

ANEXOS II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO EM
MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

ORIENTADORA: Dra. Neusa de Lima Nogueira

Aluno: Gildemberg Amorim Leal Jr

**Piracicaba-S.P.
Julho/1998**

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	2
MATERIAIS E MÉTODOS	4
Preparo das Amostras	4
Fixação	5
Pós Fixação	5
Desidratação	5
Inclusão	6
Toailete dos Blocos	7
Cortes Semi Finos e Ultra Finos	8
Coração de Grades	9
Revelação de Chapas Fotográficas	10
Revelação por Contato	11
Soluções utilizadas	11
RESULTADOS	17
Figura 2	18
Figura 3	18
Figura 4	18
Figura 5	18
Figura 6	19
Figura 7	19
Figura 8	19
Figura 9	19
Figura 10	20
Figura 11	20
Figura 12	20
Figura 13	20
BIBLIOGRAFIA	21

I - INTRODUÇÃO:

A vassoura de bruxa é uma doença endêmica e originária da bacia da Amazônia. O agente causador é o basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*, da ordem agaricales, que foi observado pela primeira vez em 1895 no Suriname (Evans, 1978). Atualmente a doença encontra-se em todos países produtores de cacau, seja da América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela), países da América Central (México, Panamá) ou Ilhas do Caribe (Trinidad-Tobago e Granada).

Os sintomas característicos da doença são hipertrofia dos meristemas apicais, e posteriormente conformações de ramificações vegetativas em excesso, seguido de secamento. As almofadas florais infectadas desenvolvem brotações vegetativas e agrupamento de flores hipertrofiada que são abortadas. Geralmente os frutos proveniente de flores infectadas apresentam formas de cenoura ou morango e não completam o seu desenvolvimento. Quando o nível de infecção torna-se alto (90% dos lançamentos infectados) os frutos já desenvolvidos provenientes de flores normais apresentam manchas amarelas (quando verdes) e manchas escuras e duras

(nos frutos maduros) com seu interior em ambos os casos apodrecidos ou endurecido e petrificado.

As perdas geradas pela vassoura de bruxa podem atingir até 90% da produção, o que desestimulou os produtores de cacau, que a busca de alternativas de sobrevivência estão derrubando as matas que antes serviam para sombreamento do cacau. Com isto, os prejuízos ecológicos são elevados.

O fungo *C. pernicioso* tem como hospedeiros em ambiente natural as espécies de *Teobroma cacao*, *Teobroma bicolor* Humb Bompl e *Herrania nitida* (Poepp) Schuler. No Pará ocorre vassoura de bruxa em Urucum (*Bixa orellana*). Nos plantios comerciais de cacau isolados de *C.pernicioso* infectam plantas invasoras das espécies, *Solanum rugosum* Dun e *Solanum lasiantherum* V. Hewrek, porém não induzem sintomas em variedades de cacau susceptíveis a doença (ICS-39).

O trabalho tem por objetivo familiarizar o estagiário com as práticas de microscopia eletrônica de transmissão. Aproveitando a oportunidade para otimizar as técnicas de preparo de amostras para hifas do fungo *Crinipellis pernicioso* e observar estruturas celulares das hifas.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - PREPARO DAS AMOSTRAS.

O material didático foi hifas do fungo *Crinipellis perniciososa* crescido em meio de batata, dextrose 2% e ágar a 2%. O material foi crescido por 7 dias à 28 °C. Foram coletadas hifas de 3 isolados (CP-STIG, CP-30 e CP-104 isolados que infectam diferentes hospedeiros)

As hifas foram coletadas junto com pedaços de ágar na forma de retângulo. Também foram colocados no meio pequenos pedaços de papel filtro esterilizados para que a hifas desenvolvessem na superfície e pudesse ser retirado do meio com maior facilidade e sem levar junto com a amostra pedaços de meio onde foram crescidos.

As amostras antes de serem analisadas no microscópio eletrônico foram fixadas, pré - fixadas, desidratadas, incluídas e emblocadas com resina. No bloco com amostras foram feitas toaletes para melhor expor o material. Após a toaletes dos blocos foram feitos cortes semi finos e ultra finos. Os cortes ultra finos foram

colocados em suportes (grades cobertas com Colódio) que foram fixados e estudados em microscópio de transmissão.

2 - FIXAÇÃO.

Os pedaços de material com hifas do fungo foram colocados no fixador Glutataldeído 2% por 1 hora e meia à de 4 °C. Após a fixação o material foi lavado por 3 vezes com tampão de Cacodilato 0,1M cada lavagem durante 15 minutos e sob agitação.

3 - PÓS FIXAÇÃO

No final das lavagens segue a pós fixação que é realizada com Tetraóxido de Ósmio 1% a temperatura de 4 °C por 1 hora e meia. Passado o tempo da pós fixação o material e lavado 3 vezes com solução salina (0,9 %), sendo que cada lavagem leva o tempo de 5 minutos. Caso não possa ser necessário realizar a desidratação no mesmo dia pode se deixar as amostra em acetato de Uranila 2% a 4 °C por uma noite.

4 - DESIDRATAÇÃO.

A desidratação do material é necessário para que durante a visualização no vácuo do microscópio não haja vaporização da água presente na amostras rompendo estruturas do espécimen. A presença de vapores de água no vácuo do microscópio

faz com que elétrons sejam desviados do alvo e prejudique o resultado final. A desidratação é gradativa evitando a saída rápida da água para não danificar estruturas durante esse processo. A água da amostra é trocada de forma gradativa e essa troca é feita por acetona.

A desidratação foi realizada em 5 etapas. A primeira, segunda e terceira são realizadas com acetona nas diluições de desidratação 25% , 50% , 75% respectivamente sendo que cada etapa leva o tempo de 5 minutos. A quarta desidratação é realizada duas vezes com tempo de 10 minutos cada e com acetona a 95%, se for preciso interromper o processo deve ser feito nessa etapa e podendo continuar em outro momento. Por final segue 3 desidratações de 20 minutos com acetona pura

5 - INCLUSÃO.

A inclusão é realizada com resinas do tipo SPURR, EPPON ou ARALDITE. A resina tem por finalidade penetrar no tecido ocupar o lugar da pouca água que ainda existe no material e manter a estrutura firme dos tecidos da amostra para que não seja danificado durante o cortes no microtomo.

A inclusão também é progressiva como a desidratação para se realize uma melhor substituição da água pela resina. A inclusão é realizada em 3 etapas. A primeira inclusão é feita com mistura de 1 parte de resina com 1 parte de acetona e leva o tempo de 2 horas a 37 °C. Na Segunda faz se a mistura de 2 partes de resina par 1 de acetona por 3 horas a 37 °C. A última e realizada com resina pura e o tempo de duração são doze horas ("over night") a 4 °C . Na inclusão existe um passo

intermediário entre o segundo e o terceiro que pode ser opcional, a mistura utilizada é de 3 partes de resina para 1 de acetona com o tempo de 3 horas a 37 °C.

Após a inclusão com resina pura, o material é posto em formas para polimerizar a resina, porém quando retirar o material da geladeira deve-se esperar por 10 minutos antes de enformar o material. Se for preciso completa-se o volume da forma com resina pura. As amostras devem ser identificadas com pequenas etiqueta que são postas no bloco na extremidade oposta da amostra antes da houver a polimerização. Os bloquinhos de resina conferem estrutura as amostras para melhor manuseio na toaletes e corte no microtomo

Após a identificação o material é levado para uma estufa por 6 horas a temperatura de 37 °C, depois segue para uma a 45 °C por 18 horas e por final foi transferida para uma estufa a 24 °C por 24 horas ("over night")

6 - TOALETE DOS BLOCOS.

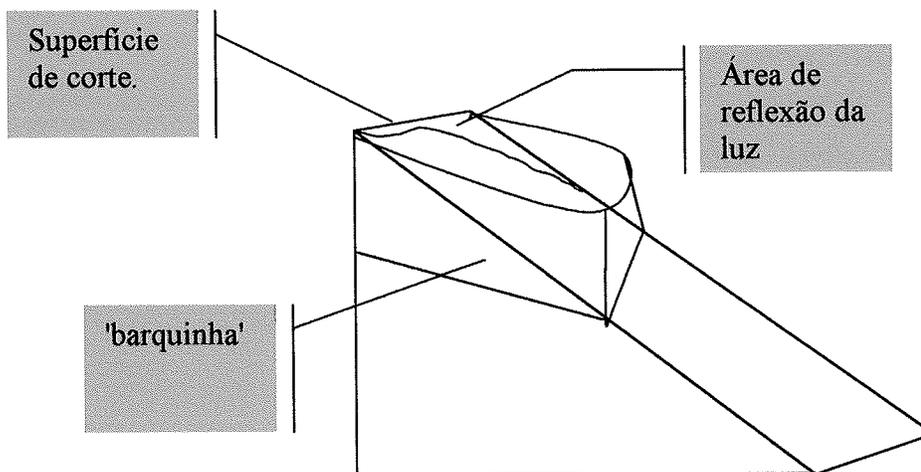
A toalete tem por finalidade expor as amostra emblocadas para os cortes. O material emblocado quando não se faz toalete fornecerá cortes sem tecido que se deseja estudar . Assim a toalete tem por finalidade retirar os excessos de resina sobre a superfície do amostra e obter cortes com material desejado.

A primeira toalete é grosseira e é realizada com um pequeno pedaço de lixa para parede. Consequinte, faz-se uma toalete mais delicada sendo utilizado lamina de barbear e o processo é visualizada com uma lente de aumento para que durante a toalete o material não seja esrripado do bloco junto com a resina. Danificando assim a amostra. Durante a toalete com lamina de barbear é necessário que se esculpe uma

forma trapezoidal na topo do bloco, essa configuração irá facilitar a orientações futura para melhor precisão de cortes.

7 - CORTES SEMI FINOS E ULTRA FINOS

Os cortes são realizados no microtomo e são utilizadas navalhas de vibro. As navalhas podem ser de vidro ou diamante, as de diamantes são mais caras mais conferem melhor qualidades aos cortes. As navalhas de vidro (figura 1) são de qualidade inferior e são descartáveis, apresentam um formato triangular e são preparadas em um aparelho denominado "Knifer Maker", as boas navalhas de vidro devem apresentar uma superfície de corte lisa e quando posta contra luz apresentar uma área curva de reflexão da luz. Defeitos nas navalhar prejudicam a qualidade dos cortes, apresentado laminas estriadas e com sulcos. Nas navalhas são feitas pequenos reservatórios de água, chamadas de barquinhas, com fita adesiva ("crepe") e vedadas com parafina para evitar vazamentos. São nesses reservatórios que serão depositados os cortes .



Os cortes semi finos apresentam espessura de $1\mu\text{m}$ são coletados das barquinhas por uma pequena alça de platina e posta em uma lamina de vidro, muitas vezes apresentam enrugadas e são esticados com uma pincelada leve com xilol. Os cortes posto em laminas de vidro são secos e corados com Azul de Toluidina 1%. O corante também é evaporado e depois a lamina é visualizado em microscópio óptico. A visualização no microscópio óptico serve para o observar a qualidade da amostra e onde se localiza no corte a região do tecido a ser melhor estudado. A orientação da localização do tecido desejado para análise tem como referências as bases e laterais da figura geométrica esculpida durante a toaleta. Assim poderemos realizar uma terceira toaleta para cortes ultra finos direcionado a retirada da resina deixando apenas a área do bloco que se deseja ter os cortes.

Após a terceira toaleta o material é novamente cortado em espessuras menores e são coletados e pequenas grades cobertas com colodium de 200 meshes. O colodium tem por finalidade fixar os pequenos cortes nas grade.

As grades com amostras são guardadas em recipientes apropriados e coradas.

8 - CORAÇÃO DAS GRADES

As grades são coradas com Acetato de Uranila 2,5% e Citrato de Chumbo. Primeiramente coloca-se uma gota para cada grade de Acetato de Uranila em uma superfície limpa e lisa. Em cada gota coloca-se a grade com a parte das amostras (superfície mais brilhante) em contato com o Acetato e cubra com uma tampa para que fique no escuro. Depois de 15 por grade de coração faz-se a lavagem de cada

uma com água deionizada e destilada e depois secar com papel filtros. Posteriormente coloque para corar em uma gota de Citrato de Chumbo para não haver precipitação deve ter ao lado uma pastilha de hidróxido de chumbo. A parte da grade com amostras deve ficar em contato com a solução de Citrato de Chumbo corando por 5 minutos em ambiente escuro.

9 - REVELAÇÃO DE CHAPAS FOTOGRÁFICAS

Quando o material foi analisado no microscópio eletrônico de transmissão. Foram retiradas chapas fotográficas dos campos focalizados mais interessantes para estudos posteriores.

A revelação das chapas foram feitas em ambiente escuro apenas na presença de luzes amarela e vermelha, possibilitando assim o mínimo de luz para se trabalhar no local. As chapas foram dispostas em suportes e imersas em solução reveladora a 21 ° C por 4 minutos. Depois da reação com revelador foi estabilizada imergindo o suportes com as chapas em solução de Ácido Acético por alguns segundos e passados por seguinte na água, também por alguns segundos. Após a lavagem em água o material e posto em um solução fixadora permanecendo por 8 minutos. Depois a chapas são lavadas em água corrente por meia hora e posta para secar .

10 - REVELAÇÃO POR CONTATO

Na revelação foi utilizada luzes vermelhas e amarela. As chapas reveladas são colocadas sobre papel fotográfico branco e preto no amplificador. Antes de realizar a revelação foram acertados o foco, abertura do diafragma e tempo de exposição a luz. O teste foi realizado com pequenas tiras de papel fotográfico exposto na chapas reveladas com os fatores de variação acertados. Para saber se as modificações foram satisfatórias faz-se a revelação do pedaço do papel fotográfico e observa-se a nitidez, velocidade da revelação e contraste da foto.

Quando foram retiradas as fotos colocou-se na solução reveladora até que toda fique visível e nítida. É recomendável que manuseie a foto com pinça de plástico sempre movimentando o papel e tirando do contato com a solução partes já revelada evitando na revelação falta de homogeneidade. Com a foto revelada paralisa-se a reação imergindo em solução de Ácido Acético por alguns segundos e deixando por meia hora em solução fixadora e depois lavando por meia hora e por para secar.

11 - SOLUÇÕES UTILIZADAS

<u>Fixador -Glutaraldeido</u>	0,4 ml
P.E.A. 4% (no total)	2,5 ml
CaCl ₂ 5 mM	0,5 ml
T. Cacodilato 0,1 M	6,6 ml
Total	10,00 ml

Glutaraldeido 5%

Água deionizada	6,0 ml
Tampão Fosfato 0,2 M	3,00 ml
Glutaraldeido 50%	1,00ml

Glutaraldeido 3%

Água deionizada	6,0 ml
Tampão Fosfato 0,2 M	3,4 ml
Glutaraldeido 50%	0,6 ml

Tampão Cacodilato De Sódio 0,2 M

Cacodilato de Sódio	4,28g
Água	100,00 ml

Tetróxido de Ósmio

Utilizar 1 ampola de tetróxido de ósmi. Lavar a ampola com detergente secar utilizando luvas. Colocar 50 ml de água deionizada dentro de um frasco, quebrar a ampola dentro do frasco. Deixar na geladeira por 24 hs e depois armazenar em freezer.

Acetato de Uranila

Acetato de Uranila	0,624g
Água	2,5 ml

Armazenar em frasco escuro na geladeira.

Resina - Eppon 812.

Mistura A

Embed 812	10,00 ml
DDSA	15,5 ml

Mistura B

Embed 812	10,00 ml
NMA	8,5 ml

Juntar as misturas A e B e acrescentar o volume DMP-30 referente a 20% do volume da mistura. Depois fazer as mistura com acetona segundo a necessidade(1:1,2:1 e 3:1).

Colódio 1,5%

Acetato de Amila	2,00 ml
Colódio	3,00 ml

Colocar em proveta de 5 ml o Acetato de Amila e a seguir o Colódio. Agitar bem e Armazenar em frasco escuro.

Azul de Toluidina 1%

Borax	0,25 g
-------	--------

Azul de Toluidina	0,25 g
-------------------	--------

Dissolver o Borax em 25 ml de água deionizada colocar Azul de Toluidina e sempre que for usar filtrar para eliminar precipitados.

Citrato de Chumbo

Pb(NO ₃) ₂	0,266 g
-----------------------------------	---------

Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) · 2 H ₂ O	0,325 g
--	---------

Dissolver o nitrato de Chumbo em 6 ml de água bidestilada. Em seguida colocar o citrato de sódio. Deixar agitar durante 15 minutos vedar o becker com papel alumínio. Adicionar 1,6 ml de NaOH 1N. Adicionar 2,4 ml de água bidestilada. Armazenar em frasco escuro na geladeira.

Tampão Fosfato 0,15 M

1^o Preparar Tampão de Sódio e Potássio 0,2 M da seguinte maneira.

Fosfato de Sódio	5,1572 g
------------------	----------

Fosfato de Potássio	0,7621 g
---------------------	----------

Dissolver em água deionizada e completar a volume para 100,00 ml.

2^o Preparar Tampão de Fosfato 0,15M propriamente dito.

Utilizar o Tampão 0,2 M e diluir

Tampão 0,2 M	37,2 ml
Água	12,4 ml

Azul de Metileno

Azul de Metileno	1,5 g
Fenol Fundido	5,0 g
Álcool 95%	10,00ml
Completar o volume para 100 ml de água destilada	

Revelador Fotográfico para Chapas

Utilizar solução reveladora D-19. Diluir 1:2 somente na hora em que for utiliza. Deixar a 21 °C. Revelar durante 4 minutos utilizando somente luz vermelha.

Água destilada	50 °C
Metol	2,2g
Sulfito de Sódio	96,00g
Hidroquinona	8,8 g
Carbamato de Sódio	56,00 g
Brometo de Potássio	5,00 g
Completar para 1000 ml e armazenar em frasco escuro.	

Ácido Acético

Diluir 15 ml de Ácido Acético em 1000 ml de água destilada e armazenar em frasco escuro.

Fixador F5 para Chapas

Hipossulfito de Sódio	240 g
Sulfito de Sódio	15 g
Ácido Bórico	7,5 g
Alumém de Potássio	15 g
Ácido Acético	15 ml

Aquecer a água destilada a 50 °C e dissolver lentamente na ordem acima.

Armazenar em frasco escuro. Fixar durante 8 minutos

Revelador Fotográfico para Papel

Utilizar revelador Dektol da Kodak. Preparar soluções do pacote (para 3 l), armazenar em frasco escuro, diluir par 2:1 em água destilada.

Fixador Fotográfico para Papel

Utilizar fixador Kodak. Dissolver o conteúdo (segundo instruções do fabricante) em 1000 ml de água destilada. Armazenar em frasco escuro.

III - RESULTADOS

Ambas as metodologias de coleta das hifas como as práticas de fixação e inclusão em resina EPPON demonstraram bons resultados podendo esta metodologia ser aplicada futuramente em trabalhos científicos. Sendo as figuras 2, 3, 4, 5 do isolado CP-STIG, as figuras 6, 7, 8, 9 são o isolado CP-104 e as fotos 10, 11, 12 e 13 do isolado CP-30.

As fotografias apresentam boa visualização podendo ver partes integrantes da células da hifas demonstrando grande valor didático, cumprido com a finalidade de aprendizado. Porém diferenças marcantes entre isolados não foram percebidas, deve ser salientado que os envolvidos no trabalho não estão familiarizados com as estruturas que foram utilizadas como material didático para estudo acadêmico.

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão se está toda adequada para utilização no fungos da espécie *Crinipellis perniciososa*

Figura 2) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-STIG (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .), hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 3) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-STIG (aumento 12.000x, barra = 0,6 μm .), hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 4) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-STIG (aumento 12.000x, barra = 0,6 μm .), hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 5) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-STIG (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .)

Figura 6) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-104 (aumento 12.000x, barra = 0,6 μm .) hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 7) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-104 (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .) hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 8) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-104 (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .) hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 9) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-104 (aumento 20.000x, barra = 0,4 μm .) hifas coletadas do meio de cultura.

Figura 10) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-30 (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .), material hifas coletadas de papel filtro.

Figura 11) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-30 (aumento 12.000x, barra = 0,6 μm .), material hifas coletadas de papel filtro.

Figura 12) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-30 (aumento 7.000x, barra = 1,1 μm .), material hifas coletadas de papel filtro.

Figura 13) Electromicrografia de hifas de *Crinipellis pernicisa*, isolado CP-30 (aumento 4.400x, barra = 1,7 μm .), material hifas coletadas de papel filtro.

BLIBLIOGRAFIA CONSULTADA.

- BASTOS, C. N., et al . 1991. Ocorrência de Vassoura de Bruxa em Solanáceas Silvestre na Região Produtora de Cacau da Bahia. *Agrotropica* 3 (2): 109-110p
- BASTOS , C. N., EVANS, H. C. 1985. A New Pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witche's broom disease) on Solonaceous hosts. *Plant Pathology* 34: 306-312p.
- BASTOS , C. N., ANDERBHRAN, T. 1986. Urucu (*Bixa orellana*):nova espécie da Vassoura de Bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do Cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira* 13(3): 963-965p.
- BULCHER, W. Introdução às tecnicas microscópica. Ed.Polígono/S.A, 4ed 178p.São Paulo, 1980.
- EVANS, H. C. 1978. Witche's Broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador: 1.the fungus. *Annals of Aplied Biology* 89: 185-92.
- GRIMSTONE, A. V. O Microscópico eletrônico em Biologia, Coleção temas de Biologia, EDUSP, v.11, 70p. São Paulo,1977.
- PEREIRA, J. L., et al. 1989. Primeira Ocorrência de Vassoura de Bruxa na Principal Região Produtora de Cacau do Brasil. *Agrotropica* 1(1): 79-81p.

**PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONA PARA
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
*Crinipellis pernicioso***

GILDEMBERG AMORIM LEAL JR

Relatório de Residência
apresentado à Escola
Superior de Agricultura
"Luiz de Querioz", para
aprovação, na disciplina
estágio profissionalizante

PIRACICABA
Estado de São Paulo

Novembro - 1998

**PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONA PARA
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
*Crinipellis pernicios***

GILDEMBERG AMORIM LEAL JR
Acadêmico do Curso de Engenharia Agrônômica

Orientador: Prof. Dr. **FLÁVIO CÉSAR DE ALMEIDA
TAVARES**

Relatório de Residência
apresentado à Escola
Superior de Agricultura
"Luiz de Querioz", para
aprovação na disciplina
estágio profissionalizante

PIRACICABA
Estado de São Paulo

Novembro - 1998

INDICE

RESUMO	2
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO	2
3 MATERIAIS E MÉTODOS	2
3.1 Isolados	2
3.2 Ensaio imunoenzimático	2
3.3 Purificação de soro de coelho anti C. pernicioso em Proteína A	2
3.4 Soluções utilizadas	2
PBS	2
Tampão de Bloqueio - TB1	2
Tampão PBS-T-G	2
Tampão de OPD	2
"STOPPER" para OPD	2
Tampão Tris-NaCl	2
Tampão Tris-HCl	2
Tampão Glicina	2
4 RESULTADOS	2
5 DISCUSSÃO	2
6 CONCLUSÃO	2
TABELAS	2
TABELA 1	2
GRÁFICO 1	2
GRÁFICO 2	1
GRÁFICO 3	2
GRÁFICO 4	1
GRÁFICO 5	1
BIBLIOGRAFIA	2
BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA	2

RESUMO

A Vassoura de Bruxa é uma doença endêmica originária da bacia da Amazônia. O agente causador *Crinipellis perniciosa*, basidiomiceto da ordem Agaricales, foi observado pela primeira vez em 1985 no Suriname por Stahel. Hoje é encontrado em todos países produtores de cacau da América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela), países da América Central (México, Panamá) e Ilhas do Caribe (Trinidad Tobago e Granada). O primeiro relato da ocorrência de Vassoura-de-Bruxa no sul da Bahia ocorreu no ano de 1989 na cidade de Uruçuca (Perreira, Almeida e Figueredo, 1989).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de soro policlonal para a identificação e caracterização do *Crinipellis perniciosa*, isolado patogênico comparando-o a isolados de *C. perniciosa* patógeno de outras espécies para a avaliação da reação cruzada. Para este trabalho, uma fêmea de coelho da raça Nova Zelândia com 2 meses de idade recebeu quatro imunizações da suspensão do antígeno a intervalos de 20 dias.

A titulação dos soros foi feita através da retirada do sangue através de corte na orelha do animal. O sangue foi coagulado e o soro coletado e testado em ELISA indireto.

Os resultados mostram que o soro foi capaz de identificar isolados de *C. perniciosa*, diferenciando-os quanto à patogenicidade.

1 INTRODUÇÃO

O cacauero é uma planta da família Sterculiaceae, nativa de florestas quentes e úmidas das terras baixas do México e América Central, e das bacias do rio Amazonas e Orinoco. É uma planta que pode atingir até dez metros de altura e apresentar folhas grandes, oblongas e membranáceas. Suas pequenas flores se inserem sobre o tronco e ramos, onde também surgem os frutos grandes, longos, que medem de 10 a 25 cm. Os frutos podem pesar até 1 kg, e contêm uma polpa doce, acidulada e de sabor agradável. As sementes em número de 15 a 56 por fruto, com o teor de 42 a 50% de lipídeos conhecido industrialmente como manteiga de cacau, servem depois de torradas como principal matéria-prima na indústria de chocolate. O cacauero pertence a família Sterculiaceae que apresenta três gêneros: *Theobroma*, *Herrania* e *Guazuma*. O gênero do cacau é o *Theobroma* que engloba 23 espécies sendo apenas o cacau utilizado economicamente pelo homem. Atualmente *Theobroma bicolor*, ocupação, está sendo explorada para extração de sulco da polpa, costume este já observado em tribos indígenas da região amazônica.

Inicialmente o cacau foi identificado por Charles de L'Ecluse como *Cacao fructus*. Linneus no ano de 1737 reclassificou como *Theobroma fructus* sendo modificado finalmente como *Theobroma cacao* (1753).

O cacauero produz na latitude de 8° Sul a 8° Norte com regime de pluviosidade entre 1250 mm a 2300 anuais e altitude máxima de 1000 metros.

Existem cultivos até 1300 próximo a linha do equador sendo a altitude compensada pela latitude. A planta estabiliza o crescimento a temperatura de 10 °C e quando próximas de 5 °C a planta morre. A faixa ideal de temperatura para o cacaueteiro entre 18° C a 32°C de temperatura com umidade relativa do ar acima de 80%.

A planta do cacaueteiro apresenta sistema radicular pivotante que varia de 1 a 2 metros de profundidade dependendo do tipo de textura do solo onde se encontra tendo a função de fixação da planta no solo. Da raiz pivotante nascem raízes secundárias que situam-se próximas a superfície e são responsáveis pela absorção de nutrientes.

O caule da planta apresenta coloração verde até o segundo ano tornando cinza escuro com superfície irregular a partir do terceiro ano. Quando o ramo ortotrópico (perpendicular ao solo) atinge de 0,6 a 2,0 metros de altura emite 3-5 ramos plagiotrópicos (ramos laterais) em palma que irão formar a copa da planta.

As folhas quando novas apresentam coloração róseo-bronzeado, tornando verde e rígidas posteriormente. Nos ramos laterais as folhas estão dispostas espacialmente de forma alternada e opostas e nos ramos verticais alternadas porém em espiral.

Nos ramos lenhosos encontramos as flores que são completas e dispostas em inflorescência conhecidas como almofadas florais. Apesar de ser uma flor perfeita apresentam incompatibilidade, sendo necessária a polinização cruzada. A polinização do cacaueteiro acontece logo após períodos chuvosos

quando ocorre a emissão de flores pela planta. Sendo efetuada por pequenas moscas do gênero *Forcipomyia*.

Os frutos são do tipo cápsula com cinco lóculos contendo entre 20 a 30 sementes. A superfície apresenta de cinco a dez sulcos longitudinais pronunciados. A coloração do fruto imaturo é verde e adquire coloração amarela ou vermelha.

O produto comercial do cacau são as amêndoas fermentadas e secas. As amêndoas são comercializadas em sacas de 60 kg. Na indústria Chocolateira as amêndoas são torradas e prensadas para obtenção de manteiga de cacau e a massa de cacau, matérias primas para fabricação de chocolate.

No Brasil o estado da Bahia era responsável por 79,4 % da produção nacional, o Pará por 10 %, o Espírito Santo 5,14 % e Roraima por 4,25 %. Estes são os estados com produtividade nacional expressiva ficando Amazonas e o Mato Grosso com parcelas menores que 1% de produtividade do ano de 1997. A produção mundial no ano de 1997 foi de 2660,2 mil toneladas sendo que aproximadamente 64% da produção são dos países da África (Costa do Marfim, Gana, Camarões e Nigéria). A Costa do Marfim no ano de 1997 produziu 1050 mil toneladas. Em segundo lugar o Gana com 390 mil ton., seguida pela Indonésia com 280 mil. O quarto lugar com 198 mil ton. fica o Brasil e a Malásia com o quinto produzindo 120 ton. mil toneladas (Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos E.U.A., *Agrianual*, 1998)

O Brasil nos últimos anos tem diminuindo a produtividade devido crise financeira dos fazendeiros e incidência da doença Vassoura-de-Bruxa na Bahia desde 1987. A doença até o ano de 1996 gerou perdas na produtividade

fazendo com que o Brasil perdesse o segundo lugar para a Gana no ano de 1992 e posteriormente o terceiro lugar para a Indonésia.

