética entre populações de *Ceratobasidium* sp. obtidas desses dois distintos hospedeiros: caqui e chá. De forma

geral, este estudo compreendeu analisar a variação nas seqüências ITS1-5.8S-ITS2 rDNA de populações de *Ceratobasidium* sp. responsável por ocasionar a queima-do-fio em plantas de caqui e chá e outras plantas frutíferas. Além de compará-las intraespecificamente, buscou-se também comparar, sob o ponto de vista filogenético, estas duas populações com outras espécies de *Ceratobasidium* sp. descritas no mundo.

Dados de regiões específicas (por exemplo, da região ITS = *internal transcribed spacer* ou espaçador interno transcrito) do rDNA têm sido muito utilizados para esclarecer aspectos filogenéticos e para estudos sobre divergência genética entre espécies e populações de fungos (CARBONE et al., 1999; CARBONE & KOHN, 2004; JAMES et al., 2001).

A análise da variação na seqüência de DNA por meio de métodos filogenéticos, possibilita a observação de padrões ancestrais da diversidade genética atual encontrada e a história dos alelos ou haplótipos. Histórias mutacionais devem convergir na interface entre populações e espécies, onde a divergência mais recente entre populações é distinguível do processo de especiação (considerado mais antigo) e as causas dos eventos de divergência podem ser determinadas. A variação genética no rDNA é frequentemente menor entre populações dentro da espécie e consideravelmente maior entre espécies fúngicas distintas (CARBONE & KOHN, 2001).

A história evolucionária de haplótipos (tanto na escala populacional quanto na escala de espécie) pode ser reconstruída usando uma abordagem integrada que combina sistemática evolucionária com genética de populações. Para isso utiliza-se uma combinação de métodos de análises de dados genéticos que vão da parcimônia estatística, máxima verossimilhança, estatística bayesiana, análises cladísticas e coalescentes (CARBONE & KOHN, 2001). A força de métodos integrativos de análise dos limites entre populações e espécies de fungos fitopatogênicos foi inicialmente

testada por CARBONE & KOHN (2001) avaliando-se dados empíricos de múltiplos loci de uma amostra populacional de *Sclerotinia sclerotiorum* (fungo Ascomiceto fitopatogênico).

O primeiro objetivo deste trabalho foi determinar o posicionamento filogenético independente de populações de *Ceratobasidium* sp. do caqui e do chá, em relação a espécies de *Ceratobasidium* sp. descritas no mundo. Objetivou-se, também, analisar seqüências de DNA da região ITS-5.8S do rDNA dessas duas populações do patógeno, inferindo-se sobre a história dos alelos ou haplótipos deste locus por meio de métodos filogenéticos, cladísticos e coalescentes. Testou-se a hipótese de que essas populações distintas de isolados de *Ceratobasidium* sp. de caqui e chá constituem espécies semelhantes.

Uma série de pesquisas já foi desenvolvida para tentar compreender aspectos relativos à epidemiologia e controle do fungo *Ceratobasidium noxium*, causador da queima-do-fio, em grande número de plantas frutíferas nativas ou cultivadas na região Amazônica. Entretanto, não há informação sobre a patogenicidade cruzada de isolados de *C. noxium* do caqui para outras culturas hospedeiras nem tampouco sobre a patogenicidade de isolados de *C. noxium* de outros hospedeiros (como o chá) ao caquizeiro.

O segundo objetivo deste trabalho foi testar a patogenicidade cruzada de isolados de *C. noxium* de caqui e de chá para ambas as culturas e também a outros hospedeiros como café e citros. Objetivou-se também, testar a reação de oito variedades de caqui a *C. noxium*. A hipótese (H₀) é que isolados de *C. noxium* do grupo *Camellia* e do grupo *Diospyrus* não têm patogenicidade cruzada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Populações de isolados

Foram amostradas duas populações de isolados de *Ceratobasidium* sp., agente causal da queima-do-fio. Uma população foi proveniente de caqui “Rama Forte”, “Giro” ou “Fuyu” (coletada na região de Mogi das Cruzes, em Guararema (23° 32` 32”S, 46° 12` 00” W), do Estado de São Paulo, em fevereiro de 2005, a outra população foi isolada de planta de chá “IAC 259”, coletada na Fazenda *Tea Hills*, no Vale do Ribeira, em Registro (24° 29` 15” S, 47° 50` 37” W), SP. Estes materiais foram coletados de folhas de plantas adultas infectadas naturalmente. A amostragem seguiu o padrão de coleta em 10 a 12 pontos (ou focos da doença) distribuídos por seções transversais ao longo das propriedades. De cada foco, coletou-se amostras de cinco a seis plantas infectadas. No total, obteve-se 31 isolados de caqui e 31 isolados de chá. Os isolamentos do patógeno foram efetuados em meio de ágar-água (AA) alcalino (pH 8,5), seguido de transferência de culturas puras para o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (GUTIERREZ et al., 1998). Culturas do fungo obtidas de replicagem do meio de BDA e crescidas por cinco dias em arroz parboilizado cozido (contendo 50 µg de cloranfenicol/mL) foram secas ao ar sob condições de câmara de fluxo laminar e então preservadas a -20°C (CERESINI & SOUZA, 1996). Quatro isolados adicionais de caqui, de chá, de graviola e mangueira foram isolados anteriormente em nosso laboratório de material coletado na Região de Mogi das Cruzes e Amazônica. Todos os isolados apresentaram crescimento típico de *Ceratobasidium* sp. em meio de cultura de BDA e foram caracterizados como binucleados por meio de métodos clássicos de determinação de características citomorfológicas (HERR & ROBERTS, 1980; SNEH et al., 1991; CERESINI & SOUZA, 1996).

2.2 Extração do DNA genômico.

De cada isolado de *Ceratobasidium* sp. de caqui e de chá foi produzido micélio em 25 mL de BD (caldo de batata-dextrose) contendo 50 µg de kanamicina/mL. As culturas foram incubadas a 25°C, com agitação. O micélio foi coletado após cinco dias de incubação, sendo então congelado e depois liofilizado. O DNA total foi extraído do tecido do micélio liofilizado, utilizando-se *DNeasy Plant Mini Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com recomendação do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em um fluorômetro (TBS-380 Mini-Fluorometer), usando reagente PicoGreen® (Topac Inc., Hingham, MA) e em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio.

2.3 Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.

Procedeu-se as reações de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA), utilizando condições semelhantes às descritas por Gonzales *et al.* (2001) e Kuramae-Izioka (1997). Amplificações foram efetuadas usando-se o conjunto de iniciadores (*primers*) ITS4/ITS5 (WHITE *et al.*, 1990). As amplificações (20 µl) foram efetuadas utilizando-se 20 ng de DNA genômico, MgCl₂ a 1,5 mM, 0,5 U de *Taq* polymerase (Gibco Life Technologies), 0,2 mM de cada um dos dNTPs, KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM, e 0,2 µM de cada iniciador. Uma alíquota de 5 µL de água *milliQ* foi utilizada como controle negativo ao invés do DNA alvo. O programa de amplificação em termociclador compreendeu o seguinte ciclo: dois min a 94°C, ciclo inicial de desnaturação; um min a 94°C, um min a 55°C, dois min a 72°C, 35 ciclos; cinco min a 72°C, um ciclo. Os produtos da amplificação da região ITS do rDNA foram visualizados em transiluminador de UV após eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE e coloração com brometo de etídio (SAMBROOK *et*

al., 1987). Cada produto de PCR foi purificado utilizando-se colunas MicroSpin S-400 HR (Amersham Pharmacia), de acordo com instruções do fabricante.

No seqüenciamento do operon ITS1-5.8S-ITS2 rDNA amplificado foi utilizado kit pré-misturado para ciclo de seqüenciamento baseado em química de corante terminador (“Big-Dye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction”) (Applied Biosystems). Cerca de 75 ng de DNA amplificado foram utilizados por reação e 1 µM de cada um dos iniciadores ITS4 ou ITS5 em reações independentes, para assegurar confiabilidade dos dados de seqüenciamento dos fragmentos de DNA. Os produtos de seqüenciamento foram separados em gel de poliacrilamida a 6% utilizando-se sequenciador automático capilar PE Applied Biosystems ABI-3100. As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa Sequencher™ 4.1 (Gene Codes Cooperation, Ann Arbor, Michigan, EUA), para avaliação da qualidade e montagem de *contigs* dos fragmentos.

2.4 Clonagem dos produtos de PCR.

Dada à condição predominante de heterocário no ciclo de vida de *Ceratobasidium* sp., é comum observar-se heterogeneidade nas seqüências de DNA em produtos de PCR não clonados. Para separar diferentes alelos no operon ITS1-5.8S-ITS2 dentro de uma reação heterogênea de PCR, os amplicons (produtos da amplificação) foram clonados dentro de um vetor PCR2.1-TOPO® (Invitrogen, San Diego). Plasmídeos selecionados de *Escherichia coli* One Shot® DH5a™-T1R recombinantes (Invitrogen, San Diego) foram extraídos de cada amostra, e purificados por QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®). Foram usados iniciadores *forward* (para diante) e reverso, para um dos múltiplos sítios de clonagem do vetor, visando reamplificar e seqüenciar os clones obtidos.

2.5 Análise de dados.

Inicialmente, as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências da região ITS do rDNA de *Ceratobasidium* spp. depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®. As comparações de similaridade entre estas seqüências foram obtidas por BLASTN (nucleotídeo-nucleotídeo) versão 2.2.12 de 28/08/2005, disponível no site [http:// www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997).

2.5.1 Análise filogenética.

Procedeu-se à análise filogenética dos haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA dos isolados de *Ceratobasidium* spp. por máxima parcimônia. Foram incluídas, na análise, seqüências de região ITS-5.8S do rDNA das seguintes espécies de *Ceratobasidium*: *C. albasitensis*, *C. anceps*, *C. angustisporum*, *C. bicornis*, *C. cereale* (*R. cerealis*), *C. cornigerum*, *C. papillatum*, *C. ramicola*, todas depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank® e com algum nível de similaridade com as seqüências brasileiras de *Ceratobasidium* do caqui e do chá. As seqüências foram alinhadas pelo programa computacional “ClustalX” (THOMPSON et al., 1994 e 1997).

Para determinar as relações filogenéticas, aplicou-se análise de máxima verossimilhança (*maximum likelihood* = ML) e de máxima parcimônia (MP) utilizando-se o programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). As relações filogenéticas foram também determinadas por meio de análise Bayesiana usando o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metropolis (MCMCMC), usando o programa MrBayes v 2.01 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001).

Para a análise de ML e MCMCMC, MODELTEST 3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998) foi utilizado para se determinar o modelo de substituição de bases de DNA o qual mais se ajustou aos dados. Um teste hierárquico da razão da verossimilhança implementado no MODELTEST selecionou o modelo GTR + G (proporção de sítios invariáveis = 0; frequência de bases A = 0.3127, C = 0.2099; G = 0.2167 e T = 0.2607; parâmetro da distribuição gama = 0.2303). Sob este modelo evolutivo, o valor de ML da árvore mais provável foi de $-\ln L$ 2258.82.

