

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



Anthomyces brasiliensis e Caesalpinia echinata:
INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO, CICLO VITAL
E BIOLOGIA DO PATÓGENO.

CRISTIANE FERREIRA LOPES DE ARAÚJO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

CRISTIANE FERREIRA LOPES DE ARAÚJO

***Anthomyces brasiliensis* e *Caesalpinia echinata*: INTERAÇÃO
PATÓGENO-HOSPEDEIRO, CICLO VITAL E BIOLOGIA DO
PATÓGENO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

CRISTIANE FERREIRA LOPES DE ARAÚJO

***Anthomyces brasiliensis* e *Caesalpinia echinata*: INTERAÇÃO
PATÓGENO-HOSPEDEIRO, CICLO VITAL E BIOLOGIA DO
PATÓGENO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

APROVADA: 10 de agosto de 2004

Dra. Denise Vilela de Rezende Santiago

Dra. Rachel Passos Rezende

Dr. José Luiz Bezerra
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À

Weldon, meu esposo

Isa Maria, minha filha

Fátima, Telma, Sílvia, Rosemayre, minhas irmãs

Ofereço.

À minha mãe (In memorian),

Maria José Ferreira Primo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, socorro presente nas horas de angústia, por me ajudar a transformar as dificuldades em desafios, e os desafios em força.

Ao meu esposo Weldon, pela compreensão, dedicação, carinho e amor que tornaram os momentos mais difíceis mais confortáveis.

À Isa Maria, que a simples existência é um incentivo para mim.

À minha irmã Fátima, pelo crédito, incentivo, apoio e presença constante.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) – pela realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Dr. José Luiz Bezerra, pelo apoio, amizade e orientação eficiente, criteriosa e disponível.

À Dra. Karina Gramacho, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos.

À Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, pela amizade, incentivo e conhecimentos transmitidos.

À Dra. Denise Vilela de Rezende Santiago, membro da banca examinadora, por suas correções, sugestões, orientação.

Ao Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelo apoio, sugestões e acompanhamento deste trabalho.

Aos inesquecíveis colegas de curso, pela troca de idéias, pelo incentivo e pelo espírito de solidariedade durante o tempo de convívio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

EXTRATO

ARAÚJO, Cristiane Ferreira Lopes, MS Universidade Estadual de Santa Cruz, agosto de 2004. ***Anthomyces brasiliensis* e *Caesalpinia echinata*: interação patógeno-hospedeiro, ciclo vital e biologia do patógeno.** Orientador: Prof. Dr. José Luiz Bezerra. Co-orientador: Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa. Colaboradora: Profa. Dra. Edna Dora Newman Luz.

O fungo *Anthomyces brasiliensis* Dietel foi descrito em 1899 no Rio de Janeiro causando ferrugem em *Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp. sendo redescoberto no ano de 2001 em Porto Seguro, Bahia, causando a ferrugem do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Dietel na sua diagnose original descreveu apenas télios e urédios não tendo observado a existência de espermogônios e écios. Folhas com pequenas lesões necróticas nos folíolos, foram coletadas de mudas e plantas adultas de pau-brasil na Estação Experimental Pau-brasil (CEPLAC) no município de Porto Seguro, Bahia. Folíolos frescos e herborizados foram examinados ao microscópio estereoscópico, sendo efetuadas raspagens e cortes histológicos, os quais foram analisados aos microscópios composto e eletrônico de varredura para caracterização, mensuração e fotomicrografias das estruturas observadas. Nos estudos conduzidos no material coletado na Bahia foram encontrados espermogônios do grupo VI, tipo 7, característicos da família Raveneliaceae à qual pertence o gênero *Anthomyces*. Os espermogônios de *A. brasiliensis* são subcuticulares, de contorno circular, aplanados e medem 70-100 x 30-56 μ m, com espermacióforos hialinos, basais, cilíndricos, agrupados em forma de paliçada, medindo 12-14 x 2-3 μ m. Os espermacios são hialinos, unicelulares, lisos, medindo 3-4 x 2-3 μ m. Pústulas conectadas a espermogônios por meio de

hifas, foram interpretadas como écios uredinóides, característicos da família Raveneliaceae. Estas estruturas têm aspecto de pústulas alargadas, sem perídio definido, mostrando-se maiores que os télios e os urédios, medindo 200-700 μ m diâmetro e 100-110 μ m de altura, com eciósporos idênticos aos urediniósporos, medindo de 22-24 x 18-22 μ m. Desta forma, *A. brasiliensis* passou a ser definida como um fungo causador de ferrugem macrocíclico, autóico, contendo os estádios de 0 a IV. Extraíu-se o DNA de *A. brasiliensis* e observou-se que o ajuste nos processos de extração e amplificação, permitiu a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de marcas RAPD.

PALAVRAS-CHAVE: *Anthomyces brasiliensis*, *Caesalpinia echinata*, ciclo vital, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The fungus *Anthomyces brasiliensis* Dietel described in 1899 in Rio de Janeiro causing rust on *Caesalpinia* sp. or *Piptadenia* sp., was rediscovered in 2001 in Porto Seguro, Bahia, Brazil on *Caesalpinia echinata* Lam. In his original description Dietel described only telia and uredia having not observed spermogonia and aecia. Leaves with small necrotic lesions were collected from seedlings and trees of *C. echinata* at Pau-Brasil Experimental Station (CEPLAC) in Porto Seguro Municipality, Bahia state. Material from fresh and dried leaflets were examined under dissecting and compound microscopes. Micrographs were obtained using the compound and scanning electron microscopes. Spermogonia of group VI and type 7 were found on the material collected in Bahia. These were subcuticular, round in outline, flattened, 70-100 x 30-56µm with spermatophores hyaline, cylindrical, grouped in palisade, 12-14 x 2-3 µm. Spermatia hyaline, smooth, 3-4 x 2-3 µm. Pustules connected by hyphae to the spermogonia were interpreted as uredinoid aecia, typical of the Raveneliaceae family. They are larger than uredia and telia, 200-700 µm broad. Aeciospores are similar to urediniospores, measuring 22-24 x 18-22 µm. *A. brasiliensis* was defined as a macrocyclic, autoecious rust containing 0 to IV states. DNA from *A. brasiliensis* was extracted through adjustments in the extraction and amplification processes allowing the obtention of reproducible distinct patterns of RAPD bands.

KEY-WORDS: *Anthomyces brasiliensis*, *Caesalpinia echinata*, life cycle, molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 **ESPERMOGÔNIO** 25
- A. Espermogônios ao microscópio estereoscópico
 - B. Espermogônios anfígenos em secção longitudinal
 - C. Espermogônios subcuticulares com espermacióforos em paliçada
 - D. Espermogônios contendo espermácios
- Figura 2 **ÉCIO UREDINÓIDE** 26
- A. Écios uredinóides ao microscópio estereoscópico
 - B. Écio uredinóide em secção longitudinal
- Figura 3 **URÉDIOS** 27
- A. Urédios ao microscópio estereoscópico
 - B. Urédios vistos ao MEV
 - C. D. Urediniósporos vistos ao MEV
- Figura 4 **HAUSTÓRIOS** 28
- A. Haustórios
 - B. Micélio interno
 - C. Micélio intracelular em células de parênquima paliçádico
- Figura 5 **TÉLIO** 29
- A. Télios ao microscópio estereoscópico
 - B. - C. Secções transversais de télios
- Figura 6 **TELIÓSPOROS** 30
- A. Teliósporo ao microscópio ótico
 - B. Télio visto ao MEV
 - C. - D. Teliósporos vistos ao MEV

CAPÍTULO 2

Figura 1 **Bandas RAPD**

41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação DNA	38
Tabela 2 - Número de bandas polimórficas por “primer”	39

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
INTRODUÇÃO	4
EXTRATO	5
ABSTRACT	6
REVISÃO DE LITERATURA	7

CAPÍTULO 1: *Anthomyces brasiliensis* em *Caesalpinia echinata* no Brasil.

RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO	23
LITERATURA CITADA	23

CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Anthomyces brasiliensis* VISANDO OBTENÇÃO DE MARCADORES RAPD.

RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	39

LITERATURA CITADA	40
CONCLUSÕES GERAIS	42
REFERÊNCIAS	43

INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie pertencente à família Fabaceae que representa um marco histórico devido ao fato de ter originado o nome do nosso país, pelo ciclo econômico que representou e pela grande ameaça de extinção. Sua casca pode ser pardo-acinzentada, ou pardo-rosada nas partes descascadas, com cerne vermelho. A árvore atinge 8-12m de altura e 60cm de diâmetro (Lorenzi, 1949). Sua floração ocorre no final do mês de setembro até meados de outubro. Entre os meses de novembro e janeiro ocorre a maturação dos frutos. A árvore pau-brasil é conhecida também como: ibirapitanga, orabutã, brasileto, ibirapiranga, ibirapita, ibirapitã, muirapiranga, pau-rosado e pau-pernambuco. Presente nas florestas litorâneas, geralmente em solos arenosos e arenoso argilosos bem drenados, freqüentemente encontra-se em ambientes secos e iluminados. A espécie tem merecido a atenção de organizações públicas e privadas quanto a preservação e multiplicação no território nacional.

Nesta planta, aparentemente muito rústica, foram registrados poucos patógenos. Mendes et al. (1998) citam neste hospedeiro os fungos *Ganoderma* sp. e *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj (1985). Grandi e Silva (2003) estudaram os seguintes Hyphomycetes na serrapilheira de pau-brasil: *Chaetendophragma fasciata* Castañeda, *Henicospora minor* P. M. Kirk & B. Sutton, *Pseudodictyosporium wauense* Matsushima e *Sporidesmium filiferum* Pirozynsky.

Anthomyces brasiliensis, é um fungo da ordem das Uredinales. Esta ordem tem especial importância por serem suas espécies obrigatoriamente parasitas, provocando o tipo de doença conhecida por ferrugem. Os Uredinales, possuem quatro tipos de frutificações: pícnios ou espermogônios, écios, urédios e télios.

Em fevereiro de 2001, observaram-se mudas de pau-brasil em viveiro da Estação Ecológica de Pau-Brasil, da CEPLAC, município de Porto Seguro, apresentando manchas necróticas nos folíolos. Posteriormente, os mesmos tipos de manchas foram observada em folíolos de plantas adultas, com mais de dez anos. Verificou-se nessas lesões, a existência de urédios e télios de tamanho reduzido, sendo os teliósporos característicos da espécie *Anthomyces brasiliensis* Dietel, descrita sobre *Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp., no Rio de Janeiro, em 1899. A morfometria desta espécie é compatível com os espécimes encontrados na Bahia sobre *C. echinata* que foi reportado como um novo hospedeiro de *A. brasiliensis* (Bezerra, 2001).

Os fungos causadores de ferrugem representam um grupo de patógenos economicamente importantes por causarem doenças destruidoras em muitas plantas cultivadas. Por esta razão, problemas com ferrugens tendem a aumentar com o cultivo intensivo e extensivo de muitas espécies vegetais importantes. Estes fungos são de grande interesse por representarem fator limitante para o cultivo de muitas plantas de grande importância para o homem (Alexopoulos et al., 1996).

Do ponto de vista fitopatológico é importante conhecer a biologia, o ciclo de vida e a epidemiologia de *A. brasiliensis*, bem como, a sua variabilidade genética, para poder traçar estratégias de manejo a fim de minimizar os danos causados pela doença ao hospedeiro.

Os objetivos deste trabalho foram a redescrição do patógeno em face das novas informações obtidas e a obtenção de amostras de DNA de *A. brasiliensis* que pudessem ser amplificadas pela técnica de RAPD.

REVISÃO DE LITERATURA

Originária da floresta pluvial Atlântica, o pau-brasil é de ocorrência natural desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, numa larga faixa de 3000 km. Vegetando, tipicamente, em floresta primária densa. Raramente é encontrado em formações secundárias. As plantas começam a florescer entre o terceiro e o quarto ano de idade. Sua floração ocorre no final do mês de setembro até meados de outubro. Entre os meses de novembro e janeiro ocorre a maturação dos frutos.

A espécie se apresenta nas matas litorâneas, geralmente em solos arenosos ou arenosos argilosos bem drenados, preferindo matas abertas, freqüentemente em ambientes secos e luminosos. O desenvolvimento da madeira em plantações é consideravelmente mais rápido que na natureza (Anon, 1997).

Sua madeira é muito dura, pesada, compacta, de grande resistência mecânica e praticamente imputrecível. Nos tempos coloniais era muito utilizada na construção civil e naval e para trabalhos de torno, pela coloração vermelho-laranja-vivo. Era também exportada em grande quantidade para extração de um corante vermelho denominado "brasileína", muito usado para tingir tecidos e fabricar tintas de escrever, representando a primeira grande atividade econômica do país (Lorenzi, 1949).

Após a chegada dos portugueses ao Brasil em 1500, teve início em 1503 o ciclo econômico do pau-brasil e, até 30 anos depois, era o único recurso explorado pelos colonizadores. Nesse período, calcula-se que foram exploradas 300 toneladas de madeira por ano, sempre aumentando nos anos posteriores. Com a exploração, a terra do pau-brasil tornou-se de muita importância, e em pouco tempo Pindorama (denominação tupi que significa

Terra das Palmeiras), oscilou entre os nomes oficiais Ilha de Vera Cruz, Terra de Santa Cruz, Terra do Brasil e logo em seguida apenas Brasil.

O monopólio da coroa portuguesa sobre o pau-brasil teve existência curta, pois França, Inglaterra, Holanda e Espanha passaram a participar das atividades extrativistas ajudados pelos inocentes índios (em troca de quinquilharias). Este processo de exploração conjunta e contínua consistiu nesse período, na retirada de um recurso natural mais intensa e devastadora que se ouviu falar na história do Brasil.

O término do ciclo econômico do pau-brasil no século XIX, foi determinado pela quase inexistência da espécie nas matas e pela descoberta de corante artificial correspondente. Foram 375 anos de exploração e, após 500 anos da chegada dos portugueses, restou menos de 3% de pau-brasil na Floresta Atlântica. Assim, os colonizadores criaram um modelo de devastação, que se fixou profundamente nos sistemas sócio-econômicos seguintes.

Atualmente o pau-brasil continua sendo utilizado na fabricação de arcos de violinos e é considerado como a madeira mais importante para este fim (Anon, 1997), mas a produção racional da árvore não é estimulada porque são necessárias árvores com, pelo menos, 30 anos de cultivo.

A extração ilegal de *C. echinata* por madeireiros continua acontecendo. Desconhece-se, porém, a intensidade com que isto ocorre. Esta espécie está incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção no Brasil (IBAMA, 1992).

O pau-brasil tem um papel muito importante no ecossistema, pois, encontra-se freqüentemente coberto por orquídeas e outras epífitas.

A ordem Uredinales tem especial importância pelo fato de suas espécies provocarem um tipo de doença conhecida como ferrugem. O nome ferrugem surgiu do fato dos soros possuírem uma coloração ferrugínea. No seu habitat natural são parasitas obrigatórios de plantas, embora algumas espécies tenham sido cultivadas com dificuldade em meios artificiais muito complexos (Cummins & Hiratsuka, 1959).

Os fungos causadores de ferrugem parasitam um grande número de plantas e possuem características particulares, tais como: 1) no ciclo vital de uma única espécie podem existir cinco estádios esporícos morfologicamente distintos; 2) muitas espécies precisam de dois hospedeiros para completar seu

ciclo de vida (heteróica) e outras precisam de hospedeiro único (autóica); 3) de um modo geral, as espécies parasitam hospedeiros específicos (Alexopoulos et al., 1996).

Os cinco tipos de esporóforos produzidos pelos Uredinales são: espermogônio; écio; urédio; télio e basídio. Estes são designados pelos numerais romanos 0, I, II, III, IV respectivamente.

Dois sistemas têm sido usados na definição e terminologia dos estádios espóricos: O sistema morfológico e o sistema ontogênico. O sistema morfológico definido por Loundon (1967 a, b) e Holm (1973), enfatiza a morfologia dos esporos como a base para a definição dos estádios espóricos. Loundon (1972) procurou diferenciar eciósporos e urediniósporos. Neste sistema, **eciósporos** são definidos como sendo produzidos em cadeias, possuindo ornamentações verrucosas; **urediniósporos** são definidos como sendo unicelulares, repetitivos, gerados isoladamente no pedicelo e apresentando equinulações (Loundon, 1972).

O sistema ontogênico usado por Cummins (1959), seguido por Arthur (1905, 1925, 1929) e expandido por Hiratsuka (1973, 1975) enfatiza a posição dos esporos no ciclo de vida. De acordo com este sistema os estádios espóricos são os seguintes: **teliósporos** - esporos produtores de basídio (probasídio, hipobasídio); **basidiósporos** – esporos haplóides produzidos no basídio; **espermácios** – elementos de dicarionização; **eciósporos** – esporos não repetitivos produzidos como resultado de dicarionização; **urediniósporos** – mitósporos, repetitivos, produzidos no micélio dicariótico.