A doença Vassoura-de-Bruxa é endêmica e originária da bacia Amazônica sendo descoberta em 1895, no Suriname. Ocorre em todos países produtores de cacau das Américas (Evans, 1978) e também foi primeiramente identificada no município de Uruçuca, BA (Pereira et al., 1989). Sua importância se deve pois pode gerar perdas de até 90% nas lavouras infestadas (Evans,1981)

A infecção do patógeno ocorre via os basidiósporos do fungo *Crinipellis perniciosa* que penetram nos tecido meristemáticos, penetrando de forma passiva através dos ferimentos ou aberturas naturais da planta (estômatos). Os sintomas ocorrem nos brotos vegetativos, almofadas florais e frutos (Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991).

O período de incubação após a infecção é de 3 a 4 semanas. Posterior a esse espaço de tempo os brotos vegetativos começam a apresentar uma hiperplasia caracterizada pelo aumento do diâmetro dos ramos e conseguinte hipertrofia com brotamentos de ramos laterais com entre nós curtos e folhas grandes retorcidas, podendo apresentar os pulvinos inchados. Essa conformação dos galhos é chamado de vassoura verde e após 4 a 6 essas vassouras secam devido a morte dos tecidos e passa a apresentar coloração castanha escura e são denominadas de vassoura seca, (Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991).

As almofadas florais infectadas desenvolvem cachos com flores anormais hipertrofiadas com pedicelos grandes e inchados. Os frutos originados destas

flores são anormais e morrem prematuramente(Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991).

Frutos provenientes de flores normais e que são infectados, apresentam sintomas variados dependendo do estágio de desenvolvimento apresentado pelo fruto no momento da infecção. A infecção pode ser indireta ocorrida por micélio que se encontra na flor infectada ou direta que ocorre através dos esporos. A infecção indireta proporciona uma má formação do fruto paralisando o crescimento e o tornando negro e petrificado. A infecção direta ocorre nos frutos em qualquer fase de desenvolvimento: os mais novos (1 cm de comprimento) tornam-se alongados e paralisam o crescimento; os frutos mais desenvolvidos aparecem com uma mancha negra, dura e irregular e as amêndoas ficam aderidas uma às outra sendo portanto inaproveitáveis ; para os frutos em início de maturação as amêndoas geralmente não são afetadas podendo ser aproveitadas para comercialização mas nunca para o plantio. A doença não provoca a morte da planta mas a torna bastante debilitada e improdutivas.(Evans, 1978, Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991).

O fungo *Crinipellis perniciosa* é um basidiomiceto da ordem Agaricales e da família Agaricaceae responsável por causar a doença Vassoura-de-Bruxa em cacauero, *Theobroma cacao* L., (Pigler, 1978) e infecta outras espécies da família Sterculiaceae como *Theobroma bicolor* Humb, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma obovatum* Klotz ex Born, *Theobroma microcarpum* Mart, *Theobroma subinatum* Mart, *Theobroma speciosum* Wild, *Herrania albiflora* Gudot, *Herrania nitida* Poepp, *Herrania purpurea* Pitter e *Sterculia*

speciosa Schum, sendo especializado para membros da família Sterculiaceae (Evans, 1978). Também infecta as espécies *Bixa orellana* (Urucum) (Bastos e Anderbhran, 1986), *Solanum rugosum* Dun e *S. lasiantherum* v Heurck, (Bastos e Evans, 1985), *Athanaea aff pagogena* Moric, (Bastos et al., 1991), *Entata gigas* (L.) Falk e Rendle (Evans, 1978) e *Solanum paniculatum* (Silva et al., 1992)..

Durante o ciclo de vida, o fungo *C. pernicioso* apresenta dois estágios de vida: um biotrófico ou parasítico e o estágio saprofítico ou necrotrófico. O primeiro estágio é o que infecta os tecidos vivos e desenvolve os sintomas de Vassoura-de-Bruxa. Após a paralisação dos processos fisiológicos da planta o fungo desenvolve o segundo estágio invadindo e matando as células dos hospedeiros (Lawrence, Campêlo e Figueredo, 1991).

Na fase saprofítica o patógeno desenvolve corpo de frutificação, basidiocarpo, onde são produzidos os basidiósporos responsáveis pelo processo infeccioso. O tamanho do píleo do corpo de frutificação é de 5 a 20 mm e o estirpe variando de 2 a 10 mm.

Os três variantes morfológicos do fungo são classificados segundo a coloração do píleo. Sendo o variante *pernicoso* o primeiro a ser identificado e apresenta o píleo de coloração vermelho escuro; isolados com basidiocarpo grande e de coloração vermelho claro é característico do variante *ecuadorensis* e isolados com píleo de coloração amarela caracterizam os isolados do variante *citriniceps*, ambos coletados do Equador (Pegler, 1978). As diferenças morfológicas não interferem na patogenicidade do fungo.

As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são alta umidade relativa do ar e incidência constante de chuvas, não sendo a altitude fator limitante para o seu desenvolvimento. A intensidade e a periodicidade das chuvas são fatores importantes para a indução da frutificação, liberação, germinação dos basidiósporos e a infecção. O desenvolvimento ótimo da doença ocorre em regimes pluviométricos de 1.500 mm a 2.300 mm distribuídos uniformemente durante o ano. A liberação dos basidiósporos ocorre com umidade relativa do ar acima de 90% sendo que o efeito de temperatura é pouco conhecido (Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991).

A disseminação acontece após a liberação dos basidiósporos na atmosfera no período da noite com a queda de temperatura e aumento da umidade relativa do ar. O transporte dos esporos é realizada por correntes de vento sendo viáveis por uma hora já que são sensíveis a desidratação que sofrem na atmosfera, assim o espectro de disseminação dos esporos para grandes distâncias é restrito. O basidiocarpo tem a duração de 3 dias após atingir a maturidade em condições favoráveis porém um ramo infectado pode gerar em média 30 basidiocarpos por semana. (Almeida, Bastos e Ferreira,1995). A doença também pode ser disseminada por sementes de frutos infectados principalmente, fruto com leves sintomas internos, pois a sementes infectadas não mostram sinais da infecção. Essas sementes infectadas são viáveis e produzem plântulas também infectadas sendo responsáveis pela disseminação da doença a longa distância (Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991)

O controle da doença com produtos químicos é de difícil viabilidade pelo fato do basidiósporo infectar regiões da planta com crescimento ativo, sendo difícil manter uma cobertura protetora adequada de fungicidas. O uso de princípios ativos de fungicidas sistêmicos tem dado resultados em testes "in vitro" (Bastos,1989). O método de controle mais eficiente é a remoção dos ramos infectados das plantas e a destruição destes, evitando assim o inóculo na área infestada. Geralmente as podas são realizadas nos períodos de seca para diminuir a incidência de esporos na atmosfera que possam infectar os ferimentos causados pela poda e trato cultural. Os ramos infectados podem permanecer na lavoura desde que sejam picado o seu processo de decomposição acelerado evitando que o fungo desenvolva sobre o substrato, (Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991). O controle biológico é uma das soluções estudadas para o controle biológico da doença tendo enfoque os microrganismos *Thricoderma viridi*, *Cladobotryum amazonense*, *Verticillium lamellicola*, (Bastos, 1988; Bastos, 1990 e Lawrence, Campêlo e Figueredo,1991). Outra medida de controle é uso de variedades resistentes a *C. pernicioso* (Fonseca, 1990). Recentemente para as lavouras de cacau a CEPLAC obteve vários clones com tolerância a doença. (Ver Artigo).

2 REVISÃO

O fungo *C. pernicioso* possui grande variabilidade de hospedeiros e permite a diferenciação dos isolados em quatro grupos de biótipos de acordo com o hospedeiros que infectam. Sendo biótipos de cacau (C-biotipo) isolados que infectam *Theobroma* spp e *Herrania* spp, biótipo de Solanácea (S-biotipo) isolados que infectam membros da espécie solanácea, biótipo de Liana (L-biotipo) isolados que são predominante saprofítico e que colonizam um grande número de substratos e o biotipo de *Bixa* (B-biotipo) isolados que infectam *Bixa orrelana*, (Hedger, Piking e Aragundi, 1987). Dos quatro grupos, o C-biotipo que é o que tem maior importância econômica pois é o que causa perdas nas lavoura de cacau tendo grande importância o estudo deste biótipo.

Varias metodologias têm sido aplicadas para classificar diferentes grupos, como características morfológica dos isolados, características de crescimento em meio de cultura, compatibilidade vegetativa, reações bioquímicas, degradação de lignina e indução de sintomas em plântulas em cultivares de *Theobroma cacao* e outras *Theobroma* spp, Bastos et al. (1988), Wheller e Mepsted (1988), McGeary e Wheller (1988) e Andebhram e Furtek (1994).

Bastos et al. (1988) classificaram os isolados de *C. pernicioso* de acordo com os hospedeiros e através de reações cruzada de patogenicidade. Distribuindo os isolados em grupos como altamente patogênicos ao cacau e algumas espécies de *Theobroma*; isolados moderadamente patogênicos ao

cacau e altamente patogênico a algumas espécies de *Theobroma* e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu); e isolados de fraca patogenicidade a espécies de *Theobroma*, mas altamente patogênicos a *Herrania* spp e solanáceas. Wheller e Mepsted (1988) avaliaram isolados de cacau da região Amazônica com teste de patogenicidade e os distribuiu em um grupo os isolados do Equador, Bolívia e Colômbia, e em outro grupo, os isolados do Brasil, Trinidad-Tobago e Venezuela, sendo o primeiro grupo mais agressivo que o segundo. McGearly e Wheller (1988) por teste de compatibilidade somática reuniu 87 isolados da América do Sul e Caribe de *C.perniciosa* em 6 grupos e os resultados foram semelhantes aos teste de patogenicidade.

Usando marcadores moleculares do tipo RAPD, Andebhram e Furtek (1994) separaram os isolados de *Solanum rugosum* em um único grupo. Os isolados de *Theobroma cacao* suscetíveis a Vassoura-de-Bruxa agruparam-se com os isolados de *Bixa orrelana* e em outro grupo, reuniram-se os isolados de *Theobroma* spp, *Herrania* e *Theobroma cacao* resistente a doença, concluindo que a proximidade genética é mais importante que espécies de hospedeiros para determinar relações entre isolados de *C.perniciosa*.

O uso testes serológicos para identificação e caracterização de patógenos de plantas tem se aplicado com grande êxito, tanto para teste de diagnose de forma rápida e eficiente como para estudos acadêmicos de identificação e classificação de patógenos.

Rondeau, Malandri e Samsom (1996) diferenciaram patovares de *Pseudomonas syrygae* com os anticorpos policlonais contra proteínas de flagelo, denominados de H1 e H2. Nas reações de imunofluorescência com os

isolados de vários patovares de *P. syrygae* e outras *Pseudomonas* spp, foram classificados em dois grupos: um grupo que reagiu com o soro tipo H1 (*P. syrygae* pv aptata, *P. syrygae* pv helianthi, *P. syrygae* pv pisi, *P. syrygae* pv syringae) e outro grupo reagindo com o soro tipo H2 (*P. cichori*, *P. syrygae* pv delphini, *P. syrygae* pv glicynea, *P. syrygae* pv lacrimans, *P. syrygae* pv phaseolicola, *P. syrygae* pv tabaci, *P. syrygae* pv tomato e *P. viridiflava*). Os resultados obtidos foram confirmados com a nova classificação de espécie, por homologia de DNA, para o gênero realizado por Garrdan et al (1994) e Shaffik (1994) demonstrando que os serotipos H1/H2 podem distinguir os grupos taxinômicos.

Teste de ELISA de *Sclerospora graminicola* (Sacc) Schoet associado a géis de proteína (Kumar Shishupala e Shetty, 1993), evidenciaram e identificaram as raças 1, 2, 3 e 4 destes patógeno. O soro policlonal contra as proteínas reagiram somente com bandas no gel presente para as raças 1 e 2, e não apresentou reação em proteínas da raça 4. Para a raça 3 houve reação cruzada porém a quantificação da proteína demonstrou concentrações inferiores aos do isolados 1 e 2. Realizando teste de patogenicidade na variedade HB3, foi demonstrada que as raças 1 e 2 são patogênicas, a raça 3 apresenta sintomas atenuados e a raça 4 não expressou sintomas nessa variedade, concluindo que a patogenicidade e pode estar ligada a presença da proteína identificada por serologia.

Matthew e Brooke (1991) diferenciaram os grupos AG 8 de *Rhizoctonia solani* dos grupos AG 2-1, AG 3 e AG 4 com reação de anticorpo policlonal contra proteínas secretadas por cada grupo. O padrão de reação para proteínas

nos géis foi diferente para cada grupo, sendo que cada um apresentava um padrão próprio que pode ser utilizado para comparação entre isolados desconhecidos. Como teste de campo, esse procedimento não pôde ser aplicado pois a reação do soro policlonal não foi específica para um único grupo.

Roberts e Ambler (1988) com uso de anticorpo monoclonal e hibridação de DNA confirmaram resultados anteriores obtidos com soro policlonal que apontavam proximidade genética entre as espécies da bactéria *Pseudomonas solanacearum* como a bactéria causadora da doença "Sumatra" , em *Syzygium aromaticum*, diferente dos resultados obtidos através de testes microbiológicos como coloração Gram, velocidade de crescimento, tolerância a temperatura e concentração de NaCl, que os caracterizavam como espécies distintas.

Baharuddin, Ruldolphh e Niepold (1994) diferenciaram o patógeno causador da "Blood Disease Bacterium" (BDB) em bananeiras de *Pseudomonas solanacearum*, causadora do "Moko", que apresentam sintomas semelhantes da BDB. O soro policlonal produzido contra células em suspensão da bactéria causadora da BDB foram testados para bactérias dos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e isolados de BDB em bananeira infectadas. A reação foi realizada em gel de corrida de proteínas das bactérias havendo reação cruzada apenas para uma única banda de proteína da bactéria *P. solanacearum*. Posteriormente obteve-se soro policlonal monoespecífico para a proteína identificada que nos novos testes não reagiram com o padrão proteico da *P. solanacearum*. Extratos coletados de bananeira inoculados com *P. solanacearum* desenvolveram colônias em meio de cultura, porém o soro

monoespecífico não apresentou reação de imunofluorescência para colônias desenvolvidas a partir do extrato.

O soro policlonal pode ser aplicado para obtenção de teste de diagnóstico a campo pois são mais rápidos que as práticas convencionais.

O diagnóstico com simulação de infecção e isolamento do patógeno em cultura pura, observando de característica morfológicas ou fisiológicas que identifique o patógeno avaliado, pode ser demorado e esse prazo de tempo pode ser crucial para definição das estratégias de controle do patógeno ou dificultar a comercialização de mudas ou sementes que devem apresentar certificação de fitossanidade. Como por exemplo, o diagnóstico de "pox", causado por *Streptomyces ipomoea*, em batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), pode demorar até 4 semanas, pois o procedimento requer isolamento do patógeno em cultura pura e realização de teste patogenicidade do isolado. Assim Moyer e Echandi (1986) obtiveram soro policlonal contra células da bactéria, *Streptomyces ipomoea*, que não produziu reação cruzada para outras raças de *Streptomyces ipomoea* e outras espécies.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados

Os isolados de *C. pernicioso* são provenientes da micoteca da Secção de Fitopatologia do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC), em Ílhéus, BA e os isolados de *Verticillium fungicola*, *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum* foram cedidos pela Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP. A relação dos isolados e os códigos usados neste trabalho seguem na tabela 1.

Imunização dos coelhos

Um coelho fêmea da raça Nova Zelândia com 2 meses de idade foi imunizado com suspensão de micélio (0,1 g de micélio do isolado CP-85 de *C. pernicioso*) em PBS a intervalos de 15 dias, sendo a primeira imunização com adjuvante Completo de Freund na proporção de 1:1 e as imunizações subsequentes apenas com o patógeno diluído em PBS. Antes de cada imunização, uma alíquota do sangue foi retirada da orelha para obtenção do soro e titulação. Passado 15 dias após a quarta imunização, o coelho foi sacrificado e sangrado. O sangue coletado foi centrifugado após descanso por uma hora a 37 °C para obtenção do soro policlonal .

3.2 Ensaio imunoenzimático

A titulação dos soros de coelho foram feitas numa primeira etapa, através de ensaio imunoenzimático. Resumidamente, as placas de polivinil de 96 orifícios foram sensibilizadas com suspensão de micélio em diferentes diluições colocando-se 50µl por poço, sendo incubadas por 1 hora a 37 °C.

Após a sensibilização, os sítios ativos remanescentes do plástico foram bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (PBS e 1% BSA) por poço, por mais uma hora a 37 °C, batendo-se a placa após este período para descarte do líquido em excesso. Em seguida diluições dos soros de coelho contra *C. pernicioso* (a serem testados), foram adicionados às placas, nas diluições pré-estabelecidas, em duplicatas, e incubados por uma hora a 37 °C.

Os orifícios foram então lavados com 200µl de PBS-T-G por 3 vezes. A placa foi seca batendo-se em papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, fez-se a incubação, uma hora a 37 °C, com conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase ("blotting grade affinity purified goat anti-rabbit IgG (H+L) human IgG adsorbed horseradish peroxidase conjugate" - Bio Rad). Após mais 3 lavagens com PBS-T-G, como descrito anteriormente, a reação foi revelada com orto-fenilenodiamina (OPD) contendo H₂O₂, diluído em tampão de OPD, no escuro por 2 a 3 minutos, quando foi bloqueada com solução "stopper" de OPD, procedendo-se a leitura em leitor de placa de ELISA, a 492 nm. Os ensaios foram realizados com o suspensão de micélio de *Verticillium fungicola*, *Alternaria solani* e *Fusarium*

oxyssporum, da mesma forma descrita acima, para se testar o nível de reações cruzadas que os soros apresentam.

Para se obter a quantidade ideal de antígeno a ser colocado, bem como a diluição mais apropriada dos soros a serem testados, foram realizados diversos ELISAs, partindo de concentrações de 4 a 20 µg/ml do soro purificado, variando a diluição do soro bruto de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 para se chegar à quantidade ideal de soro que melhor reage no ensaio estabelecido. A quantidade de anti-IgG de coelho marcado com peroxidase foi também estabelecida para 1: 2000.

3.3 Purificação de soro de coelho anti *C. perniciosus* em Proteína A

O soro de coelho foi purificado em uma coluna de sefarose-proteína A (Affi-gel protein A agarose, Bio-Rad, cat. no. 153-6153) segundo o procedimento abaixo (OI & HEZENBERG, 1980): a coluna, preparada com 5 cm, foi lavada com 100 ml de uma solução de Tris-HCl, pulsionada por bomba peristáltica. O soro foi preparado, antes de passar na coluna, adicionando-se para cada 1,5 ml de soro, 4 ml da solução de Tris-NaCl e filtrado em membrana millipore de 0,22µm.

Em sistema fechado, 5,5 ml da solução contendo o soro foi passado, por duas horas pela bomba peristáltica. Após este período, a coluna foi lavada com

100 ml de tampão Tris-NaCl para a remoção das impurezas contidas no soro, ficando retidos na coluna, apenas imunoglobulinas do tipo IgG.

O eluato foi então recolhido passando-se em tampão Glicina-NaCl, em alíquotas de 2 ml em 10 tubos contendo 50 µl do tampão Tris-HCl. O tubo controle recebeu 50 µl do tampão Tris-HCl mais 2 ml de tampão Glicina.

De cada tubo foi retirada uma alíquota de 20µl para realização do teste de quantificação proteica (BRADFORD, 1978), utilizado como indicador, ou seja, como um teste qualitativo. Este teste foi realizado colocando-se os 20 µl de cada tubo mais 200 µl do reagente Coomassie-blue em placa de 96 orifícios. Os tubos correspondentes às amostras dos orifícios que adquiriram coloração azul, foram separadas utilizados para os teste em ELISA.

3.4 Soluções utilizadas

PBS

- 8 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,15 g de Na₂HPO₄
- 0,2 g de KH₂PO₄

O volume foi completado para 1 litro com água destilada, e o pH acertado para 7,36.

Tampão de Bloqueio - TB1

- PBS
- 1% de BSA (Soro Albumina Bovina)

Tampão PBS-T-G

- PBS
- 0,05 % de Tween 20
- 0,25 % de gelatina

Tampão de OPD

- 12,15 ml de ácido cítrico 0,4 M
- 25,7 ml de Na_2PO_4 0,4 M
- 300 ul de H_2O_2 30 vol.

O volume foi completado para 200 ml com água destilada e o pH foi acertado para 5,3, ficando armazenado no escuro a 5°C.

"STOPPER" para OPD

- H_2SO_4 4N
- 0,5 % de Na_2SO_3

Tampão Tris-NaCl

- Trizma Base 0,05 M

- NaCl 0,15 M

Acertado o pH para 8,2.

Tampão Tris-HCl

- Trizma Base 1 M

Acertado o pH para 9,0 com HCl.

Tampão Glicina

- Glicina 50 mM

- NaCl 0,15 M

Acertado o pH para 3,0.

4 RESULTADOS

Na Figura 1, foram exemplificadas as curvas de Densidade Ótica a 492 nm, dos soros coletados ao longo do tempo do coelho. Por esta Figura, podemos observar que a curva acompanha as diluições de soro de maneira suave.

O soro bruto coletado foi utilizado em ensaios imunoenzimáticos nas diluições de 1:800, 1:1600 e 1:3200. Foram realizados os teste para os isolados de cacau (tabela 1) e contra isolados das espécies de *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* e *Verticillium fungicola*, denominados de teste negativo. As reações em relação às diluições avaliadas apresentaram um padrão constante de resposta porém em alguns casos o aumento da diluição não resultou em menor reatividade do soro com a suspensão de micélio ou não houve alteração considerável da resposta entre diluições para cada isolado. As diluições 1:1600 e 1:3200 não reagiram com os teste negativos apenas a diluição 1:800. A diluição 1:800 apresentou reação cruzado com o isolado de *Fusarium oxysporum* caracterizando uma falta de especificidade para o soro policlonal.

O soro bruto foi purificado, quantificado e testado novamente contra os isolados de cacau e contraos teste negativos. As concentrações testadas foram de 10, 15 e 20 μg de IgG / ml. As resposta imunoenzimáticas foram reduzidas com a diminuição da concentração de IgG do soro mas em alguns casos não ocorreu alteração na resposta entre as diluições para um isolado ou ocorreu um aumneto da reação imunoenzimática (Grafico 2). Os resultados dos testes ELISA do soro purificado não apresentou nenhuma reação cruzada com os teste negativos, demonstrando maior especificidade do soro purificado e concentração escolhida para estudo foi 10 μg de IgG/ ml.

A classificação dos isolados foi feita através de agrupamento do isolados que tinha resposta nos intervalos de a cada variação de 0,2 na leitura D.O. iniciando da leitura zero. O agrupamento não seguiu nenhum parâmetro estatístico e apenas foi utilizado para fins didático. A distribuição dos isolados no grupo segue um comportamento aleatório sendo que isolados de biótipos diferentes apresentavam respostas imunoenzimáticas próximas ou semelhantes. Na formação dos grupos, isolados de um mesmo biotipo foram distribuídos em todos espectros de leitura que variavam 0,2, principalmente os biótipos de Cacau que foram representados em maior número .

5 DISCUSSÃO

O soro bruto foi considerado para identificação e classificação dos isolados de *C. perniciosa* por apresentar resposta cruzada com um dos testes negativos. Assim foi considerado os resultados do teste ELISA para o soro purificado (gráfico 3).

A avaliando o gráfico não foi obtido nenhum grupo definido que agrupa-se os isolados do mesmo biotipo, tendo isolados do biotipo Cacau em grupos com diferentes respostas ao soro contra *C. perniciosa*. Também isolados de diferentes biotipo apresentaram reação semelhante ou próximas para o soro contra *C. perniciosa*.

A grande importância da dispersão aleatório dos isolados do biotipo de cacau é que podemos de alguma forma poder detectar diferenças entre isolados do biotipo cacau. Os diferentes níveis de resposta pode estar relacionado a grande variabilidade patogênica presente neste grupo. Assim utilizando metodologias aplicadas por (Kumar Shishupala e Shetty, 1993), associando genes de corrida de proteína com Teste ELISA podemos identificar uma proteína específica responsável por tal processo e obtenção de um soro policlonal monoespecífico (Baharuddin, Ruldolph e Niepold, 1994) e podendo aplicar uma tecnologia mais cara e amplamente utilizada que é a obtenção de anticorpo monoclonal porém com previo estudo que grupos ou isolados pretende se identificar.

O soro policlonal pode ser aplicado para teste de diagnóstico rápido pois apresenta especificidade para com o fungo *C. perniciosa* e apresenta um grande espectro reação para os isolados do biotipo cacau.

6 CONCLUSÃO

Os ratos produziram soro que identifica e classifica os isolados de *C. perniciosa*.

O soro bruto não é específico para *C. perniciosa*, já que teve reação cruzada com *Verticillium fungicola*.

O soro purificado é específico para vassoura-de-bruxa e diferencia isolados de *C. perniciosa* e não reage com os teste negativo.

O soro purificado apresenta diferentes reações para os isolado de *C. perniciosa* porém a formação de grupo não respeita nenhum padrão, como por exemplo o soro não reage semelhante mente para isolados de um mesmo biotipo ou espécie de hospedeiro. Para patogenicidade podemos apenas supor e realizar novos estudo tendo com foco esse parâmetro.

TABELAS

Legenda	Isolado	Hospedeiro
1	CP-12	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
2	CP-6	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
3	CP-22*	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
4	CP-106	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
5	CP-21 *	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
6	CP-37	Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i>)
7	Verticilium	
8	CP-85	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
9	<i>Alternaria solani</i>	
10	CP-38	Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i>)
11	CP-93	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
12	CP-23*	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
13	CP-24*	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
14	<i>Fusarium oxysporum</i>	
15	CP-102	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
16	CP-20	Solanácea
17	CP-27*	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
18	CP-30	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
19	CP-36	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
22	CP-80	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
23	CP-83	Herrania nitida
24	CP-98	Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)
25	CP-104	Pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>)
26	CP-108	Caiçara
27	CP-114	JURUBEBA (<i>Solanum paniculatum</i>)
28	CP-Cam	CACAU (<i>Theobroma cacao</i>)