A análise de parcimônia foi executada tratando todos os 496 caracteres (bases) com o mesmo peso e considerando inserções como dados perdidos. Deste total, 109 continham informação para parcimônia. Cem buscas heurísticas foram efetuadas com o número máximo de árvores (*maxtrees*) fixados como auto incremento, adição casual de seqüências dos taxa, com opção de troca de ramificações fixada como TBR, e armazenando-se 839 árvores com número de passos ≥ 295 /replicação.

Análise de *bootstrap* foi executada para testar a significância estatística para cada ramo das árvores geradas (pela análise de ML e de MP) com 1000 pseudo-replicações com todos os caracteres re-amostrados em cada replicação, com adição casual de seqüências dos taxa por replicação e com opção de troca de ramificações fixada como TBR.

A análise filogenética através de MCMCMC foi executada usando como hipótese *a priori* o modelo de substituição de bases de DNA acima descrito para análise de ML. Procurou-se por 1.000.000 de gerações, usando-se quatro cadeias de buscas, eliminando-se as primeiras 250 árvores, e armazenando-se uma árvore a cada 500. Valores de probabilidade posterior (PP) para as ramificações da árvore consenso foram gerados considerando-se a regra de no mínimo 50% do total de 3502 árvores apresentarem a respectiva ramificação.

2.5.2 Evolução intraespecífica de *Ceratobasidium* sp. do caqui e do chá, inferida por análises de reticulogramas de genes individuais.

Para inferir sobre a evolução intraespecífica de *Ceratobasidium* sp. do caqui e do chá, foram construídas redes de haplótipos, usando o algoritmo proposto por POSADA & CRANDALL (2001) e o “shareware” TCS, desenvolvido por Clement et al. (2000). Este método estima o máximo número de diferenças entre os haplótipos como resultado de uma única substituição em um único sítio, com nível de significância estatística de 95%, e é denominado limite de parcimônia (ou limite de conexão de parcimônia). Desse modo, haplótipos diferindo por uma única mudança/alteração são conectados, e finalmente, aqueles que diferem por duas, três ou mais alterações, até que todos os haplótipos estejam incluídos em uma única rede, ou quando o limite de conexão de parcimônia for atingido. O método da parcimônia estatística enfatiza o que é compartilhado entre haplótipos que diferem minimamente, ao invés de diferenças entre haplótipos, e permite uma avaliação empírica dos desvios da parcimônia. Este método também permite a identificação de prováveis ancestrais (pela maior frequência de ocorrência na rede de haplótipos) e de prováveis recombinantes, através de observações da distribuição espacial de homoplasias nas conexões definidas pela rede (CRANDALL & TEMPLETON, 1999).

2.5.3 Teste de subdivisão populacional e análise de coalescência.

Para as duas populações de *Ceratobasidium* amostradas (chá e caqui), foi estimado o valor de Θ (taxa de mutação populacional), baseando-se no número de sítios segregantes s para a região ITS-5.8S do rDNA (WATTERSON, 1975). Isto possibilitou

a estimativa, *a priori*, de parâmetros populacionais e a inferência sobre o padrão de expansão populacional, i.e., equilíbrio versus não-equilíbrio. Para testar-se diferenciação populacional utilizou-se SNAP Map (algoritmo implementado no programa SNAP Workbench (PRICE & CARBONE, 2005), para gerar os arquivos apropriados de seqüências (Seqtomatrix) e converter o arquivo de seqüências numa matriz de distâncias (HUDSON *et al.*, 1992a); e Permttest, para testar a subdivisão geográfica em amostras de DNA para duas ou mais localidades (HUDSON *et al.*, 1992b). É importante testar-se a hipótese de nenhuma diferenciação genética entre populações para determinar ou não assumir um modelo de população panmítica ou subdividida, para então se examinar a divergência de populações usando Genetree (também implementado pelo programa SNAP Workbench). O programa MIGRATE (BEERLI & FELSENSTEIN, 2001), implementado no SNAP Workbench, foi utilizado para estimar taxas de migração assumindo-se equilíbrio na história ancestral das populações. A genealogia com a maior probabilidade de enraizamento e o tempo desde o mais recente ancestral comum (TCMR) da amostra foram estimados por simulações coalescentes. As posições relativas das mutações dando origem a alterações/substituições na região gênica estudada foram determinadas. Estas posições ao longo da genealogia estão relacionadas com o tempo para coalescência em direção à seqüência ancestral.

2.6 Patogenicidade cruzada

O teste de patogenicidade cruzada para os isolados de *C. noxium* de caqui e de chá, foi comparado em plantas de caqui cultivares “Fuyu”, “Giombo”, “Giro”, “Pomelo”, “Rama Forte”, “Regina” e “Rubi”, café “Mundo Novo” (IAC 502-1), chá “IAC 259” e citros (laranja “Pera IAC-2000”). Dois experimentos foram conduzidos,

um sob condição de casa de vegetação e outro sob condição de estufa incubadora (BOD). Neste segundo experimento, utilizou-se ramos destacados de todas as plantas mantidas em casa de vegetação, após poda para estimular brotação nova. A inoculação do fungo nas plantas hospedeiras seguiu adaptação do método de inoculação pela deposição de palitos de madeira colonizados por micélio do fungo em ramos das plantas. No experimento conduzido em casa de vegetação foram utilizados três tratamentos: a) inoculação com isolados de *C. noxium* de caqui [mistura dos isolados DK_CAF (de folhas infectadas) e DK_CAC (de caule infectado) obtidos em Guararema, SP]; b) inoculação com isolado de chá escolhido aleatoriamente da população de *C. noxium* amostrada de chá obtida no Vale do Ribeira, SP; c) testemunha não inoculada. Os isolados de caqui representam o haplótipo HDk1 da região ITS-5.8S do rDNA mais freqüentemente amostrado na população de *C. noxium* do caquizeiro em São Paulo (COSTA-SOUZA et al., 2006).

A inoculação foi efetuada transferindo-se palitos de madeira colonizados pelo fungo [(mantidos por sete dias sobre culturas crescidas em meio de BDA (batata, dextrose, ágar), a 25°C)] para a superfície dos ramos, previamente feridos no ponto de inoculação. Os palitos colonizados foram fixados ao ramo dos hospedeiros com auxílio de filme plástico. Após a inoculação, os ramos foram mantidos sobre condição de câmara úmida em sacos plásticos umedecidos, até o momento da avaliação. Para os tratamentos testemunhas não inoculadas foram transferidos palitos não infestados pelo fungo (mantidos sob a superfície de meio de BDA pelo mesmo tempo de incubação do fungo). O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados num esquema fatorial do tipo 3 x 4, com fatores representados por isolados de *C. noxium* do caqui ou do chá mais o tratamento não inoculado x espécies de plantas (caqui, café, chá e citros). As parcelas experimentais representadas pelo tratamento caqui foram subdivididas em

sete variedades. Para o experimento em casa de vegetação foram utilizados 5 vasos ou repetições por tratamento (inclusive para as testemunhas não inoculadas de cada variedade de caqui e de cada espécie de planta testada). Em cada vaso de 10 a 20 L de volume (dependendo da espécie de planta testada) de solo foi mantida uma planta. A inoculação do fungo foi efetuada em brotações jovens das plantas (de 17 a 20 dias de idade). A condição de alta umidade relativa do ar foi mantida de forma contínua durante todo o período de permanência na casa de vegetação, através de nebulização automática, e da manutenção (por sete dias) de um saco plástico envolvendo o ramo inoculado. O experimento foi conduzido no mês de Fevereiro de 2005.

O segundo experimento foi conduzido em estufa incubadora (BOD), com delineamento semelhante ao primeiro. A metodologia de inoculação foi a mesma utilizada no experimento realizado em casa de vegetação, ou seja, utilizou-se palitos de madeira colonizados pelo fungo, mas com uma diferença: para a inoculação dos ramos das plantas, ao invés de usarmos um ou dois isolados de cada um dos hospedeiros, optou-se por utilizar-se um grupo de isolados de *C. noxium* do caqui ou do chá. Cada grupo de isolados foi transferido de maneira independente para placas contendo meio de BDA com palitos de madeira para colonização (“tipo palito de dente”), representando placas de isolados de caqui e de chá. O inóculo de *C. noxium* do caqui compôs-se do seguinte grupo de isolados: Dk_2c, Dk_5e, Dk_6a, Dk_6d, Dk_9e, Dk_10a, Dk_10c, Dk_11b, Dk_12a, Dk_12d, CAC e CAF; enquanto o inóculo de *C. noxium* do chá compôs-se do seguinte grupo de isolados de chá: Cs_13, Cs_16, Cs_24, Cs_62, Cs_63, Cs_72, Cs_76, Cs_81, Cs_91, Cs_94, Cs_101, Cs_102, Cs_103, e Cs_108. Estes isolados representaram a maioria dos haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA amostrados das populações de *C. noxium* de caqui e de chá (COSTA-SOUZA et al., 2006).

Duas estufas incubadoras foram utilizadas neste experimento. Cada repartição da estufa representou um bloco contendo todas as parcelas experimentais com cinco repetições de cada planta testada. Para inoculação, foram utilizados ramos de brotações novas coletados das mudas em estágio ativo de desenvolvimento, em outubro de 2005, após cerca de 20 dias do início das brotações. Cada parcela experimental, nesse caso, foi representada por um ramo destacado. As extremidades dos ramos destacados foram envolvidas em algodão esterilizado umedecido e estes ramos foram acondicionados em sacos plásticos. As condições de inoculação foram semelhantes às descritas para o experimento anterior. Os ramos inoculados com palitos colonizados ou não pelo fungo, foram incubados por sete dias em estufa incubadora biológica a 25°C, com fotoperíodo de 12 h.

Nos dois experimentos, os ramos inoculados ou não de todas as parcelas experimentais foram fotografadas com o intuito de registrar a colonização ou não dos tecidos dos hospedeiros pelos respectivos inóculos do patógeno, visando posterior avaliação da patogenicidade cruzada. O parâmetro avaliado foi a colonização ou não de tecidos dos hospedeiros pelos inóculos do patógeno.

2.7 Reação de variedades de caquizeiro a *Ceratobasidium noxium*.

Foram testadas as reações de oito variedades de caquizeiro disponíveis na Fazenda Experimental da UNESP Campus de Ilha Solteira: “Taubaté”, “Fuyuhana”, “Giombo”, “Pomelo”, “Fuyu”, “Rubi”, “Rama forte” e “Giro”. A inoculação do fungo nas variedades de caqui seguiu a metodologia citada anteriormente, usando-se palitos de madeira colonizados pelo fungo, utilizando inóculo composto por mistura dos isolados de *C. noxium* Dk-CAF e Dk_CAC.