A ontogenia dos esporos de Uredinales foi estudada por Hughes (1970) que concluiu que os picniósporos ou espermácios têm desenvolvimento fialospórico, os eciósporos têm formação artrospórica-meristemática, os urediniósporos desenvolvem-se como simpodioconídios e os teliósporos são produzidos como células terminais semelhantes a clamidósporos, de crescimento determinado, como simpodioconídios, ou como artrósporos meristemáticos.

Os espermogônios são produzidos no talo haplóide resultante da infecção pelo basidiósporo. São diminutos, ocorrem em grupo, freqüentemente em manchas descoloridas ou tecidos hipertrofiados do hospedeiro e são tipicamente associados com écios ou télios. O espermogônio produz

espermácios em um exsudato adocicado os quais funcionam como gametas masculinos. Estes espermácios são pequenos, unicelulares e hialinos. Tipos de espermogônios morfológicamente distintos têm sido utilizados como caracteres taxonômicos supragenéricos úteis e confiáveis (Hiratsuka e Cummins, 1963).

Os espermácios conduzem os núcleos masculinos para a fecundação; os núcleos são recebidos pelas hifas receptoras femininas que se originam do interior da folha. A fecundação também pode ocorrer entre células hifais de diferentes polaridades no interior da folha. Quase simultaneamente ao desenvolvimento dos espermogônios, as hifas se aglutinam também abaixo da epiderme da face inferior da folha formando o primórdio ecidiano. Depois da fecundação os núcleos complementares se transmitem de célula em célula até chegar a estes primórdios. Após a dicarionização, se diferencia a parte produtora de esporos, os écios, que produzem os eciósporos. Os eciósporos são unicelulares, e após a germinação, produzem micélio dicariótico o qual origina urédios ou télíos, mas nunca écios. Os soros dos écios uredinóides parecem com os urédios mas são acompanhados pelo espermogônio e ocupam a posição de écio no ciclo vital. Estes também produzem esporos após a espermatização, morfológicamente parecidos com os urediniósporos, e são característicos, mas não exclusivos da família Raveneliaceae.

Os urédios são produzidos pelo micélio dicariótico e os urediniósporos produzem hifas dicarióticas quando germinam. O micélio resultante da germinação de urediniósporos pode produzir mais urédios, como também podem originar télíos.

Os télíos produzem teliósporos, um tipo de esporo importante para a sistemática das Uredinales. Muitos gêneros são descritos baseados na morfologia dos teliósporos. Da germinação deste tipo de esporo é que se originam os basídios e os basidiósporos.

Nem todos os Uredinales possuem todos os tipos de frutificações. Os que possuem todos os tipos são chamados de ciclo completo e os que não apresentam uma destas frutificações são chamados de ciclo incompleto.

Dependendo do número de estádios espóricos, três tipos básicos de ciclo de vida são reconhecidos: macrocíclico (possui todos estádios espóricos), semicíclico (falta o estágio uredinial) e o microcíclico (faltam os estádios de écio e urédio). Acredita-se que o macrociclo heteróico seja o mais primitivo e

que os ciclos reduzidos são tipos derivados (Jackson, 1931). A combinação entre o número de estádios esporóicos e a presença ou ausência de hospedeiros alternativos, resulta em algumas variações no ciclo vital denominadas como: heteromacrocíclica, automacrocíclica, heterodemicíclica, autodemicíclica, microcíclica e endocíclica (Cummins & Hiratsuka, 2003).

Os sintomas de ferrugem caracterizam-se por pústulas (saliências ou pequenas elevações) de coloração amarela nas folhas e ramos que podem dar origem a áreas necróticas ou hipertrofiadas. Essas folhas tornam-se amarelas e secam, podendo ocorrer desfolha precoce se o ataque for intenso, redução do crescimento dos ramos e diminuição na produção de frutos. Existe uma relação tão íntima entre a planta hospedeira e os Uredinales, que à medida que vão sendo selecionadas plantas resistentes aos diversos Uredinales, estes vão se adaptando também às novas condições (Silveira, 1968).

Atualmente não há concordância entre os especialistas com relação a divisão dos Uredinales em famílias (Alexopoulos, 1996). Segundo Cummins e Hiratsuka (1983), adeptos do sistema ontogênico, a família Raveneliaceae (Arth.) Leppik compreende os gêneros *Anthomyces*, *Anthomycetella*, *Apra*, *Cystomyces*, *Diabole*, *Dicheirinia*, *Diorchidiella*, *Diorchidium*, *Kernkampella*, *Lipocystis*, *Ravenelia*, *Sphenospora*, *Spumula*, e *Ypsilospora*. A família é descrita como possuindo espermogônios dos tipos 5 e 7, grupo VI, o estágio ecidiano do tipo *Aecidium* ou *Uraecium*, os urédios com ou sem paráfises e uredósporos equinulados, os télios com ou sem paráfises e os teliósporos pedicelados com dois ou mais esporos apicais dispostos radialmente no topo do pedicelo. As espécies são autóicas e os hospedeiros geralmente são da família Fabaceae. O gênero tipo é *Ravenelia* Berkeley.

O fungo *Anthomyces brasiliensis* (Dietel) foi descrito em 1899 no Rio de Janeiro causando ferrugem em *Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp. A diagnose original de Dietel, menciona apenas urédios e télios sem referência a espermogônios e écios (Dietel, 1899): “*Soros formados em manchas amareladas ou castanhas, hipófilos, esparsos, diminutos, lisos, pulvinados, castanhos; uredósporos subglobosos, 21-24µm de diâmetro ou obovais até 28µm de comprimento, amarelo-acastanhados, equinulados, munidos de três poros germinativos; capítulos teleutospóricos de células lageniformes ou*

ovóides, compostos de 3-8 células, geralmente 4-6, obovais ou esféricos, 33-52 x 25-40µm, de episporio liso, castanho-amarelado, com ápice espesso; pedicelo firme, fosco, até 70µm de comprimento; paráfises curvas marrom-amareladas.”

Cummins & Hiratsuka (2003) consideraram que os gêneros *Anthomycetella* e *Dicheirinia* são afins de *Anthomyces*. Entretanto *Anthomycetella* possui pedicelo composto, células apicais capazes de produzir mais de um teliospоро e apresenta o fascículo de teliosporos revestido por uma membrana, além de ocorrer em plantas da família Burseraceae. O gênero *Dicheirinia* possui teliosporos fortemente ornamentados com um poro germinativo lateral. Já o gênero *Anthomyces* tem teliosporos lisos, com pedicelo simples, uma célula apical para cada teliospоро, o fascículo teliospórico não revestido por membrana, poro germinativo apical e parasita plantas da família Fabaceae igualmente ao gênero *Dicheirinia*.

Diferentemente de outros patógenos que tendem atacar plantas debilitadas, os fungos causadores de ferrugens parasitam tecidos em crescimento vigoroso. Nas relações planta-patógeno há padrões definidos de especificidade entre os fungos causadores de ferrugem e seus hospedeiros. Alguns gêneros compreendem espécies capazes de parasitar plantas de muitas famílias, mas, outros gêneros parecem se restringir a certas plantas. A restrição quanto ao hospedeiro em espécies heteróicas, pode-se aplicar a ambas as fases do ciclo vital ou a uma fase apenas. Estas restrições ou especificidade são úteis como atalhos para a identificação dos fungos causadores de ferrugem. Os Uredinales autóicos com restrição quanto ao hospedeiro apresentam especificidade para certas famílias botânicas. O gênero *Ravenelia* por exemplo, pertencente a mesma família de *Anthomyces* (Raveneliaceae) é altamente especializado no seu parasitismo a plantas da família Fabaceae (Cummins & Hiratsuka, 2003).

A nível celular, as associações parasíticas envolvendo Uredinales e seus hospedeiros o fungo altera a estrutura da membrana e da parede celular da planta. Uma classe de proteínas associada com o transporte ativo através da membrana (H⁺ ATP-ases) está ausente na parte invaginada da membrana do hospedeiro adjacente ao haustório do fungo, embora esteja presente em outras partes. Conclui-se que os fungos causadores de ferrugem alteram o

transporte através da membrana da célula vegetal na região dos haustórios (Carlile et al., 2001).