Isolados da região Amazônica

TABELA1

Titulações das Coletas do Soro de Coelho

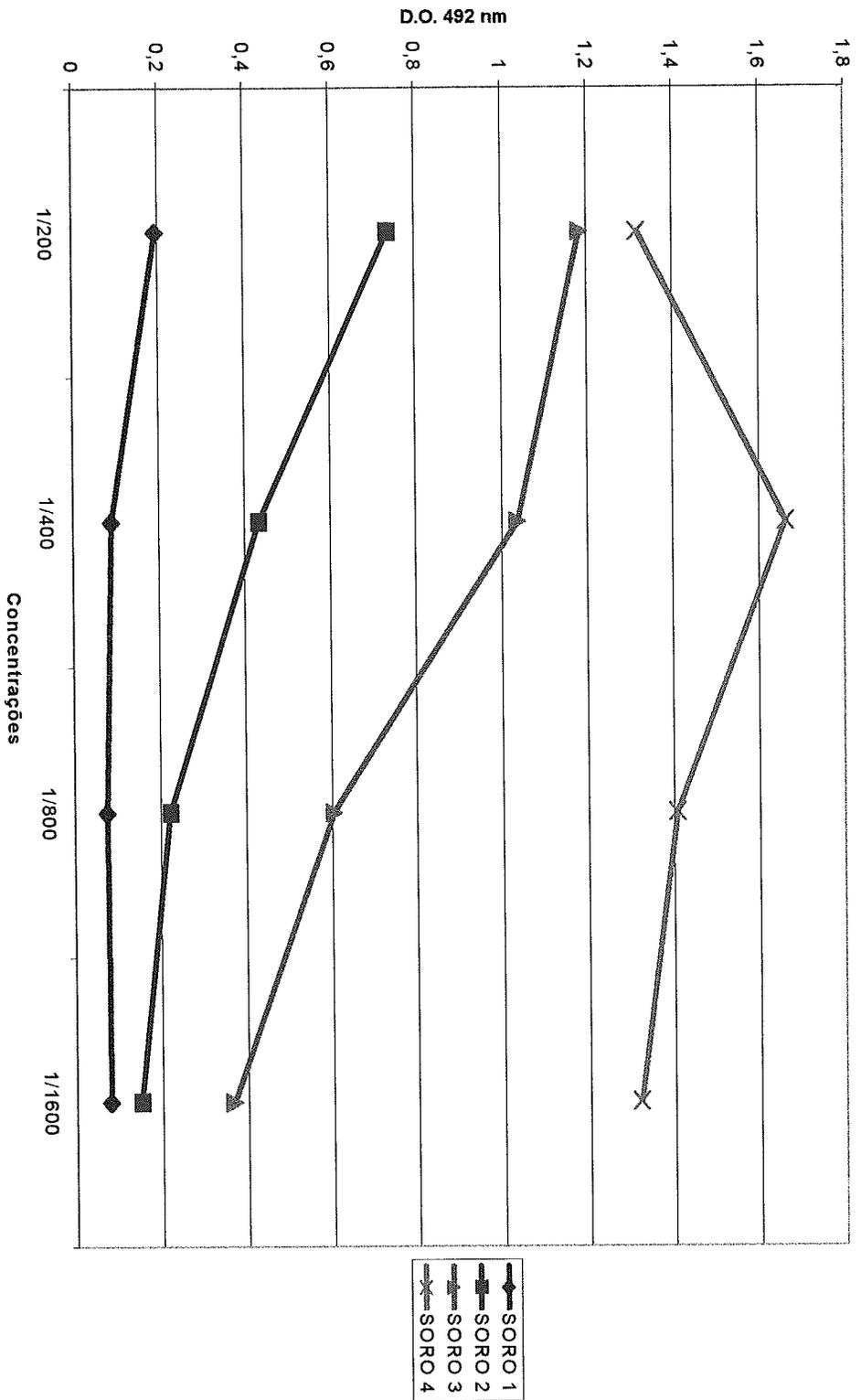


GRÁFICO 1

Teste ELISA com Soro Purificado em Três Concentrações

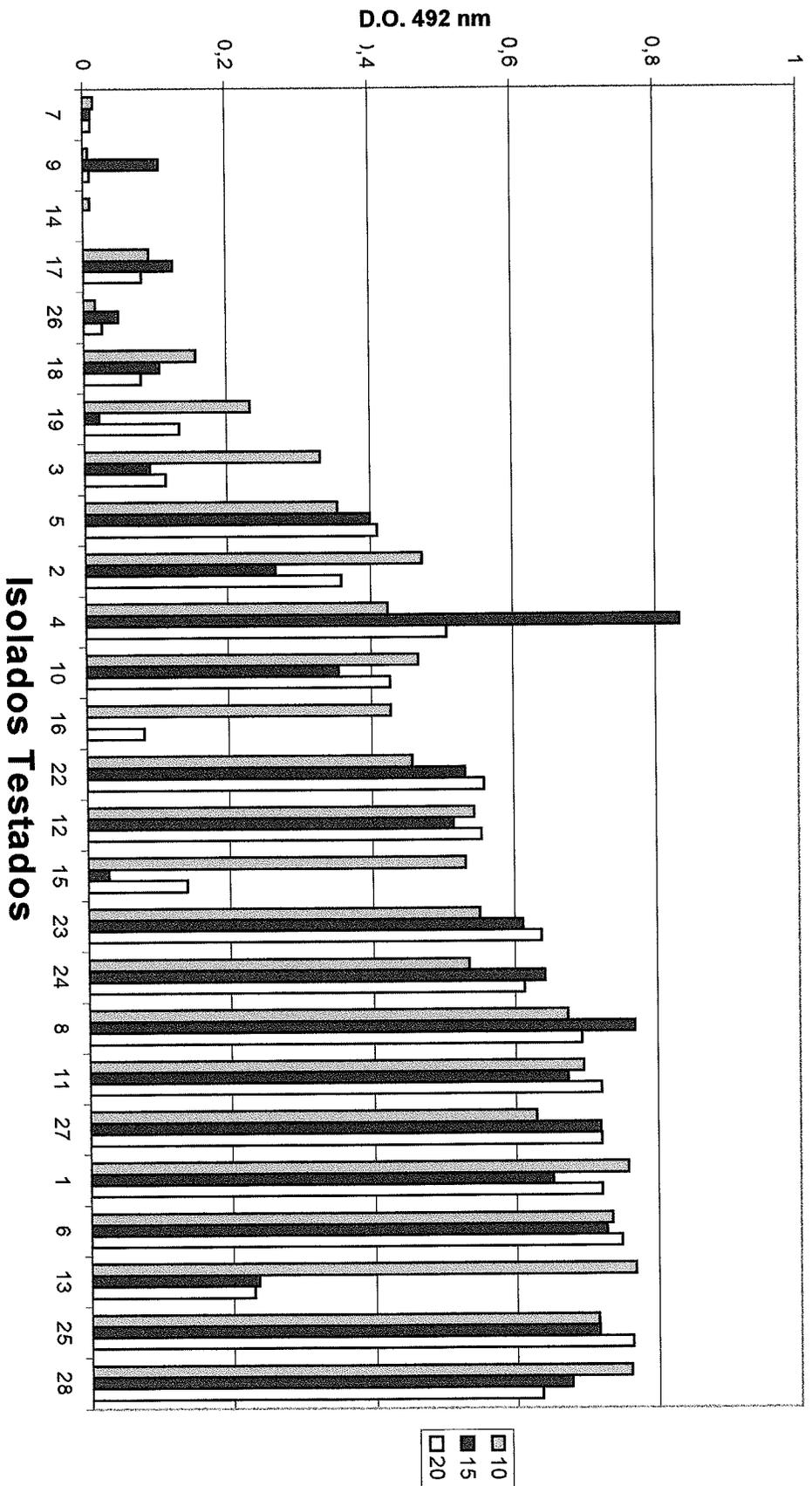


GRÁFICO 2

Isolados Testados

Teste ELISA com Soro Bruto em Três Diluições

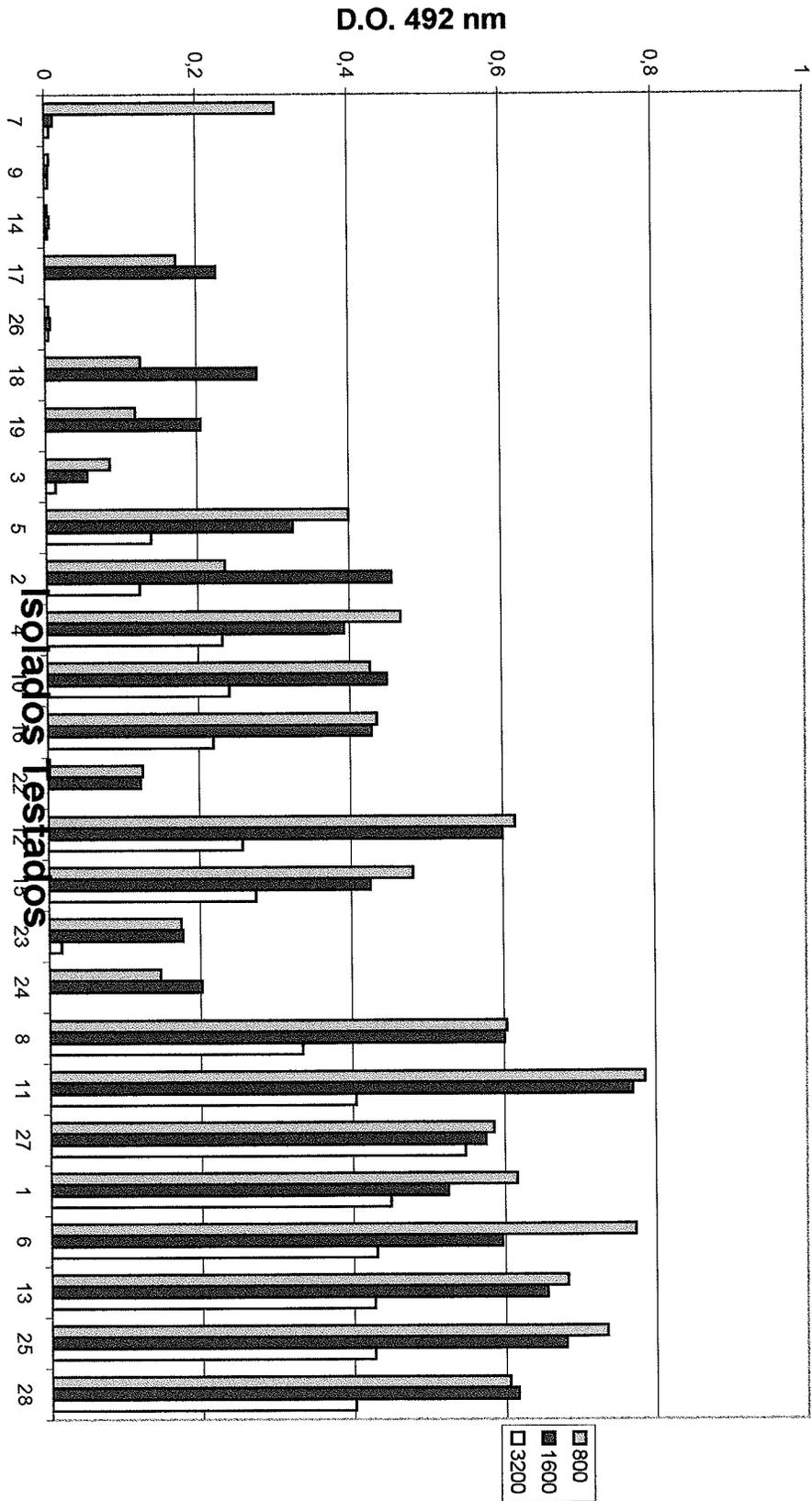


GRÁFICO 3

Soro Bruto Dil. 1/800

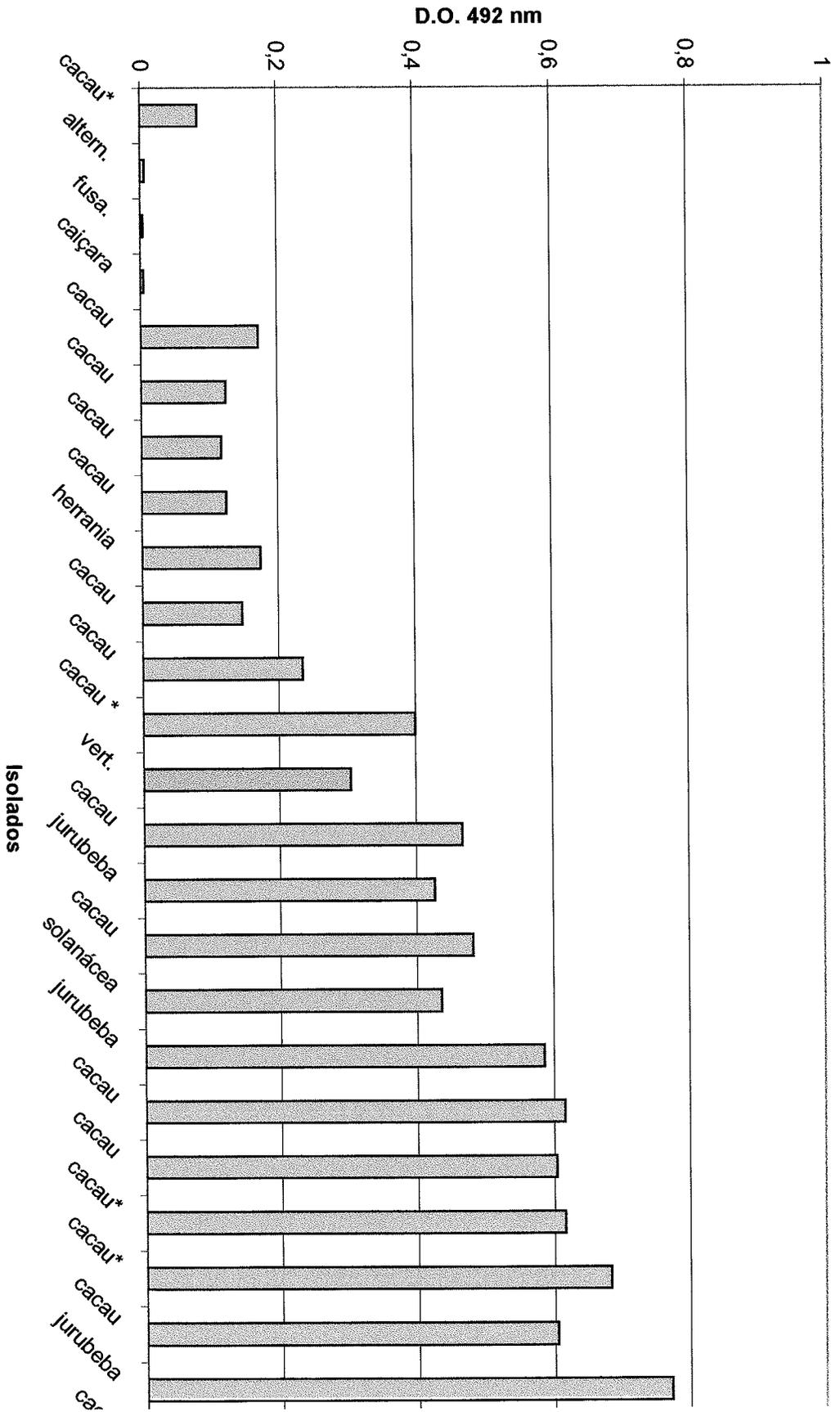


GRÁFICO 4

Soro Purificado 10 ug

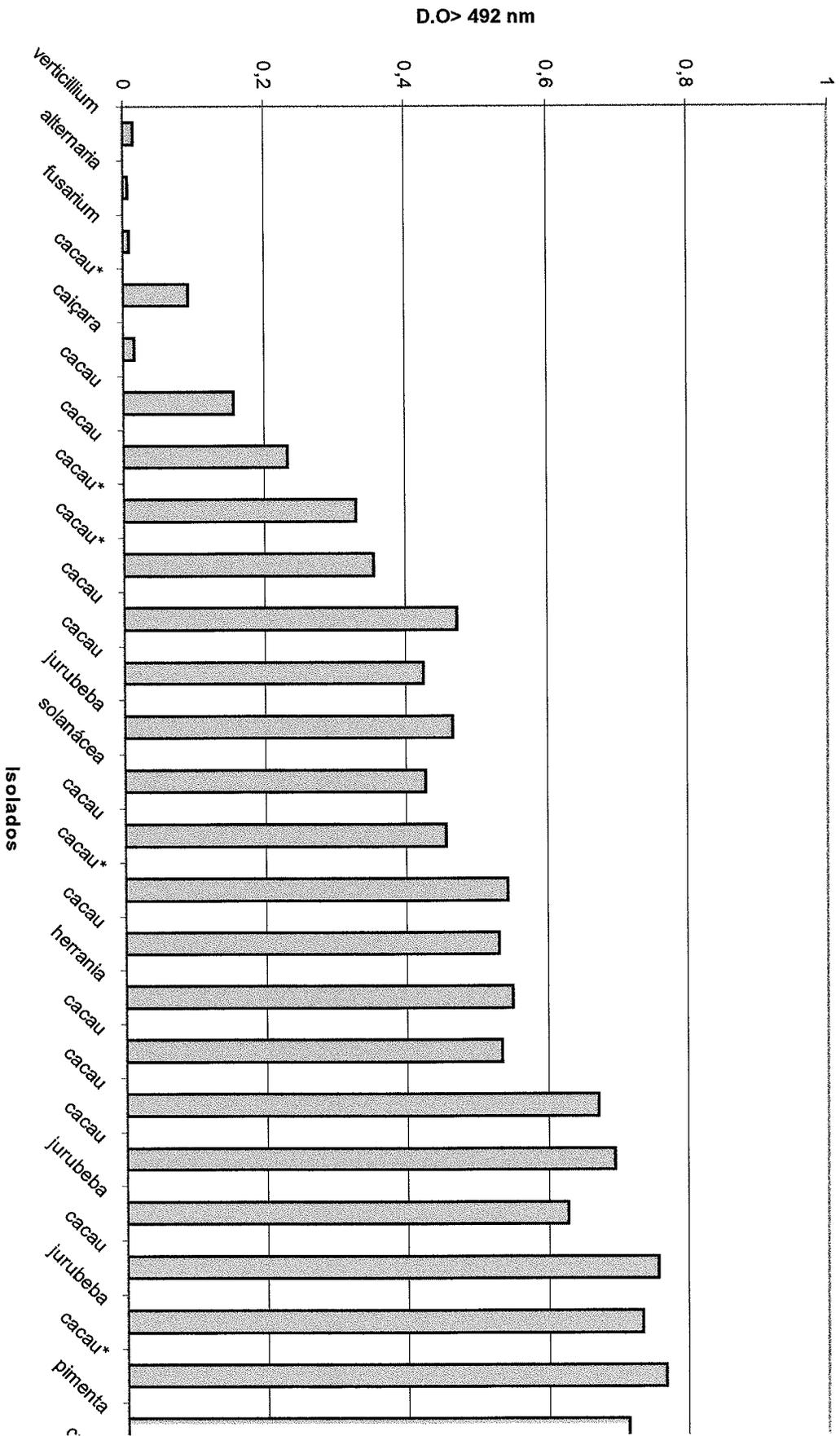


GRÁFICO 5

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, L. C.; BASTOS, C. N.; FERREIRA, N. P. Produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* em dois sistemas de cultivo do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, 20, 1, 60-64, 1995.
- ANDERBHRAN, T., FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of *Crinipellis pernicioso* isolates from different host. **Plant Pathology**, 43, 1020-1027, 1994..
- BAHARUDDIN, B.; RUDOLPH, K. and NIEPLOD, F. Production of monospecific antiserum against the wood disease bacterium affecting banana and plantain. **Phytopathology**, 84, 6, 570-575, 1994.
- BASTOS , C. N., EVANS, H. C. A New pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witch's broom disease) on solonaceous hosts. **Plant Pathology**, 34, 306-312, 1985.
- BASTOS , C. N., ANDERBHRAN, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie da Vassoura de Bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do Cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, 13, 3, 963-965, 1986..
- BASTOS, C. N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Tricoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, 13, 4, 340-343, 1988.
- BASTOS, C. N.; ANDERBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. Comparação morfológica de isolados de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, 13, 3, 202-206, 1988.

- BASTOS, C. N. Avaliação de fungicidas sistêmicos no controle da vassoura-de-bruxa do cacau. **Agrotrópica**, 1, 2, 128-132, 1989.
- BASTOS, C. N. Patogenicidade e caracterização do isolado de *Crinipellis perniciosa* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, 15, 4. 344-346, 1990.
- BASTOS, C. N. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) (Stahel) Singer. Ilhéus, Itabuna, Brasil, CEPALC/CEPEC. **Boletim Técnico** n.º 168, 21, 1990.
- BASTOS, C. N., SILVA, S. D. V. S.; ALMEIDA, O. C. de. 1991. Ocorrência de vassoura de bruxa em solanáceas silvestre na região produtora de cacau da Bahia. **Agrotrópica** 3 (2): 109-110.
- EVANS, H. C. 1978. Witches' Broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador: 1. the fungus. **Annals of Applied Biology**, 89: 185-92.
- FONSECA, S. E. A. Avaliação da resistência a *Crinipellis perniciosa* em novos clones de *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, 2,3, 137-143, 1990.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the Witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, 72, 278-289, 1994.
- GUILLOT-RONDEAU, C.; LAURENCE, M. and SAMSON, R. Identification of serological flagellar types (H1 and H2) in

- pseudomonas syringae* pathovare. **European journal of plant pathology**, 102: 99-100, 1996.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V., and ARAGUNDI, J. N. Variability of population of the Witches broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicios*a). **Transact. British Mycological Society**, 88, 533-546, 1987.
- DUARTE, K. R.
- KUMAR, V. U.; SHISHUPALA, S. and SHETY, H. S. Serological for the occurrence of races in *Sclerospora graminicola* and identification of race-specific surface protein involved in host recognition. **Canadian Journal Botanic**, 71:11, pg 1467-1471, 1993.
- LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacauzeiro. II-doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, 3, 1, 1-14, 1991.
- MATTHEW, J. S.; BROOKER, J. D. The isolation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies to anatomosis group 8 of *Rhizoctonia solani*. **Plant Pathology**, 40, 67-77, 1991.
- McGEARY, F.M. and WHELLER, E. J. Growth rates of and mycelial interaction between isolates of *Crinipellis pernicios*a from cocoa. **Plant Pathology**, 37, 489-498, 1988.
- MOYER, J. W. and ECHANDI, E. Serological detection and identification of *Streptomyces ipomoea*. **Plant Disease**, 70, 6, 516-518, 1986.

- NOGAMI, O. Cacao : o fruto de ouro. **Universitário de Agronomia**, 2, 7, 4-7, 1991
- OI, V. T. & HERZENBERG, L. A. Antibody purification: protein A-sepharose column chromatography. In: MISHELL, B.B. & SHIIGI, S. M. Selected methods in cellular immunology. 1o. ed., San Francisco, Freeman, 1980. p. 368-70.
- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J.M.; DE ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura de bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica** ,1,1, 79-81. 1985.
- ROBERTS, S. J. and AMBLER, D. J. Progress with identification methods for a fastidious xilem-limited bacterium which causes sumatra of cloves in indonésia. **Acta Horticulturae**,225,103-107,1988.
- SILVA, S. D. V. S.; GRAMACHO, K.P.; ALMEIDA, O. C. de. *Solanum paniculatum* Hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. **Agrotrópica**, 4 ,1 , 17-20, 1992.
- WELHER, B. E. J., MEPSTED, R.. Pathogenic variabilit amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Teobroma cacao*). **Plant Pathology**, 37,: 475-488, 1988.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

Cacau, Manjar dos Deuses. Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia.

Instituto do Cacau da Bahia. Comissão do Comércio do Cacau, 33 p.

Dezembro(1953).

GRAMACHO, I da C. P., MAGNO, A. E. S., MANDARINO, E. P. e

MATOS, O. Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia. Ilhéus ,

CEPLAC. 124 p.

MENEZES, J. A. de S. A modernização do agrobusiness cacau.

Fundação Cargill, 1991. 223p.

HARAY, F. Manual del Cacao, cap 24 pg 333-357, Turrialba; Costa Rica (1961).

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Fitoplasmas:

Agente Etiológico de Certas Doenças de Plantas.

Aluna: Juliana Abreu Giacomeli
Prof. Orientador: Ivan P. Bedendo

1.Introdução:

Micoplasmas são microorganismos causadores de doenças de plantas do tipo PPLO (=pleuropneumonia - "like organisms") em bovinos e caprinos.

Micoplasma em planta, foi descoberto em 1967, por um grupo de pesquisadores japoneses da Universidade de Tóquio. Eles obtiveram evidências de que certas doenças de plantas, conhecidas por amarelos, até então consideradas de etiologia viral, eram causadas por microorganismos semelhantes aos micoplasmas encontrados em animais, denominados MLOs.

Após anos de estudo, esses microorganismos, presentes no floema de plantas, passaram a ser chamados de fitoplasmas (1994). São organismos unicelulares, procariotos e não possuem parede celular, apresentando assim, um alto grau de pleomorfismo.

As doenças atribuídas aos fitoplasmas são caracterizadas por uma série de anormalidades relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, sugerindo a ocorrência de profundos distúrbios no balanço hormonal, atingindo uma enorme gama de espécies de hospedeiros naturais e insetos vetores.

2.Deteção e Identificação:

A observação cuidadosa dos sintomas continuará sendo uma etapa preliminar importante para deteção e identificação de fitoplasmas, porém a existência de hospedeiros que não exibem sintomas, a presença de infecção provocada por mais de um fitoplasma em único hospedeiro e a ocorrência de insetos vetores ainda desconhecidos, enfatizam a necessidade de métodos sensíveis, rápidos e seguros que permitam a deteção de fitoplasmas.

A deteção em plantas visa evidenciar a natureza do possível agente etiológico associado a um determinado quadro sintomatológico exibido pela planta doente.

Vários métodos e testes têm sido empregados na tentativa de se detectar a presença de fitoplasmas em plantas. Entre eles, podem ser citados a coloração DAPI, secções ultrafinas em microscopia eletrônica, a serologia, as técnicas moleculares utilizando DNA, os métodos biológicos de transmissão por enxertia e por insetos vetores e o uso de antibióticos visando a remissão da doença.

O uso recente de PCR (Reação em cadeia por Polimerase) para deteção de fitoplasma, combina as vantagens da serologia com a alta sensibilidade do PCR baseado no DNA.

A identificação permite diferenciar ou reunir em grupos os fitoplasmas com características divergentes ou comuns, envolvendo o uso de metodologias mais complexas e sensíveis como a serologia e as técnicas de homologia de DNA (PCR; RFLP).

3.Sintomatologia:

Os sintomas mais comumente associados aos fitoplasmas manifestam-se na forma de clorose, redução do tamanho das folhas, superbrotamento ou proliferação de brotações (vassoura-de-bruxa), deformação de órgãos florais, como gigantismo do cálice e redução do tamanho das flores, esterelidade de flores, enfezamento da planta, necrose do floema e declínio generalizado.

Dois sintomas em particular estão associados aos fitoplasmas: a virescência (desenvolvimento de cloroplastos nas pétalas resultando em flores verdes) e a filodia (transformação de órgãos florais em estruturas foliares), resultante de distúrbios hormonais causados pelos fitoplasmas.

Até o momento não foi possível cultivar fitoplasmas em meio de cultura, implicando na impossibilidade de conduzir testes de patogenicidade para provar que estes microorganismos são agentes causais de doenças. Mesmo assim, são constantemente detectados em plantas sadias (da mesma espécie das doentes).

4.Suscetibilidade dos fitoplasmas a agentes inibidores:

Fitoplasmas têm sido resistentes a sulfa, penicilina e acetato de tálio. Por outro lado, fitoplasmas são sensíveis a numerosas substâncias relativamente inócuas a outros microrganismos como água destilada, solução fisiológica, íons metálicos, detergentes, água oxigenada (provavelmente por causa da ausência da catalase), etc.

Alguns compostos arseniacaisorgânicos têm propriedades terapêuticas. Um estudo extensivo dos efeitos dos diferentes antibióticos sobre os fitoplasmas, mostraram que a tetraciclina foi a mais eficiente em inibir o crescimento das colônias de fitoplasmas.

5. Conclusões:

A associação de corpúsculos do tipo fitoplasma, tanto em material vegetal como no inseto vetor com doenças do tipo amarelo, determinada pela microscopia eletrônica e a sensibilidade do agente causal, a tetraciclina, têm sido verificada literalmente em todo o mundo.

A aceitação do fitoplasma como agente etiológico de numerosas doenças de plantas, até então tidas como virais, deverão alterar certos conceitos estabelecidos em virologia vegetal.

A sensibilidade comprovada de algumas moléstias do grupo amarelo a antibióticos do grupo tetraciclina, oferece uma possibilidade de controle ainda não extensiva a doenças verdadeiramente virais.

6. Bibliografia:

Davis, R. E. & Bedendo, I. P. 1997. Identificação Molecular do Fitoplasma Associado ao Enfezamento Vermelho do Milho. Fitopatologia. ESALQ - USP. Piracicaba. 12p.

Davis, R. E. 1995. Fitoplasmas: Fitopatógenos Procarióticos sem Parede Celular Habitantes do Floema e Transmitidos por Artrópodes. Fitopatologia. RAPP - Volume 3. 27p.

Kitajima, E.W. & Costa, A.S. 1970. Micoplasma: Possível Agente Etiológico de Certas Moléstias de Plantas. Virologia. Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo. Ciência e Cultura. Volume 22 n°.4. 13p.

GRUPO PET-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA
RELATÓRIO PARCIAL DE ESTÁGIO
JULHO / 1998

Determinação da origem dos clones diferenciais NtGi2 e NtGi3 de raízes de fumo infectadas com *Glomus intraradices*

Aluna: Leandra Maria Scarpari

Orientador: Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

Departamento de Ciência do Solo – ESALQ/USP

1. Introdução

Micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre raízes da maioria das plantas terrestres e certos fungos do solo. As micorrizas arbusculares constituem-se na mais disseminada destas associações, ocorrendo em cerca de 80% das espécies de plantas (Cardoso *et al*, 1992).

As micorrizas arbusculares têm importância fundamental nos sistemas agrícolas tropicais, sendo uma alternativa viável para o desenvolvimento de uma agricultura auto-sustentável e de baixo custo. Essa importância se deve ao fato de ocorrer um aumento na absorção de fósforo pela planta, sendo este um elemento dos mais limitantes para a produção vegetal em solos tropicais, além de ter uma mobilidade muito baixa na solução do solo (Lambais, 1995).

Apesar disso, as alterações bioquímicas e moleculares que ocorrem durante esta interação ainda não são bem compreendidas.

Ditt (1997), em sua dissertação de Mestrado intitulado: "Clonagem molecular de genes com expressão diferencial em raízes de fumo infectadas com *Glomus intraradices*", obteve através da técnica "Display" Diferencial, dois clones de cDNA, NtGi2 e NtGi3, expressos somente em raízes de fumo micorrizadas com o fungo *Glomus intraradices*.

2. Objetivos

O presente trabalho objetivou determinar a origem dos referidos clones, identificando se pertencem ao fungo ou à planta, e confirmar sua expressão diferencial.

3. Materiais e métodos

Para a confirmação da expressão diferencial do gene, quando da micorrização, bem como a identificação da origem, foi utilizada a técnica de PCR utilizando primers internos específicos (F03 e F04, sintetizados pela Gibco).

Na reação de PCR utilizou-se 20 ng de DNA, 1 unidade da enzima Taq Polimerase e tampão da reação 1x, 4 mM MgCl₂, 0,3 mM DNTPs, e primers F03 e F04 (1 μM cada). A ciclagem utilizada foi a seguinte: um ciclo à 94°C, por 3 minutos, 29 ciclos à 94°C, por 1 minuto, à 55°C, por 1 minuto, e 72°C, por 3 minutos e um ciclo à 72°C, por 10 minutos.

Os resultados das reações foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo, após eletroforese à 55 V, por 2 horas.

4. Resultados e discussão

Com pode ser visto na figura 1, ocorreu a amplificação do fragmento de tamanho esperado (469 pb) nas amostras da planta não micorrizada e não micorrizada, não ocorrendo com o DNA do esporo do fungo micorrízico.

Para confirmar a viabilidade do DNA do esporo do fungo micorrízico, amplificou-se o mesmo com o primer aleatório OPB10.

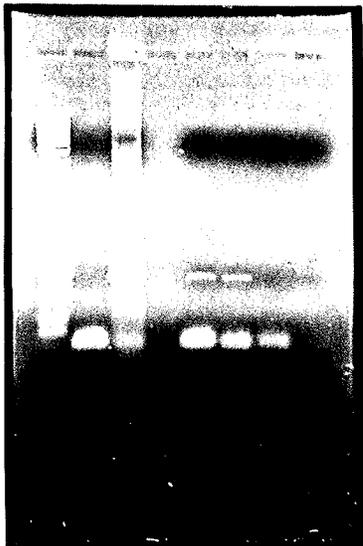


Figura 1

Canaleta 1: Marcador 1 Kb

Canaleta 2: Controle negativo (H₂O)

Canaleta 3: Controle positivo (Clone NtGi3)

Canaleta 4: em branco

Canaleta 5: DNA planta não micorrizada

Canaleta 6: DNA planta micorrizada

Canaleta 7: DNA esporo fungo micorrízico (primers F03 e F04)

Canaleta 8: DNA esporo de fungo micorrízico (primer OPB10)

5. Conclusão

Através da figura e dos dados apresentados, podemos concluir que os clones identificados pertencem à planta e não ao fungo micorrízico.