Utilizou-se ramos destacados das oito variedades de caquizeiro. Cada parcela experimental, nesse caso, foi representada por um ramo destacado (contendo brotações jovens, de 17-20 dias de idade) com cinco repetições para cada variedade testada. Os ramos foram obtidos de plantas em estágio ativo de desenvolvimento, entre outubro e dezembro de 2004. As extremidades dos ramos destacados foram envolvidas em algodão esterilizado umedecido e estes ramos foram acondicionados em sacos plásticos. Os ramos inoculados com palitos colonizados ou não pelo fungo foram incubados por sete dias em duas estufas incubadoras biológicas a 25°C, com fotoperíodo de 12 h, onde cada repartição de duas estufas representou um bloco. Para avaliação parâmetro avaliado, fotografou-se digitalmente os ramos inoculados de todas as parcelas experimentais. Determinou-se a porcentagem da área foliar e o número de folhas infectadas de uma sub-amostra de ramos de caqui infectados pelo patógeno. A partir disso construiu-se uma escala de notas para avaliação da severidade da doença, baseado-se em recomendação de AZEVEDO (1998) para construção de escalas de severidade (Figura 4).

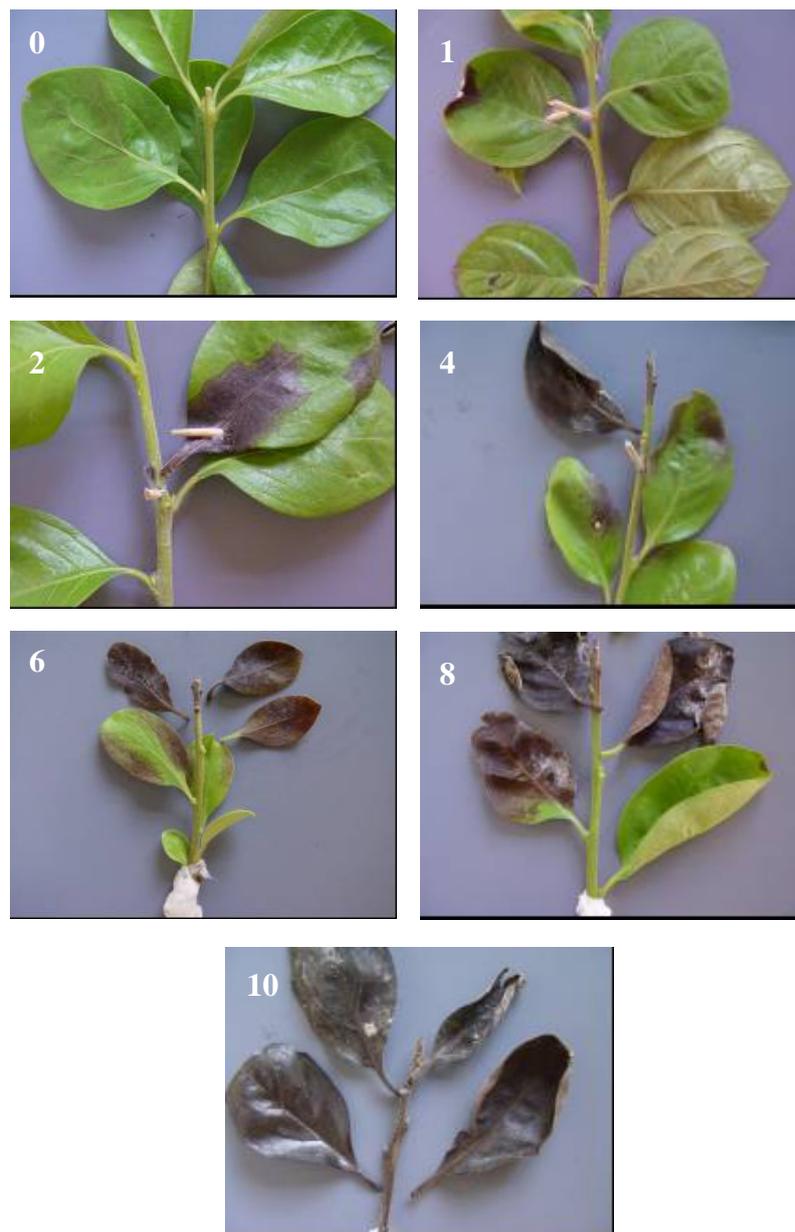


Figura 4. Escala de notas para avaliação da severidade da queima-do-fio (*Ceratobasidium noxium* grupo *Diospyrus*) do caquizeiro: 0 (0% de área foliar infectada), 1 (1 a 10% de área foliar infectada restrita as folhas do ponteiro), 2 (11 a 20%), 4 (21 a 40% de área foliar das folhear do ponteiro até a segunda folha abaixo), 6 (41 a 60% da área foliar do ponteiro até a terceira folha abaixo), 8 (61 a 80%) e 10 (81 a 100% de área foliar infectada e de todas as folhas do ramo). Escala de notas estabelecida de acordo com Azevedo (1998).

Os dados % da área do ramo infectado foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Este experimento foi repetido duas vezes.

Foi efetuado o reisolamento do patógeno em uma repetição de cada tratamento dos itens 2.6 e 2.7 para confirmação de sua atuação como agente causal da doença.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Posicionamento filogenético global da população dos isolados de *Ceratobasidium* spp. de caqui e de chá.

Todos os 66 isolados analisados provenientes de caqui, chá, manga e graviola apresentaram seqüências da região ITS-5.8S do rDNA similares a seqüências de *Ceratobasidium* spp. (por meio de comparações por BLASTN com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank®), o que corrobora com ROBERTS (1999), que relata associação de *Ceratobasidium* sp. ao mal do fio em diversas plantas arbóreas.

Identificou-se 38 haplótipos mundiais distintos entre as seqüências da região ITS-5.8S de *Ceratobasidium* spp. (incluindo-se as do fungo do mal-do-fio obtidas de caqui, chá, graviola e manga com as das diversas espécies de *Ceratobasidium* depositadas no GenBank®/NCBI): *Ceratobasidium albasitensis* (H15), *C. raminicola* (H17), *C. cereale* (H5 a H12), *C. cornigerum* (H03, H20 a H25), *C. bicorne* (H13), *C. angustisporum* (H16), *C. anceps* (H05) e *C. papilatum* (H14). Os isolados de *Ceratobasidium* sp. do caqui, do chá, da graviola e de manga foram agrupados em 17 haplótipos mundiais distintos: H01 e H02, H18 e H19, H26 a H38 (Tabela 1 – item filogenia).

Tabela 1. Haplótipos mundiais e brasileiros de *Ceratobasidium* spp. determinados com base em polimorfismos detectados em seqüências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.

Haplótipos mundiais (filogenia)*	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)*	Haplótipos brasileiros (filogenia reticulada)*	Código da seqüência	Espécies	Isolados	Hospedeiro e local de origem dos haplótipos			
Frequência	Frequência	Frequência							
H01	41	F	40	Hdk01	40	N.D.	<i>Ceratobasidium noxium</i>	DK11b1a, DK11c1a, DK11e1a, DK12a1, DK12b1a, DK12d1a, DK12e1a, DK1a1a, DK1c1a, DK1e1a, DK2a1a, DK2c1a, DK2d1a, DK2e1a, DK3a1a, DK3b1a, DK3c1a, DK3d1a, DK4d, DK4da, DK5b, DK5ba, DK5c, DK5ca, DK5e1a, DK6a, DK6aa, DK6d, DK6da, DK7a, DK7aa, DK7d, DK7da, DK7e, DK7ea, DK8e, DK8ea, DK9e1, DKCAF, DKCAFa,	<i>Diospyrus kaki</i> (Ericales, Ebenaceae), Mogi das Cruzes, SP, Brasil
		G	1	Hdk28	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	DK9e2	<i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil
H02	1	B	1	HCs02	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs631	<i>Camellia sinensis</i> (Ericales, Theaceae), Registro, SP, Brasil
H03	1	-	-			AJ301903.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 132.82	<i>Festuca</i> sp. (Poales, Poaceae), Pennsylvania, EEUU
H04	5	-	-			AX195385.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 17 da patente WO0151653	Suíça
						AX195386.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 18 da patente WO0151653	Suíça
						AX195388.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 20 da patente WO0151653	Suíça
						AX195393.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 25 da patente WO0151653	Suíça
						AF063019.1	<i>Rhizoctonia cerealis</i> (<i>C. cereale</i>)	-	<i>Poa annua</i> (Poales, Poaceae), Wisconsin, EEUU
H05	1	-	-			AJ427402.1	<i>C. anceps</i>	CBS 152.32	<i>Pteridium aquilinum</i> (Tracheophyta, Filicales, Dennstaedtiaceae), Reino Unido
H06	1	-	-			AX195391.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 23 da patente WO0151653	Suíça

Haplótipos mundiais (filogenia)*	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)*	Haplótipos brasileiros (filogenia reticulada)*	Código da seqüência	Espécies	Isolados	Hospedeiro e local de origem dos haplótipos
Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência			
H07	1	-	-	AX195392.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 24 da patente WO0151653 Suíça
H08	1	-	-	AF222793.1	<i>R. cerealis</i> (<i>C. cereale</i>)	99125 <i>Agrostis palustris</i> (Poales; Poaceae), Ontario, Canadá
H09	1	-	-	AJ302008.1	<i>C. cereale</i>	CBS 558.77 <i>Secale cereale</i> (Poales, Poaceae), Alemanha
H10	1	-	-	AX195390.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 22 da patente WO0151653 Suíça
H11	1	-	-	AX195387.1	<i>C. cereale</i>	Seqüência 19 da patente WO0151653 Suíça
H12	1	-	-	AJ302009.1	<i>C. cereale</i>	CBS 559.77 <i>Triticum aestivum</i> (Poales, Poaceae), Alemanha
H13	1	-	-	AF200514.1	<i>C. bicorne</i>	1231 <i>Polytrichastrum formosum</i> (Bryophyta, Polytrichales) Finlândia (Hietala et al., 2001)
H14	1	-	-	AJ427401.1	<i>C. papillatum</i>	CBS 570.83 <i>Sarcochilus dilatatus</i> (Tracheophyta, Asparagales, Orchidaceae), Queensland, Austrália
H15	2	-	-	AJ427399.1	<i>C. albasitensis</i>	Eab-T2 <i>Crocus sativus</i> , (Embryophyta, Asparagales, Iridaceae), Espanha
				AJ427398.1		Eab-T2 <i>Crocus sativus</i> , Espanha
H16	1	-	-	AJ427403.1	<i>C. angustisporum</i>	CBS 568.83 <i>Pterostylis mutica</i> (Tracheophyta, Asparagales, Orchidaceae), Sul da Austrália
H17	1	-	-	AJ427404.1	<i>C. ramicola</i>	CBS 758.79 <i>Pittosporum</i> sp. (Tracheophyta, Apiales, Pittosporaceae), Florida, EEUU
H18	1	D	1	HDk18	<i>C. noxium</i>	DK5e2a <i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil
H19	1	eliminado	-	HCS05	<i>C. noxium</i>	Mango2a <i>Mangifera indica</i> (Sapindales, Anacardiaceae), Manaus, AM, Brasil
H20	1	-	-	AJ301899.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 133.82 <i>Pittosporum</i> sp., Florida, EEUU
H21	1	-	-	AJ301902.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 137.82 <i>Erigeron canadensis</i> (Asterales, Asteraceae), EEUU
H22	1	-	-	AJ302010.1	<i>C. cornigerum</i>	Eab-aB Alfala, <i>Medicago sativa</i> (Fabales, Fabaceae), Espanha