Erickson & Henning, 1894 demonstraram que dentro da espécie *Puccinia graminis* ocorriam diferenças na habilidade de infectar diferentes gêneros de plantas. Ward (1962) formulou a teoria do hospedeiro-ponte, que consistia na manutenção de um patógeno sobre um hospedeiro intermediário por diversas gerações, ao final das quais, o referido patógeno seria capaz de infectar espécies até então resistentes.

Stakman & Piemeirel (1917) observaram que isolamentos de *Puccinia graminis tritici* diferiam em patogenicidade às diferentes cultivares de trigo.

Em 1942, ao estudar a ferrugem do linho, FLOR concluiu que para cada gene que condiciona a resistência no hospedeiro há um gene específico que determina patogenicidade no patógeno (*Melampsra lini*).

De acordo com (Stakman et al., 1962) a reação de hipersensibilidade contra ferrugens é controlada por um número limitado de genes específicos.

De um modo geral fungos que são parasitas obrigatórios apresentam alta variabilidade, o que dificulta o trabalho de melhoramento visando resistência. A técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") vem sendo usada na caracterização de diversos tipos de fitopatógenos, (Crowhurst et al., 1991; Guthrie et al., 1992; Cobb & Clarkson, 1993; MaClean et al., 1995; Kolmer et al., 1995; Kosman et al. 2004).

O desenvolvimento de marcadores polimórficos amplificados ao acaso (RAPD) (Wesh & Mc Clelland, 1990; Williams et al., 1990), permitiu o exame da variabilidade genômica sem conhecimento prévio das seqüências de DNA. Esta técnica tem se mostrado útil no estudo da base molecular do polimorfismo, caracterizando recursos genéticos e localizando genes de interesse (Ferreira & Gratapaglia, 1998).

Com as novas técnicas de genética molecular, os marcadores moleculares de DNA, têm contribuído como ferramenta para incrementar o conhecimento dos patógenos e o melhoramento genético de plantas cultivadas.

CAPÍTULO 1

***Anthomyces brasiliensis* em *Caesalpinia echinata* no
Brasil .**

**CRISTIANE F. L. ARAÚJO¹ & KARINA P. GRAMACHO² & JOSÉ
L. BEZERRA²**

¹Universidade Estadual de Santa Cruz , Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45.650-000,

BA

e-mail: lopesdearaujo@hotmail.com

²CEPLAC/CEPEC/SEFIT, Cx. Postal 07, 45600-000, Itabuna , BA.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Cristiane Ferreira Lopes de Araújo

ARAÚJO, C.F.L. & BEZERRA, J. L. *Anthomyces brasiliensis* em *Caesalpinia
echinata* no Brasil. Fitopatologia Brasileira

RESUMO

O fungo *Anthomyces brasiliensis* Dietel foi descrito em 1899 no Rio de Janeiro causando ferrugem em *Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp. sendo redescoberto no ano de 2001 em Porto Seguro, Bahia, causando a ferrugem do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Dietel na sua descrição original descreve apenas télios e urédios não tendo observado a existência de espermogônios e écios. Folhas com pequenas lesões necróticas nos folíolos, foram coletadas de mudas e plantas adultas de pau-brasil na Estação Experimental Pau-brasil (CEPLAC) no município de Porto Seguro, Bahia. Folíolos frescos e herborizados foram examinados ao microscópio estereoscópico, sendo efetuadas raspagens e cortes histológicos, os quais foram analisados aos microscópios composto e eletrônico de varredura para caracterização, mensuração e fotomicrografias das estruturas observadas. Nos estudos conduzidos no material coletado na Bahia foram encontrados espermogônios do grupo VI, tipo 7, característicos da família Raveneliaceae à qual pertence o gênero *Anthomyces*. Os espermogônios de *A. brasiliensis* são subcuticulares,

de contorno circular, aplanados e medem 70-100 x 30-56 μ m, com espermacióforos hialinos, basais, cilíndricos, agrupados em forma de paliçada, medindo 12-14 x 2-3 μ m. Os espermácios são hialinos, unicelulares, lisos, medindo 3-4 x 2-3 μ m. Pústulas acompanhadas por espermogônios foram interpretadas como écios uredinóides, característicos da família Raveneliaceae. Estas estruturas têm aspecto de pústulas alargadas, sem perídio definido, mostrando-se maiores que os télios e os urédios medindo 200-700 μ m diâmetro e 100-110 μ m de altura, com ecidiósporos idênticos aos urediniósporos, medindo de 22-24 x 18-22 μ m. Desta forma, *A. brasiliensis* passa a ser definida como uma ferrugem macrocíclica, autóica, contendo os estádios de 0 a IV.

Palavras-chave adicionais: ferrugem, taxonomia, ciclo vital, micologia.

ABSTRACT

The fungus *Anthomyces brasiliensis* Dietel described in 1899 in Rio de Janeiro causing rust on *Caesalpinia* sp. or *Piptadenia* sp., was rediscovered in 2001 in Porto Seguro, Bahia, Brazil on *Caesalpinia echinata* Lam. In his original description Dietel describes only telia and uredia having not observed spermogonia and aecia. Leaves with small necrotic lesions were collected from seedlings and trees of *C. echinata* at Pau-Brasil Experimental Station (CEPLAC) in Porto Seguro Municipality, Bahia state. Material from fresh and dried leaflets were examined under dissecting and compound microscopes. Micrographs were obtained using the compound and scanning electron microscopes. Spermogonia of group VI and type 7 were found on the material collected in Bahia. These were subcuticular, round in outline, flattened, 70-100 x 30-56 μ m with spermatophores hyaline, cylindrical, grouped in palisade, 12-14 x 2-3 μ m. Spermatia hyaline, smooth, 3-4 x 2-3 μ m. Pustules associated with spermogonia were interpreted as uredinoid aecia. They are larger than uredia and telia, 200-700 μ m broad. Aecidiospores are similar to urediniospores, measuring 22-24 x 18-22 μ m. *A. brasiliensis* is defined as a macrocyclic, autoecious rust containing 0 to IV states.

INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie pertencente à família Fabaceae, semidecídua, heliófita, com casca pardo acinzentada, ou pardo-rosada nas partes descascadas, e cerne vermelho. A árvore adulta atinge de 8-12 metros de altura (Lorenzi, 1949). Originária da floresta pluvial Atlântica, é de ocorrência natural desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, numa larga faixa de 3000 km.

A multiplicação e a preservação desta espécie arbórea tem sido buscada pelos poderes públicos e organizações privadas em função do que representa em termos de valor histórico, da sua ameaça de extinção, e por seu valor como planta ornamental. Foi o primeiro produto de exportação nacional tendo sido comercializado pelos franceses mesmo antes do descobrimento oficial do Brasil. Atualmente o pau-brasil continua sendo utilizado na fabricação de arcos de violinos e é considerada a madeira mais importante para tal finalidade (Anon., 1997). A exploração comercial da madeira é proibida mesmo quando proveniente de áreas replantadas, o que tem estimulado o seu contrabando para o exterior devido ao seu alto valor no mercado europeu. A espécie está incluída na lista de plantas ameaçadas de extinção no Brasil (IBAMA, 1992). Além do mais, o pau-brasil tem um papel muito importante no ecossistema, pois, encontra-se freqüentemente coberto por orquídeas e outras epífitas.

Poucos patógenos foram registrados sobre a espécie. Mendes et al. (1998) citam neste hospedeiro os fungos *Ganoderma* sp. e *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj (1985). Grandi e Silva (2003) estudaram os seguintes Hyphomycetes na serrapilheira de pau-brasil: *Chaetendophragmia fasciata* Castañeda, *Henicospora minor* P. M. Kirk & B. Sutton, *Pseudodictyosporium wauense* Matsushima e *Sporidesmium filiferum* Pirozynsky. Em 1899 Dietel encontrou uma ferrugem em folhas de Leguminosae (*Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp.) no Rio de Janeiro a qual foi descrita sob o nome de *Anthomyces brasiliensis* Dietel. O gênero é monotípico tendo como espécie tipo *A. brasiliensis* Dietel (Cummins & Hiratsuka, 1959; Kirk et al., 2001). Em fevereiro de 2001, foram observadas sobre mudas de pau-brasil em viveiro da Estação Ecológica de Pau-Brasil, da CEPLAC,

município de Porto Seguro, lesões necróticas nas folhas. Posteriormente, o mesmo tipo de lesão foi observada em folhas de plantas adultas com mais de dez anos de plantadas. Em exames efetuados sobre as lesões, detectaram-se a presença de urédios e télios, de tamanho reduzido, sendo os teliósporos característicos da espécie *Anthomyces brasiliensis* Dietel. A morfometria desta espécie é compatível com os espécimes encontrados na Bahia sobre *C. echinata* que foi reportado como um novo hospedeiro de *A. brasiliensis* (Bezerra e Costa, 2001).