6. Bibliografia

Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M., Neves, M.C.P. **Microbiologia do Solo**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP., 1992, 360 p.

Gianinazzi-Pearson, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbioses. **The Plant Cell**, v.8, p. 1871-1993, october, 1996.

Lambais, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J.O. **Avanços em Fundamentos e Aplicações de Micorrizas**, UFLA, 1995.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DO SOLO
011-601 RESIDÊNCIA AGRONÔMICA**

**Identificação e clonagem molecular de genes com expressão diferencial em
raízes de fumo (*Nicotiana tabacum*) colonizadas por *Glomus intraradices***

**Leandra Maria Scarpari
Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais**

**Piracicaba
Dezembro / 1998**

ÍNDICE

1. Introdução.....	3
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1. Micorrizas arbusculares	4
2.2. Interações planta - fungo micorrízico	4
2.3. Métodos para o estudo de expressão gênica diferencial.....	7
2.4. A técnica do "display" diferencial	9
3. Objetivos.....	12
4. Materiais e métodos.....	12
4.1. Experimento em casa-de-vegetação.....	12
4.2. Avaliação da porcentagem de colonização	13
4.3. Extração de RNA total de raízes	13
4.4. Tratamento do RNA com DNase	13
4.5. Síntese de primeira fita de cDNA	14
4.6. Amplificação do cDNA por PCR com primers aleatórios	14
4.7. Isolamento dos fragmentos diferenciais	15
4.8. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos diferenciais	15
4.8.1. Clonagem com o kit pCR-Script™ SK(+) Stratagene	15
4.8.2. Clonagem no vetor pUC18	16
4.8.3. Sequenciamento.....	17
4.9. Análise de homologia e alinhamento de seqüências.....	17
5. Resultados e discussão	18
5.1. Massas da parte aérea e do sistema radicular e colonização radicular.....	18
5.2. Extração e purificação de RNA total	18
5.3. Análise dos cDNAs amplificados	20
5.4. Purificação dos fragmentos isolados.....	20
5.5. Clonagem dos cDNAs diferenciais.....	20
5.6. Sequenciamento.....	22
5.7. Análise de homologia e alinhamento de seqüências.....	22
6. Conclusões	22
7. Bibliografia	23

1. Introdução

As micorrizas arbusculares (MAs) são associações mutualísticas de grande importância na natureza, sendo disseminadas na maioria dos habitats naturais. Cerca de 80% das plantas superiores associam-se com fungos da ordem Glomales, formando MAs.

O fungo micorrízico arbuscular favorece a absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, sendo de fundamental importância para a nutrição mineral das plantas. As plantas, por sua vez, fornecem fotossintatos ao fungo.

Nos ecossistemas tropicais, as MAs representam uma alternativa viável para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de baixo custo, devido ao fato do fósforo ser um dos elementos mais limitantes em solos tropicais.

Apesar disso, as bases bioquímicas e moleculares que regem esta associação não são bem conhecidas. O presente trabalho vem de encontro à necessidade de se obter maiores informações sobre a associação, pois tem como objetivo investigar a expressão gênica diferencial em raízes de fumo (*Nicotiana tabacum*) colonizadas pelo fungo *Glomus intraradices*.

Para tal, utilizou-se a técnica do DDRT-PCR ("Differential Display of Reverse Transcripts – Polimerase Chain Reaction"), modificada por Ditt (1997). Como resultado, um cDNA de aproximadamente 1,1kb, com expressão suprimida durante a simbiose, foi identificado.

2. Revisão de Literatura

2.1. Micorrizas arbusculares

As micorrizas são associações mutualísticas, nas quais as raízes das plantas vasculares são invadidas por fungos específicos, ocorrendo perfeita integração morfológica e funcional entre os simbioss. Os fungos formadores de micorrizas são habitantes comuns do solo e, ao colonizar as raízes, estabelecem uma série de inter-relações biotróficas: a planta fornece substrato energético ao fungo, e este, através da rede de hifas externas, absorve nutrientes da solução do solo e os transfere à planta hospedeira. Deste modo, na maioria dos casos, a micorriza estimula o crescimento vegetal, favorecendo a nutrição mineral da planta, principalmente com relação à absorção de fósforo (Silveira, 1992).

Nas micorrizas arbusculares (MAs), os fungos da ordem Glomales colonizam tanto o espaço intercelular como o intracelular do tecido cortical. Hifas intracelulares da camada mais interna do córtex podem sofrer repetidas divisões dicotômicas, formando sistemas complexos de hifas ramificadas, chamados de arbúsculos (Bonfante-Fasolo, 1984).

Os arbúsculos são estruturas efêmeras, de ciclo curto (4-5 dias), responsáveis pela troca bidirecional de nutrientes entre os simbioss, e definem a funcionalidade da simbiose. As hifas também podem diferenciar-se em vesículas, estruturas globosas e ricas em lipídios, com aparente função de reserva (Lambais, 1996). Estas estruturas são ilustradas na Figura 1.

O micélio externo desempenha um papel importante no sistema, uma vez que constitui uma estrutura adicional de absorção, capacitando a planta para obter nutrientes que, de outra forma, não lhe estariam disponíveis (Silveira, 1992).

2.2. Interações planta - fungo micorrízico

Durante a colonização das raízes pelo fungo micorrízico, ocorrem profundas alterações morfológicas e bioquímicas tanto no fungo quanto no hospedeiro. Segundo Gianinazzi-Pearson (1996), as células que contém arbúsculos sofrem uma série de modificações, tais como a diminuição do tamanho do vacúolo, o aumento do volume citoplasmático, proliferação das organelas e principalmente aumento da síntese de membrana plasmática.

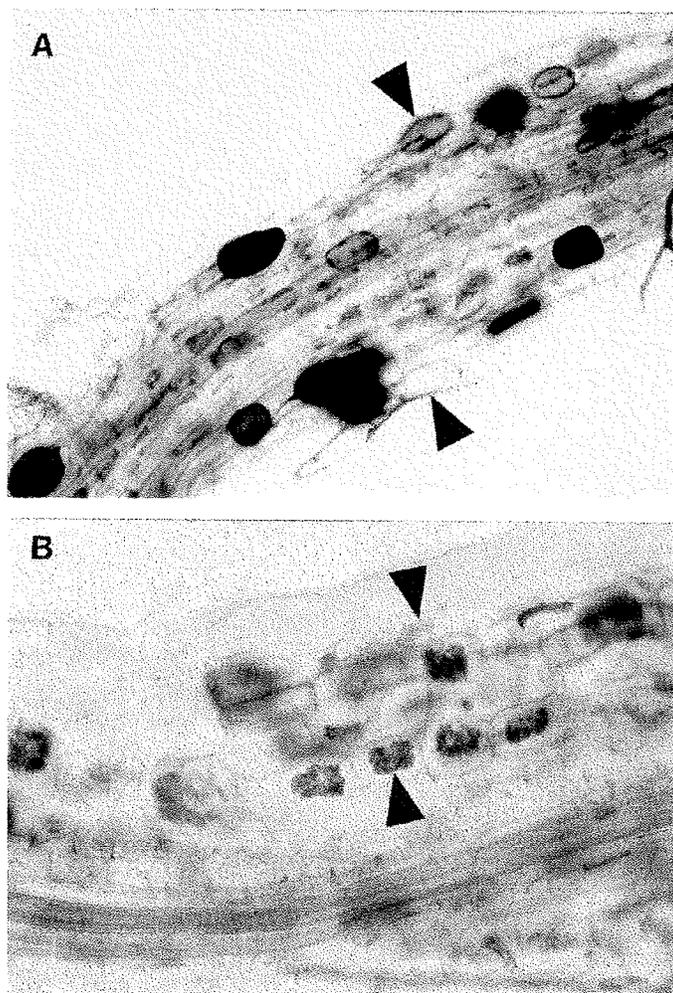


Figura 1: Aspectos morfológicos de micorrizas arbusculares em raízes de feijão colonizadas por *Glomus clarum*. **A:** seta superior, vesícula; seta inferior, hifa. **B:** seta superior, hifa; seta inferior, arbúsculo (Ríos Ruiz, 1998).

O desenvolvimento e a funcionalidade das MAs são resultado da interação de produtos de vários genes que apresentam expressão diferencial em ambos os simbiontes durante o processo.

Tagu et al. (1993) estimam que cerca de 50% da população de RNA mensageiro (RNAm) do fungo é regulada pelo desenvolvimento da simbiose, tendo isolado muitos cDNAs com expressão diferencial. Estes autores afirmam também que a abundância de um RNAm em particular não reflete necessariamente a quantidade de proteína por ele codificada, já que para alguns genes pode ocorrer regulação pós-transcrição.

A troca de sinais e o reconhecimento entre o hospedeiro e o fungo iniciam-se antes do contato físico, por exemplo com a liberação de exudatos pela planta, que estimulam a germinação de esporos do fungo micorrízico (Gianinazzi-Pearson et al., 1996).

A diferenciação de hifas em apressórios é uma etapa crítica para o estabelecimento da simbiose. Dados obtidos por vários autores sugerem que em plantas não hospedeiras, algum fator essencial para a completa diferenciação de apressórios funcionais não está presente. O nível de fosfato na planta parece também afetar esta diferenciação, sendo que em altos níveis de P, a síntese do fator responsável pela indução da formação de apressórios é inibida ou esse fator é inativado (Lambais, 1993).

O processo de penetração é pouco danoso aos tecidos vegetais, pois os fungos micorrízicos produzem baixas concentrações de enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal, quando comparados com fungos patogênicos necrotróficos. Essa baixa atividade enzimática provavelmente resguarda a integridade do tecido hospedeiro e evita a ativação do sistema de defesa vegetal, possibilitando o desenvolvimento de uma interação plenamente compatível (Lambais, 1996).

A exemplo do que ocorre nas interações leguminosas-*(Brady)Rhizobium*, não há desenvolvimento de sintomas de resposta de hipersensibilidade (acúmulo de fitoalexinas e morte das células microbianas e do hospedeiro em MAs (Lambais, 1996). Os microssimbiontes são reconhecidos pelo hospedeiro, de modo a formarem interações compatíveis de longa duração. A complexa intercomunicação que ocorre entre fungo e hospedeiro deve envolver sinais moleculares reconhecidos ao nível de membrana plasmática e transmitidos até sítios de transcrição gênica, regulando o processo de síntese ou a estabilidade de transcritos (RNAm). Esta troca de sinais deve regular todas as etapas do processo: pré-infecção, infecção e colonização. Acredita-se que compostos fenólicos estejam envolvidos nessa sinalização, assim

como ocorre nas interações dicotiledôneas-*Agrobacterium* e leguminosas-*(Brady)Rhizobium* (Lambais, 1996).

O processo de colonização das raízes é aparentemente controlado pela planta hospedeira, já que a proliferação do fungo no tecido epidérmico e hipodérmico é muito restrita e a hifa nunca penetra no cilindro central ou meristema (Gianinazzi-Pearson, 1996). Esse "crescimento controlado" pode envolver o sistema de defesa vegetal.

Lambais & Mehdy (1993), investigando a possibilidade de um aumento na expressão de genes de defesa vegetal, como endoquitinase, β -1,3-endoglucanase e genes codificando enzimas para a síntese de fitoalexinas, que contribuiria para a inibição do crescimento intrarradicular do fungo sob altas concentrações de P, concluíram que ocorre uma supressão geral das respostas de defesa da planta durante o desenvolvimento de MAs. Concluíram, ainda, que a supressão da atividade de endoquitinase é atenuada sob altas concentrações de P, e que sob baixo P, a máxima supressão ocorre durante o período de máxima taxa de crescimento do fungo.

Um estudo com *Glomus intraradices* e soja mostrou que a expressão de genes de defesa em MAs é afetada pela infectividade do fungo. Detectou-se a supressão das atividades de endoquitinase nas raízes colonizadas pelo isolado mais infectivo (26), comparado com o isolado menos infectivo (25) (Lambais & Mehdy, 1996).

Essa expressão diferencial de genes de defesa pode ser causada por alterações no balanço de fitormônios nas raízes e pela síntese de elicitores / supressores específicos.

Os estudos sobre os mecanismos reguladores da simbiose são limitados em virtude da dificuldade de cultivar tanto o fungo micorrízico quanto as MAs *in vitro*. Uma contribuição de grande importância para o entendimento dos mecanismos que controlam o desenvolvimento da simbiose, seria o isolamento de genes preferencialmente modulados (induzidos ou suprimidos) durante o desenvolvimento das MAs (Lambais, 1996).

2.3. Métodos para o estudo de expressão gênica diferencial

Os organismos superiores possuem aproximadamente 100.000 genes diferentes, dos quais apenas uma pequena fração, cerca de 15%, são expressos individualmente em cada célula (Liang & Pardee, 1992).

A expressão gênica de uma célula reflete todos os processos metabólicos que ocorrem na mesma. Portanto, o estudo de genes com expressão diferencial é de grande importância, pois permite identificar quais genes são ativados ou desativados

em determinada condição e, conseqüentemente, quais os reflexos no metabolismo da célula.

Os métodos tradicionais para a identificação de genes com expressão diferencial são a hibridização diferencial e a hibridização subtrativa.

A hibridização diferencial ou "screening" diferencial envolve a construção de dois bancos de cDNA, ou seja, do tecido onde o gene está sendo expresso e do tecido onde não está sendo expresso. Extrai-se RNA total ou RNAm e, a partir deste, sintetizam-se sondas de cDNA. Estas sondas são hibridizadas com réplicas dos dois bancos. Os clones que hibridizam com as sondas de ambos os bancos não são diferenciais, enquanto aqueles que hibridizam com sondas de apenas um banco, representam genes diferencialmente expressos. Trata-se de um método trabalhoso e que permite a identificação de genes expressos em abundância. (Sambrook et al., 1989).

Utilizando hibridização diferencial, foi isolado um gene que codifica uma H⁺-ATPase vegetal, com expressão diferencial em raízes de *Hordeum vulgare* colonizadas por *Glomus intraradices*, sendo que dois clones, BMR6 e BMR78, apresentaram níveis mais altos de expressão em raízes micorrizadas (Murphy et al., 1997).

Liu et al. (1998) identificaram dois clones de cDNA (MtPT1 e MtPT2) que codificam transportadores de fosfato de uma biblioteca de cDNA de raízes micorrizadas (*Medicago truncatula* / *Glomus versiforme*). Ambos os clones são transcritos em raízes, sendo que o nível de transcrição aumenta em resposta à deficiência de fosfato e decresce significativamente durante a colonização das raízes pelo fungo *G. versiforme*.

Na hibridização subtrativa, a partir do RNA total ou RNAm, sintetizam-se sondas de cDNA do tecido de interesse, ou seja, onde o gene está sendo expresso. Estas sondas são então hibridizadas com RNA total ou RNAm do tecido onde o gene não está sendo expresso. Os genes expressos nas duas situações formam híbridos RNA:DNA, e são separados, através da cromatografia em colunas de hidroxiapatita, das fitas únicas de cDNA. Estas últimas representam os genes com expressão diferencial, e servem de molde para a síntese de sondas subtrativas que são utilizadas na seleção de clones em uma biblioteca de cDNA. Apesar de ser um método muito trabalhoso, permite a identificação de genes expressos em menor abundância. (Sambrook et al., 1989).

Através da hibridização subtrativa, Harrison & van Buuren (1995) clonaram um transportador de fosfato com expressão diferencial em hifas internas e externas de *Glomus versiforme*.

Ambos os métodos descritos requerem grandes quantidades de RNA (nem sempre disponível), e demandam um tempo prolongado.

2.4. A técnica do "display" diferencial

A técnica do "display diferencial" (DD), apresenta muitas vantagens quando comparada com hibridização diferencial e subtrativa. É muito mais rápida, permite detecção simultânea de genes induzidos e suprimidos. Trata-se de um método simples, baseado em PCR e separação de amplicons em gel de poliacrilamida, duas técnicas muitas usadas em biologia molecular, encontrando muitas aplicações (Liang & Pardee, 1992).

A estratégia geral da técnica é amplificar seqüências parciais de cDNA de subgrupos de RNAs através de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia (PCR). Para tal, utiliza conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores diferenciados, um baseado na seqüência poliadenílica dos RNAs eucarióticos (ancorados ao poliA) e outro de seqüência aleatória, para definir segmentos de cDNA de tamanhos distintos, os quais são amplificados por PCR e separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida. A Figura 2 traz uma ilustração da técnica.

Um iniciador ancorado como por exemplo 5'-T₁₁CA permite pareamento com RNAs que apresentem UG como as duas últimas bases antes do poliA. Assim, este iniciador irá reconhecer 1/12 da população total de RNAs, uma vez que há 12 possíveis combinações para as duas bases da extremidade 3', omitindo-se T como penúltima base. Liang et al. (1993), em estudos para o refinamento da técnica, relataram que o número de iniciadores oligo-dT ancorados pode ser reduzido de 12 para 4, em virtude da degeneração da penúltima base da extremidade 3', durante o pareamento na transcrição reversa.

Segundo Liang et al. (1994), os maiores obstáculos para a utilização do método são a redundância e a sub-representação de certas espécies de RNAm, além do alto número de falsos positivos, que não se confirmam pela análise de Northern blot. No trabalho citado, o uso de três iniciadores oligo-dT com uma base ancorada permitiu excelente seletividade, subdividindo os RNAs em 3 populações.

Diversos trabalhos na literatura, como Vögeli-Lange et al. (1996) e Poirier et al. (1997), sugerem métodos para seleção rápida e classificação de clones falsos positivos. Porém, é necessário o uso de radioatividade, o que dificulta sua utilização em nossas condições de trabalho.

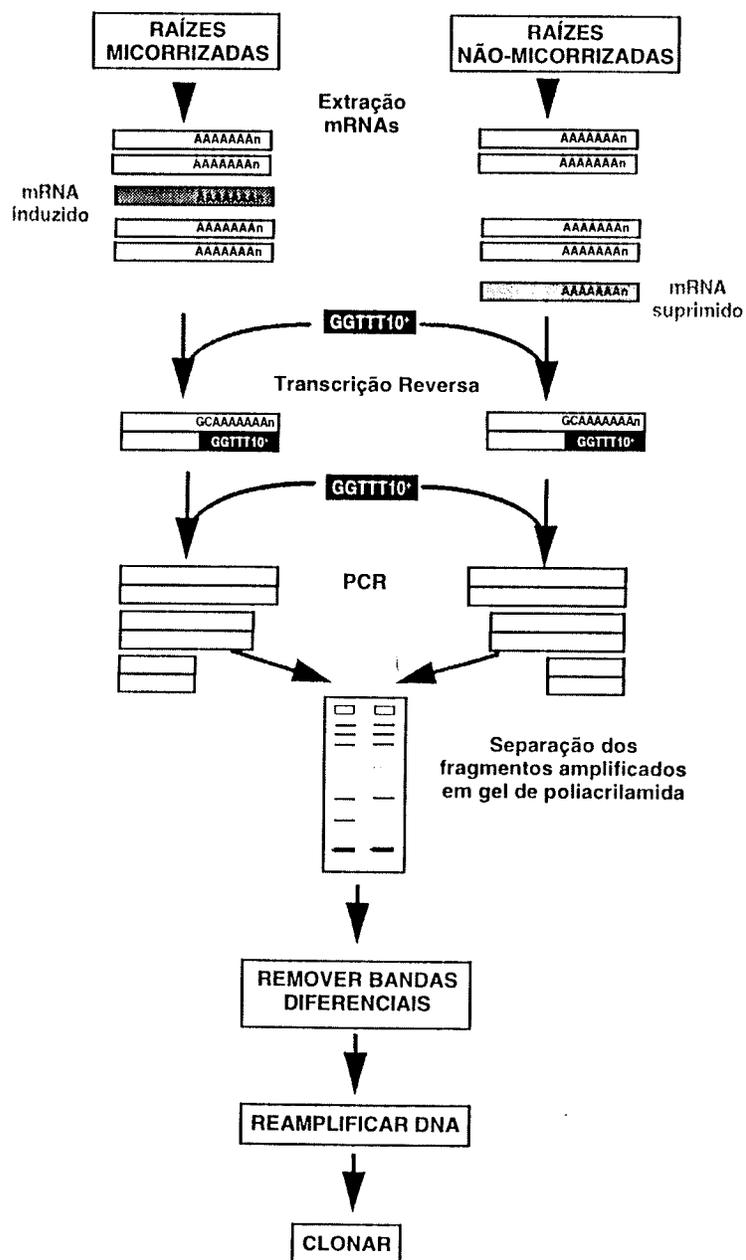


Figura 2: Esquema da técnica de "display diferencial" para identificação de genes induzidos e suprimidos durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares (Lambais, 1996).

Bertioli et al. (1995) dizem que a pequena sensibilidade para RNAs raros merece especial atenção, já que a maioria das espécies de RNA, aproximadamente 90%, são raras, cada uma representando aproximadamente 0,004% do mRNA total. Ressaltam ainda a competição durante a reação de PCR é mais severa do que em PCR regular, tendo grande importância a baixa concentração de dNTPs e o fato de que os decâmeros não são iniciadores eficientes para PCR.

Wilkinson et al. (1995) obtiveram bons resultados na identificação de RNAs com expressão induzida durante o amadurecimento de morango usando a técnica do DDRT-PCR. Foram identificados 5 RNAs com expressão induzida, sendo 3 deles aparentemente fruto-específicos, com expressão muito baixa ou nula em tecidos vegetativos.

Sharma & Davis (1995) usaram a técnica do DDRT-PCR para isolar cDNAs correspondentes aos transcritos induzidos em resposta à exposição a ozônio em *Arabidopsis thaliana*, obtendo o clone AtOZ11, que representa uma nova proteína relacionada a estresse, acumulada em resposta à produção de espécies ativas de oxigênio.

Niebel et al. (1998), usando a técnica do DDRT-PCR, isolaram o gene MtAnn1, que codifica uma proteína homóloga a anexinas, a qual é induzida durante a simbiose entre *Medicago truncatula* e *Rhizobium meliloti*. Trata-se de um novo gene marcador da zona de pré-infecção, sendo que sua expressão durante a nodulação requer fatores Nod biologicamente ativos e não depende do processo de infecção.

Ditt (1997) modificou a técnica do DDRT-PCR, usando apenas um iniciador aleatório na amplificação do cDNA. Deste modo, obtém-se um menor número de fragmentos e estes possuem massa molecular relativamente mais elevada, permitindo a separação por eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo. A utilização de géis de agarose apresenta as vantagens de facilidade de preparação e manuseio, tempo reduzido para obtenção dos resultados e fácil documentação, fotografando-se o gel sob luz ultravioleta.

Utilizando essa técnica modificada, clones representando RNAs induzidos durante a formação de MAs foram isolados e sequenciados. As seqüências gênicas foram comparadas com seqüências de genes conhecidos, e mostraram alto grau de homologia com genes que codificam proteínas acessórias da urease (UreG).

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo identificar e clonar genes com expressão diferencial durante a interação *Nicotiana tabacum* - *Glomus intraradices*, os quais poderão servir de marcadores nos estudos dos mecanismos que regulam a simbiose.

4. Materiais e métodos

4.1. Experimento em casa-de-vegetação

As sementes de fumo (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR1) foram germinadas em bandejas de isopor, tendo como substrato uma mistura de areia:vermiculita (2:1) esterilizada. As mudas foram irrigadas com solução de Hoagland semanalmente.

Após um período de 50 dias, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo 3kg do substrato acima descrito. A adubação básica consistiu em 20mg de Pkg^{-1} de substrato, 80mg de Nkg^{-1} (parcelados em 2 aplicações de $40mgkg^{-1}$, separadas de 15 dias), 100mg Kkg^{-1} , 40mg $Ca kg^{-1}$, 20mg $Mgkg^{-1}$, 1ml de solução de Fe-EDTA e 1ml de solução de micronutrientes de Hoagland por vaso.

Foram aplicados três tratamentos aos vasos: controle (plantas não-inoculadas), plantas inoculadas com *Glomus intraradices* e plantas inoculadas com *Glomus clarum*, sendo que a inoculação foi realizada no momento do transplante das mudas. O delineamento foi totalmente casualizado, com 10 repetições de cada tratamento.

A colheita foi feita após 8 semanas de cultivo. A parte aérea foi separada do sistema radicular, e seca em estufa à 60°C para a determinação da massa da matéria seca. O sistema radicular foi lavado em água corrente, eliminando-se a umidade excessiva com papel absorvente. Determinou-se o peso fresco, separou-se uma amostra de aproximadamente 0,5g para determinação do nível de colonização pelo fungo micorrízico, e o restante foi congelado com nitrogênio líquido e mantido à -80°C.

4.2. Avaliação da porcentagem de colonização

As amostras para a determinação da colonização pelo fungo micorrízico foram conservadas em AFA (ácido acético glacial 2%, formaldeído 2%, álcool etílico 45%).

Para a determinação do nível de colonização, procedeu-se da seguinte maneira: as raízes foram lavadas em água e aquecidas à 90°C em KOH 10% por 50 minutos. Foram lavadas novamente em água, e posteriormente em HCl 5% por 5 minutos. A coloração foi feita com azul-de-tripano em lactoglicerol à 90°C por 4 minutos, e as raízes coloridas foram mantidas em lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970). A porcentagem de colonização foi determinada através da contagem de pontos de infecção sob microscópio estereoscópico, segundo Giovanetti & Mosse (1980).

4.3. Extração de RNA total de raízes

A extração de RNA total das raízes foi realizada segundo Mehdy & Lamb (1987). Para a inativação das RNAses, toda a vidraria foi esterilizada à 160°C por 4 horas, e as soluções foram elaboradas com água destilada tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e posteriormente autoclavadas.

A extração foi feita a partir de amostras compostas de 5g (0,5g de cada repetição), as quais foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão TLE (Tris 200mM, cloreto de lítio 100mM, EDTA 5mM, pH 8,3) e fenol saturado em TLE. A extração do RNA foi feita duas vezes em fenol saturado em TLE, uma vez em uma mistura de fenol saturado em TLE e clorofórmio (1:1, vol/vol) e uma vez em clorofórmio. O RNA foi precipitado em etanol 100% à -20°C e ressuspendido em água tratada com DEPC. Foi realizada uma precipitação em acetato de sódio 3M e centrifugação em NaCl 300mM para a remoção dos polissacarídeos. O sobredanadante foi recolhido e o RNA foi precipitado em etanol 100%, e dissolvido em água tratada com DEPC.

A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260nm, ($OD_{260} = 40\mu\text{g de RNAmL}^{-1}$). Em seguida, a integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2% (Sambrook et al., 1989).

4.4. Tratamento do RNA com DNase

É conveniente usar amostras de RNA livres de DNA, para evitar a amplificação de fragmentos de DNA genômico (Liang *et al.*, 1993). Isto posto, é importante fazer o

tratamento do RNA total com DNase para eliminar o DNA cromossômico. Assim, 50µg de RNA total foram tratadas com 40 unidades (U) de inibidor de RNase (Stratagene), 10U de DNase livre de RNase (Gibco BRL), Tris-HCl 5mM pH 8,3, KCl 25mM e MgCl₂ 750µM. As amostras foram incubadas por 1 hora à 37°C e, após este período, o RNA total foi extraído com um volume de fenol:clorofórmio (3:1, vol/vol), precipitado com acetato de sódio 300mM e 3 volumes de etanol 100% à -80°C por 1 hora. Após centrifugação à 4°C, por 10 minutos em microcentrífuga à velocidade máxima, descartou-se o sobrenadante e o pélete foi lavado em etanol 70% (diluído em água tratada com DEPC). O RNA foi ressuspendido em 20µL de água tratada com DEPC. A quantificação e a checagem da integridade do RNA foram realizadas como descrito no item 4.3.

4.5. Síntese de primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita com o kit SUPERSRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA synthesis da Gibco-BRL, conforme as instruções do fabricante. Partiu-se de 2µg de RNA total, 0,5µg do iniciador ancorado AP1 (5'T₁₃VC3', onde V=C, G ou A) e 10µL de água tratada com DEPC. Esta mistura foi aquecida à 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 1 minuto. Adicionou-se, então, solução tampão PCR 1X, MgCl₂ 2,5mM, dNTPs 500µM e DTT 10mM. As amostras foram incubadas por 5 minutos à 42°C e, em seguida, adicionou-se 200U SuperScript II transcriptase reversa. Incubou-se à 42°C por 50 minutos e, em seguida, as enzimas foram inativadas à 70°C por 15 minutos. Foram adicionadas 2U de RNase H às reações e incubou-se à 37°C por 20 minutos, para a degradação dos RNAs de fita simples. As reações foram armazenadas à -20°C até a amplificação por PCR.

4.6. Amplificação do cDNA por PCR com primers aleatórios

Foram utilizados 1/10 do volume da reação de primeira fita de cDNA (2µL) em reações de 25µL, contendo solução tampão PCR 1X (Pharmacia), dNTPs (Gibco-BRL) 100µM, iniciadores aleatórios AW01 a AW10 (0,2µM) do Kit Operon e 0,5U de DNA polimerase Taq (Pharmacia). A amplificação foi realizada em 45 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 42°C e 2 minutos à 72°C, seguidos de um período de extensão de 5 minutos à 72°C (Ditt, 1997).

4.7. Isolamento dos fragmentos diferenciais

Alíquotas de 10 μ L da reação de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5X, a 70V por 2 horas. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e fotografado sob luz ultravioleta. As bandas diferenciais foram removidas do gel e purificadas com o kit GeneClean II (BIO 101).

Em um tubo contendo as bandas removidas, adicionou-se 4,5 volumes de iodeto de sódio (NaI) e 0,5 volume de uma solução modificadora de TBE (TBE modifier) e incubou-se à 55°C por 5 minutos para derreter a agarose. Em seguida, adicionou-se 5 μ L Glassmilk, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente, agitando sempre para o DNA entrar em contato com a sílica. A amostra foi centrifugada rapidamente, removendo-se o sobrenadante. O pélete foi lavado 3 vezes com solução New Wash e seco à temperatura ambiente. O DNA foi eluído da sílica adicionando-se 15 μ L de água milli-Q e incubando-se por 5 minutos à 55°C.