Haplótipos mundiais (filogenia)*	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)*	Haplótipos brasileiros (filogenia reticulada)*	Código da seqüência	Espécies	Isolados	Hospedeiro e local de origem dos haplótipos			
Freqüência	Freqüência	Freqüência	Freqüência						
H23	1	-	-	AJ301901.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 136.82	<i>Taxus</i> sp. (Coniferales, Taxaceae), Rhode Island, EEUU		
H24	1	-	-	AJ301900.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 135.82	<i>Juniperus</i> sp. (Coniferales, Cupressaceae), Carolina do Norte, EEUU		
H25	1	-	-	AJ302006.1	<i>C. cornigerum</i>	CBS 139.82	<i>Pittosporum</i> sp., Florida, EEUU		
H26	24	K	13	HCs04	3	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs1011, Cs1021, Cs331	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
		K	1	HCs15	1	N.D.		Cs911	
		K	1	HCs16	1	N.D.		Cs921	
		K	5	HCs19	5	N.D.		CHA1, Cs131, Cs221, Cs321, Cs341	
		K	3	HCs21	3	N.D.		Cs621, Cs641, Cs651	
		N	1	HCs17	1	N.D.		Cs1031	
H27	3	M	3	HCs06	3	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs721, Cs731, Cs741	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H28	2	K	2	HCs08	2	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs1081, Cs512	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H29	1	J	1	HCs07	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	CHA11Fa	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H30	24	A	24	HCs09	24	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs1012, Cs1022, Cs1032, Cs1082, Cs132, Cs21, Cs21a, Cs222, Cs242, Cs322, Cs332, Cs342, Cs362, Cs511, Cs622, Cs632, Cs642, Cs652, Cs812, Cs831, Cs842, Cs851, Cs862, Cs932	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H31	17	C	2	HCs03	2	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs94, Cs94a	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
		K	3	HCs10	3	N.D.		Cs722, Cs732, Cs742	
		K	3	HCs12	3	N.D.		Cs811, Cs852, Cs861	
		K	3	HCs13	3	N.D.		Cs162, Cs912, Cs922	
		K	6	HCs20	6	N.D.		Cs241, Cs361, Cs762, Cs832, Cs841, Cs931	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil

Haplótipos mundiais (filogenia)*	Freqüência	Haplótipos brasileiros (análise coalescente)*	Freqüência	Haplótipos brasileiros (filogenia reticulada)*	Freqüência	Código da seqüência	Espécies	Isolados	Hospedeiro e local de origem dos haplótipos
H32	2	eliminated	-	HCs11	2	N.D.	<i>C. noxium</i>	Graviola, Mango1a	<i>Annona muricata</i> (Magnoliales, Annonaceae), <i>M. indica</i> , Manaus, AM, Brasil
H33	1	L	1	HCs14	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs161	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H34	1	K	1	HCs22	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	Cs761	<i>C. sinensis</i> , Registro, SP, Brasil
H35	2	H	2	Hdk23	2	N.D.	<i>C. noxium</i>	DK10a2a, DK10c2a	<i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil
H36	14	I	1	Hdk24	1	N.D.	<i>C. noxium</i>	DK2c2a	<i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil
		I	13	Hdk26	13	N.D.		DK11b2a, DK11c2a, DK11e2a, DK1a2a, DK1c2a, DK1e2a, DK2a2a, DK2d2a, DK2e2a, DK3a2a, DK3b2a, DK3c2a, DK3d2a	
H37	4	E	4	Hdk25	4	N.D.	<i>C. noxium</i>	DK12a2, DK12b2a, DK12d2a, DK12e2a	<i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil
H38	2	F	2	Hdk27	2	N.D.	<i>C. noxium</i>	DK10a1a, DK10c1a	<i>D. kaki</i> , Mogi das Cruzes, SP, Brasil

As seqüências da região ITS-5.8S da maioria dos haplótipos mundiais de espécies de *Ceratobasidium* utilizadas para análise filogenética são oriundas do GenBank® (NCBI).

* Exemplo de código utilizado para designar isolados brasileiros de *C. noxium*: Isolado Dk10a, originário de caqui, do qual duas cópias distintas da região ITS-5.8S foram identificadas: Dk10a1a [(referente ao haplótipo mundial H38 e haplótipo brasileiros F (na análise de coalescência) e HDk27] (na análise de filogenia reticulada)] e Dk10a2a [(haplótipo mundial H35 ou haplótipos brasileiros H (na análise de coalescência) e HDk23 (na análise de filogenia reticulada)]. N.D. Até o momento, não depositada no GenBank® (NCBI).

A comparação, em separado, entre seqüências da região ITS-5.8S do rDNA da amostra brasileira de isolados de *Ceratobasidium* sp. de caqui, chá, de graviola e de manga indicou a ocorrência de um total de 28 haplótipos (Tabela 1 – item filogenia reticulada). Este incremento do número de haplótipos da amostra brasileira de 17 para 28 se deve ao fato de que muitos sítios polimórficos (presentes apenas na amostra brasileira) foram excluídos na comparação global. Esta exclusão ocorreu em função da coincidência desses sítios com regiões caracterizadas por eventos de perdas de nucleotídeos ao longo de seqüências tão divergentes de *Ceratobasidium* spp. no mundo. O haplótipo mundial H14 foi excluído das demais análises filogenéticas em função de apresentar seqüência incompleta da região ITS do rDNA.

Nesta análise, em separado das seqüências da região ITS-5.8S da amostra brasileira de isolados de *Ceratobasidium* sp., observou-se também a ocorrência de 20 haplótipos distintos de *Ceratobasidium* spp. do chá (incluindo, entretanto, um da amostra de graviola e outro da amostra de manga) e de oito haplótipos de *Ceratobasidium* do caqui (Tabela 1)

3.2 Composição e diversidade de haplótipos de *Ceratobasidium* spp.

Do total de 31 isolados de *Ceratobasidium* sp. do chá obtidos, 29 (93,5 %) apresentaram-se sob a condição genética de heterocário, nos quais se detectou a presença de dois alelos distintos da região ITS-5.8S. O isolado de manga também apresentou-se como heterocário, enquanto o isolado de graviola apresentou um único alelo desta região. Esta condição, característica do ciclo de vida de *Ceratobasidium* sp., assemelha-se ao heterozigoto, porém os alelos distintos estão em cromossomos presentes em núcleos independentes na célula (SNEH et al., 1991). Em contraste, setenta e um por cento dos isolados de *Ceratobasidium* do caqui (22 isolados de um

total de 31) apresentaram-se sob a condição de heterocário. O isolado de caqui CAF, obtido anteriormente, apresentou-se como homocário para a região ITS-5.8S. Nenhum dos alelos ou haplótipos da região ITS-5.8S foi compartilhado entre isolados da população de chá e de caqui.

Nenhuma seqüência de qualquer gene de *C. noxium* foi depositada, até hoje, no GenBank® (NCBI). Também não dispomos, até o momento, da cultura tipo de *C. noxium* depositada no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), na Holanda, sob número 154.35. A introdução dessa cultura tipo no Brasil será necessária para melhor esclarecer esta questão filogenética. Entretanto, respeitando-se a nomenclatura e o posicionamento taxonômico atuais dos agentes causais do mal-do-fio em plantas arbóreas, atribuído pelo Index Fungorum (2004) (bem como a classificação efetuada por Roberts (1999) para a espécie tipo do mal-do-fio em cafeeiro), usaremos a denominação *C. noxium* para os agentes do mal-do-fio em chá, graviola, manga e em caqui.

3.3 Análises filogenéticas por ML, MP e Bayesiana nas populações de isolados de *Ceratobasidium* spp. do caqui e do chá em relação as espécies descritas no mundo do gênero *Ceratobasidium*.

A árvore de ML obtida indicou que os haplótipos da região ITS-5.8S de *C. noxium* da população de caqui e de chá constituem um ramo independente em relação às demais espécies analisadas, incluindo *C. cornigerum*, *C. cereale*, *C. anceps*, *C. angustiporum* e *C. bicornis*. (Figura 1).