Este trabalho propõe uma nova descrição para o patógeno, em bases modernas, utilizando as observações das diferentes fases do ciclo vital de *A. brasiliensis* em pau-brasil, a sazonalidade das suas fases no hospedeiro, além da avaliação da intensidade dos danos causados pelo patógeno ao hospedeiro em condições de viveiro, em função da área foliar afetada e dos seus efeitos sobre o desenvolvimento das mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

Foram realizadas coletas nos municípios de Porto Seguro, Pau-brasil, Uruçuca, Ilhéus e Itajuípe, no estado da Bahia e no município de São Lourenço da Mata, em Pernambuco. O material coletado consistia de folhas e folíolos com manchas necróticas, retirados de mudas enviveiradas e da ramagem de plantas adultas, bem como de mudas e plantas jovens nascidas espontaneamente na mata, ao lado de plantas adultas. O material exibindo manchas foi prensado entre folhas de papel de jornal e desidratado em secador ventilado, aproximadamente, à 60°C. Após este procedimento foi acondicionado em exsiccatas e depositado em herbário. Na Estação Experimental Pau-brasil, no município de Porto Seguro, coletou-se material ao longo do ano visando acompanhar o desenvolvimento da ferrugem.

Microscopia ótica:

Para observação ao microscópio ótico foram utilizados materiais frescos e herborizados. Lâminas de raspagem foram feitas com ácido láctico ou lactofenol, com ou sem corante azul-de-algodão. Cortes histológicos manuais foram montados de forma idêntica entre lâmina e lamínula. As observações das estruturas do fungo foram efetuadas em um microscópio Leica DMLS, nas objetivas de 40 e 100 vezes de magnificação, sendo as imagens registradas em fotos convencionais ou digitalizadas e capturadas em computador utilizando-se o software Capkit. Observações detalhadas dos sintomas e sinais foram efetuadas em um microscópio estereoscópico Olympus, e as imagens digitalizadas capturadas conforme descrição anterior.

No preparo de cortes mais delgados, foram adotados os seguintes procedimentos: o material herborizado foi inicialmente submetido a uma solução aquosa hidratante, constituída de etanol a 10% e tween 20 a 0,1% por 24 h, e em seguida congelados a -21° C. Os cortes histológicos foram efetuados em micrótomo de congelamento, marca Micron HM505E, e montados, de forma semipermanente em lâminas de vidro para observações e microfotografias em microscópio ótico. No preparo das lâminas semipermanentes os cortes, selecionados eram transferidos para lâminas contendo gotas do corante lactoglicerol/azul de algodão ou as secções eram colocadas em solução saturada de cloral hidratado, quando se pretendia ver os poros germinativos dos esporos. Na observação de detalhes morfológicos ou ontogênicos dos esporos, foi utilizado o corante de Bruzesse & Hassan (1983), sem fenol, preparado com a seguinte composição: 40 g de cloral hidratado, 15 ml de clorofórmio, 125 ml de ácido láctico a 90%, 300 ml de etanol a 95% e 0,6 g de azul de anilina. Em seguida, as lâminas foram seladas com esmalte de unha, etiquetadas e armazenadas para estudo.

No exame do material foram também utilizados cortes histológicos em tecidos embebidos em parafina onde os fragmentos foram fixados, desidratados em uma série de álcool butílico terciário (50 a 100%) e embebidos em parafina (ponto de fusão 56,5°C), após serem seccionados (5 a 12 µm de espessura) em um micrótomo rotativo. As secções foram fixadas em lâminas de microscopia com o adesivo de Haupt, após serem desengorduradas em 3 trocas de xilol 100%, e passadas através de uma série de xilol/álcool etílico absoluto (AEA) (1:1), AEA absoluto, AEA 70% e as secções foram coradas com Pianeze IIIB (VAUGHAN, 1914; GRAMACHO, 1999).

Microscopia eletrônica de Varredura

No exame de tecidos infetados e de estruturas fúngicas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram efetuados cortes em tecidos frescos ou hidratados, medindo 0,5 x 0,8 cm², os quais foram transferidos para recipientes contendo uma solução fixadora de glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 6,9. Os recipientes foram tapados e mantidos em geladeira a 4° C, por 12 h e em seguida, efetuadas cinco lavagens sucessivas do material com a mesma solução tampão. Após a lavagem, os cortes foram tratados com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão de cacodilato, permanecendo em refrigerador a 4 °C, por 4 h e em seguida submetidos a uma nova série de cinco lavagens com a solução tampão.

A seguir o material foi desidratado em uma série aquosa contendo 30%, 50%, 70%, 85%, 95% e 100% de acetona. Os fragmentos permaneceram em cada concentração por 10 a 20 min, sendo que a última solução foi trocada três vezes. Em seguida, procedeu-se a secagem do material, ao ponto crítico, em um aparelho de secagem CPD-030 Balzers (Baltec, Fuerstentum, Liechtenstein), utilizando-se CO₂ líquido. Os

fragmentos de tecidos secos foram presos a suportes metálicos utilizando-se pasta condutiva de prata. Os suportes contendo o material foram então cobertos com uma fina camada de ouro por meio de pulverização catódica em aparelho marca Balzers, modelo SCD50 por 140 seg. Observações foram efetuadas ao microscópio eletrônico de varredura marca Jeol, modelo JSM840-A (Jeol Ltd, Tóquio, Japão), com acelerações de 5 e 10 KV e distância de trabalho de 20mm e obtidas fotografias das várias estruturas do fungo.

Como critérios morfológicos utilizados na identificação taxonômica foram considerados a espessura e ornamentação da parede, cor, tamanho e forma dos teliósporos e urediniósporos, características dos pedicelos dos teliósporos e número e posição dos poros germinativos em urediniósporos. Paráfises, forma dos esporos, sintomas e sinais no hospedeiro, especificidade pelo hospedeiro, foram características adicionais que também ajudaram na identificação da espécie. Os resultados obtidos foram então comparados com a descrição da espécie na literatura. O espécime tipo de *A. brasiliensis* depositado no Arthur's Herbarium da Universidade de Purdue foi disponibilizado para efeito de comparação.

RESULTADOS

Descrição do Patógeno

Manchas a princípio punctiformes, tornando-se circulares a irregulares, castanhas, com um halo amarelado, dispersas, às vezes coalescentes, tornando-se necróticas com o passar do tempo, medindo 1-6mm de diâmetro. **Espermogônios** subcuticulares, anfigenos, de contorno circular, aplanados, tipo 7, grupo VI (Cummins & Hiratsuka, 1983) (Figura 1), medindo 70-100 μ m de diâmetro e 30-56 μ m de altura, com espermacióforos basais, hialinos, cilíndricos, dispostos em paliçada, medindo 12-14 x 2-3 μ m; espermácios hialinos, unicelulares, elipsóides,

lisos, 3-4 x 2-3 μ m. **Écios uredinóides** formados em manchas foliares grandes, necróticas, resultantes de infecções primárias dos basidiósporos, geralmente hipófilos, subepidérmicos, irrompentes, amarelos, usualmente maiores e mais espalhados que os urédios, 200-700 μ m de diâmetro e 100-110 μ m de altura (Figura 2A); **eciósporos** ovóides a elipsóides, subhialinos a amarelo-claros, equinulados, unicelulares, 22-24 x 18-22 μ m, com 2-3 poros germinativos equatoriais (Figura 2B); epispório 1,5-2 μ m de espessura. **Paráfises** periféricas, curvadas para dentro dos écios, não septadas, de paredes espessas e lúmen estreito, 8-12 μ m de diâmetro. **Urédios** hipófilos, subepidérmicos, irrompentes, dispersos, pustuliformes, amarelos, parafisados, 150-210 μ m de diâmetro e 40-100 μ m de altura (Figura 3A, 3B); **urediniósporos** idênticos aos eciósporos (Figura 3C, CD, 3E); haustórios unicelulares, hialinos, oblongos, formados nas células subepidérmicas (Figura 4A, 4B); micélio imerso extenso, formado de hifas flexuosas, septadas, ramificadas, intra e intercelulares, 3-4 μ m de diâmetro, estendendo-se da epiderme foliar inferior à superior (Figura 4C). **Paráfises** periféricas em sua maioria, cilindro-clavadas, fortemente arqueadas, de paredes espessas e lúmen estreito, unidas duas a duas na base, 4-6 μ m de diâmetro. **Télios** anfígenos, subepidérmicos, castanhos, protuberantes, pustuliformes, dispersos, parafisados, 220-240 μ m de diâmetro e 160 μ m de altura (Figura 5A, 5B, 5C); **teliósporos** unicelulares, castanhos, lisos, firmemente unidos lateralmente formando um cacho radial com três ou mais esporos 40-48 μ m de diâmetro (Figura 6 A e D), com um poro germinativo apical em cada teliósporo (Figura 6C); pedicelos simples 6-9 μ m de diâmetro e 40-100 μ m de comprimento (Figura 6 A e D), com células apicais em igual número ao dos esporos 12-18 μ m de comprimento e 4-8 μ m de largura; micélio imerso idêntico ao dos urédios. Paráfises semelhantes às dos urédios, porém, menos abundantes. Soros mistos contendo urediniósporos e teliósporos foram também observados.