A quantificação do DNA eluído foi realizada através de eletroforese com marcador de massa molecular ("Low DNA mass ladder" - Gibco-BRL).

4.8. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos diferenciais

4.8.1. Clonagem com o kit pCR-Script™ SK(+) Stratagene

Primeiramente, a clonagem do fragmento isolado do gel e purificado, foi feita com o kit de clonagem pCR-Script™ SK(+) Stratagene, conforme instruções do fabricante. O fragmento de interesse (200ng) foi ligado a 10ng do vetor pCR-Script na presença de tampão de reação pCR-Script 1X, rATP 500 μ M, 5U da enzima de restrição *SrfI* e 4U da enzima T4 DNA ligase, num total de 10 μ L, por 3 horas à temperatura ambiente. As enzimas foram inativadas pela incubação por 10 minutos à 65°C.

Uma alíquota de 4 μ L da reação de ligação foi utilizada para a transformação das 200 μ L células competentes de *E. coli* ADH-5 α . O tubo contendo a reação foi mantido em gelo por 30 minutos e, em seguida, procedeu-se o choque térmico por exatos 90 segundos. Adicionou-se 500 μ L de meio LB líquido (NaCl 1%, triptona 1% e extrato de levedura 0,5%) e incubou-se à 37°C por 1 hora. Foram plaqueadas alíquotas de 50, 100 e 150 μ L da reação em meio LB-ágar (1,5%), contendo ampicilina 75 μ g mL⁻¹, X-Gal (40 μ L/placa de uma solução 20mg mL⁻¹ em dimetilformamida) e IPTG (4 μ L/placa de uma solução 200mg mL⁻¹ em água). Após aproximadamente 15 horas de

incubação à 37°C, as colônias brancas foram identificadas, coletadas com palitos estéreis e inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina 75µg mL⁻¹ e incubadas à 37°C sob agitação.

Nesta primeira tentativa, obteve-se muitas colônias, todas brancas. Fez-se, então, uma reação de PCR com os iniciadores (T3 e T7) específicos do plasmídeo utilizado, contendo tampão de PCR 1X (Pharmacia), dNTPs (Gibco-BRL) 300µM, primers T3 e T7 1µM e 1U de DNA polimerase Taq (Pharmacia), num volume total de 25µL. A amplificação foi realizada através da separação das fitas por 3 minutos à 94°C, seguida de 29 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 50°C e 3 minutos à 72°C, e de um período de extensão de 10 minutos à 72°C. Esta reação resultou num fragmento clonado de aproximadamente 800 pares de bases (pb).

Em seguida, utilizou-se uma alíquota de 1,5mL da cultura para a extração de DNA plasmidial. Este volume foi transferido para microtubos e centrifugado a 15000 rpm por 5 minutos à 4°C. O meio foi descartado, adicionou-se 100µL da solução 1 gelada (Tris-HCl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0, glicose 50mM) e agitou-se vigorosamente. Em seguida, 200µL da solução 2 (SDS 1%, NaOH 0,2N) foi adicionado e misturado por inversão. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos, e então foi adicionado 150µL da solução 3 (acetato de potássio 3M, ácido acético glacial 10%), misturando-se por inversão. Manteve-se os tubos em gelo por 10 minutos e, após este período, centrifugou-se a 15000 rpm por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, adicionou-se 15µg de RNase A, e incubou-se à 37°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com etanol 100% gelado e mantido no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 15000 rpm por 20 minutos à 4°C, e lavou-se o pélete em etanol 70% gelado. O pélete foi então seco e ressuspendido em 30µL de água milli-Q.

4.8.2. Clonagem no vetor pUC18

Em virtude de problemas ocorridos na clonagem do ítem acima, o experimento foi repetido, alterando-se alguns passos. A reação de ligação foi feita utilizando-se 60ng do fragmento e 20ng do vetor pUC18 tratado com a enzima de restrição Sma, linearizado e desfosforilado (Gibco - BRL), na presença de tampão de reação 1X, 1U da enzima T4 DNA ligase, num total de 10µL. A reação foi mantida à 15°C por aproximadamente 10 horas.

O volume total da reação de ligação foi utilizado para a transformação de 100µL de células competentes de *E. coli* ADH-5α. A reação foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, procedeu-se o choque térmico por exatos 45 segundos. Foram

adicionados 900 μ L de meio LB líquido (NaCl 1%, triptona 1% e extrato de levedura 0,5%) e incubou-se à 37°C por 1 hora. Plaqueou-se alíquotas de 100, 150 e 200 μ L da reação em meio LB-ágar (1,5%), contendo ampicilina 100 μ g mL⁻¹ e 100 μ L de uma solução 10mg X-Gal mL⁻¹ e 2,4mg IPTG mL⁻¹ em dimetilformamida. As placas foram incubadas por aproximadamente 15 horas à 37°C.

4.8.3. Sequenciamento

Apesar de não ter o tamanho do fragmento de cDNA inicial, o inserto obtido com a clonagem descrita no ítem 4.8.1 foi sequenciado para efeito de treinamento e para verificar se era uma sequência de *E. coli*. Utilizou-se o método de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977).

Um total de 200ng de DNA foi utilizado para as duas reações de PCR com o DNA Sequencing Kit - Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. Adicionou-se 3 μ L do tampão de reação (Tris-HCl 200mM pH 9,0 e 5mM MgCl₂), 1 μ L de mix do kit e 3,2 μ M dos iniciadores T3 (reação 1) e T7 (reação 2), num volume total de 10 μ L. A amplificação foi realizada pela desnaturação do DNA à 96°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 50 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C.

O produto do PCR foi purificado através de precipitação com isopropanol 75% à temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugou-se a 15000 rpm por 20 minutos e lavou-se o pélete com etanol 70%. Em seguida secou-se o pélete, adicionou-se tampão de corrida com formamida. O DNA foi desnaturado à 95°C por 5 minutos e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida no sequenciador automático ABI Prism.

4.9. Análise de homologia e alinhamento de seqüências

Apenas para treinamento, uma seqüência-teste foi utilizada para comparação com seqüências em banco de dados através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5. Resultados e discussão

5.1. Massas da parte aérea e do sistema radicular e colonização radicular

Na tabela 1 são apresentados os dados referentes à massa da matéria seca da parte aérea, massa da matéria fresca do sistema radicular e porcentagem de colonização das raízes pelo fungo micorrízico. Não houve diferenças significativas entre as massas dos três tratamentos, havendo uma certa homogeneidade entre as plantas. Os níveis de colonização do sistema radicular pelo fungo *Glomus intraradices* foram satisfatórios, o mesmo não ocorrendo com *Glomus clarum*, para o qual obteve-se colonização muito baixa. Este fato deve ter ocorrido devido a problemas com o inóculo utilizado.

Desta forma, as análises posteriores foram realizadas apenas com as plantas controle e com as inoculadas com *Glomus intraradices*.

Tabela 1: Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria fresca do sistema radicular (MFSR) e porcentagem de colonização de raízes de *Nicotiana tabacum* não-inoculadas e inoculadas com *Glomus clarum* e *Glomus intraradices*.

Tratamento	MSPA (g)	MFSR (g)	Colonização (%)
Não inoculado	15,8±0,7	16,4±1,0	0±0
<i>Glomus clarum</i>	15,1±0,3	17,98±1,1	7±4
<i>Glomus intraradices</i>	14,8±0,6	17,35±0,8	42±6

5.2. Extração e purificação de RNA total

A extração de RNA total apresentou um bom rendimento: 71µg de RNA total/g de raízes para as plantas controle, e 82µg de RNA total/g de raízes para o tratamento com *G. intraradices*. A análise do RNA em gel de agarose-formaldeído mostrou que o mesmo estava de boa qualidade, fato evidenciado pelas bandas representativas dos RNAs 28S e 18S, como pode ser visto na Figura 3A.

A Figura 3B mostra que após o tratamento com DNase, o RNA total manteve a mesma qualidade.

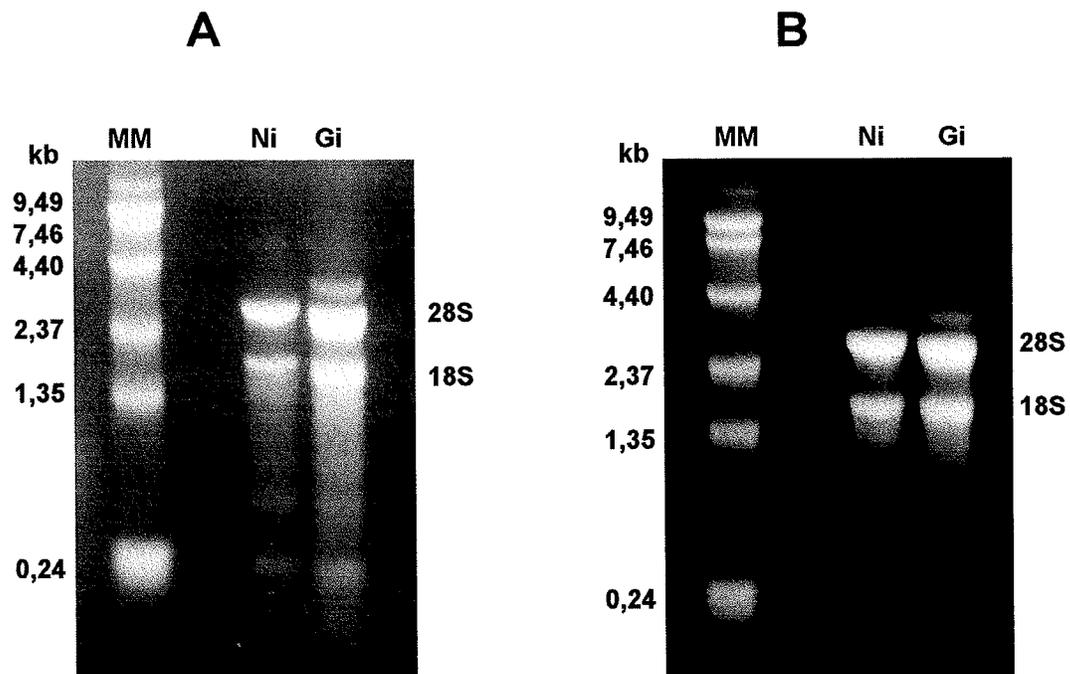


Figura 3: RNA total (3 μ g) extraído de raízes de fumo não-inoculadas (**Ni**) e inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**). **A:** RNA total; **B:** RNA total após tratamento com DNase; **MM:** Marcador molecular ("RNA ladder" - Gibco - BRL).

5.3. Análise dos cDNAs amplificados

A amplificação da primeira fita de cDNA com os iniciadores aleatórios só foi eficiente com OPAW1. As reações com os iniciadores OPAW02 a OPAW10 não produziram amplicons.

Um fragmento diferencial de aproximadamente 1,1kb foi identificado na amostra controle não inoculado (Ni) não estando presente na amostra inoculada (Gi), como pode ser visto na Figura 4. Foram feitas réplicas das reações de PCR, as quais confirmaram estes dados.

5.4. Purificação dos fragmentos isolados

Após a purificação do fragmento diferencial como citado no item 4.7, o DNA foi quantificado em gel de agarose através de comparação com o marcador de massa molecular ("Low DNA mass ladder" - Gibco-BRL), como mostra a Figura 5.

5.5. Clonagem dos cDNAs diferenciais

A clonagem descrita no item 4.8.1 apresentou muitos problemas. Como já descrito do citado item, obteve-se a partir de PCR com os iniciadores específicos do plasmídeo utilizado (T3 e T7), um fragmento de 800pb (figura não apresentada).

Porém, a extração rápida mostrou que as bactérias clonadas não continham plasmídeo, apesar de serem resistentes à ampicilina e apresentarem em seu material genético seqüências homólogas às do plasmídeo, já que ocorreu amplificação na reação de PCR com os iniciadores específicos.

Uma hipótese para explicar tal fato é a integração do plasmídeo ou parte dele no DNA genômico da bactéria através de recombinação.

Já na clonagem descrita no item 4.8.2, não foram obtidas colônias brancas, ou seja, contendo o plasmídeo recombinante. O fato de se tratar de um produto de amplificação por PCR provavelmente dificultou a ligação do mesmo com o vetor. Isto ocorre porque fragmentos amplificados por PCR possuem extremidades com terminação abrupta. Além disso, algumas DNA polimerases adicionam uma base a mais em uma das fitas, geralmente timina (T) ou adenosina (A), dificultando a reação de ligação.

O fragmento de cDNA deverá ser tratado com exonuclease para remover eventuais bases sem complementação, e posteriormente ligado ao vetor (pUC 18). Após a transformação de células de *E. coli* competentes, a amplificação e purificação

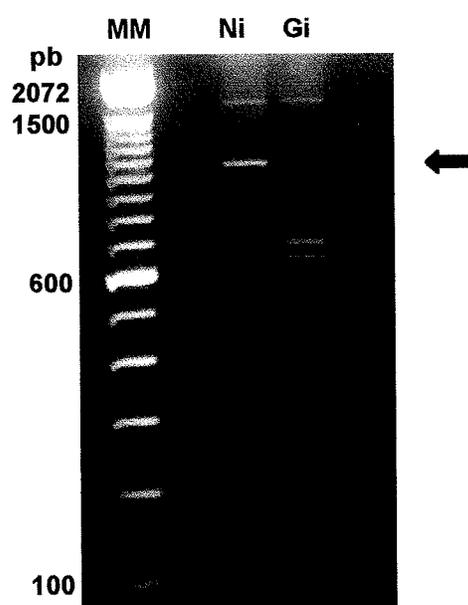


Figura 4: Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) e inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do primer AP1 e amplificada com o primer aleatório AW01. O fragmento diferencial está indicado pela seta. **MM:** Marcador de massa molecular ("100bp Molecular Marker" - Gibco - BRL)

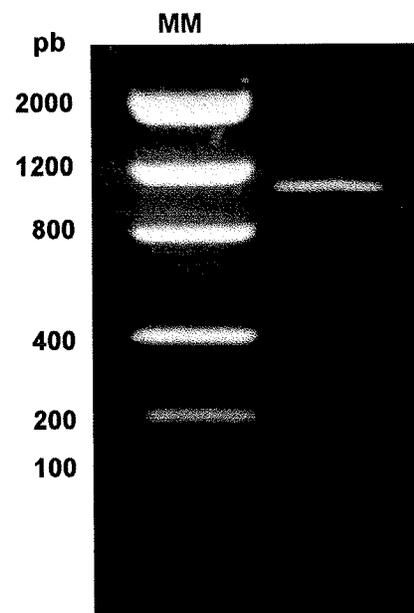


Figura 5: cDNA diferencial isolado do gel de agarose e purificado com o kit GeneClean II. **MM:** Marcador de massa molecular ("Low DNA mass ladder" - Gibco - BRL)

do plasmídeo contendo o inserto deverá ser feita. Esse material deverá ser utilizado em novas reações de sequenciamento.

5.6. Sequenciamento

O sequenciamento descrito no ítem 4.8.3 não foi bem sucedido, provavelmente devida à baixa concentração de DNA da amostra. Normalmente, a quantidade usada de DNA na reação de PCR para sequenciamento é de 300 a 400ng, e neste caso foi usado somente 100ng, pelo baixo rendimento de purificação do inserto.

5.7. Análise de homologia e alinhamento de seqüências

O resultado obtido na análise de homologia e alinhamento da sequência-teste encontra-se em anexo.

Esta sequência apresenta alta homologia com DNA genômico de cloroplasto de tabaco (97%), bem como com DNA genômico de cloroplastos de outras plantas superiores. Apresenta, ainda, homologia com DNA de vários vetores de clonagem.

6. Conclusões

Obteve-se, a partir da técnica do DDRT-PCR, modificada por Ditt (1997), um fragmento de cDNA de 1,1kb com expressão suprimida durante a simbiose *Nicotiana tabacum* - *Glomus intraradices*. Isto mostra a eficácia da técnica do DDRT-PCR na detecção de tais genes. As tentativas de clonagem desse amplicon em pCR-Script e pUC18 não foram bem sucedidas, inviabilizando o sequenciamento do cDNA e a confirmação de sua expressão diferencial.

As próximas etapas a serem realizadas são a clonagem do fragmento obtido, e a confirmação da expressão diferencial, através da análise por RT-PCR ou hibridização em Northern blots.

A sequência usada para análise de homologia em banco de dados apresentou alta homologia com DNA genômico de cloroplasto de tabaco (97%), bem como de outras plantas superiores.

7. Bibliografia

BERTIOLI, D.J.; SCHLICHTER, U.H.A.; ADAMS, M.J.; BURROWS, P.R.; STEINBIB, H.; ANTONIW, J.F. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4520-4523, 1995.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, D.LI. & BAGYARAJ, D.I., eds. **VA Mycorrhiza**. Florida, CRC Press, Inc., 1984, p. 5-33.

DITT, R.F. Identificação e clonagem molecular de genes com expressão diferencial em raízes de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectadas por *Glomus intraradices*. Piracicaba, 1997, 90 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **The Plant Cell**, v.8, p.1871-1883, october, 1996.

GIANINAZZI-PEARSON, V; DUMAS-GAUDOT, E.; GOLLOTTE, A.; TAHIRI-ALAUQUI, A.; GIANINAZZI, S. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.133, p.45-47, 1996.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.

HARRISON, M.J.; VAN BUUREN, M.L.. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, v.378, n.6557, p.626-629, 1995.

LAMBAIS, M.R. Expression of plant defense genes during the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Austin, 1993. 150p. Dissertation (Ph.D) - University of Texas.

- LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J.O. **Avanços em Fundamentos e Aplicações de Micorrizas**. Lavras:UFLA, 1996, cap.2, p.5-38.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanases, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.75-83, 1993.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanases expression. **New Phytologist**, v.134, n.3, p.531-538, 1996.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential Display of Eukariotic Messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.
- LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. Distribution and cloning of eukariotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acid Research**, v.21, n.14, p.3269-3275, 1993.
- LIANG, P.; ZHU, W.; ZHANG, X.; GUO, X.; O'CONNEL, R.P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. **Nucleic Acid Research**, v.22, n.22, p.5763-5764, 1994.
- LIU, H.; TRIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago trunculata* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.1, p.14-22, 1998.
- MEHDY, M.C.; LAMB, C.J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. **The EMBO Journal**, v.6, n.6, p.1527-1533, 1987.
- MURPHY, P.J.; LANGRIDGE, P.; SMITH, S.E. Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v.135, p.291-301, 1997.

- NIEBEL, F.C.; LESCURE, N.; CULLIMORE, J.V.; GAMAS, P. The *Medicago trunculata* *MtAnn1* gene encoding an annexin is induced by nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.6, p.504-513, 1998.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots, and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v.55, p.158-162, 1970.
- POIRIER, G.M.C.; PYATI, J.; WAN, J.S.; ERLANDER, M.G. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. **Nucleic Acid Research**, v.25, n.4, p.913-914, 1997.
- RÍOS RUIZ, W.F. Atividades de superóxido dismutase, catalases e peroxidase durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em feijoeiro, sob condições de baixo e alto nível de fosfato. Piracicaba, 1998, 50p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 1989. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R. Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.91-98, 1995.
- SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, cap.19, p.257-282.
- TAGU, D.; PHYTON, M.; CRÉTIN, C.; MARTIN, F. Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhiza by PCR-assisted differential screening. **New Phytologist**, v.125, p.339-343, 1993.

VÖGELI-LANGE, R.; BÜRCKERT, N.; BOLLER, T. Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. **Nucleic Acid Research**, v.24, n.7, p.1385-1386, 1996.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAH, M.B.; CONNER, T.W.; KLEE, H.J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.1097-1108, 1995.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "Luiz de Queiroz"

PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

Herança da resistência à *Puccinia polysora* e
a magnitude da ação gênica envolvida em
Zea mays

Dezembro de 1998

Bolsista: Maurício Pires M. Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Camargo Aranha

1) Introdução

O milho cultivado (*Zea mays*) é uma planta anual, robusta, monocotiledônea, utilizada preferencialmente como fonte alimentar. Apresenta grande importância sócio-econômica mundial, não só pela grande área de produção que ocupa, mas por ser matéria prima de produtos industrializados, movimentando grandes complexos industriais responsáveis por milhares de empregos e contribuindo como uma das principais fontes de carboidratos. Tem origem no continente americano e difundiu-se ao Velho Mundo através de Colombo, ao retornar para a Espanha em novembro de 1493.

O grão do milho é um fruto do tipo cariopse de coloração variável sendo cada fruto portador de uma única semente. O desenvolvimento da semente se completa após 50 a 55 dias da fertilização. A origem do milho é tropical, ou seja, em seu ciclo vegetativo necessita de calor e umidade para se desenvolver e produzir. O milho é cultivado entre as latitudes de 58° a 40° sul e em diversas altitudes. Não se recomenda o plantio de milho onde a temperatura média diária seja inferior a 19°C e a noturna inferior a 12,8°C. Existem vários cultivares, cada qual com características distintas: cultivares de ciclo curto (zona temperada), ciclo médio (zona tropical e subtropical) e ciclo longo (zonas tropicais úmidas).

Atualmente são mais de 50 empresas produzindo, distribuindo e comercializando sementes de milho, das quais aproximadamente 35% com pesquisa própria. Essas empresas plantam aproximadamente 85 mil hectares de campo de produção de sementes desde o Rio Grande do Sul até o cerrado brasileiro, visando um mercado que movimenta aproximadamente 235 milhões de

reais por ano. Já para produção de grãos, a área explorada é de 13,7 milhões de hectares, com produção total de 32 milhões de toneladas de grãos colhidas.

A cultura do milho está espalhada também pelo estado de São Paulo, contudo, ela sofre uma série de entraves com relação a sua produção. Para sua estabilização, torna-se necessário racionalizá-la o máximo possível, caso contrário cederá lugar a outras culturas devido ao desinteresse por parte dos agricultores. A produtividade média brasileira é de 2500 kg/ha e está muito aquém da produtividade média dos 22 principais países produtores deste cereal que é de 3840 kg/ha. Os principais pontos de estrangulamento desta cultura são: conservação e preparo do solo, semeadura correta (época de semeadura, regulagem da semeadora e espaçamento), adubação, cultivos corretos (época, modo e número), controle de pragas, doenças e ervas daninhas, colheita e preservação do produto. Também é fundamental para obtenção do “stand”, o uso de sementes melhoradas e tratadas.

Em 1985, a área plantada na safrinha (período de cultivo fora do usual) representava cerca de 2% da área total de milho plantado no país, porém nos últimos anos esta área tem apresentado grande crescimento, alcançando no ano de 1997 18%. Isto possibilitou que doenças que antes não eram importantes, como é o caso da ferrugem polysora, passassem a causar perdas na produção. Um dos métodos mais utilizados para o controle desta doença é a resistência genética, uma vez que o controle químico somente é utilizado em culturas de valor estratégico, como por exemplo campo de sementes ou de linhagens. A resistência pode ser do tipo monogênica, ou do tipo “slow-rusting”, aumentando o período latente, diminuindo o tamanho da lesão, possibilitando assim o retardamento da infecção e instalação da epidemia.

O desenvolvimento de variedades e híbridos resistentes tem sido favorecido quando se tem parâmetros para sua execução, como o conhecimento do modo de herança genética e a magnitude da ação gênica envolvida. Outra

ferramenta utilizada para o melhoramento é o uso de mapas genéticos, tanto citológicos como moleculares. Estes mapas auxiliam no estudo das variantes genéticas existentes para as características morfológicas, fisiológicas ou processo de desenvolvimento. O número de genes envolvidos nestas características também pode ser determinado por esta técnica, assim como seus efeitos de variação e dosagens influenciando o fenótipo. Programas de retrocruzamento têm sido favorecidos pelo uso de marcadores, possibilitando a redução de até duas gerações nos programas. O presente trabalho teve como objetivos obter estimativas do modo de herança da resistência a *Puccinia polysora* e a magnitude da ação gênica envolvida, além de determinar o coeficiente de herdabilidade dos caracteres e analisar possível ligação entre loci marcadores e genes de resistência.

2) Revisão de literatura

2.1) Etiologia e sintomatologia da ferrugem de *P. polysora*

A ferrugem polysora é a mais agressiva doença da cultura do milho no Brasil. Foi relatada pela primeira vez em 1986 por Underwood numa espécie de *Tripsacum dactyloides* L., coletada e herbarizada em 1891 no Alabama. Altitudes acima de 1200m são desfavoráveis para a doença, sendo abaixo de 900m mais favorável (Shurtleff, 1973). Porém, Silva (1997) destaca que para as condições brasileiras, *P. polysora* tem sido mais problemática em altitudes inferiores a 700m e plantios tardios. Culturas instaladas fora da época podem servir de inóculo inicial. Futrell (1975) destaca que no vale do rio Mississipi, além deste inóculo inicial, a doença é agravada pela estreita base genética dos materiais plantados.

P. polysora diferencia-se de *P. sorghi* pelo tamanho e cor de lesões, sendo pequenas, circulares e elípticas, de cor alaranjada. Seus uredosporos são amarelo - dourados com forma elipsoidal a ovóide, medindo de 20-29 x 29-40 μ m, equinados com 4 ou 5 poros equatoriais e teliósporos com paredes menos espessas e pedicelos mais curtos. As pústulas podem afetar o limbo foliar principalmente na face superior, bainhas, brácteas e até o pendão. Outra importante diferença é que *P. polysora* pode matar a planta, já *P. Sorghi* raramente o faz.

Como fator de disseminação destaca-se o vento, podendo os uredosporos serem transportados por longas distâncias, como possivelmente ocorreu no Sul dos EUA em 1973, quando não se detectou a fonte de inóculo, podendo esta ser o Caribe (Futrell, 1975).

O período latente de *P. polysora* é de 12-14 dias e a epidemia se dá tão mais rápido e intensa quanto mais próxima do inóculo, atacando primeiramente e sendo mais severa nas folhas de baixo (Raid, 1998). Após 1 a 3 dias da infecção das folhas de baixo é que a doença inicia a infecção nas folhas superiores. King (1982) sugere que não há diferença entre a intensidade da doença em diferentes estádios fenológicos, sendo estas diferenças baseadas no clima.

Uredosporos germinam melhor em temperaturas compreendidas entre 12-20 °C e umidade relativa de 65%, porém seu período de germinação se mantém viável até 28 dias. Temperaturas abaixo de 8 e acima de 28 °C prejudicam muito a germinação. Umidades entre 15 e 35% viabilizam a infectividade dos uredosporos por até 56 dias. A infectividade é diretamente ligada com a germinação (Hallier, 1985). O principal hospedeiro de *P. polysora* é o milho, mas Robert (1962) cita ainda *Euchlaena mexicana*, *Tripsacum dactyloides*, *T. loxum* e *Erianthus alopecuroides* como hospedeiros alternativos.

Ryland & Storey identificaram duas raças fisiológicas de *P. polysora* no leste da África denominadas de EA1 e EA2. No Quênia, Storey & Howland, (1961 e 1962) encontraram uma terceira raça chamada de EA3. Robert (1962) descreveu então mais seis raças, sugerindo que fossem identificadas como PP.3, PP.4, PP.5, PP.6, PP.7, PP.8. Ullstrup (1965) identificou mais uma raça sugerindo o nome de PP9.

Perdas causadas pela ferrugem polysora variam de acordo com o inóculo inicial, proximidade do inóculo e posição das folhas e idade da cultura (Raid, 1988). Rodriguez-Ardon (1980), em condições de campo e com três plantios bissemanais, estimou 4, 23 e 45% de perdas. Melching (1975) havia relatado perdas de 37% em um teste de campo e 50% em condições de casa de vegetação. Raid (1988) relatou perdas que variaram entre 18 a 39% na Pennsylvania. King (1982) estudou a diferença da incidência da doença em diferentes estádios da planta, não observando diferenças significativas na época, somente na posição das

folhas, sendo as de baixo mais afetadas que as de cima. Atribuiu este fato a uma explicação ambiental e não genética, devido ao posicionamento da folha e ao tempo para infecção que as folhas mais novas teriam para o desenvolvimento da doença.

2.2) Genética da resistência no patossistema *P. polysora*– milho

A resistência a doenças pode ser resultado de diversos fatores, que vão desde o estado nutricional da planta, passando por condições climáticas, estresse hídrico e chegando até fatores genéticos. Estes por sua vez podem retardar a penetração do patógeno no tecido hospedeiro, reduzir sua frequência de penetração, diminuir o número de pústulas, número e tamanho de esporos produzidos. Estudos mostram que o tipo de infecção é governado por interação entre genes correspondentes para reação no hospedeiro e genes de patogenicidade no patógeno (Hooker, 1967). Pode ser encontrado ainda em patossistemas a tolerância, que é a habilidade de uma variedade de suportar severidades elevadas sem danos qualitativos ou perdas severas. Assim, o melhoramento busca a melhor maneira possível de agrupar estas características para geração de híbridos comerciais.

A resistência a patógenos pode ser do tipo monogênica. Monogenes dominantes de resistência a *P. polysora* foram identificados por Ullstrup (1965), Futrell (1975), Storey(1954) e Storey (1957). Estes genes de resistência são chamados de Rpp relativos à raça de *P. polysora* que conferem resistência, tendo sido identificados na literatura vários deles como Rpp1, Rpp2 (Storey 1957) e

Rpp9 (Ullstrup 1965). Os genes Rpp1 e Rpp2 estão ligados (Storey 1959), ao passo que o gene Rpp9 está ligado ao gene resistência a *P. sorghi* (Rp1).