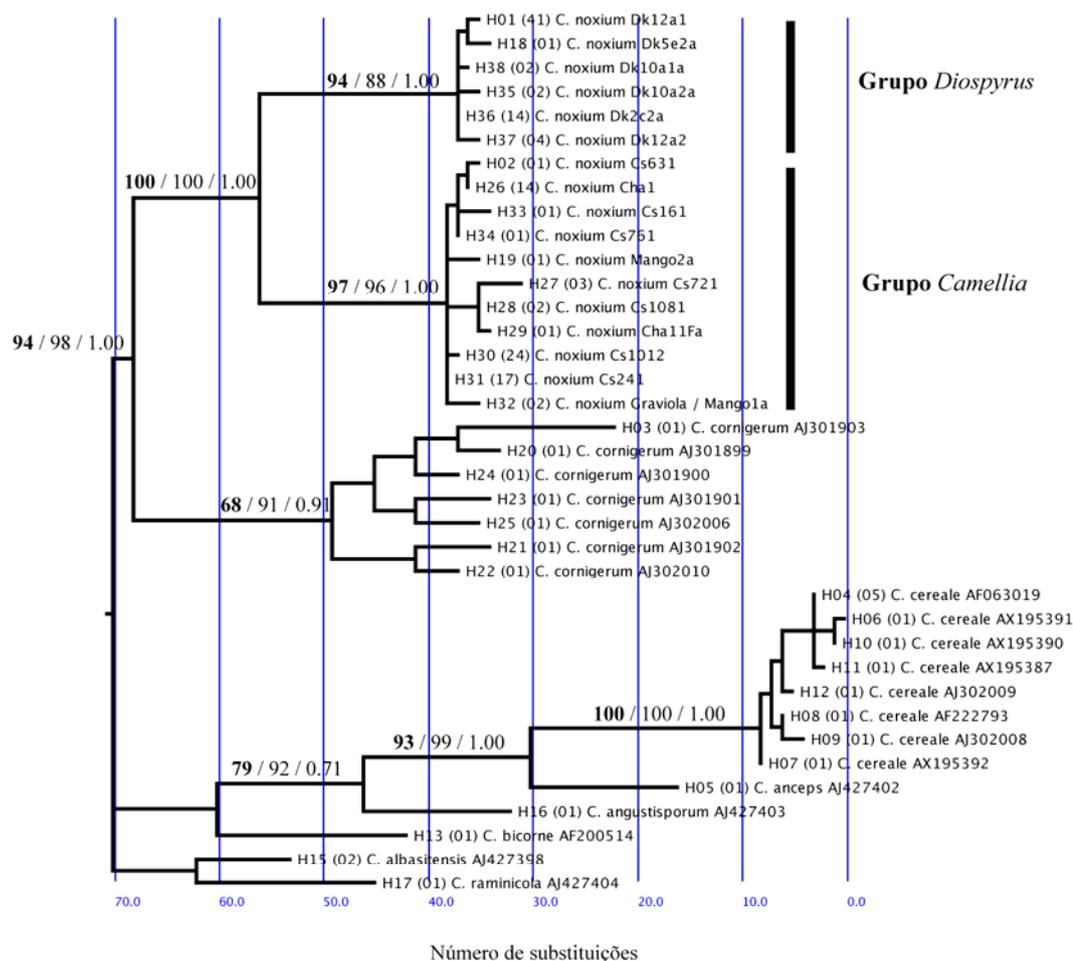


Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada no modelo GTR + G de evolução de bases de DNA. Valores relativos à significância estatística através de análise de “bootstrap” para os ramos das árvores geradas por análise de ML (negrito) e máxima parcimônia (fonte regular). Os valores são expressos em percentual relativo à 1000 pseudo-replicações. Por exemplo, 94% das 1000 árvores de ML e 88% das árvores de MP geradas por pseudo-replicações dos dados apresentaram ramo que agrupa todos os haplótipos do grupo *Diospyrus*. Valores de probabilidades posteriores (variando de 0 a 1.0) geradas por análise Bayesiana de MCMCMC são apresentadas para os ramos principais. Valores próximos a 1.0 indicam elevada significância estatística para o respectivo ramo, avaliada em 3502 árvores artificialmente geradas. A árvore foi enraizada usando seqüências da região ITS-5.8S do rDNA de *C. albasitensis* and *C. ramnicola*. Os taxa são identificados pelo código do haplótipo mundial, seguido pelo tamanho da amostra, pela espécie de *Ceratobasidium* e exemplos de isolados pertencentes ao respectivo haplótipo e/ou o código da seqüência obtida do GenBank®/NCBI. A designação de haplótipos de *Ceratobasidium* spp. e de *C. noxium* é apresentada na Tabela 1.

As espécies *C. albasitensis* e *C. raminicola* foram definidas como *out-groups* (ou grupos externos) para enraizamento da árvore. Além do posicionamento filogenético global, objetivou-se, também, testar a hipótese de que a população de isolados de *C. noxium*, oriundos de caqui constituem espécie semelhante à detectada causando a queima-do-fio em chá em São Paulo, no Vale do Ribeira.

Neste contexto, a árvore de ML (Figura 2) revelou dois clados principais que agruparam, primariamente, haplótipos da região ITS-5.8S de *C. noxium* de acordo com o hospedeiro de origem: o clado ou grupo *Diospyrus*, que é composto exclusivamente de haplótipos associados com isolados coletados de caqui em SP, e outro clado (grupo *Camellia*) contendo haplótipos de *C. noxium* de isolados coletados principalmente de chá em SP, ou de manga ou graviola na Amazônia.

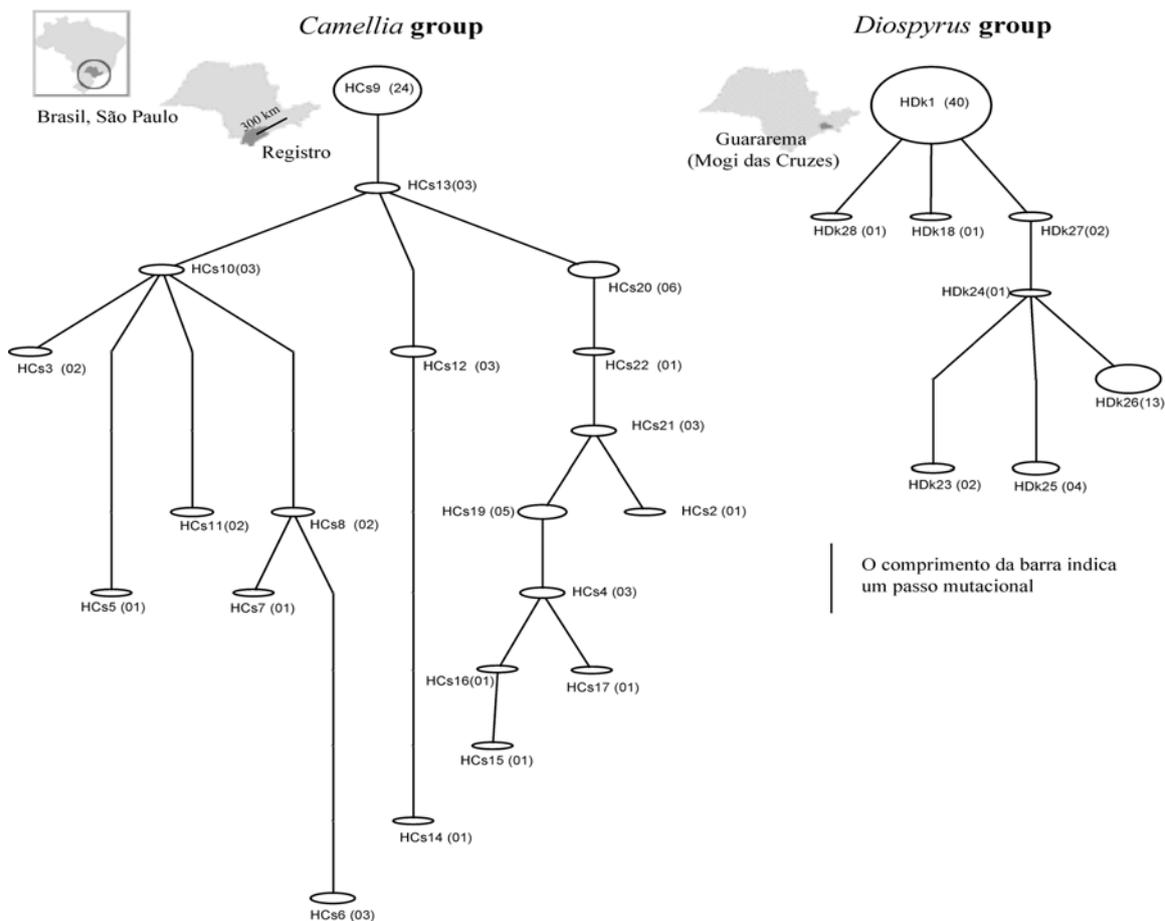


Figura 2. Rede de haplótipos brasileiros da região ITS-5.8S do rDNA de *Ceratobasidium* sp. (*C. noxium*) de caqui (Grupo *Diospyrus* = HDk) e de chá, graviola e mangueira (Grupo *Camellia* = HCs) em Guararema (região de Mogi das Cruzes) e em Registro, São Paulo, Brasil. A rede de haplótipos foi construída usando algoritmo de parcimônia estatística implementado pelo programa TCA (Templeton et al., 1992). Figuras geométrica circulares agrupam haplótipos e a área de cada figura representa a frequência relativa de cada haplótipo na população. Ao lado de cada figura observa-se referência aos haplótipos de caqui e chá (e entre parênteses sua frequência), por exemplo, HDk1 (40): indica o haplótipo brasileiro HDk1 que foi amostrado quarenta vezes na população. Os haplótipos são separados uns dos outros por passos mutacionais. O comprimento da barra separando haplótipos é variável indicando que vários haplótipos mutantes hipotéticos não foram amostrados (por exemplo, os haplótipos HCs12 e HCs14 são separados por seis passos mutacionais). A rede de haplótipos da amostra da população de caqui (Grupo *Diospyrus*) não apresentou conexão com a rede haplótipos da amostra da população de chá (Grupo *Camellia*), tendo excedido ao limite máximo de 5% de parcimônia

Através de parcimônia estatística, construiu-se uma rede de haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA de *C. noxium* do chá e do caqui. A rede de haplótipos da amostra da população de caqui não apresentou conexão com a rede de haplótipos da amostra da população de chá, tendo excedido o limite máximo de 5% de parcimônia (Figura 2). Esse é um indicativo da divergência filogenética entre os dois grupos, podendo, inclusive, constituir-se em sub-espécies distintas dentro de *C. noxium*, os quais denominamos: Grupo *Camellia* e Grupo *Diospyrus*.

A população de *C. noxium* Grupo *Camellia* de Registro, SP, apresentou-se mais diversa, considerando-se o número de haplótipos da região ITS-5.8S do rDNA constituindo a rede de parcimônia estatística (20 haplótipos). Já a população de *C. noxium* Grupo *Diospyrus* de Guararema, Mogi das Cruzes, SP, foi constituída por oito haplótipos. O haplótipo brasileiro ancestral da região ITS-5.8S de *C. noxium* Grupo *Camellia* foi o HCs9 (o qual aparece como o mais freqüente na rede (freqüência = 24) a partir do qual são derivadas todas as ramificações da rede). Já para a rede de haplótipos do Grupo *Diospyrus*, o haplótipo brasileiro ancestral foi o HDk1 (freqüência = 40).

A genealogia coalescente (Figura 3) foi informativa para inferir a história mutacional da região ITS-5.8S em relação à variação genética entre populações. Com base nas estimativas médias da idade das mutações determinadas pela análise através de simulações coalescentes (medidas em unidades coalescentes de N gerações), as mutações mais antigas estão no grupo *Diospyrus* de *C. noxium*. A de número 11 na genealogia é a mais antiga, com idade média de 0.942 (SD = 0.119). Os haplótipos do grupo *Diospyrus* parecem ser mais jovens, acumulando um total de 11 a 13 mutações. Este grupo apresentou ainda seis das mutações mais antigas observadas na região ITS-5.8S, em comparação com o grupo *Camellia*. Já os haplótipos do grupo *Camellia*, a mutação mais velha no grupo *Camellia* de *C. noxium* é a de número 9 na genealogia,

com idade média de 0.542 (SD = 0.052), relativamente mais recente que a do grupo *Diospyrus*. Entretanto, aparentemente os haplótipos deste grupo são mais antigos, acumulando menor número de mutações ao longo da genealogia, num total de 4 a 6 apenas.