Ciclo Vital

Como muitas das ferrugens tropicais, *A. brasiliensis* não possuía seu ciclo de vida completamente esclarecido. Dietel (1899) na sua descrição original descreveu apenas télios e urédios não tendo observado espermogônios e écios. Nos estudos conduzidos no material coletado na Bahia foram encontrados espermogônios do grupo VI, tipo 7, característicos da família Raveneliaceae na qual se situa o gênero *Anthomyces*. Soros acompanhados por espermogônios, foram interpretadas como écios uredinóides, também característicos da família Raveneliaceae. Desta forma, *A. brasiliensis* passa a ser descrita como uma ferrugem macrocíclica autóica, contendo os estádios de 0 a IV.

Na Estação Experimental de Pau-Brasil os diferentes estádios esporicos do fungo foram observados nas seguintes épocas: espermogônios à partir de julho; écios uredinóides à partir de setembro; urédios à partir de dezembro e télios à partir de janeiro.

Observou-se que as mudas de pau-brasil produzidas na Biofábrica de Cacau, município de Uruçuca, Bahia, são muito sensíveis às pulverizações com defensivos químicos. Este ponto deve ser levado em conta em pesquisas futuras sobre o controle químico da ferrugem do pau-brasil.

Distribuição geográfica

O fungo *Anthomyces brasiliensis* está relatado para os estados do Rio de Janeiro (Dietel, 1899) e Bahia (Bezerra, 2001). Na Bahia foi confirmada a ocorrência do patógeno apenas no município de Porto Seguro. A ocorrência desta espécie na Estação Ecológica de Tapacurá, município de São Lourenço da Mata, PE, é um novo registro para *A. brasiliensis*.

Espécimes examinados

BRASIL, BAHIA: Município de Porto Seguro, Estação Experimental Pau-brasil (CEPLAC), 14.07.2003, 05.12.2003, 19.03.2004, 21.01.2004.

BRASIL, PERNAMBUCO: Município de São Lourenço da Mata, Estação Ecológica de Tapacurá, 07.2003.

Arthur's Herbarium, Universidade de Purdue, Indiana, USA, F2190, F2189, F18301, N2526.

DISCUSSÃO

O fungo causador da ferrugem do pau-brasil é uma espécie macrocíclica, autóica que se enquadra nas características da espécie *A. brasiliensis*, diferindo de *Anthomycetella* entre outras características por não possuir pedicelo composto, nem capítulos teliospóricos revestidos por membrana, nem células apicais do pedicelo gerando mais de um teliósporo. Difere também do Gênero *Dicheirinia* que apresenta teliósporos fortemente ornamentados e dotados de poro germinativo lateral (Rezende comunicação pessoal). Por estes motivos não se justifica a afirmativa de Cummins & Hiratsuka (2003) de que ao gêneros *Anthomyces* e *Dicheirinia* seriam praticamente indistinguíveis caso se constatasse a ocorrência de espermogônios do grupo VI, tipo 7 e écios uredinóides em *Anthomyces*. Dietel (1899) não observou espermogônios e écios uredinóides possivelmente por não ter tido oportunidade de examinar um número suficiente de espécimes coletados em diferentes épocas do ano.

A questão dos hospedeiros de *A. brasiliensis* é dificultada pela falta de determinação específica dos espécimes estudados por Dietel. No Arthur's Herbarium estão os três espécimes originais estudados por Dietel: F2190 Isotipo (*Caesalpinia* sp.); F2189 (*Caesalpinia* sp.); e F18301 (*Piptadenia* sp.) de forma que só os espécimes coletados pelos autores foram em espécie botânica conhecida (*C. echinata*). Então torna-se evidente a necessidade de se conhecer as espécies dos outros hospedeiros de *A. brasiliensis*.

O fato da doença ter sido encontrada na Estação Experimental Pau-Brasil (CEPLAC), e na Reserva Ecológica de Tapacurá deve estar relacionado ao adensamento do hospedeiro em arboretos e viveiros, já que na natureza o hospedeiro ocorre de forma dispersa. Caso semelhante ocorre com a seringueira (*Hevea* spp.) que no seu habitat natural na

Floresta Amazônica, é hospedeira do fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx o qual causa epidemias severas da doença denominada mal-das-folhas apenas nos seringais comerciais (Gasparotto et al., 1997).

A distribuição geográfica de *A. brasiliensis* não está elucidada. É possível que a espécie ocorra de forma contínua em toda faixa litorânea que vai do Rio de Janeiro a Pernambuco ou mesmo em toda área de ocorrência do pau-brasil o que só será confirmado através de levantamentos realizados com tal finalidade. Na Bahia, ainda há a necessidade de levantamentos mais detalhados nas áreas de distribuição do pau-brasil a fim de determinar com segurança a amplitude de sua ocorrência.

O modo de formação dos esporócios obedece ao padrão fialídico descrito por Hughes (1970) embora não tenham sido observados colaretes nas células conidiógenas. Os teliósporos são originados a partir de células conidiógenas retangulares que dão origem em vários pontos aos esporos de forma simpodioconidial conforme descreve Hughes (1970) para *Gymnosporangium gaeumanii*. A ontogenia dos urediniósporos não foi claramente observada, mas aparenta ser semelhante a dos teliósporos.

CONCLUSÃO

A. brasiliensis é um fungo causador de ferrugem, definido como macrocíclica, autóica, contendo os estádios de 0 a IV tendo como hospedeiros *C. echinata* e *Piptadenia* sp. ou *Caesalpinia* sp.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Denise Vilela de Rezende Santiago pela orientação nos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura. À CEPLAC pela disponibilização dos laboratórios, veículos e motoristas para a realização dos trabalhos. À Universidade Federal de Brasília por ter viabilizado os

estudos em microscopia eletrônica de varredura. Ao colega Olinto Liparini (UFV) pela ajuda na detecção de espermogônios de *A. brasiliensis*.

LITERATURA CITADA:

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.. Introductory Mycology 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1996.

ANON. Conservation and manegement of pau-brasil, *Caesalpinia echinata* – An action plan. Fauna and Flora International (UK), Botanical gardens of Rio de Janeiro (Brasil), Margaret Mee Foundation (Brasil). (Unpublished report).1997.

BEZERRA, J. L. & COSTA, J, C. B. *Anthomyces brasiliensis* parasitando folhas de pau-brasil, na Bahia. Fitopatologia Brasileira (Suple.), 314: 351-352. 2001.

BRUZESSE, E. & HASAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. Plant Pathology 32:335-338. 1983.

DIETEL, P. 1899. Uredineae brasilienses, a cl. E. Ule lectae. II. Hedwigia 38:248-246.

CUMMINS, G.B. & HIRATSUKA, Y. Illustrated Genera of Rust Fungi. Revised edn. The American Phytopathological Society of Minnesota U.S.A. 1959.

CUMMINS, G.B. & HIRATSUKA, Y. Illustrated Genera of Rust Fungi. Rev. ed. APS Press, St. Paul, MN. 152 p. 1983.

CUMMINS, G.B. & HIRATSUKA, Y. Illustrated Genera of Rust Fungi. Revised edn. The American Phytopathological Society of Minnesota U.S.A. 2003.

GRAMACHO, K. P. Disease resistance and pathogenic variability in the fusiform rust-slash pine pathosystem. PhD. Thesis. Univ. Fla., Gainesville. 147 p. 1999.

GRANDI, R. A. & SILVA, T. V. Hyphomycetes sobre folhas em decomposição de *Caesalpinia echinata* Lam.: ocorrências novas para o Brasil. Revista Brasil. Bot., V. 26, n.4, p. 489-493.