A utilização de base genética estreita devido a busca de alta produtividade, tem propiciado o aumento da importância de doenças na cultura do milho por resultar em campos geneticamente semelhantes, favorecendo o surgimento de novas raças dos patógenos. Em 1970, por exemplo, 50% das sementes de milho dos EUA eram produzidas por três linhagens, sendo todas suscetíveis a polysora. Neste ano houve o maior prejuízo causado por doenças da história, quando 50% do milho plantado nos EUA foi destruído pela raça T de *Helminthosporium turcicum*, pois as linhagens utilizadas na produção de híbridos tinham estreita base genética para macho – esterilidade citoplasmática do tipo T e eram suscetíveis a *H. turcicum*.

Outra modalidade de resistência é a chamada quantitativa, caracterizada pela distribuição contínua em graus de resistência em populações segregantes, diferindo das outras modalidades de resistência como a hipersensibilidade, que forma classes distintas e nunca contínuas. Este tipo de resistência é resultado entre combinações de diversos fatores ambientais, idade das plantas e poligenes que podem aumentar o período latente, o número de lesões e o tamanho e número de esporos, caracterizando a resistência do tipo “slow-rusting” (Parlevliet, 1979). Pouca informação existe acerca da herança deste tipo de resistência, sendo necessários mais estudos para a estimativa de suas bases genéticas.

2.3) Marcadores moleculares micro-satélites

Organismos eucariotos possuem sequências de DNA repetidas em tandem aleatoriamente distribuídas pelo genoma (Charlesworth, 1994; Hearne 1996), chamadas de satélites, quando possuem de 5 a 100 pares de base (pb), e estão localizadas na heterocromatina. Quando possuem cerca de 15 pb e localizam-se na eucromatina são chamados de minissatélites. Podem ainda ocorrer na eucromatina repetições de 2-5 pb recebendo então a denominação de micro-satélites (ou SSR, Single Sequence Repeats). O DNA repetitivo é definido por sua rápida taxa de renaturação. Genomas de mamíferos podem possuir até cerca de 10% de DNA repetitivo, enquanto que *Drosophilla virilis* pode ter aproximadamente 50%.

Repetições em tandem são sujeitas a desalinhamentos durante o pareamento cromossômico, o que leva aos agrupamentos em tandem a serem altamente polimórficos, com grandes variações entre indivíduos (Lewing, 1997). Estas repetições são flanqueadas por sequências normais de DNA conservadas, não repetidas (Yu,1994). Desta forma, pode-se identificar variações entre o tamanho dos fragmento que contém as repetições se forem utilizados primers (de cerca de 20 a 30 pb) específicos que tenham homologia com estas regiões de sequência única que flanqueiam esta repetição. A diferença no tamanho desta repetição entre indivíduos pode ser detectada através de resolução de fragmentos alélicos amplificados em gel de agarose especial em concentrações de 3 ou 4%, ou ainda poliacrilamida, que permitem alta resolução (Chin et al., 1996). Este tipo de marcador é codominante, o que permite a amplificação de todos alelos do locus, possibilitando o estudo de genética de populações, estimativas de variabilidade e mapeamentos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Vegetais como sorgo, soja, arroz, uva, cevada, *Brassica* e algumas espécies arbóreas já possuem documentados a presença de locus micro-satélites. Em milho, os primeiros estudos foram realizados por Chin et al. (1996), que demonstraram a existência de polimorfismo em locus micro-satélites. Análises de cosegregação podem facilmente identificar praticamente qualquer sítio genômico, permitindo a seleção assistida por marcadores e facilitando o melhoramento genético (Vogel, 1997).

3) Material e Métodos

3.1) Material Vegetal

As linhagens utilizadas neste estudo pertencem ao programa de melhoramento da Zeneca Sementes, estão em avançado grau de endogamia (autopolinizações sucessivas durante oito gerações) e foram previamente avaliadas em condições de campo para resistência/suscetibilidade. A linhagem P1 foi classificada como resistente, com severidade média de 3,0. A linhagem P2 foi classificada como suscetível, apresentando severidade média de 8,5, avaliadas em escala diagramática que vai de 1 a 9, sendo 1 extremamente resistente e 9 extremamente suscetível. As demais gerações também foram previamente obtidas na estação, sendo F1 o cruzamento entre as duas linhagens, RCP1 o cruzamento entre F1 e o pai resistente, RCP2 o cruzamento entre F1 e pai suscetível e F2 autopolinização de F1.

3.2) Avaliação da resistência a ferrugem polysora em campo

O experimento foi instalado na estação experimental da Companhia Zeneca Sementes Ltda, em Cravinhos (S.P.), localizado em altitude de 820 metros latitude 23º, no Nordeste do Estado de São Paulo, sob o regime de plantio direto na palhada de aveia preta.

Foram realizados dois plantios com três repetições cada. O primeiro plantio foi realizado em 10 de dezembro de 1997 e o outro em 10 de janeiro de 1998, sendo que a bordadura composta por um híbrido comercial altamente suscetível foi plantada com 30 dias de antecedência para servir como

fonte de inóculo natural. A parcela experimental consistiu de uma linha de 5 metros com 5 plantas/m para as gerações P1, P2 e F1, duas linhas para as gerações RCP1 e RCP2 e quatro linhas para a geração F2. No campo, as gerações P1 e P2 receberam bordaduras de linhagens resistentes, as gerações F1, RCP1, RCP2 e F2, bordaduras de híbridos também resistentes para que não ocorresse nas parcelas competição entre híbridos e linhagens que seriam avaliadas.

As adubações foram de 400 Kg/ha de 10-20-20 no plantio e cobertura com 200 Kg/ha de uréia 35 dias após o plantio. Entre 10 e 45 dias após o plantio, houve aplicações semanais de lambdacialothrina, produto comercial Karatê, para controle de pragas.

O patógeno foi inoculado na bordadura com uredosporos coletados em três locais distintos (Guaíra, Monte Limpo e Cravinhos) de forma a assegurar a ocorrência da doença e possibilitar inoculação natural no experimento.

A severidade da doença foi avaliada no estádios fenológicos 5, segundo Fancelli & Silveira Neto (1997). A severidade média da doença no tecido foliar da planta inteira foi avaliada através de uma escala diagramática, atribuindo notas de 1 a 9 que correspondem aos níveis de 0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 e acima de 75% da área foliar atacada, respectivamente (Anexo).

3.3 Análises estatísticas

A análise das médias das gerações foi realizada através do modelo matemático $Y = m + a_1d + a_2h$ de Mather e Jinks (1971), na qual **Y** é a média de uma dada geração, **m** a média geral, **d** o agrupamento do efeito genético aditivo, **h** o agrupamento do efeito genético dominante e **a₁** e **a₂** as relativas contribuições destes efeitos para cada média da geração.

Para a análise da variância da média das gerações, os dados expressos

como notas e porcentagem foram transformados conforme recomendação de Steel & Torrie (1960). O teste de significância dos efeitos genéticos e desvios do modelo foram avaliados mediante o teste F na análise da variância das médias das gerações. O valor da heterose foi determinado através da fórmula $Heterose = F_1 - MP$, na qual MP é a média das linhagens parentais. Estimativa da herdabilidade no sentido amplo, foi calculada pela fórmula $(\sigma^2 F_2 - \sigma^2 e) / \sigma^2 F_2$, na qual $\sigma^2 F_2$ é a variância fenotípica dos indivíduos na geração F2 e $\sigma^2 e$ é a variância ambiental entre indivíduos do mesmo genótipo, estimada através do agrupamento da soma de quadrados e dos graus de liberdade das linhagens parentais e da geração F1. Estimativas do número mínimo de fatores efetivos (K_1) foram calculados de acordo com a fórmula de Castle - Wright (Castle, 1921 e Wright, 1921), sendo $K_1 = D^2 / 8 (\sigma^2 F_2 - \sigma^2 F_1)$, na qual D é a diferença entre as médias das linhagens parentais, σF_1 é o desvio padrão da média da geração F1 e σF_2 é o desvio padrão da média da geração F2.

3.2) Extração de ácidos nucléicos

Após a avaliação, 10 plantas de cada repetição pertencendo aos extremos de suscetibilidade e resistência foram selecionadas dentro da progênie F₂. Colheu-se um pedaço de folha de cada planta, dos parentais e F1 para extração de ácidos nucléicos. As plantas foram identificadas de acordo com sua parcela, número individual e característica resistente (r) ou suscetível (s). As folhas foram coletadas e transportadas em isopor até o Depto. de Fitopatologia da ESALQ onde foram armazenadas em ultra freezer à -80°C. A extração foi realizada de acordo com Hoisington et al.(1994). O tecido vegetal foi macerado em cadinhos de porcelana com o auxílio de nitrogênio líquido e transferido para tubos de 50

ml, aonde foi adicionado 10 ml de solução de extração (0,1g de CTAB, 1,0 ml de 1M Tris pH 7,5, 1,0 ml de 0,5 M EDTA pH 7,0,1,4 ml de 5M NaCl e 0,1 ml de β -mercaptoetanol e 6,5 ml de água destilada deionizada). Seguiu-se uma incubação por 60 minutos a 65°C. Em seguida, foi realizada uma extração com 10 ml de 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico, invertendo-se o tubo gentilmente durante alguns minutos e seguindo-se uma centrifugação a 3470 rpm durante 10 minutos. Foi retirado o sobrenadante e o passo anterior foi repetido. Novamente retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 10 ml de álcool etílico absoluto, invertendo gentilmente os tubos. Nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições. Em seguida, lavou-se os pellets durante 10 minutos com álcool etílico 75%, 90% e 20 minutos com álcool etílico absoluto (99,8%), ressuspendeu-se em seguida em 500 μ l de TE, transferindo então o material para tubos “eppendorf”.

Para purificação do DNA, fez-se um digestão utilizando 1mg/ml de RNase por amostra durante 2 horas a 37°C. Em seguida, adicionou-se 500 μ l de fenol saturado invertendo-se gentilmente durante alguns minutos e centrifugando a 12.000 rpm durante 10 minutos, repetindo esta operação. Transferiu-se então o sobrenadante para outro tubo e foi adicionado 60 μ l de 5M NaCl e 250 μ l de etanol absoluto realizando-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após a secagem do pellet, este foi lavado com solução WASH 1 (76ml etanol absoluto, 20ml de 1M KOAc e 4ml de água destilada deionizada) durante 15 minutos e em seguida rinsado com solução WASH 2 (76 ml etanol absoluto, 100 μ l NH₄OAc e 23,9 ml de água destilada deionizada). Após secos, foram ressuspendidos em 250 μ l de TE e quantificados em fluorômetro.

Após a quantificação, foram realizadas diluições de cada amostra para concentração final de 5ng/ μ l. Para análise utilizando marcadores, foi realizado o agrupamento entre amostras de DNA de plantas resistentes e suscetíveis, transferindo-se 5 μ l de cada diluição das amostras resistentes para novo tubo,

constituindo assim o “bulk” resistente e realizando o mesmo procedimento para a composição do “bulk” suscetível. Esta técnica é interessante por diminuir o número de reações de PCR a serem realizadas (Michelmore, 1991), reduzindo significativamente os custos e o tempo despendido. Assim, somente marcadores ligados a genes de resistência a *P. polysora* revelarão polimorfismos entre os “bulks”.

3.3) Amplificação de locus micro-satélites e resolução em géis de agarose

Para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foram utilizados 10ng de DNA por amostra, sendo pai resistente (R), pai suscetível (S), F1, “bulk” resistente (BR) e “bulk” suscetível (BS). A reação de amplificação, com volume final de 30 μ l, foi otimizada a partir do protocolo desenvolvido por Chin et al. (1996), sendo constituída por 2 μ l de DNA 5ng/ μ l, 3 μ l de Tampão da *Taq* 10X, 0,3 μ l cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,5 μ l “forward primer”, “0,5 μ l reverse primer”, 1 μ l *Taq* DNA polimerase e 21,8 μ l de água MILLI Q. Deste modo, as concentrações ficaram 1X tampão da *Taq*, 0,3 mM dNTP, 0,33mM Primer e 1 unidade de *Taq* por reação. Primeiro colocou-se o DNA nos tubos, fez-se então o Mix, suficiente para 5,5 reações (R, S, F1, BR, BS e 0,5 reação a mais), adicionou-se então ao tubo com DNA 28 μ l do mix, agitou-se levemente, pulsou-se rapidamente em microcentrifuga a 13.000 rpm e adicionou-se uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação durante a reação. As reações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ. Reserch Inc.) Foram utilizados 6 primers (*bngl* 469, *bngl* 125, *bngl* 381, *bngl* 121, *phi* 083, *bngl* 420) do grupo de ligação 2 por já terem sido identificados locus de resistência a *P. polysora* e outras doenças e pragas (McMullen & Sincox, 1995) neste cromossomo.

O programa utilizado foi de 94°C 3 min, 94°C 1 min (denaturação), 65°C 1 min, 72°C 2 min (polimerização), repetindo dois ciclos e abaixando a temperatura de anelamento 1°C até atingir 55°C, então repetindo 19 vezes este ciclo, terminando com 5 min a 72°C para polimerização final. Os primers utilizados foram adquiridos de Reserch Genetics Inc., EUA.

Depois da amplificação, cada amostra recebeu 4 µl de tampão de corrida (EDTA 0,5M pH 8,0, + glicerol 99% + bromofenol blue). Foram tomados então 17 µl da amostra e carregados em gel de agarose 3% (1/4 agarose Tipo I, 3/4 agarose Amplisize, 10% TBE (Tris 0,5 M pH 8,0 + ácido bórico + EDTA 0,5 M pH 8,0) e 90% água destilada deionizada) corado com brometo de etídeo. A resolução foi feita por corrida das amostras em tampão TBE 1X durante 3 horas a 70 V. Após a corrida, os géis foram fotografados em câmera polaroide e analisados verificando o polimorfismo entre as bandas dos pais, a presença destas em F1 e a presença de polimorfismo de bandas ou de intensidade de bandas entre os “bulks”.

4) Resultados e discussão

4.1) Resistência a polysora

O clima no local do ensaio favoreceu a ferrugem polysora somente a partir da segunda quinzena de janeiro, resultando maior severidade na segunda época de plantio. As bordaduras, sendo suscetíveis e mais velhas, serviram para aumentar o inóculo inicial, resultando assim nas diferenças visíveis entre plantas resistentes e suscetíveis. A linhagem parental resistente, parental suscetível, híbrido, F2, RcP1 e RcP2 apresentaram severidades médias na primeira época de 1.3, 4.6, 1.8, 2.1, 1.8 e 3.7, respectivamente, sendo que na segunda época apresentaram severidades médias de 2.4, 5.7, 3.0, 3.3, 3.0, 4.33, na mesma ordem. As heteroses calculadas para primeira e segunda época foram de -1.15 e -0.98, ambas sendo significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t. (Tabela 1).

Tabela 1. Média das reações a *P. polysora* avaliadas segundo escala de severidade da doença na planta inteira e valor da heterose

	Gerações						Heterose F1-MP ^a
	P1	P2	F1	F2	RcP1	RcP2	
1 ^a Época	1.3	4.6	1.8	2.1	1.8	3.7	-1.15
2 ^a Época	2.33	5.67	3.02	3.3	3.03	4.33	-0,98

Tabela 2. Estimativa da herdabilidade (h^2) e do número de fatores efetivos (K_1) envolvidos na resistência a *P. polysora*

	Herdabilidade (h^2)^a	Fatores efetivos (K)^b
1ª Época	81.5%	2.36
2ª Época	74.7%	3.60

a. Herdabilidade estimada pela fórmula : $h^2 = [\delta^2 F_2 - \delta^2 e] / \delta^2 F_2 \times 100$

b. Número de fatores efetivos (K_1) pela fórmula : $K_1 = D^2 / 8(\delta^2 F_2 - \delta^2 F_1)$

A distribuição das notas mostra a continuidade entre os graus de resistência nas gerações F2, RcP1 e RcP2, caracterizando a resistência como quantitativa (Fig. 1 e 2). As herdabilidades calculadas para primeira e segunda época foram respectivamente de 81.5% e 74.7%. O número estimado de fatores efetivos para primeira época foi de 2.36 e para segunda época foi de 3.6 (Tabela 2). As variações observadas nas progênies calculadas pelo modelo aditivo - dominante foram, para os efeitos aditivo, dominante e desvio de 61.0%, 35.6% e 3.4% (Tabela 3), respectivamente. Para segunda época, as variações aditiva, dominante e desvio foram de 60.1%, 35.9% e 4.0%, respectivamente. A análise da variância para as médias da severidade das reações mostra que os efeitos aditivos e dominantes foram significativos ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 4).

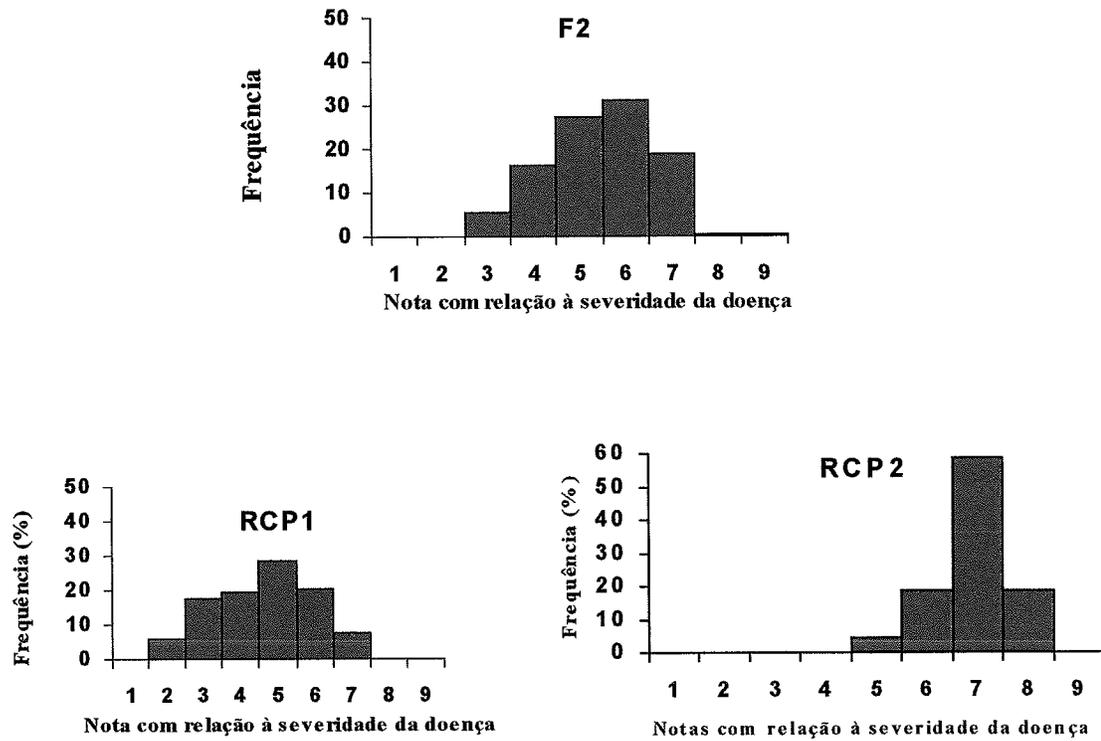


Figura 1. Distribuição das notas em relação a severidade da doença avaliada na primeira época nas gerações F2, RCP1 e RCP2.

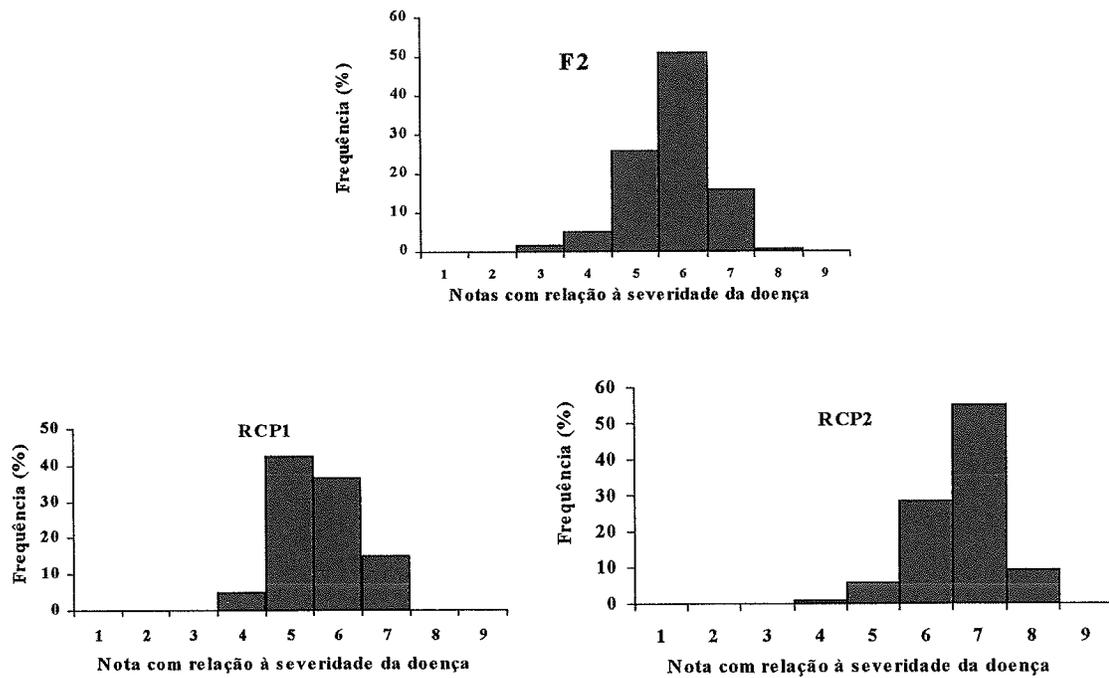


Figura 2. Distribuição das notas em relação a severidade da doença avaliada na segunda época nas gerações F2, RCP1 e RCP2.

Tabela 3. Porcentagem de variações das reações a *P. polysora* entre as médias das gerações, calculada para os efeitos genéticos aditivos, dominantes e desvios do modelo aditivo - dominante

	Efeitos		
	Aditivo	Dominante	Desvios
1ª Época	61.0%	35.6%	3.4%
2ª Época	60.1%	35.9%	4.0%

Tabela 4. Análise da variância para as médias das reações a *P. polysora*

	Causas de Variação				
	Repetições	Aditivo	Dominante	Resíduo	Desvios
1ª Época^a	0.113	0.514*	0.301*	0.009 ns	0.012
2ª Época	0.049	0.192	0.115	0.004	0.07

a. Quadrado médio

(* , ns) Indicam significativo ao nível de 1% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente

Outro parâmetro utilizado foi o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AUPDC)(Fig.3), que serviu para demonstrar o efeito fenotípico global de todos os genes de resistência envolvidos durante o ensaio, evitando que ocorra a resistência governada por genes que estejam sendo expressos somente num determinado estágio em que as plantas foram avaliadas. A AUPDC para a linhagem resistente, suscetível e híbrido foi de 203.46, 391.62 e 283.40 respectivamente.

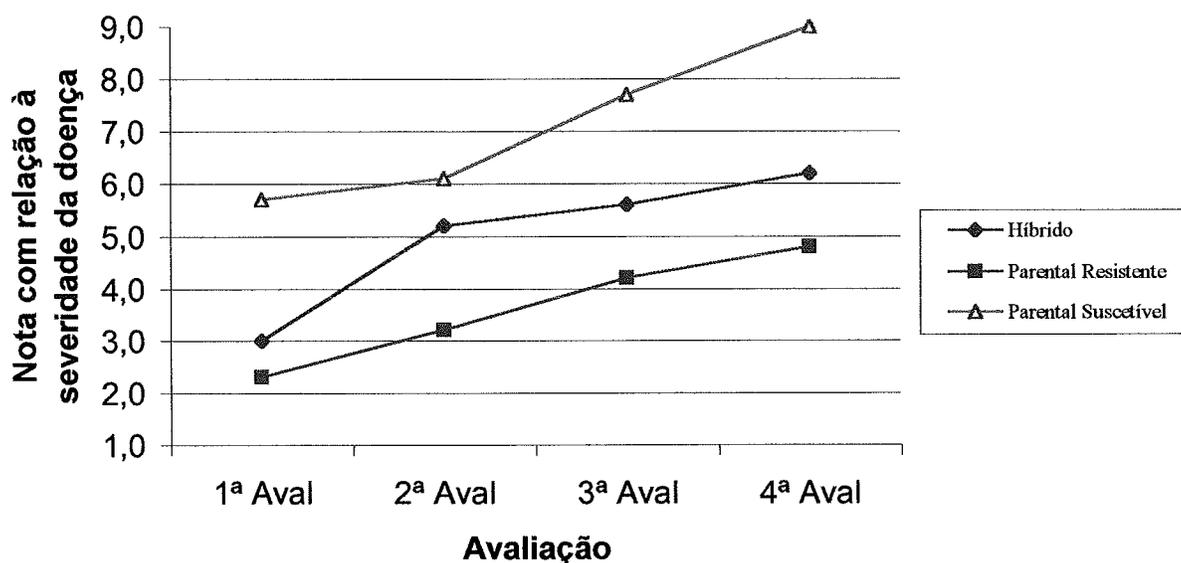


Figura 2. Curva de progresso da doença de *Puccinia polysora* em milho

A média das plantas selecionadas foi de 1.6 para plantas resistentes e 2.6 para plantas suscetíveis. A AUPDC das plantas selecionadas foi de 32.2 para as plantas resistentes e 68.6 para plantas suscetíveis.

4.2) Amplificação de Locus micro-satélites

As reações realizadas mostraram que para os primers testados, *bngl* 469, *bngl* 125, *bngl* 381, *bngl* 121, *phi* 083, *bngl* 420, com localização 2.01, 2.02, 2.03, 2.03, 2.04, 2.04 e 2.06, respectivamente, não revelaram polimorfismos entre os “bulks”. No caso dos primers *bngl* 125, *bngl* 469 *bngl* 108 e *bngl* 381, pode-se identificar polimorfismo entre os pais, porém não entre os “bulks”, não caracterizando ligação entre estes marcadores e o gene de resistência a *Puccinia polysora*.

A figura 4 mostra um gel de agarose com as bandas características obtidas a partir da reação de PCR utilizando os primers específicos.

Figura 4. Amplificações de locus micro-satélites. Da direita para esquerda: *bngl* 420 *bngl* 469, *bngl* 381. Embaixo no mesmo sentido: *bngl* 108, *bngl* 180.

5) Conclusões

A resistência a *Puccinia polysora* é governada por vários genes, com cerca de 60% de efeitos aditivos e 35 % de efeitos dominantes. A herdabilidade do carácter é alta, o que possibilita a obtenção de híbridos com resistência elevada através do cruzamento entre linhagens resistentes e suscetíveis. É possível também prever o grau de resistência deste híbrido, desde que se conheça o grau de resistência das linhagens parentais.

A resistência quantitativa leva a importante redução da AUPDC, demonstrando que a doença é consideravelmente reduzida quando comparadas com a sua ocorrência em materiais suscetíveis.

Não foi identificado locus de resistência no entre as regiões 2.01 a 2.06 do cromossomo 2.

6) Referências bibliográficas

- BAILEY, B. A.; SCHUH, W.; FREDERIKSEN, R.A.; BOCKHOLT, A. J.; SMITH, J. D. Identification of slow -rusting resistance to *Puccinia polysora* in maize inbreds and single cross. **Plant Disease**, St. Paul, **71**(6): 518-521, 1987.
- CHARLESWORTH B; SNIEGOWSKI P; STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** **371**:215-220, 1994.
- CHIN, E.C.L; SENIOR, M.L; SHU, H. et. al. Maize simple DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, V.39, p. 866-873, 1996.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FUTRELL, M. C. *Puccinia polysora* epidemics on maize associated with cropping practice and genetic homogeneity. **Phytopathology**, St. Paul, **65**(11): 1040 - 1042, 1975.
- FUTRELL M.C; HOOKER A.L; SCOTT GE. Resistance in maize to corn rust controlled by a single dominant gene. **Crop Sci.** **15**:597-599. 1975.
- HOOKER, A.L. The genetics and expression of resistance in plants to rusts of the genus *Puccinia*. **Annual Review of Phytopathology**, Wallingford, **5**:163-168, 1967.

MATHER K. JINKS JL. Biometrical Genetics. Cornell University. Press Ithaca. New York, 1971.

McMULLEN, M. D.; SIMCOX, K. D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 6, p.811-15, 1995.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-32, 1991.

RYLAND, A. K. & STOREY, H.H. Physiological races of *Puccinia polysora* Underw. **Nature**, London, **176**:655-656, 1955.

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Wallingford, **17**:203-222, 1979.

PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. São Paulo: Fundação Cargil, s/d. 650p.

ROBERT, A. L. Host ranges and races of the corn rusts. **Phytopathology**, St. Paul, **52**: 1010-1012, 1962.

- RODRIGUEZ - ARDON, R.; SCOTT, G. E.; KING, S. B. Maize yield losses caused by southern corn rust. **Crop Science**, Madison, **20** (6) : 812-814, 1980.
- SCOTT GE; ZUMMO N. Effect of genes with slow-rusting characteristics on southern corn rust in maize. **Plant Disease** **73**:114-116. 1989.
- SENIOR, L.; LEE, M. Polymorphic microsatellites found in cDNA clones, **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 71, 72-73, Apr. 1997.
- SHURTLEFF, M. C. ed. **Compendium of corn diseases**. 2. Ed., St. Paul, American Phytopathological Press, 1973.104p.
- SILVA, H.P. Incidência de doenças fúngicas na “safrinha”. **In: DUARTE, A.P.,** Coord. **IV Seminário sobre a cultura do Milho “Safrinha”**. Campinas, IAC/CDV, p. 81-86, 1997.
- SILVA,HP. & MENTEN, J. O. M. Manejo integrado de doenças na cultura do milho.**In: FANCELLI e** Coord. **Simpósio sobre a cultura do milho**, Piracicaba, ESALQ/USP, p.40-56,1997.
- STOREY, H.H.; HOWLAND (RYLAND) A. K. Resistance in maize to the tropical american rust fungus, *Puccinia polysora* Underw. I. Genes Rpp1 e Rpp2. **Heredity**, London, **11**(3) : 289-301, 1957.
- STOREY H.H.; HOWLAND A., Resistance in maize to the tropical American rust fungus *Puccinia polysora* Underw II. Linkage of genes Rpp1 and Rpp2 **Heredity** **2**:289-301, 1957.