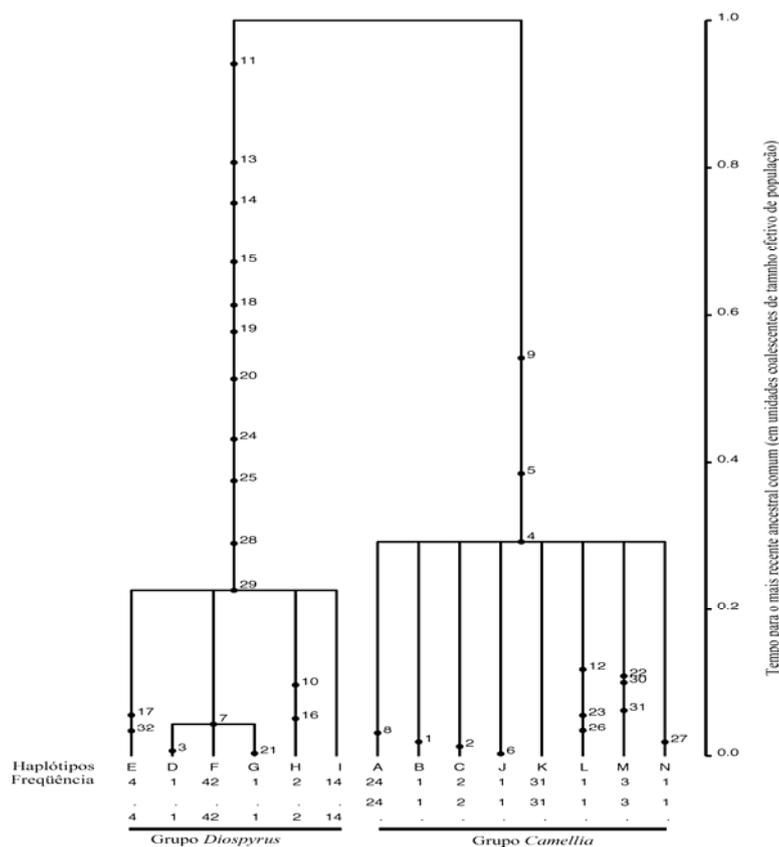


Figura 3. Genealogia gênica coalescente com a mais alta probabilidade (Verossimilhança= 1.7465×10^{-293} , desvio padrão = 0.0000) mostrando a distribuição de mutações (pontos pretos ao longo da genealogia) na região ITS-5.8S do rDNA em populações de *Ceratobasidium noxium* do caqui (grupo *Diospyrus*) e do chá (grupo *Camellia*) obtidas em Guararema (Mogi das Cruzes), e Registro, em São Paulo. As simulações do processo coalescente foram baseadas em estimador de Watson para $\Theta = 1.905$ e populações de tamanho e taxa de crescimento constantes. A escala de tempo é expressa em unidades coalescentes de tamanho efetivo de população. Na genealogia gênica a direção da divergência ocorre do topo da genealogia (significando o haplótipo mais velho, ou o passado) para a base (o haplótipo mais jovem, ou o presente). O processo coalescente vai da base (presente) ao topo (passado). Como a genealogia gênica é enraizada, todas as mutações e bifurcações estão também organizadas (ordenadas) do topo para a base. Os números abaixo de cada ramo da árvore denominam (em ordem) cada haplótipo distinto (de A a M), sua frequência total (i.e.,

o numero total de ocorrências do haplótipo na amostra populacional) e a frequência de cada haplótipo nas amostras de caqui e de chá. A descrição dos haplótipos é dada na Tabela 1.

Todas as mutações ao longo das ramificações são específicas às populações, o que é uma indicação de que, provavelmente, devem ter surgido em cada população do hospedeiro em particular (caqui e chá).

A análise coalescente possibilitou determinar se há alguma evidência de migração entre as duas populações. Valor significativo de P (<0.0001) para o teste de Hudson ($K_{ST} = 0.8880$, $K_S = 0.9288$, $K_T = 8.2954$) indicou que as populações de *C. noxium* do caqui e do chá são geneticamente diferenciadas (HUDSON et al., 1992 a).

Há evidência de imigração assimétrica da população de *C. noxium* do caqui em Guararema para a população de *C. noxium* do chá ($M_{2,+1} = 31.907$). Coletivamente, nós interpretamos estes resultados como evidência de polimorfismos ancestrais compartilhados entre a população de *C. noxium* do caqui e do chá, mas pouca ou não detectável migração.

Além das evidências da análise filogenética por ML, MP e Bayesiana MCMCMC, vários foram os indicativos de subdivisão populacional entre as populações de *Ceratobasidium* do caqui e do chá: o não compartilhamento de alelos de uma mesma região gênica (Figuras 1 e 2), a presença de mutações restritas a uma ou outra população e a inexistência de migração simétrica entre populações.

O alto nível de diversidade genética observado em cada um dos dois únicos campos amostrados (tanto de chá como de caqui) é indicativo de que estes patógenos podem ter se originado no Brasil e não introduzidos com as respectivas culturas, cujos primeiros materiais propagativos são procedentes da Ásia (BRACKMANN, 2003). Os relatos da incidência do patógeno do mal-do-fio em inúmeras espécies nativas da Amazônia (LOURD & ALVES, 1987; GASPAROTTO & SILVA, 1999) dão respaldo à hipótese alternativa da origem brasileira do patógeno. Patógenos introduzidos

normalmente experimentam efeito denominado “gargalo de garrafa”, com enorme diminuição no nível de variação genética na população introduzida em comparação com a população de origem (MCDONALD & LINDE, 2002 a, b). Este fenômeno, aparentemente, não foi observado para a população brasileira de *C. noxium* de chá e de caqui.

Para testar a hipótese de origem local do patógeno, entretanto, é necessário que se faça amostragens de mais populações brasileiras de *Ceratobasidium* sp. Esta expansão pode ser baseada na inclusão de amostras de populações de *C. noxium* de outras culturas (como café e citros), de culturas adjacentes ao cultivo de chá e de caqui e, de forma importante, de plantas nativas do Brasil (por exemplo, da Mata Atlântica e da Amazônia). A colaboração com grupos de pesquisa internacionais poderia viabilizar a expansão da população de *C. noxium* para uma população mundial do patógeno.

3.4 Patogenicidade Cruzada

Após sete dias da inoculação, pode-se observar intensa colonização superficial de tecidos pelo crescimento micelial do fungo (tanto no tratamento com isolados de *C. noxium* de caqui quanto no com isolados de chá), em todas as variedades de caqui testadas bem como nas plantas de café “Mundo Novo”, nas plantas de chá “IAC 259” e nas plantas de citros “Pêra- IAC 2000”. Nas plantas testemunhas não-inoculadas, não foi constatado qualquer tipo de colonização ou crescimento micelial do fungo (Tabela 2, Figuras 5 e 6). Apesar da colonização micelial intensa das plantas inoculadas com *C. noxium* do caqui e do chá, não foi verificado qualquer tipo de sintoma adicional mais severo referente ao mal-do-fio causado por este patógeno (como a queima de folhas e a produção de fios ou cordões miceliais) (Figuras 5 e 6). Evidenciou-se que os dois grupos de *C. noxium* do caqui e do chá têm patogenicidade cruzada aos hospedeiros

testados. A hipótese inicial H_0 deve ser rejeitada, mesmo sendo os grupos de *C. noxium* do caqui e do chá filogeneticamente distintos.

Tabela 2. Patogenicidade do fungo do mal-do-fio (*Ceratobasidium noxium* grupos *Diospyrus* e *Camellia*) a sete variedades de caqui e patogenicidade cruzada a plantas de café, caqui, chá e citros.

Condições experimentais ^b	Variedades do hospedeiro	Patogenicidade ^a			
		Inóculo de isolados de caqui ^c	Inóculo de isolados de chá ^d	Testemunha não inoculada ^e	
Casa de vegetação	Fuyu	+	+	-	
	Giombo	+	+	-	
	Giro	+	+	-	
	Caqui	Pomelo	+	+	-
		Rama Forte	+	+	-
		Regina	+	+	-
		Rubi	+	+	-
	Café	Mundo Novo	+	+	-
	Chá	IAC 259	+	+	-
	Citrus	Pêra-IAC 200	+	+	-
Estufa incubadora	Fuyu	+	+	-	
	Caqui	Giombo	+	+	-
		Pomelo	+	+	-
		Rama Forte	+	+	-
	Café	Mundo Novo	+	+	-
	Chá	IAC 259	+	+	-
	Citrus	Pêra-IAC 200	+	+	-

^a Os símbolos + e - indicam : (+) Patogênico; (-) Não Patogênico

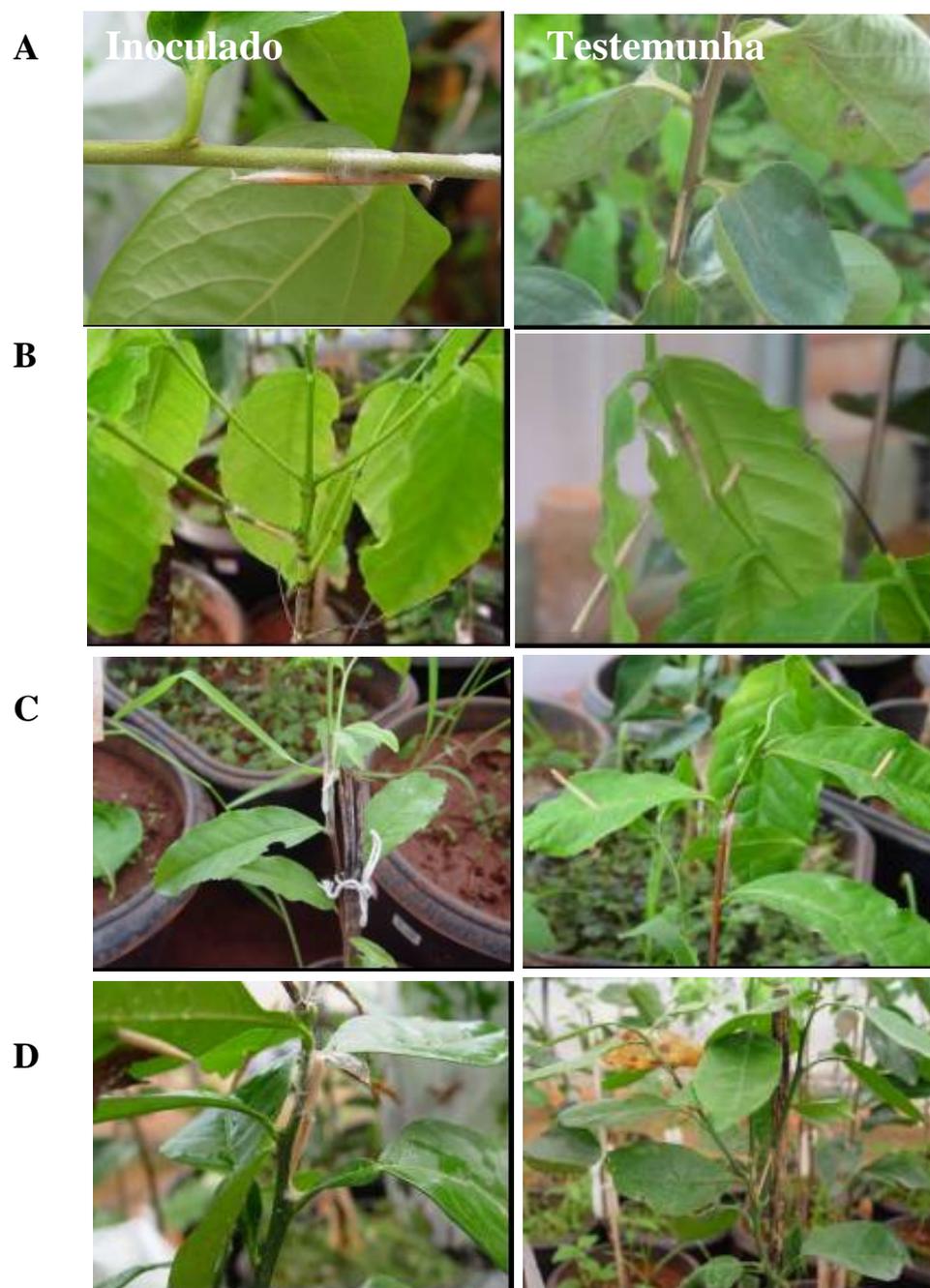


Figura 5. Colonização de órgãos aéreos de plantas de caqui (A), café (B), chá (C) e citros (D) por *Ceratobasidium noxium* grupo *Diospyrus* sob condições de casa de vegetação, 21 dias após a inoculação. Ilha Solteira, SP. As testemunhas (não inoculadas) de cada uma das espécies testadas são apresentadas à direita.