IBAMA. 1992. Lista oficial de espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção. (unpublished). 4pp. Sociedade Botânica do Brasil. Centuria plantarum Brasiliensium extinctionis minitata. Sociedade Botânica do Brasil. 175pp. 1992.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F. & STALPERS, P. A.. Dictionary of the Fungi, 9^a edition, CABI Bioscience, 2001.

LORENZI, H. 1949. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil/ Nova Odessa, SP: Editora Plantarum 1992.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F. & CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. EMBRAPA, Brasília, 1998.

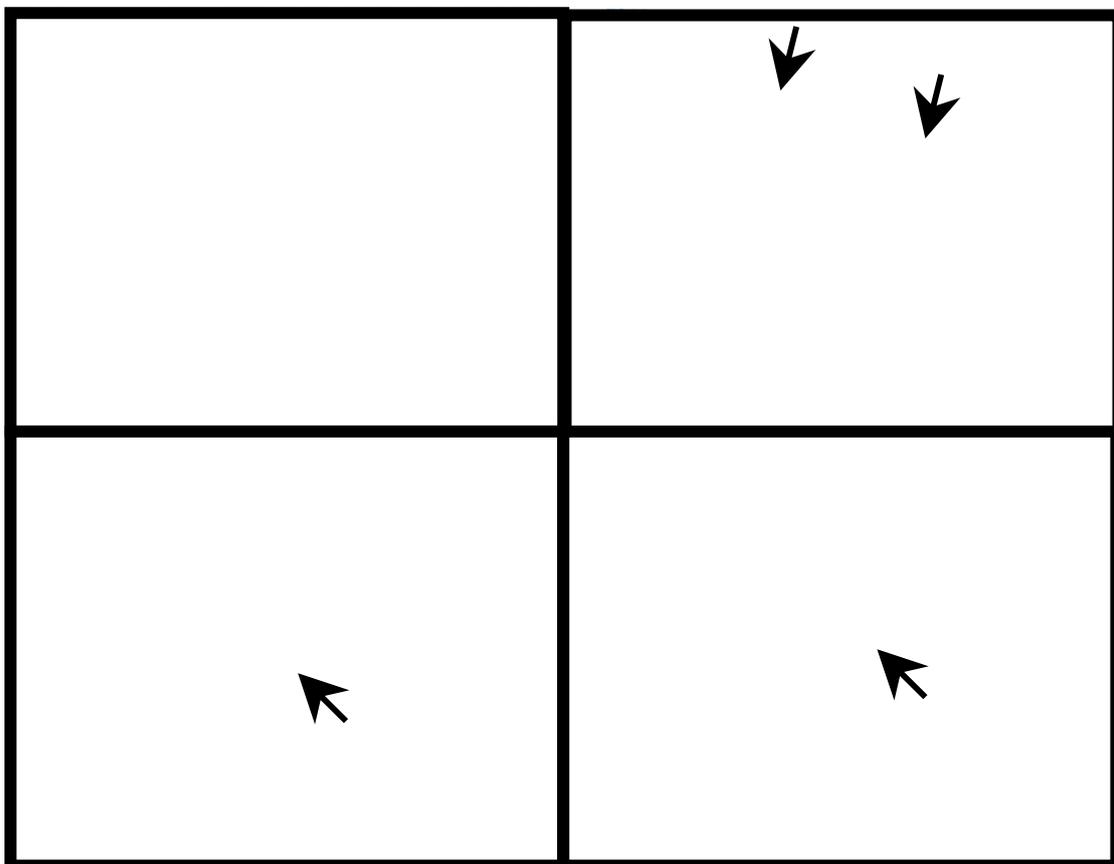


FIG. 1. *Anthomyces brasiliensis*. A. Espermogônios ao microscópio estereoscópico. B. Espermogônios anfigenos em secção longitudinal. C. Espermogônio subcuticular com espermacióforos em paliçada (seta). D. Espermogônio contendo espermácios (seta). Barras: A = 200 μm ; B = 100 μm ; C e D = 20 μm .

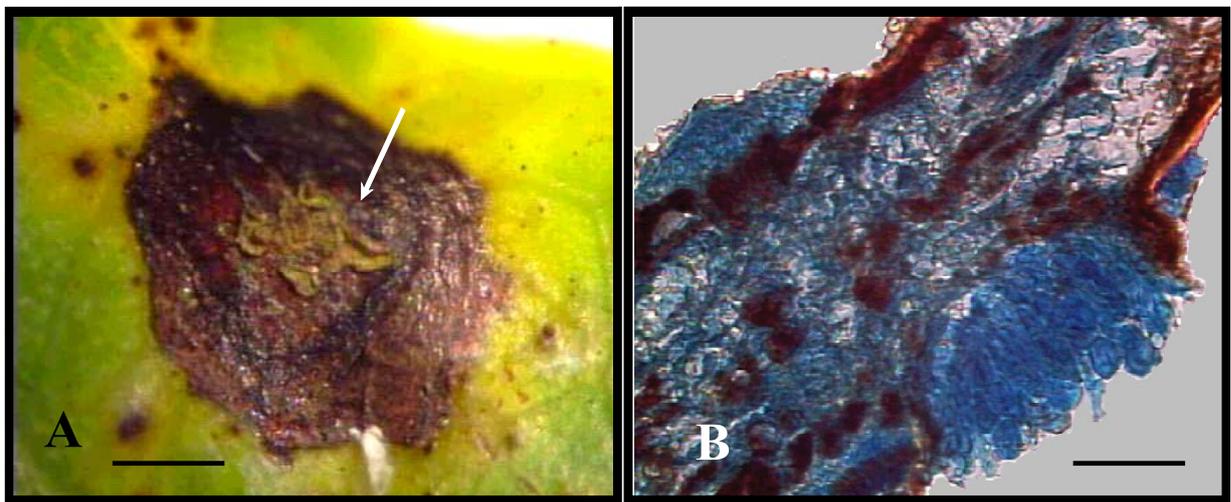


FIG. 2. *Anthomyces brasiliensis*. A. Écios uredinóides ao microscópio estereoscópico. B. Écios uredinóides em secção longitudinal. Barras A = 1000 μm ; B = 70 μm .

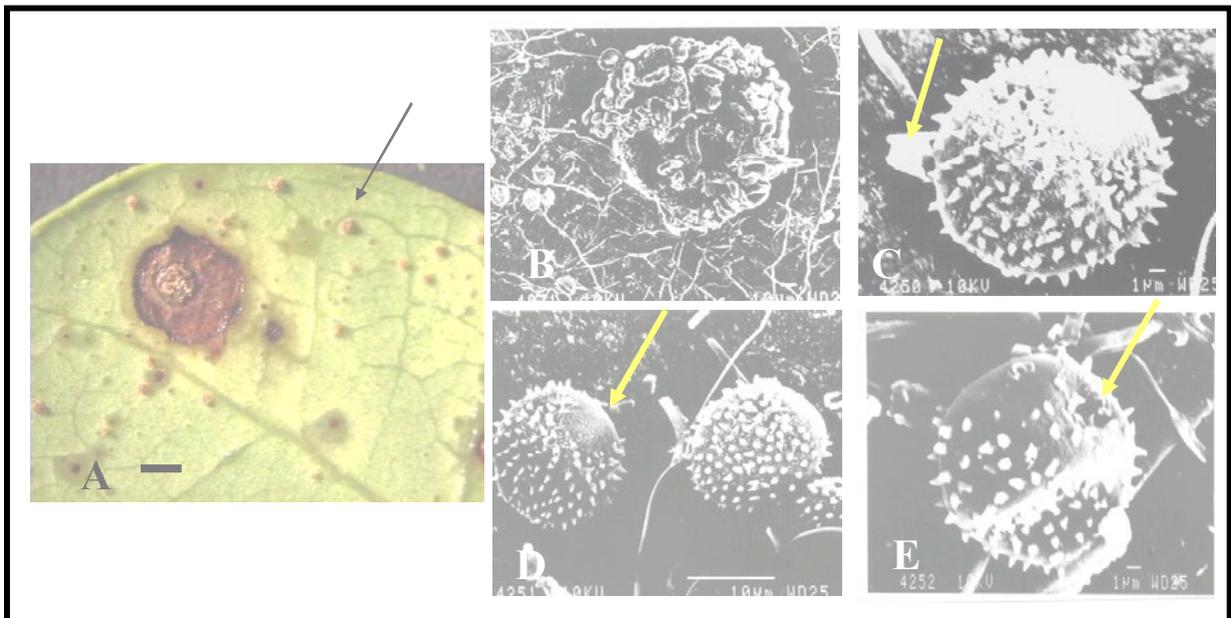


FIG. 3. *Anthomyces brasiliensis*. A. Urédios ao microscópio estereoscópico (seta). B. Urédios vista ao MEV. C. Urediniósporos com pedicelo visto ao MEV (seta). D. Urediniósporo com parte apical lisa visto ao MEV (seta). E. Urediniósporo com poro germinativo na região equatorial visto ao MEV (seta). Barras: A = 200 μ m; B = 10 μ m; C = 1 μ m; D = 10 μ m; E = 1 μ m.