ULLSTRUP, A. J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an American race of *Puccinia polysora*. **Phytopathology**, St Paul, **55**: 425-428, 1965.

YU, Y.G.; SAGHAI MAROOF, M.A.; BUSS, G.R. et. al. RFLP and Microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, v.84, n.1, p. 60-64, 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
DEPARTAMENTO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS DO VÍRUS DO MOSAICO DO TOMATEIRO -
ToMV EM *Nicotina Tabacum***

Aluno:Max Francisco Fernandes

Dezembro 1998

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que me auxiliaram neste trabalho: à Profa. Dra. Neusa Nogueira, pelos ensinamentos necessários para a execução deste; à Ms. Keila Duarte pelas orientações e por ter me fornecido os vírus e as plantas utilizadas no experimento; aos técnicos de Nível Superior Mônica, Adilson, e a Daniela e Renata, por todo o apoio e ajuda.

INTRODUÇÃO:

O vírus do mosaico do do Tomateiro (ToMV) infecta tomateiros comprometendo a produção. Este vírus foi identificado recentemente no Brasil, havendo assim, da mesma forma que em outros países, uma preocupação quanto à diagnose e ao controle desta virose.

O ToMV, identificado e caracterizado no município de Conchal, SP, teve seu primeiro relato em duas regiões produtoras de tomate, localizadas na Zona da Mata e no Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais, sendo constatada sua ocorrência em 73% das amostras coletadas.

O ToMV constitui-se em uma virose que em potencial pode se tornar economicamente importante, pois resulta em grandes perdas na produção de tomates, especificamente na Europa. Os sintomas no tomateiro são mosaicos de áreas verde claro e escuro na folhas; o enrolamento, a redução e afilamento de folíolos, além de apresentar aspecto bolhoso nas folhas e aspermia nos frutos.

Como características gerais do ToMV, este vírus faz parte do grupo dos Tobamovírus, contém RNA de fita simples como material genético; possui tamanho de 300 por 18 nm e representa um dos vírus mais persistentes e infecciosos que se tem conhecimento.

Sua transmissão pode se dar através de ferramentas e pelo manuseio humano, assim como por sementes, o que o torna mais problemático que o TMV (Vírus do Mosaico do Tomateiro), cuja transmissão não se dá através de sementes. O vírus pode permanecer ativo por anos, sendo bastante sensível a umidade do solo (em solos secos, chega a permanecer latente por dois anos e em solos úmidos, por apenas um mês), tendo-se o cuidado de eliminar os restos culturais de forma a não serem

fontes de inóculo para o solo. A ocorrência de insetos vetores na transmissão desses vírus é desconhecida.

Apesar do ToMV causar prejuízos no tomateiro, existe uma gama bastante grande de hospedeiros intermediários, nos quais ele se aloja, sendo mais comuns as plantas das famílias *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Scrophulariaceae* e *Solanaceae*.

No Brasil, o controle dessa virose resume-se no uso de sementes sadias, fuga de áreas contaminadas, rotação de culturas, e, finalmente, um manejo adequado jao plantio de qualquer cultura. O tratamento térmico para sementes secas de tomate, utilizando ar quente a 70 - 76 °C por 1 a 3 dias, embora não erradique o vírus do embrião da semente, também é sugerido como tratamento. Na Europa, faz-se menção do tratamento de sementes utilizando uma solução de fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 10% por pelo menos 15 ou então o tratamento térmico para sementes secas, contudo, estes tratamentos ainda estão em fase de pesquisa.

PRINCIPAIS SINTOMAS:

Fonte: Manual de Fitopatologia, Vol. II

OBJETIVO:

Este trabalho teve como objetivo obter fotos de microscopia eletrônica de transmissão de plantas de *N. tabacum* sadias e contaminadas com o vírus ToMV. Estas fotos, após serem obtidas, serão comparadas mostrando os sintomas causados pela presença do vírus, e se possível, o próprio vírus.

PREPARO DAS FOLHAS CONTAMINADAS PARA CORTES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA:

Devido à baixa densidade eletrônica dos materiais biológicos, as imagens produzidas ao M. E. são pouco nítidas. Há necessidade de melhorar o contraste para se obter melhor nitidez das imagens e informações precisas. Para isso, é necessário contrastar o material ou metalizá-lo.

Contrastação negativa:

A contrastação negativa ou colaração negativa é uma técnica utilizada para examinar ao microscópio eletrônico de transmissão, pequenas partículas em suspensão, no caso vírus. Consiste no envolvimento destes elementos por um meio mais denso que eles, de modo que suas imagens apresentam-se como um negativo, isto é, o elemento fica mais transparente aos elétrons do que a solução contendo o metal de alto número atômico, aparecendo portanto, mais claro sobre o fundo escuro.

Os eletrodensos ou contrastantes são soluções de metais pesados e de fina granulação. O sucesso da obtenção de uma boa imagem vai depender da limpeza das suspensões, do seu pH e da

solução contrastante, bem como da afinidade entre as suspensões e as soluções contrastantes. Os principais agentes contrastantes são: Ácido fosfo-tungstico (PTA); Acetato de Uranila; Citrato de Uranila; Molibdato de amônia; Sílico-tungstato de Sódio (SST).

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS:

As técnicas histológicas ao nível de M. E., não diferem basicamente daquelas empregadas em microscopia fotônica, constituindo-se da fixação, inclusão, seccionamento e exame.

Fixação:

É o processo pelo qual se obtém a morte celular, e a estabilização dos seus componentes celulares e intercelulares de tal modo que o mínimo de deslocação, movimentação, eliminação de substâncias solúveis ocorra durante os processos subseqüentes de desidratação e inclusão.

O fixador utilizado neste trabalho foi o tetróxido de ósmio (OsO_4) tamponado com pH próximo de 7. Apesar de sua penetração não ser nem muito fácil, nem muito uniforme, ele preserva bem as estruturas finas, inclusive os ribossomos. Além disso, o ósmio, por ser um elemento de alto número atômico, confere contraste ao espécimen.

As soluções utilizadas na fixação foram:

Glutaraldeído 2%	0.20 ml
Paraformaldeído (PFA) 4%	1.25 ml
CaCl_2 5mM	0.25 ml
Tampão Cacodilato pH 7.2 0.2 M	3.30 ml

Os cortes foliares foram mergulhados nessas soluções, em três frascos diferentes, contendo cortes de planta sadia (3314), cortes de plantas com sintomas iniciais de ataque do vírus(3315), e plantas com sintomas agudos de ataque (3316), e colocados no vácuo por aproximadamente 15 minutos. Após este tempo, os frascos foram levados a geladeira por 45 minutos.

Decorrido este tempo, os cortes foram lavados com tampão Cacodilato 0.1 M, três vezes, com duração de 10 minutos cada lavagem. Em seguida, foram acrescentados o Ósmio 1%, durante 1 hora, em tampão Cacodilato 0.2 M.

Após este tempo, os cortes foram lavados com solução salina 0.9%, três vezes, cada uma delas com duração de cinco minutos. E, após este período, acondicionados em Acetato de Uranila durante toda a noite.

Desidratação:

Após a fixação, o material foi lavado com tampão e em seguida, desidratado por banhos sucessivos de concentrações crescentes de acetona (agente que substitui a água e a elimina do espécime). As concentrações foram as seguintes:

Acetona 25%	5 min
Acetona 50%	5 min
Acetona 75%	5 min
Acetona 90%	2 x 10 min
Acetona 100%	3 x 30 min

Inclusão:

Após a desidratação, os cortes foram acondicionados em uma mistura de resina e acetona, na proporção 1:1, e deixadas na geladeira por 3 horas, para a substituição da acetona pela resina. A resina utilizada foi a resina EPON, por ser produzir blocos melhores para cortes de tecido vegetal infectado com vírus.

Depois de decorrido o tempo, a solução foi trocada, e também alterada, passando a ter 2 partes de resina para uma parte de acetona, e foram incubadas durante toda a noite. Após este período, a mistura foi substituída por resina pura, e deixada na geladeira por mais 2 horas.

Emblocagem:

Terminada a inclusão, os cortes foram acondicionados em uma forma para que fossem formados os blocos de resina EPON que recobririam o material a ser observado. Nesta forma foram acondicionados todos os cortes e colocada a resina líquida, pura, e levada à estufa de 60 °C durante 24 horas, para que a resina se polimerize. Após a polimerização os blocos estão prontos para serem cortados.

ULTRAMICROTOMIA:

Preparo De Blocos para corte:

Com uma gilete, são feitos cortes na resina de maneira que o material a ser examinado esteja a mostra. Após este trabalho, você deve recortar a resina ao redor do material, na forma de um trapézio, anotando o lado em que a base maior está. O tamanho deste trapézio irá variar de acordo com o tipo dos cortes que irão ser realizados. Estes podem ser semi-finos e ultra-finos. Os cortes de M.E. são

cortes ultra-finos, terão 60 micrômetros de espessura, e os cortes semi-finos, que são realizados para M. Óptica, tem espessura variável entre 180 a 200 micrômetros.

Preparo de Navalha de Vidro:

Elas devem ser feitas pouco tempo antes de serem utilizadas, a partir de barras de vidro especial (semicristal) 5-6 mm de espessura, com fio constituído por um ângulo de 40 a 50 °Este fio deve ser perfeito (sem estrias) na interseção entre a linha de fratura curvada e o lado esquerdo do fio.

Execução dos Cortes:

Quando os blocos estão prontos, após a "toilette", estes são cortados, e se a "toilette" foi bem realizada, os cortes irão formar uma fita contínua, na superfície de água deionizada, e serão recuperadas com o auxílio de uma alça, e colocados sobre grades previamente preparadas, onde sofrerão coloração dupla positiva, para serem observados ao M. E..

Os cortes podem ser realizados com navalhas de vidro, ou então com navalhas de diamante, que produzem um corte de melhor qualidade (nós utilizamos esta em nossos cortes), porém os riscos na navalha de diamante podem causar a sua inutilização para esta função.

Coloração Dupla Positiva:

Em nosso trabalho, utilizamos este tipo de coloração dupla positiva, composta de Acetato de uranila 2.5 %, e Citrato de Chumbo. Colocou-se as grades com os cortes voltados sobre uma gota previamente depositada sobre um filme plástico, devidamente protegida da poeira ambiental. Deixar 30

minutos, após este tempo, as grades devem ser lavadas em três seqüências de água deionizada, mergulhando-se 20 vezes em cada frasco.

Após a lavagem, as grades são colocadas em outra gota previamente colocada, agora de Citrato de Chumbo, e novamente são esperados 30 minutos, e repetem-se os processos de lavagem das mesmas. Após este procedimento, estão prontos os cortes para serem levados ao M. E.

OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

Com os cortes prontos, foram observados ao M.E. as grades de plantas sadias e contaminadas, nestas grades foram observadas estruturas celulares que foram fotografadas com aumentos variando de 12000 a 20000 vezes.

Infelizmente na camada de células contaminadas que nós cortamos não foram encontradas partículas virais, porém foram encontradas sintomas que serão comentadas e mostradas no decorrer deste trabalho.

REVELAÇÃO DAS FOTOGRAFIAS:

Para a revelação dos negativos obtidos, foram utilizados as seguintes soluções: REVELADOR D76 (composto por Água, Elon (metol), Sulfito de Na Anidro, Hidroquinona, Borax, Ácido Bórico); Ácido Acético como "stop" da reação; Fixador LS (Água, Tiosulfato, Sulfito de Na anidro, Ácido Acético, Ácido Bórico (Cristais) Alúmen de k), nesta seqüência, no escuro.

Os negativos devem ficar mergulhados no revelador durante aproximadamente 10 minutos, após este tempo, devem ser mergulhados na solução de ácido acético bem diluído, para paralizar a reação. Isto deve demorar alguns segundos. Após a lavagem, eles devem ser fixados na solução LS por aproximadamente 8 minutos, e depois lavados em água corrente.

Após a lavagem, devem ser secos ao ar, tomando-se cuidado para não deixar que um negativo encoste em outro, o que causaria a perda dos mesmos.

Revelação das Ampliações:

Para se revelar as ampliações, foram expostas as imagens dos negativos em papel fotográfico por durante 7 a 9 segundos, e após a exposição, foram reveladas no revelador D76, paralisadas com ácido acético, e depois fixadas com fixador LS, e posteriormente foram lavadas em água corrente durante 20 minutos, e depois secas ao ar durante a noite.

CONCLUSÕES A PARTIR DAS FOTOGRAFIAS CONSEGUIDAS:

Infelizmente os vírus não foram localizados no tecido estudado, porém seus efeitos podem ser observados comparando as fotos dos núcleos sadios (fotos 4633, 4637) e dos núcleos contaminados (4639, 4640, 4641 e 4642). Nestes, nota-se que a deterioração de eucromatina é evidente, e que apenas o nucléolo resiste inicialmente ao ataque do vírus.

Os cloroplastos também são atacados pelo ToMV, onde notamos a formação de envaginações da membrana citoplasmática, e a formação de vesículas, onde segundo FRANCKI *et al*, serão formadas as partículas virais, que posteriormente sairão para o citoplasma e nele ganharão a capa proteica para que possam infectar outras células (fotos 4643, 4644, 4645, 4647 e 4648).

Uma futura exploração do material coletado pode levar a localização das partículas virais dentro do citoplasma, evidenciando assim a presença do vírus na planta *N. tabacum*.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

NOGUEIRA, N. L. - Curso de Microscopia Eletrônica - Lavras - MG, 1975.

FRANCKI, R. I. B., MILNE, R. G., HATTA, T. - Atlas of Plant Viruses - Vol. II

DUARTE, K.M.R. - Produção de anticorpos monoclonais contra o Vírus ToMV - Vírus do Mosaico do Tomateiro, ESALQ/USP - 1995.

MATTHEWS, R. E. F. - Fundamentals of Plant Virology, New Zealand, 1992.

BERGAMIN, A. F. - Manual de Fitopatologia, Volume II, ESALQ, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
PET - Biotecnologia Agrícola

PSICOLOGIA DA ADOLESCÊNCIA

Aluno: Max Francisco Fernandes
Julho de 1998

INTRODUÇÃO:

Todos os professores devem estar cientes de como seus alunos aprendem, como gostam de aprender e também em que fase do desenvolvimento intelectual estão. Este trabalho foi realizado com o intuito de mostrar um pouco desta realidade aos alunos da disciplina Psicologia da Adolescência, que certamente serão, ou professores ou extencionistas, e terão pessoas sobre seus cuidados.

Neste trabalho realizamos também uma pesquisa com alunos da escola Professora Benedita Ferreira da Costa, da rede pública de ensino de primeiro e segundo graus de Piracicaba. Os alunos entrevistados foram da sétima série do primeiro grau, período diurno, com idades variando de 13 a 16 anos.

DESENVOLVIMENTO:

Para conhecermos como nossos alunos aprendem, precisamos conhecer um pouco sobre o desenvolvimento mental da criança, sua fase de aprendizagem e também como os indivíduos dessa faixa de desenvolvimento organizam seus pensamentos, para que possam estabelecer relações.

Segundo Piaget, as idades mentais (ou fases) vão desde a fase do concreto (idade escolar), onde a criança só consegue aprender e raciocinar sobre coisas concretas, que podem ser tocadas ou lembradas por ela no momento da solução dos problemas.

Após essa idade, que pode durar até os dez ou doze anos, a criança se desenvolve e passa a conseguir estabelecer relações abstratas, podendo imaginar objetos nunca vistos ou então relacionar o concreto e o abstrato. A lógica também a ser uma realidade mental para o indivíduo, por isso ele questiona todo e qualquer ato que não lhe seja explicado.

COMO A CRIANÇA APRENDE:

Baseada na fase de desenvolvimento, cada grupo de crianças aprende de uma maneira diferente, e o educador deve estar atento a estas mudanças, pois sua didática deve estar de acordo com a capacidade de assimilação da criança.

Se a criança ainda esta na fase de desenvolvimento onde ela só consegue aprender coisas concretas, as aulas à elas ministradas nunca devem ser baseadas em pensamento abstratos, pois elas não conseguiram aprender.

Os desafios apresentados aos alunos também devem ser de um grau de dificuldade que estimule o aluno a pensar e tentar resolver, e que ele seja difícil o suficiente para que ele não consiga resolver facilmente, mas não tão difícil a ponto da criança não conseguir resolver.

ESTIMULAÇÃO

Pesquisas realizadas por cientistas americanos mostram que as crianças aprendem muito mais quando estão diante de um desafio, isto é, quando o problema apresentado é de solução complicada, e estimula o raciocínio.

Jogos, competições, trabalhos em grupo também estimulam os alunos a se relacionarem e se desenvolverem muito mais rapidamente, e o melhor, ajudando a seus colegas menos desenvolvidos a melhorarem seus ritmo de aprendizagem.

Tendo um conhecimento dos jogos que as crianças gostam, o educador tem como relacionar o conteúdo teórico do programa de ensino com estes jogos, estimulando assim a aprendizagem de conhecimentos antes julgados sem aplicabilidade pelos próprios alunos.

Alguns pesquisadores afirmam que toda matéria pode ser ensinada a qualquer idade, desde que a forma de apresentação do conteúdo seja feita de forma adequada ao estágio mental do aluno.

Se o educador se atentar a estes fatos, muitos problemas que acontecem nas salas de aula serão amenizados, e o aproveitamento dos alunos será muito melhor.

Alunos problemas muitas vezes são aqueles que tem um grau de desenvolvimento superior ao da média dos alunos, e conseguem aprender mais rapidamente o que lhe foi apresentado, e como já entendeu e é uma criança, vai começar a fazer barulho, a conversar, atrapalhando os outros alunos, e sendo considerado bagunceiro, e desinteressado.

Ou então, os alunos que não conseguem acompanhar os outros, e por isso acabam seus exercícios depois dos outros, puxando o ritmo da aula da classe para baixo.

Talvez a saída para estes problemas esteja no trabalho em grupo, onde o aluno mais adiantado, ao invés de terminar o seu trabalho e conversar, terá que ajudar todo o grupo, pois o trabalho é coletivo, e o mais lento irá começar a se desenvolver mais rapidamente, alcançando a média do grupo.

PESQUISA EM COLÉGIO PÚBLICO:

Realizamos no mês de junho de 1998 uma pesquisa junto a alunos da sétima série do primeiro grau de uma escola da rede pública de ensino de Piracicaba. Foram entrevistados 31 alunos, sendo a entrevista:

1) Quanto a professora passa um exercício, você?

- a) É o primeiro a terminar;
- b) Termina junto com o Grupo;
- c) Termina por último, quando a professora está corrigindo o problema;

2) Quando você termina, você:

- a) Ajuda seu colega ao lado;
- b) Espera em silêncio a correção;
- c) Conversa com seu colega ao lado;
- d) Você só termina com a correção

3) Qual seu esporte preferido?

- a) Jogos coletivos tipo Futebol;
- b) Jogos de estratégia, tipo WAR;
- c) Jogos de video game de Luta;
- d) Xadrez
- e) Outros

4) Qual sua matéria preferida?

- a) Ciências;
- b) Matemática;
- c) Português;
- d) Geografia/História;
- e) Educação Física;
- f) Outra

5) Você se considera um aluno:

- a) Excelente;
- b) Bom;
- c) Regular;
- d) Ruim
- e) Outra

Os resultados obtidos na entrevista estão expressos no quadro abaixo:

- | | |
|--------------------|-----------------|
| 1) a) - 9 - 29.03% | 2) a) 8 - 25.8% |
| b) - 18 - 58.07% | b) 7 - 22.5% |
| c) - 4 - 12.9% | c) 15 - 48.4% |
| | d) 0 - 0% |
| 3) a) 19 - 63.4% | 4) a) 3 - 9.7% |
| b) 1 - 3.4% | b) 6 - 16.3% |
| c) 7 - 23.4% | c) 2 - 6.5% |
| d) 1 - 3.4% | d) 2 - 6.5% |
| | e) 14 - 45.1% |
| | f) 1 - 3.2% |
| 5) a) 3 - 9.6% | |
| b) 19 - 61.3% | |
| c) 9 - 29% | |
| d) 0 - 0 % | |

Com base nestes resultados e na conversa com a Professora Jaqueline, que é professora desta escola e leciona português, nós podemos tirar algumas conclusões e experiências para nossos futuros trabalhos.

Caso nós estivéssemos diante de uma classe com este perfil, nós deveríamos nos atentar para trabalhos que visassem movimentação, pois é uma classe que gosta de

esportes de movimentação, Educação física, e também terminam, a maioria, ou na média ou acima dela (rapidez de raciocínio).

Estimular a cooperação entre estes alunos, talvez com competições entre turmas ou grupo, e estar sempre em sintonia com o que os alunos gostam de trabalhar.

BIBLIOGRAFIA:

COLL *et all* - Desenvolvimento Psicológico e Educação, 1995;

FURTER, P. - Educação e Reflexão - 1970;

PAPALIA, D. E. & OLDS, S. W. - O mundo da Criança, 1981;

ZAGURY, T. - O adolescente por Ele Mesmo 1996;

MACEDO, L. - Ensaio Construtivistas, 1994.

Cultura da Macadâmia

Paula Rodrigues Salgado.

A Cultura da Macadâmia.

1. Introdução

A Macadâmia, também conhecida com noz australiana, é natural da Austrália, onde é encontrada em florestas naturais, como a ladeira sudeste do Great Dividing Range, a qual se estende para a costa entre 23 e 30 graus de latitude sul. Há muito tempo atrás era utilizada pelos aborígenes deste país como alimento (usualmente consumida crua) e ornamento (através da extração de um óleo empregado como base para unguento, cosmético e produto para decoração de corpos e faces).

A descoberta da Macadâmia é atribuída ao herborizador alemão Ludwig Leichardt que coletou por volta de 1843. Entretanto, os primeiros plantios ocorreram na Austrália em 1870 em Alstonville.

A indústria de amêndoas de Macadâmia torradas e salgadas foi implantada por John Buckell Waldron, um campeão de box, em 1907; Hoje encontra em ascensão em seu próprio país de origem.

Na Universidade de Califórnia, o professor W. B. Storey realizou um trabalho que estabelece uma cronologia desde da descoberta da Macadâmia. Assim, considera-se que em 1878 a *Macadâmia intergrifolia* foi introduzida no Havaí; em 1890 foram plantadas 250 árvores em Rous Mill, destinadas à produção para consumo familiar; em 1894 a *Macadâmia tetraphylla* foi plantada em Monte Tantalus, No Havaí.

Dois episódios importantes foram notificados: as primeiras plantações realizadas com a finalidade de produzir nozes comercialmente – em 1922, e a primeira garfagem da Macadâmia, ocorrida no Havaí em 1926.

A ocorrência da Segunda Guerra Mundial propiciou a difusão do conhecimento da noz Macadâmia entre milhares de pessoas das forças armadas americanas. Este fato promoveu a Macadâmia e substituição de culturas abacateiras infestadas pela *Phitiphtora*.

Em 1953 foi fundada a Califórnia Macadâmnia Society, que juntamente com a Universidade da Califórnia comercialmente no próprio território da Califórnia. Desta forma, a cultura e a indústria da Macadâmnia foi responsável por 42 introduções de espécies de Macadâmnia (passíveis de ser cultivadas) e assim começou seu processo de desenvolvimento.

Por volta de 1950., a Macadâmnia foi plantada na região subtropical. No México, Guatemala, Costa Rica, Panamá e Jamaica existem, atualmente, pequenas plantações. Há ainda propostas de plantio em Porto Rico, em substituição a cultura do café.

No Brasil as primeiras três árvores de noz Macadâmnia foram plantadas na Fazenda Citra em Limeira em 1931. O instituto agrônômico de Campinas mostrou interesse pela noz em 1948, quando plantou a primeira muda responsável pelo fornecimento de nozes para plantios posteriores.

Em 1958, esse mesmo instituto importa da Califórnia “garfos” de 17 variedades das seleções do Havaí e Austrália. Assim obtém-se o pegamento do enxerto de treze variedades. A produção ultrapassa 100 Kg em 1963. A obtenção de “garfos” das seleções facilitou a distribuição dessa noz pelo território nacional, tendo esse processo a contribuição fundamental da empresa Dierberger Agrícola S/A e a empresa mineira de florestamento Ltda.

No entanto, o projeto fracassou, pois foi conduzido tecnicamente como silvicultura, não havendo manutenção das facilidades concedidas pelos incentivos fiscais abatidos do imposto de renda e não ocorreu continuidade do projeto após o afastamento de alguns coordenadores.

Durante a década de 1980, a Macadâmnia foi plantada na Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

2. Classificação Botânica

Pertencente a família *Proteaceae* é dividida nas seguintes espécies: *Macadâmnia tetraphylla* e *Macadâmnia integrifolia*.

Macadâmia tetraphilla

Possui árvores grandes e esparramadas. As ramificações são geralmente de colorido escuro. As folhas jovens, na nova vegetação, são coradas de vermelho ou rosa. Ocasionalmente, as folhas carecem desta pigmentação vermelha e têm folhas pálidas ou verde-amareladas. As folhas têm as margens dentadas e aparecem em número de quatro por nó. As flores são de cor rosada.

A casca da noz é rugosa e produz noz de boa qualidade, adocicada, porém não desejável para cozimento e torração por tornarem-se escuras.

As variedades originárias da espécie *tetraphilla* tende a produzir seus frutos nas extremidades dos ramos.

Esta espécie frutifica uma vez ao ano e se adapta melhor as regiões subtropicais.

Macadâmia Integrifolia

As boas características dessa espécie estão relacionadas a alta qualidade da noz e a tolerância das árvores à influência desagradável da umidade pouco intensa e temperaturas altas. Seus requisitos nutricionais são menores que os exigidos pela espécie *tetraphilla*.

É mais agradável de ser trabalhada nos serviços de podas e propagação devido à ausência de serrilhas espinhosas nas folhas.

Apresenta frutos lisos, esféricos ou quase arredondados. As folhas quando novas são lisas, de coloração bronzeada e surgem no mínimo de três por nó. As flores são brancas. Os frutos dessa espécie tende a produzir no interior das árvores

Esta espécie se adapta melhor as regiões de temperatura mais elevada e frutifica duas vezes por ano.

2.1 Características gerais

As Macadâmias são árvores de porte baixo a alto, atingindo de 4 a 15 m. As folhas são espatuladas, finas, porém rígidas, com 18 a 40 cm de comprimento por 3 a 8 cm de

largura. Os bordos das folhas são marcadamente ondulados, com espinhos, ou lisos, segundo a espécie. A parte ventral ou superior é de cor verde-escuro e brilhante. As flores surgem em panículas apresentando de 100 a 300 flores, em grupos de duas a quatro por axila.

A flor apresenta um pedúnculo curto e piloso e o perianto formado pelo cálice, em forma de tubo, quatro sépalas, quatro estames e o pistilo assentado sobre um disco com parte terminal volumosa.

O fruto é um folículo mais ou menos esférico de 2.5 a 5.0 cm de comprimento, com o ápice duro e curto. O pericarpo é carnosos e verde, com uma noz e raramente com duas nozes.

A noz apresenta uma semente, na qual os cotilédones ocupam a maior parte, e um embrião pequeno. A noz é liberada quando o pericarpo se abre por duas linhas de sutura.

As flores de uma panícula se abrem da base para o ápice e a flor, ao se abrir, apresenta o pistilo com grão de pólen, indicando que ocorre frequentemente a autopolinização. Porém, as plantas apresentam incompatibilidade em diferentes graus. Assim, a panícula não fixa mais que vinte frutos.

2.2 Variedades

As seguintes variedades estão relacionadas as plantas do Havá, já que estas podem ser consideradas como principal fonte de informação para o estudo da Macadâmia.

KEAUHOU – Árvore de vigor mediano; possui boa produção. Sua noz é uniforme. Frutifica onde o teor de umidade é alto e a precipitação atinge 1.800mm.

IKAÍKA – É resistente e vigorosa, produzindo bem menos em regiões em condições ambientais pouco favoráveis. No entanto a porcentagem de amêndoas é inferior as demais variedades. É bastante rústica.

WAILUA – Suas nozes são de casca delgada; sua produção é mais precoce; requer fertilização abundante.

KAKEA – É variedade resistente e de produção abundante. As árvores jovens, possuem a tendência de formar copas pesadas, sendo necessárias amarra-las a estacas ou reduzi-las.

Outra variedades se destacam no Havaí: NUUANU, KOHALA e PAHAU. Recentemente foram selecionadas mais duas variedades: PAHALA e PURVIS, ambas com qualidades desejáveis.

KEAUDO, KAKEDI, WAIADO KEAURÉ, KEAUMI, KEAUFÁ'KAKERÉ, WAIARÉ.

A Macadâmia se adapta melhor em climas tropicais. Tolerar temperaturas acima de 43° s, desde que por pouco tempo e abaixo de .0.2° . Na época de dormência e com as folhas podadas, podem suportar temperaturas inferiores a 6.5° negativos, por curtos períodos. O mínimo de água exigido é de 250mm de chuvas bem distribuídas.

Essa noqueira se desenvolve bem em solos argilosos férteis, soltos e frescos para permitir a penetração das raízes até uma profundidade de, pelo menos, 75 cm. Não há meio de crescimento em terrenos rasos, de pouca drenagem, excessivamente arenoso ou lavados.

Todo os terrenos favoráveis ao cultivo da goiabeira, do abacaxi, do café, da cana-de-açúcar são igualmente bons para o plantio da Macadâmia. Já em solos alcalinos, ela apresenta clorose.