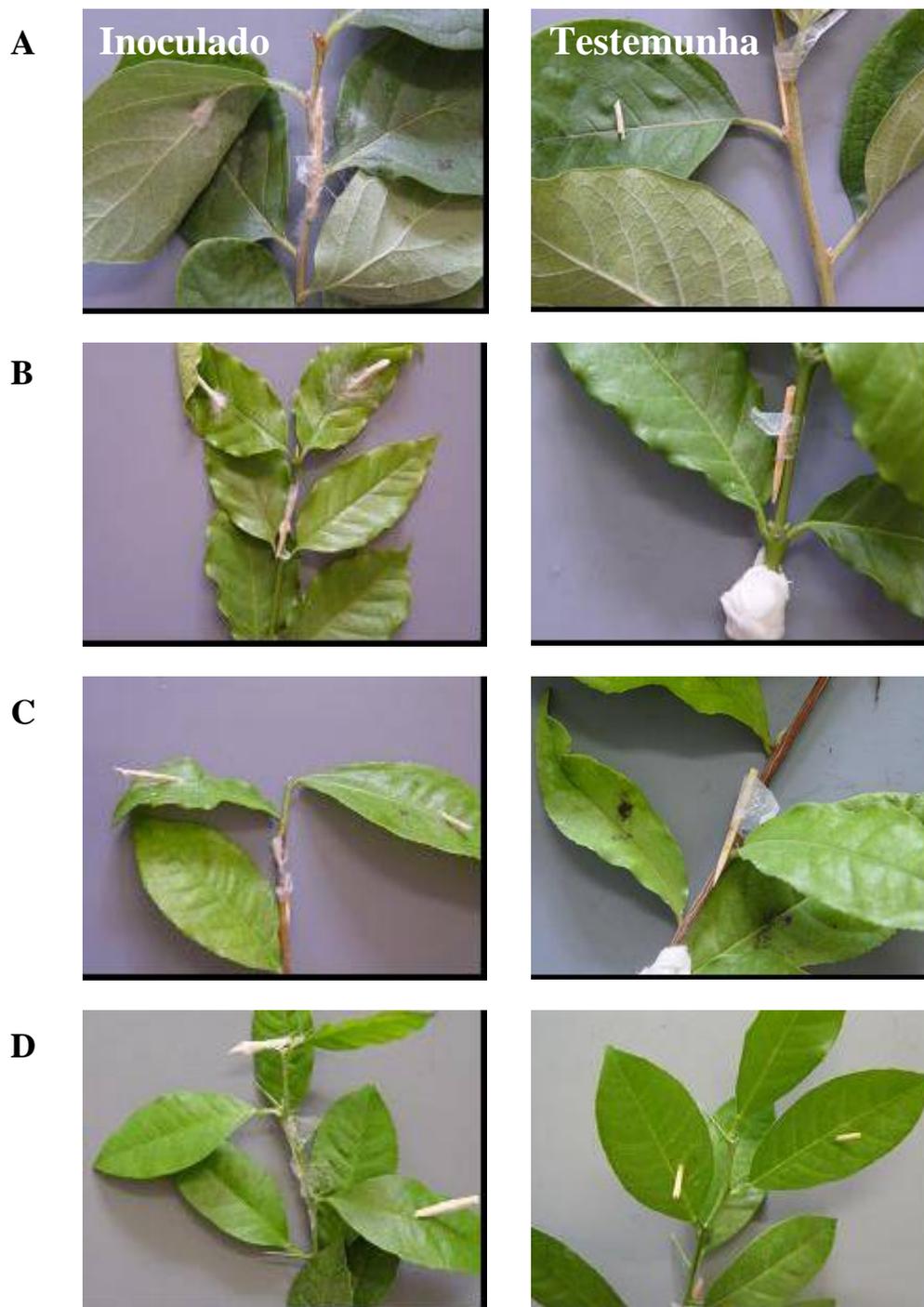


Figura 6. Colonização de ramos destacados de plantas de caqui (A), café (B), chá (C) e citros (D) por *Ceratobasidium noxium* grupo *Diospyrus* sob condições de estufa incubadora biológica, sete dias após a inoculação. Ilha Solteira, SP. As testemunhas (não inoculadas) de cada uma das espécies testadas são apresentadas à direita.

O fato do não aparecimento dos sintomas clássicos do mal-do-fio pode ser explicado, por exemplo, em virtude da idade das brotações dos ramos utilizados na inoculação, onde os tecidos de alguns ramos já se apresentavam mais velhos e lignificados por desuniformidade varietal do caquizeiro na época de emissão de brotações. Houve dificuldade também, em se obter, na mesma época, brotações jovens das quatro espécies de plantas testadas.

Outro fator que pode ter limitado o desenvolvimento mais severo da doença está associado com as condições de condução do experimento. No campo, a doença é mais severa durante períodos chuvosos e com temperaturas elevadas. É necessário que um microclima favorável para o fungo ocorra em função do adensamento da área foliar das plantas pelo intenso crescimento vegetativo (CAVALCANTE & SALES, 2001). Entretanto, o sistema de nebulização da casa de vegetação não funcionou de forma regular, exigindo que mantivéssemos, por uma semana, um saco plástico envolvendo os ramos inoculados para manutenção das condições de umidade. Isso, embora facilitasse a manutenção da umidade necessária para colonização dos tecidos pelo fungo, exigiu que efetuássemos avaliação aos sete dias da inoculação. Se os plásticos fossem mantidos por tempo superior, aumentavam a incidência de amarelecimento e queda foliar. Também não foi possível oferecer às plantas o microclima favorável necessário através do adensamento de plantas. Isto em função do próprio delineamento experimental onde, para se evitar contaminação cruzada por isolados do patógeno, foi mantido espaço entre plantas inoculadas com diferentes grupos de isolados e as não inoculadas. Finalmente, acreditamos que o tempo entre a inoculação e a avaliação deveria ser prolongada por cerca de até 20 dias, para que a doença possa ser expressa em sua magnitude.

3.5 Reação de variedades de caquizeiro a *Ceratobasidium noxium*

A coleta desse material sob condições de campo permitiu a seleção de brotações jovens uniformes entre as variedades testadas. Este fato facilitou o desenvolvimento de sintomas mais severos da doença devido à idade fisiológica do material inoculado, onde se trabalhou com ramos mais jovens, com tecido mais tenro, facilitando a infecção por parte do fungo e conseqüentemente o desenvolvimento dos sintomas. Houve diferença significativa entre experimentos (F Experimentos significativo a 1%). A interação Exp x Var foi não significativa, indicando que não há dependência entre os fatores experimentais e variedades. A média do índice de doença nas variedades foi superior no Experimento 2 conduzido em estufa incubadora (= 7,70, numa escala de 0 a 10). Não houve, entretanto, diferença significativa entre variedades de caqui quanto à severidade da doença. Estas diferiram apenas das testemunhas não-inoculadas, que não apresentaram qualquer sintoma da doença (Tabela 3).

Tabela 3. Comportamento de oito variedades de caqui ao fungo do mal-do-fio (*Ceratobasidium noxium* grupo *Diospyrus*), sob condições de incubação em estufa biológica a 25°C, sete dias após a inoculação, utilizando-se ramos destacados das plantas oriundas da FEP–UNESP–Campus de Ilha Solteira

Variedades de Caqui	^a Experimento 1		^b Experimento 2	
	Inoculado	Testemunha	Inoculado	Testemunha
Pomelo	6,60	0,00	10,00	0,00
Taubaté	6,20	0,00	10,00	0,00
Rama forte	3,90	0,00	10,00	0,00
Rubi	7,00	0,00	6,00	0,00
Fuyu	7,00	0,00	6,00	0,00
Giro	4,80	0,00	7,00	0,00
Giombo	4,20	0,00	7,30	0,00
Fuyhana	5,40	0,00	5,30	0,00
Médias ^c	5,64 B		7,70 A	
F Experimentos ^d	7,86 **			
F Variedades ^d	0,91 ns			
F Exp x Var ^d	1,61 ns			
s	3,01			
			CV. (%)	47,54

^a Médias de cinco repetições. Ramos de brotações novas, coletados em Outubro de 2004, cerca de 20 dias após o início das brotações.

^b Médias de três repetições. Ramos de brotações novas coletadas em Dezembro de 2004, cerca de 20 dias após o início das brotações.

^c Análise de variância através do teste F de Snedecor, ** significativo a 1%

^d Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A diferença entre os experimentos quanto á severidade da doença, deve-se ao fato das condições (temperatura e umidade) serem constantes na estufa incubadora, fato este não ocorrido na casa de vegetação.

Para verificar a reação das variedades locais de caquizeiro ao patógeno, obteve-se ramos com brotações jovens e uniformes no campo. Este fato facilitou o desenvolvimento de sintomas mais severos da doença (queima de folhas) devido à idade fisiológica do material inoculado (tecidos jovens e tenros), facilitando a infecção por parte do fungo e conseqüentemente, o desenvolvimento dos sintomas.

Nos testes para verificar a patogenicidade cruzada (item 3.6), os ramos das hospedeiras não eram jovens e uniformes, implicando como um dos fatores para o não desenvolvimento dos sintomas severos da doença (por exemplo, queima das folhas).

Os reisolamentos do patógeno realizados confirmaram a sua atuação como agente causal da doença.