Os ventos prejudicam severamente a noqueira, por isso aconselha-se a instalação de quebra-ventos bem planejados. Todos os lados da plantação devem ser protegidos pelo quebra-ventos. Deve constituir-se de 2 ou 3 espécies arbóreas de crescimento rápido nas fileiras exteriores, e mais alta e frondosa nas fileiras próximas a plantação.

As árvores mais apropriadas para essa função são:

- *Bambusa vulgaris* – Bambu comum;
- *Aleurites moluccana* – Nogueira de Iguape;
- *Eucalyptus sp.* – eucalipto;
- *Tristania conferta* – Tristânia
- *Cupressus lusitanica* – Cedrinho ou Pinheirinho;
- *Cryptomeria japonica* – Criptoméria. Árvore de Natal;
- *Acacia spp.* – Acácia;

- *Callitris robusta* – semelhante ao Cedrinho;
- *Casuarina equisetifolia* – Casuarina.

As Macadâmias tendem a produzir melhor em altitudes inferiores a 750 m.

3. Propagação

A propagação pode ser realizadas por sementes ou enxertia. Qualquer processo de formação de mudas é realizado através de sementes, tanto para pé-franco como para porta-enxerto. As sementes são retiradas de árvores vigorosas, simétricas, de produção e crescimento rápido. Para apressa a germinação retira-se a amêndoa da noz, pois ele só germinará após a separação.

3.1 Semeadura

Pode ser dividida em direta no viveiro ou em alfarrobe.

Direta no viveiro

É a mais onerosa, no entanto produz em menor tempo mudas mais vigorosas. A semeadura é feita no viveiro em linhas de 1,00 – 1,20 por 0,20 – 0,50m. a germinação ocorre depois de 40 a 120 dias. O desbaste é indicado quando 0,10 – 0,15m de altura. Exige constantes irrigações e controle de ervas daninhas.

Alfarrobe

É semeado em alfarrobe contendo apenas areia, sendo o espaçamento 0,10m entre si. A germinação, quando apresentar de 3 a 5 folhas, estará pronta para ser replicada ao viveiro. O espaçamento no viveiro é de 0,40 por 1,00m.

3.2 Enxertia

O tipo mais comum de enxertia realizada na Macadâmia é a de garfagem, podendo ser de meia fenda, fenda encurtada, fenda cheia e garfagem lateral. Em todos os tipos de

garfagem deve-se deixar uma haste do cavalo para melhorar o pegamento. Na garfagem lateral faz-se uma incisão oblíqua à haste, sendo o garfo cortado em bisel e encaixado na incisão e, então amarra-se bem firme. Quando o garfo apresentar brotações, elimina-se a parte apical do cavalo. A enxertia deve ser realizada no período de paralisação da planta.

Para boa reprodução a enxertia é obrigatória, ocorrem grandes segregações quando as plantas não são enxertadas, tais como:

- a. Desigualdade das árvores. Uma das copas cônicas, outras abertas, outras desganhadas, folhagens dos mais diferentes tipos.
- b. Rara e até nula fixação dos frutos. Algumas árvores florescem e fixam poucos frutos ou até nenhum. Outras nem chegam a florescer.
- c. Apresentação de casca muito grossa e amêndoas pequenas. Algumas de casca mole e outras de casca muito dura, mesmo para serem rompidas mecanicamente.
- d. Vários outros inconvenientes, como o sistema radicular não eficiente.

Por essas razões deve-se plantar variedade selecionadas, enxertadas e envasadas.

4. Transplântio

A execução do transplântio deve variar conforme a região, composição do solo e condições climáticas. No entanto a experiência indica alguns passos gerais.

O terreno deve ser convenientemente preparado e estaqueado, em seguida faz-se as covas para o plantio. Estas devem ser suficientemente amplas para permitirem o acomodamento das raízes, sem necessidade de cortá-las ou dobrá-las. Indica-se covas de 40-50cm de diâmetro por 40cm de profundidade. Em caso de solos duros, recomenda-se colocar uma quantidade de terra da superfície arável, no fundo da cova, já que as raízes da Macadâmia raras vezes penetram nas camadas muito argilosas do subsolo.

Não se deve plantar demasiadamente fundo. Se possível, é aconselhável manter a profundidade em que se achava no viveiro. A muda necessita ficar ereta, se o solo não for demasiadamente pegajoso, deve-se pressionar bem a terra ao redor das mudas para que fique firme.

As mudas requerem água, portanto convém deixar uma depressão ao redor das mesmas para que a água se direcione para essa região. Após o transplante deve-se regar as mudas somente uma vez se for período de chuvas; caso contrário deve-se aplicar logo em seguida uns 20l de água e manter a rega.

A produção de brotos ocorre geralmente 2 meses após o transplante. Sugere-se a aplicação de fertilizante: cerca de 200g da fórmula de NPK 6-6-6 ou 8-8-8.

As plantas daninhas devem ser mantidas sob controle, assim como as brotações que surgem do porta-enxerto, propriamente chamados de “galhos ladrões”.

Depois do plantio a muda deve ser amarrada a uma pequena estaca de bambu.

5. Plantio e Adubação

O plantio da Macadâmia pode ser realizado em qualquer época do ano, embora a noqueira seja sensível ao ressecamento. Não são indicadas áreas em que a umidade do ar possa cair a menos que 40%. A melhor ocasião para a plantação está compreendida entre os meses de março a abril, além da estação de inverno, pois a água das irrigações permanece por mais tempo a disposição da planta nova.

Nas estações de outono e inverno, os dias são mais curtos, o sol não é forte e com a aplicação do *mulch*, o pegamento se revela seguro.

A preparação correta das covas é imprescindível para o desenvolvimento da noqueira. Elas devem ser adubadas unicamente com super fosfato simples ou duplo (600 a 800g). Ao abrir a cova deve-se deixar 50% da terra de lado - terra de superfície – e o restante de outro lado. Na terra de superfície é adicionado o fertilizante. A cova deve ser preenchida primeiramente com esta porção de terra, ou seja, é indicada uma inversão: a terra que estava em baixo fica em cima, e vice-versa.

Para proteção do sistema radicular da muda, aconselha-se a utilização de mudas com torrões. Portanto, o transporte das mesmas deve ser cuidadoso. O plantio é conveniente após 8 ou 10 dias a partir da data de recebimento no local.

Não convém o emprego de esterco de origem animal. A Macadâmia aceita bem a aplicação de torta de mamona rica em azoto de liberação lenta, desde que seja uma dose de no máximo 20kg e eu esteja bem misturada a terra.

Os estudos revelaram que o emprego de nitrato-nitrogênio provocaram clorose. Isto ocorreu porque essas substâncias impedem a absorção e translocação de ferro. A situação se torna mais delicada quando ocorrem associações de nitrato-nitrogênio com acumulações de manganês provocando elevação do pH da seiva. Sugere-se que ministre a Macadâmia a maior parte dos adubos nitrogenados em forma de sais de amônia, nitrato de amônia e uréia.

O nitrogênio é favorável ao crescimento da planta e aumenta o tamanho das nozes. O potássio é importante para o desenvolvimento das amêndoas, além de aumentar o conteúdo de óleo. O fósforo facilita a transmissão de energia produzida dentro da planta durante o processo de respiração, relacionando-se com o crescimento e a formação de óleo nas Macadâmias.

Os especialistas sugerem a aplicação de 350g de fertilizante para cada 2,5cm de diâmetro do tronco, além de nitrogênio adicional para aumentar afixação dos frutos.

As adubações são recomendadas após 6 meses, tendo como base a data do transplantio. Constituem-se de aplicações de fórmulas balanceadas (como as utilizadas para citros) duas vezes ao ano (na primavera e no verão). Em geral admite-se a proporção de NPK 10-10-15.

Se for empregado o sistema de gotejamento, o adubo deve ser líquido e adicionado a água de irrigação; se for por aspersão, o adubo deverá ser esparramado na saia das plantas e deve ser efetuada adubação em seguida.

A cobertura morta (*mulch*), acima citada é particularmente indicada até que as Macadâmias formem copas e projetem sombra sobre o solo. Admite-se que esta seja uma camada de resíduos vegetais colocada sobre a superfície do solo. Sua importância está no auxílio da manutenção da umidade, controle da temperatura e prevenção a compactação e erosão. Ela torna mais fácil a estabilidade da estrutura da terra além de contribuir para o controle das ervas daninhas. Os materiais comumente usados incluem folhas decompostas, serragem, cepilho, palhas, bagaço de cana-de-açúcar, fibras de coco, de cacau e semelhantes.

Os microorganismos do solo causam a decomposição da cobertura morta, formando a matéria orgânica, que melhora as condições físicas do solo. A matéria orgânica em decomposição produz substâncias que ajudam aglutinar partículas do solo, formando agregados estáveis. No entanto as bactérias necessitam de nitrogênio, por isso coloca-se cerca de 2% de fertilizante nitrogenado sobre o peso do *mulch*.

Durante os dois primeiros anos após o plantio é desejável a aplicação da poda corretiva o poda d formação cujo o propósito é proporcionar a árvore uma estrutura forte e bem equilibrada para seu desenvolvimento.

Sobre espaçamento, a recomendação de dez em dez metros não é a única aceitável. Por ser menos, contanto que, posteriormente, cortem-se as árvores excedentes. Neste caso o período de produção é curto. Os cortes também respeitam a necessidade da noqueira receber muita luz para a formação de carboidratos.

Não podem ser esquecida a condição de serem plantadas pelo menos duas variedades para fins de polinização cruzada, embora a Macadâmia seja fértil e produza quando plantada isoladamente.

Quando houver interesse se plantações de culturas intercaladas o espaçamento deve ser estudado segundo a variedade a ser cultivada. Por exemplo, uma rua de citros, entre as fileiras de Macadâmia as distâncias de seis, sete ou oito metros, poderá ser eliminada quando as noqueiras tiverem doze anos aproximadamente e estiverem quase totalmente desenvolvidas, dando espaço para as Macadâmia.

Esse plantio intercalar pode ser realizado com tangerinas, goiabas, figo, maracujá, café, cereais e culturas anuais não esgotantes. Representa uma fonte de renda durante os ano improdutivo da Macadâmia, isto é, a época que antecede a reprodução remunerada de nozes. Além disso, as referidas plantas protegem o solo contra os ventos e fazem o sombreamento parcial do mesmo.

Quando se emprega o cafeeiro como cultura intercalar aproveita a colheita durante pelo menos dez safras.

Os cereais são interessantes por serem uma alternativa ao consumo local e por contribuir no enriquecimento do solo em razão dos resíduos e matéria orgânica que são incorporados ao solo. Outra boa sugestão pode estar relacionada com as leguminosas, que também podem ser consumidas no local e que promovem a adubação verde (são

produzidas grandes quantidades de matéria orgânica que beneficiarão a culturas perenes), além da fixação de nitrogênio ao solo (ocorre quando o corte é efetuado na época de florescimento das leguminosas).

É importante frisar que nenhuma cultura intercalar deve ser conservada quando a Macadâmia começar produzir colheitas abundantes ou quando for observado o adensamento da mesma. Essas culturas não podem concorrer com as noqueiras e nem podem provocar sombreamento excessivo.

6. Combate às pragas e moléstias

a utilização de herbicidas não podem atingir as Macadâmias. É recomendável o rebaixamento do mato ou até mesmo a eliminação do mesmo com o emprego de uma segadeira durante várias vezes ao ano.

Os estudos indicam que pode ocorrer um tipo não comum de *Pytophthora* nas Macadâmias. Este tipo não se localiza nas raízes. E sim nos troncos e ramos, podendo ser eliminadas com a aplicação de cúpricos.

A Antracnose causada por *Colletotrichum spp.*, é particularmente presentes em plantações de pé de franco em regiões com grande umidade. Trata-se de uma doença fungosa que ataca frutíferas tropicais e subtropicais. Nas Macadâmias ela atinge as folhas e as nozes. Os tecidos ficam escurecidos e descoloridos e com o tempo acaba se alastrando por toda a superfície dos frutos e folhas.

Quando as nozes verdes são atacadas, elas não caem. As folhas desenvolvem partes irregulares de tecido seco, morto, ao longo da margem das folhas. Por esta razão novamente é advertido não plantar Macadâmias de pé de franco, apenas sementes de variedades selecionadas e enxertadas. Noqueiras desse tipo são resistentes a Antracnose.

Na Austrália ocorre um perfurador de nozes denominado *Arotrophora ambrodella* sua atuação causa a perfuração das nozes ainda verdes e posterior deterioração das amêndoas que servem de alimento para essa praga. A infestação é mais severa durante a época da colheita, por isso recomenda-se que não seja deixada no solo nenhuma noz e que também sejam retiradas as nozes que eventualmente permaneçam entre as bifurcações do

tronco ou da ramagem (estes são locais ideais para a proliferação do inseto). O controle desta praga não deve ser realizado com substâncias químicas.

No Brasil, ocorre a broca do fruto – *Lophopoeum timbouvae*. Trata-se de um besouro de aproximadamente 10mm de comprimento, de coloração pardo- acizentado, com manchas esbranquiçadas nos élitros. Apresentam antenas alongadas de cor marrom. Suas larvas são brancas e ápodas. A atuação dessa praga também é evidenciada com a perfuração das nozes; as larvas são responsáveis pela destruição das amêndoas. Não há notificação de controle.

A lagarta do fruto – *Gymnandrosoma aurantianum* – já causou a inutilização de frutos na Brasil. O ciclo dessa praga envolve a postura de ovos (nos frutos) por mariposas cinzas de cabeças alaranjadas. Após alguns dias, nascem as lagartas que atacam os frutos verdes e maduros praticando galerias internas e se alimentando das amêndoas.

Quando está completamente desenvolvida a lagarta mede 18mm de comprimento e tem coloração marrom claro. Normalmente, as folhas, o solo, ou detritos secos são utilizados como abrigo para a transição da lagarta em pupa. O controle é efetuado com a pulverização de inseticidas clorofosforados, fosforados ou clorados após a colheita, não só sobre as árvores, como também sobre o solo e proximidades. Ainda a utilização de controle biológico através da bactéria *Bacillus thuringiensis*.

O inseto que mais causa danos as Macadâmias no Brasil é a popularmente conhecida “abelha-cachorro”. Seu nome científico é *Melipona ruficus* Latr. E provoca estragos nas jovens nogueiras, pois ataca folhas e inflorescências. Isto ocorre porque ela utiliza filamentos fibrosos vegetais com elementos aglutinantes como secreções resinosas e látex vegetais na construção de ninhos. Essas substâncias são fundamentais para essas abelhas manterem a impermeabilidade dos ninhos, e só são utilizadas quando secas. Para combater aconselha-se pulverizar os brotos com uma solução de arseniato de chumbo a 1% ou com a seguinte solução arseniato adocicado na época em que esse hymenoptero se manifestar:

Arseniato de chumbo – 500g

Açúcar mascavo – 7kg

Água – 100L

Existem outras medidas: a eliminação direta dos ninhos que se localizam entre os galhos das árvores. Normalmente despeja-se óleo diesel sobre o ninho e ateia-se fogo com o cuidado de não atingir a árvore.

7. Colheita, Descascamento e Secagem

As nozes devem ser recolhidas quando estão maduras, ou seja, quando caem no chão.

A *Macadâmia integrifolia* amadurece na Austrália de março a junho; no Havaí de julho a novembro; na Califórnia de novembro a março; e no Brasil de março a junho. Contudo, algumas nogueiras conseguem produzir durante todo ano. Já a *Macadâmia tetraphylla* amadurece de março até junho na Austrália, de maio a setembro no Havaí, de setembro a janeiro na Califórnia e de fevereiro a junho no Brasil.

Antes dessa época o solo precisa ser devidamente limpo.

Durante as chuvas as nozes não podem permanecer no chão, pois neste caso amolecem, mofam e podem até germinar. O único meio de ser realizada a colheita de modo eficiente é manter vários trabalhadores percorrendo diariamente as plantações. Desta forma elimina-se a oportunidade das nozes serem comidas por roedores, ratos, pacas, cotias, preás.

A catação baseia-se na colocação dos frutos maduros em baldes metálicos, de arame ou de plástico e, posteriormente, em sacos de juta para serem estocados. A conservação do produto por mais de um ano é obtida com o processo de secagem das nozes após a retirada dos pericarpos.

Deve-se evitar o contato das nozes com os materiais ou elementos que podem transmitir odores, impregnando-as.

Quando as nozes caem elas estão envoltas no pericarpo que deve ser retirado manualmente. Em caso de grande produção recorre-se a descascadores. Esta fase deve ser efetuada no máximo dentro de três dias; caso contrário os pericarpos endurecerão e dificultarão o processo.

A secagem a sombra promove a permanência de no máximo 3.5% de umidade das nozes. Quando o descascamento for tardio convém esparramar em camadas delgadas os

produtos colhidos, assim promove-se a secagem, preferencialmente em um galpão seco e ventilado.

O sol ou os secadores artificiais não são viáveis por estimularem a abertura das nozes pela linha de sutura.

A finalização desta fase possibilita o congelamento das amêndoas à temperatura média de 0°C por tempo indeterminado.

8. Valor Nutricional

Em cada 100g de porção comestível de Macadâmia encontra-se:

Cálcio: 53,4mg (considera-se razoável o nível de 30mg);

Fósforo: 240,8mg (considera-se bom o nível de 40mg);

Ferro: 1,99mg (o nível ótimo estimado é de 1mg);

Tiamina: 0,21mg (raras são as frutas com valor superior a 0,2mg por 100g);

Riboflavina: 0,11mg (o nível normal pertence a faixa de 0,1 a 0,2mg por 100g de fruto);

Niacina: 1,60mg (supera a maioria dos frutos).

O óleo de Macadâmia mostrou os seguintes valores, quando analisado pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas:

Ácido mirístico: 1,28%;

Ácido palmítico: 14,67%;

Ácido palmitoléico: 20,82%;

Ácido esteriático: 4,65%;

Ácido oléico: 49,27%;

Ácido linoléico: 1,57%;

Ácido araquídico: 4,50%;

Ácido icosenóico: 3,21%.

Ainda, foram evidenciados os teores de:

Umidade: 1,40%;

Extrato etérico: 76,95%;
Acúcares redutores: 0,04%;
Iodina: 80,90%;
Matérias graxas: 0,44%;
Amino-nitrogênio: 0,04%.

Estes números favorecem a indicação do óleo da Macadâmia como um substitutivo do óleo de oliva (importado). Sua utilização como *blend* (mistura) para outros óleos – soja, milho, gergelim...também é viável.

Os estudos revelaram ainda que da casca da Macadâmia é possível ser retirado outro óleo aproveitável não só para a indústria de nutrição como também para a farmacopéia e de cosméticos. Atualmente, esse material é usado por uma grande empresa nacional conhecida popularmente por sua qualidade, a Natura.

Das cascas da Macadâmia foram obtidos os seguintes resultados:

Ácido mirístico: 0,49;
Ácido palmítico: 9,44;
Ácido palmitoléico: 20,81;
Ácido esteriático: 1,50;
Ácido oléico: 55,40;
Ácido linoléico: 4,38;
Ácido araquídico: 1,57;
Ácido linolênico: 4,50;
Ácido beênico: 0,53;
Ácido erúcico: 0,53;
Ácido linocérico: 0,47.

9. Consumo

A utilização da noz da Macadâmia na alimentação é ampla:

pode-se comê-la crua, ao natural;
torrada e salgada;

frita em óleo de coco e salgada em seguida;;
na confecção de bolos e confeitos;
na confecção de marzipan;
conservada em congeladores, pode ser consumida nas festas do fim de ano;
em sorvetes;
no preparo de “caipirinha”;
em diversos doces como amêndoas cobertas por chocolate. Neste caso, a Macadâmia é excelente porque não torna-se rançosa e nem absorve umidade.

10. Custo e Comercialização

Os custos da Macadâmia estão intimamente relacionados com o plantio de variedades selecionadas e com a aceitação crescente dos produtos que podem ser obtidos a partir das nozes como óleo e amêndoas, no mercado internacional.

Existem algumas considerações quanto a dificuldade em se quebrar a semente, fator solucionado com a adoção de quebra-nozes especiais – *nut cracker* – que elevam os custos. Estes são amortizados parcialmente a partir do sexto ano do plantio. A partir do 12º ano, a amortização é total. Já foi mencionado neste trabalho uma forma de minimizar os custos: o desenvolvimento de culturas intercalares, seja de plantas permanentes erradicadas entre o 8º e o 12º ano, seja de cereais ou até flores.

Para árvores selecionadas (com 12 anos) já se obteve uma média de 90 a 100kg de nozes com os pericarpos por ano. No entanto, para cálculos, admite-se uma produção razoável de 37 a 60kg por árvore e por ano.

Não pode ser esquecido que a cada quatro ou cinco quilos de nozes proporcionarão a quantidade de um quilo de amêndoas após a extração dos pericarpos.

A seguir estão os dados da produção de uma árvore enxertada e selecionada de Macadâmia (nozes com casca), conforme o tempo de plantio.

Anos a partir do plantio	Produção (kg)
No 5º ano	5,0
No 6º ano	12.5
No 7º ano	12.5
No 8º ano	26.0
No 9º ano	42.0
No 10º ano	48.0
No 11º ano	70.0
No 12º ano	75.0
No 13º ano	75.0
No 14º ano	67.0
No 15º ano	71.0
No 16º ano	80.0
No 17º ano	100.0

A cotação da Macadâmia no mercado internacional é quase o dobro da castanha de caju. Um quilo do produto industrializado está valendo cerca de US\$10, enquanto o preço da noz em casca alcança o valor de US\$1.

O cultivo está restrito a poucos países do mundo, sendo a maior parte destas plantações formadas por variedades consideradas antigas, as quais não tem rentabilidade nem produtividade ideais. A produção mundial gira em torno de 74 mil toneladas de produto “in natura” para aproximadamente 20 mil toneladas do produto industrializado. Este volume é considerado insuficiente para atender a demanda mundial.

Dentre os maiores produtores destacam-se: Estados Unidos, Austrália, Costa Rica e África do Sul. Em menos de 40 anos essa cultura passou a ocupar o terceiro lugar entre as produções agrícolas no Havaí, que é o maior produtor mundial, destinando-se aos mercados europeus, japonês e norte americano.

Os principais consumidores desta noz são Estados Unidos, Japão, Alemanha e Inglaterra.

O custo de produção no Brasil é inferior ao do Havaí, aproximadamente a metade, pois o preço da terra é mais baixo, a mão-de-obra é mais barata, as condições climáticas são equivalentes e não há restrição de área disponível.

O potencial do mercado seguramente compensa o alto custo de formação da cultura. Pesquisadores da FEALQ-USP, apresentam um estudo em que se admite uma relação de benefício/custo igual a 3.39, ou seja, para cada dólar investido haverá um retorno de 3.39 no período.

O preço da muda é o item mais oneroso no investimento inicial, correspondendo a 26% do total de custo no primeiro ano.

A colheita é uma das mais dispendiosas operações no nogueiral. Consequentemente, o plantil de variedades que apresentam curta duração de colheita, influenciará na contratação de um menor número de apanhadores. A escolha da variedade também deve considerar algumas características que possam minimizar os custos tais como: copa arredondadas ou cônicas – são mais resistentes ao vento e possuem grande superfície de frutificação, copas nunca muito abertas e densas – estas formações tendem a ocupar muito espaço e são mais sujeitas a quebras quando expostas aos ventos fortes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "Luiz de Queiroz"

PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

Bacterioses em Citros

Dezembro de 1998
Bolsista: Rodrigo Mendes

BACTERIOSES EM CITROS

CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é uma das mais importantes bacterioses de citros. Esta doença é causada pela bactéria gram negativa *Xanthomonas campestris* pv. *citri*., a origem dessa doença é tão remota que deve coincidir com a origem dos citros, entretanto, o mais antigo material com sintomas de cancro cítrico conhecido, data do ano de 1827.

Nos últimos anos houve um significativo crescimento do cancro cítrico devido a ação da Larva Minadora dos Citros (*Phyllocnistis citrella*), já que a inspeção que era feita antigamente nos pomares foi deixada de lado e interrompida, devido, talvez, à preocupação com a Clorose Variegada do Citros.

São conhecidos quatro tipos de cancrose causadas por diferentes estirpes ou patótipos de *X. c.* pv. *citri*.

- *Cancrose "A"*, ou asiática, foi a primeira a ser constatada, afeta todas as espécies e variedades de *Citrus* e está disseminada por quase todos os continentes.
- *Cancrose "B"*, ou sul-americana, afeta apenas a laranja azeda.
- *Cancrose "C"*, atinge apenas o limão galego e foi constatada no estado de São Paulo na década de 60.
- *Cancrose dos Viveiros*, constatada em 1984 na Flórida (EUA), ataca apenas plantas jovens de viveiros.

SINTOMAS

Os sintomas da doença, são observados nas faces superior e inferior das folhas, ramos e frutos das plantas afetadas. Estes sintomas, inicialmente, são caracterizados por um halo amarelo em torno de pontuações de cor castanha clara que evolui para lesões corticosas de coloração castanha. A medida que a lesão envelhece, uma faixa de aspecto aquoso junto à lesão corticosa torna-se escura quase preta, em estágio avançado, no fruto, as lesões rompem a casca por onde entram microrganismos, acelerando o apodrecimento. Entretanto pequenas variações nesta sintomatologia podem ser observadas, dependendo do cultivar ou variedade afetada do patótipo ou estirpe bacteriana, ou ainda, das condições ambientais.

CONTROLE

Existem vários métodos para controlar o avanço do cancro cítrico, como, por exemplo, o arraquio, poda drástica e desfolha, mas com o surgimento da Larva Minadora, deve-se optar pelo método mais eficiente e seguro, que é a erradicação das árvores contaminadas e das árvores que estão num raio de trinta metros. Mesmo depois do arranquio das árvores, as bactérias podem continuar sobrevivendo no local por um certo tempo, dependendo do ambiente. Em solo nú, sobrevivem por volta de 40-60 dias, na presença de ervas daninhas, de 60-70 dias e nos restos de cultura de citros de 6-7 meses.

DISSEMINAÇÃO

A disseminação do cancro cítrico entre plantas de um mesmo pomar ocorre com auxílio da chuva, principalmente acompanhada de ventos fortes. Determinados tratamentos culturais também podem auxiliar na disseminação da doença. Portanto, o diagnóstico precoce da doença e cuidados durante o tratamento cultural evitam a disseminação do cancro cítrico no pomar e também em regiões próximas.

PREVENÇÃO

Ao comprar mudas certifique-se que o viveiro toma todas as medidas preventivas contra a doença. Deve-se ter o próprio material de colheita, se vier de outro pomar deve-se fazer a desinfecção das escadas, sacolas e caixas com quaternário de amônia a 1 litro para 1000 litros de água. Para entrada de veículos deve-se utilizar o arco rodolúvio, fazendo a pulverização com o bactericida, ou adotar pulverizador manual. O plantio de árvores de grande porte, como quebra-vento nas fronteiras da propriedade é uma boa medida de prevenção, como jambolão, grevilha, robusta, etc. O controle da Larva Minadora é muito importante, pois a ferida provocada no fruto facilita a contaminação e o desenvolvimento da bactéria na planta. É essencial fazer inspeções quinzenais no pomar, pois elas são uma das formas mais eficientes de prevenção ao Cancro Cítrico.

CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC)

A clorose variegada dos citros ou “amarelinho” foi detectada em 1987 em pomares de Minas Gerais e São Paulo e vem se alastrando para os estados de Goiás, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Argentina, onde é conhecida como pecosita.

Inicialmente, imaginava-se que a CVC era causada por *Spiroplasma citri*, agente causal do “greening”, mas, observações por meio de microscopia eletrônica indicaram grandes quantidades de bactérias no interior do xilema de plantas infectadas, enquanto que *S. citri* afeta o floema. Essas bactérias do xilema são semelhantes à bactéria gram negativa *Xyllela fastidiosa*, que causa a doença de Pierce em videiras, escaldadura da ameixeira e a “phony peach” em pessegueiros. Anteriormente já se havia verificado infecção cruzada em citros utilizando *X. fastidiosa* de videiras com a doença de Pierce. Portanto, este e outros resultados confirmaram as suspeitas existentes de que *X. fastidiosa* é o agente causal do CVC.

Inúmeros isolados de *X. fastidiosa* podem viver no xilema da planta assintomática, mas quando o hospedeiro encontra-se estressado, principalmente por fatores ambientais, os sintomas podem se desenvolver. Por essa característica, sugere-se que esta bactéria seja um patógeno fraco e oportunista.

SINTOMAS

Os sintomas do CVC se assemelham a sintomas de deficiência de zinco e potássio e toxidade a boro. A clorose variegada das folhas mais desenvolvidas é observada inicialmente na parte mediana e superior da copa, mas, em casos severos da doença pode tomar toda a copa. Os frutos podem tornar-se pequenos e endurecidos, ou seja, imprestáveis para o comércio.

DISSEMINAÇÃO

Este patógeno pode ser transmitido por *Oncometopia nigricans* Walker. Sabe-se ainda que as *Xyllela* são facilmente transmitidas por cigarrinhas da família Cicadélídeos as quais ocorrem abundantemente em pomares citrícolas ou por meio de enxertia. A disseminação à distância se dá através do plantio de mudas infectadas.

PREVENÇÃO

Para se evitar a disseminação da doença deve se tomar medidas básicas como eliminação do vetor, poda dos ramos afetados e a utilização de mudas provenientes de pomares sem a clorose variegada dos citros.

BIBLIOGRAFIA

Citricultura Atual. Revista do Grupo de Consultores em Citros. Ano I - Nº 05. Agosto de 1998.

Citricultura Atual. Revista do Grupo de Consultores em Citros. Ano I - Nº 03. Abril de 1998.

ARAUJO, WELLINGTON LUIZ DE, . Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. Tese de mestrado. Esalq - USP 1996