4. CONCLUSÕES

Todos os 66 isolados obtidos de caqui, chá manga e graviola apresentaram seqüências da região ITS-5.8 do rDNA similares a seqüências de *Ceratobasidium* spp. depositadas no bando de dados do NCBI/GenBank®;

Identificou-se 38 haplótipos mundias entre as espécies da região ITS-5.8S de *Ceratobasidium* spp.;

Os isolados brasileiros de *Ceratobasidium* spp. do caqui, do chá, da graviola e de manga agruparam-se em 17 haplótipos mundiais;

Na análise em separado das seqüências da região ITS-5.8S da amostra brasileira de isolados de *Ceratobasidium* spp., observou-se ocorrência de 20 haplótipos distintos de *Ceratobasidium* spp. da população de chá e de caqui;

Os agentes causais brasileiros do mal-do-fio em chá, graviola, manga e em caqui foram denominados *Ceratobasidium noxium*;

Análise filogenética por ML (Máxima verossimilhança) indicou que os haplótipos brasileiros da região ITS-5.8S de *C. noxium* da população de caqui e de chá constituem ramo independente em relação às demais espécies analisadas;

Detectaram-se mutações específicas ao longo das ramificações para as duas populações de *C. noxium*;

C. noxium do caqui e do chá constituem-se em populações filogeneticamente independentes, as quais foram denominadas respectivamente de grupo *Diospyrus* e grupo *Camellia*;

Ceratobasidium noxium do caqui (grupo *Diospyros*) e do chá (grupo *Camellia*) é patogênico para ambas as culturas (patogenicidade cruzada) além de ambos os patógenos infectarem café e citros;

As oitos variedades de caquizeiro cultivadas no estado de São Paulo não apresentaram reação de resistência ao patógeno *C. noxium* do caqui;

Nos experimentos conduzidos para verificar o comportamento das variedades de caqui ao fungo *C. noxium*, a severidade da doença foi maior no experimento 1 do que no experimento 2.

5.GLOSSÁRIO

Árvore filogenética: Estuda relações ancestrais entre táxons (famílias, gêneros, espécies ou populações) representados graficamente por pontos (nós) ligados por linhas (ramos) na forma de árvores, as quais podem ser enraizadas ou não. Quando enraizadas apontam para uma espécie ancestral de todo um grupo em estudo e quando não enraizadas mostram apenas as relações entre as unidades taxonômicas.

Análise Bayesiana: Direciona-se a incertezas filogenéticas, calculando as médias de inferências e as estimativas dos parâmetros sobre todas as filogenias possíveis. Baseia-se em parâmetros determinados *a priori*, como a frequência total de bases do DNA dentro da espécie, a razão entre taxas de transições/transversões, os modelos de substituição de bases, ou seja, busca uma árvore mais provável. Essa teoria tem maior probabilidade de estimar a evolução de um grupo e a árvore estimada é a árvore verdadeira sob um modelo evolucionário particular.

Análise coalescente: É um processo genealógico que tem por finalidade fornecer estimativas simultâneas de parâmetros da população, permitindo uma análise da probabilidade dos modelos evolucionários. Este método procura explicar matematicamente, com base estatística, todos os processos (seleção, recombinação, mutação, deriva gênica e fluxo gênico) em nível populacional, partindo de uma população atual para uma população ancestral em escala de tempo coalescente, dentro de uma árvore filogenética.

Análise de máxima parcimônia estatística: É um tipo de análise filogenética que se baseia na escolha da melhor árvore filogenética dentro de um conjunto de árvores geradas, ou seja, se existem diversas explicações para uma determinada observação,

escolhe-se a mais simples (árvore filogenética que possi o menor número de passos em relação a mudanças de caráter na hipótese filogenética).

Análise de máxima verossimilhança: Estima a probabilidade de um conjunto de dados estar representado em um dado processo evolutivo previamente definido. Esse método requer um modelo probabilístico de evolução de caracteres na qual se levam em conta parâmetros como a taxa de substituições entre pares de nucleotídeos em uma seqüência de DNA, a freqüência de bases, entre outros. A árvore filogenética gerada pelo método de máxima verossimilhança é aquela que apresenta maior probabilidade de que os resultados gerados tenham sido originados conforme o modelo evolutivo previamente definido.

Haplótipos: Combinação única de nucleotídeos em uma seqüência gênica (lócus). Haplótipos podem ser de simples ou de múltiplos loci. Indivíduos compartilhando um mesmo haplótipo têm os mesmo nucleotídeos tanto em posições variáveis quanto em invariáveis.

6. REFERENCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p.3389-3402, 1997.

AZEVEDO, L.A.S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Novartis Biociências, 1998. p. 9-114, 1998.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, p.4563–4568, 2001

BRACKMANN, A. O caqui. Disponível em : <<http://www.hortibrasil.org.br/caqui>>. Acesso em: 10 set. 2003.

CABI CROP PROTECTION COMPENDIUM. *Corticium koleroga* (Cooke) Höhnelt Disponível em: <<http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?CCODE=CORTKO&COUNTRY>>. Acesso em: 25 nov. 2003

CALVACANTE, M.J.B.; SALES, F. **Ocorrência da queima-do-fio (*Pellicularia koleroga*) em cafezais em Rio Branco**. Rio Branco: Embrapa, 2001. p.1-2. (Boletim Técnico Embrapa-Acre, 135).

CARBONE I.; ANDERSON, J.B.; KOHN, L. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution** Lancaster, v.52, p.11-21, 1999.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. **Molecular Ecology**, Oxford, v.10, p. 947-964, 2001.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. **Applied Mycology & Biotechnology**, v. 4: Fungal Genomics. p.30. 2004.

CERESINI, P. C.; SOUZA, N. L. Caracterização cultural e fisiológica de *Rhizoctonia solani* GA-4 HGI associado a vagens de amendoimzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.21, p.443-454, 1996.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, p.1657-1660, 2000.

COSTA-SOUZA, E.; BASSETO, M. A.; TAKADA, H. M., ZALA, M.; CERESINI, P. C. Associação de *Ceratobasidium noxium* à queima-do-fio e reação do caquizeiro ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, Supl., p.S.77, 2006.

CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Statistical methods for detecting recombination. In: CRANDALL, K. A. (Ed.). **The evolution of HIV**. Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 1999. p.153-176.

DONK, M.A. Notes on resupinate Hymenomycetes - I. On *Pellicularia* Cooke. **Reinwardtia**, Bogor, v.2, n.3, p. 425-434, 1954.

FAWCETT, G.L. *Pellicularia koleroga* on coffee in Puerto Rico. **Jornal of Agricultural Research**, Washington, v.2, p.231-233, 1914.

FURTADO, E. L. Doenças do chá. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J.A.M. (ed.) **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.257-260.

GASPAROTTO, L.; SILVA, S.E.L. New hosts of *Pellicularia koleroga* in the State of Amazonas, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.24, n.3, p.469, 1999.

GONZALEZ, D.; CARLING, D.E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M.A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, New York, v.93, p.1138-1150, 2001.

GUTIERREZ, W.A.; SHEW, H.D.; MELTON, T.A. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.S35, 1998.

HERR, L.J.; ROBERTS, D.L. Characterization of *Rhizoctonia solani* populations obtained from sugar beet fields with differing soil textures. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.476-480, 1980.

HUDSON, R. R.; BOOS, D. D.; KAPLAN, N. L. A statistical test for detecting geographic subdivision. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.9, p.138-151, 1992a.

HUDSON, R. R.; SLATKIN, M.; MADDISON, W. P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. **Genetics**, Austin, v.132, p.583-589, 1992b.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford University Press, New York, USA, v.17, p.754-755, 2001.

INDEX FUNGORUM. *Corticium koleroga* (Cooke) Höhn. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/synspecies.asp?RecordID=120730>>.

Acesso em: 25 jan. 2004.

JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.M.; LI, S.; VILGALYS, R. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. **Genetics**, Austin, v.157, p.149-161, 2001.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR**, Marília, v.19, p.683-689, 1997.

LANGER, G. Die Gattung botryobasidium DONK (Corticaceae, Basidiomycetes). **Bibl. Mycol**, v.158, p.1-459, 1994.

LANGER, E. *Botryobasidium* genus description. Disponível em: <<http://www.uni-tuebingen.de/uni/bbm/mycology/botryoba.htm>>. Acesso em: 25 set. 2003.

LOURD, M.; ALVES, B.L.M. Lista de hospedeiro e etiologia da queima-do-fio das plantas frutíferas na região Amazônica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.12, p.88-89, 1987.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.349-379, 2002a.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v.124, p.163-180, 2002b.

PEREIRA, R.C.A.; LEDO, F.J.S.; BERGO, C.L.; SIVIERO, A. Evaluation of arabica and robusta coffee genotypes in western Amazonia. **Acta Amazonica**, Manaus, v.30, n.4, p.535-541, 2000.

PEREIRA, R.A.; TAKADA, H.M.; RIBEIRO, I.J.A.; BUENO, S.C.S., YANAGISAWA, S.S.; FREIRE, I.L.C.; SANTOS, M. C.; TIMÓTEO, W.S. Registro da queima dos fios (*Ceratobasidium* sp..) em caqui (*Diospyros kaki*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.28, Supl., p.90, 2003. (Resumos).

POSADA, D.; CRANDALL, K.A.. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p.817-818, 1998.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.1, p.37-45, 2001.

PRICE, E.W., CARBONE, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. **Bioinformatics**, v.21, n.3, p.402-404, 2005.

ROBERTS, P. *Ceratobasidium noxium* (Donk). **Rhizoctonia-Forming Fungi**, In: Index Fungorum .Richmond, p.48, 1999.

ROGERS, D.P. Notes on lower Basidiomycetes. **University Of Iowa Studies In Natural History**, Iowa City, v.17, n.1, p.1-43., 1935.

ROGERS, D.P. The genus *Pellicularia* (Thelephoraceae). **Farlowia**, Cambridge, v.1, n.1, p.95-118, 1943.

ROSSETI, V.; ALVES, M. L. B.; CLEMENT, C. Ocorrência de *Pellicularia koleroga* em pomares cítricos na Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, p.526, 1982.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, p.133, 1991.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Versão 4.0b10. Sinauer Associates: Sunderland, MA. 2002.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic-analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA-sequence data .3. Cladogram estimation. **Genetics**, Pittsburgh, v. 132: p.619-633, 1992.

TIMS, E.C.; MILLS, P.J.; EXNER, B. Thread-blight (*Pellicularia koleroga*) in Louisiana. **Plant Disease**, St. Paul, v.38, p.634-637, 1954.

TALBOT, P.H.B.. Studies of '*Pellicularia*' and associated genera of Hymenomycetes. **Persoonia**, Leiden, v. 3, n. 4, p.371-406, 1965.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 4876-4882, 1997.

TIMS, E.C.; MILLS, P.J.; EXNER, B. Thread-blight (*Pellicularia koleroga*) in Louisiana. **Plant Disease**, St. Paul, v.38, p.634-637, 1954.

WATTERSON, G. A. On the number of segregating sites in genetic models without recombination. **Theoretical Population Genetics**, Stanford, v.7, p.256-276, 1975.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.

VENKATARAYAN, S.V. The validity of the name *Pellicularia koleroga* Cooke.

Indian Phytopathology, New Delhi, v.2, p.186-189, 1949.