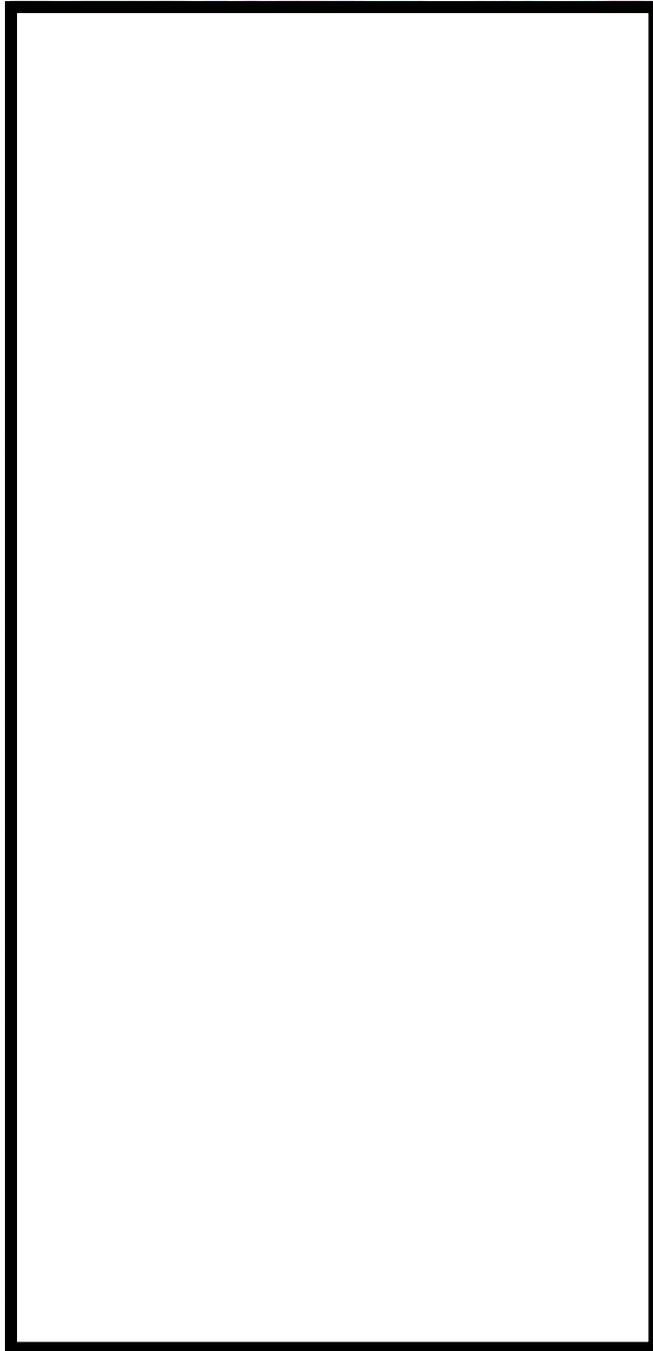


FIG. 4. *Anthomyces brasiliensis* A-B. Haustórios (setas) C. Micélio interno (ponta de seta). A a C 10 μ m.

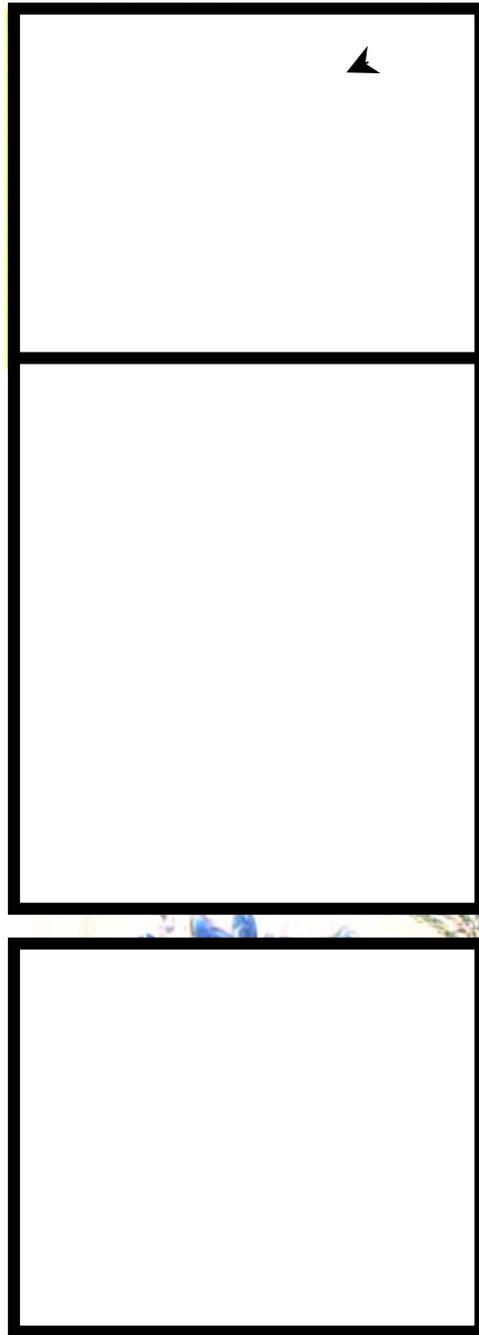


FIG. 5. *Anthomyces brasiliensis*. A. Télios ao microscópio estereoscópico. B-C. Secções transversais de télios. Barras: A = 200 μm ; B e C = 50 μm .

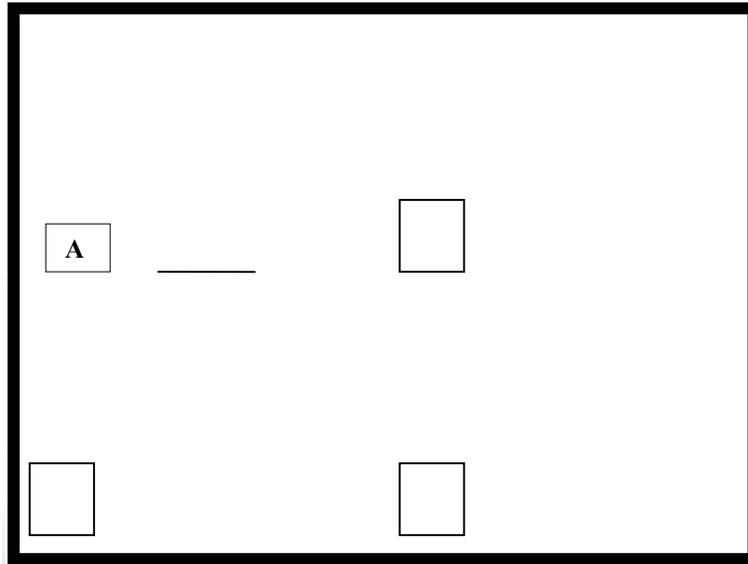


FIG. 6. *Anthomyces brasiliensis*. A. Teliósporo ao microscópio ótico. B. Télió visto em MEV. C. Teliósporo com poro germinativo apical (seta). D. Teliósporos fortemente unidos formando capítulo pedicelado, MEV. Barras: A a D 10 μ m.

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Anthomyces brasiliensis* VISANDO OBTENÇÃO DE MARCADORES RAPD.

CRISTIANE F. L. ARAÚJO¹ & JOSÉ L. BEZERRA² & KARINA P.
GRAMACHO²

¹Universidade Estadual de Santa Cruz , Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45.650-000,
BA

e-mail: lopesdearaujo@hotmail.com

²CEPLAC/CEPEC/SEFIT, Cx. Postal 07, 45600-000, Itabuna , BA.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Cristiane Ferreira Lopes de Araújo

ARAÚJO, C.F.L.; BEZERRA, J. L. & GRAMACHO, K. P. EXTRAÇÃO E
AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Anthomyces brasiliensis* VISANDO OBTENÇÃO
DE MARCADORES RAPD.

RESUMO

Para que as informações geradas por marcadores moleculares tenham qualidade, a extração e a amplificação do DNA são etapas importantes. Este trabalho teve como objetivo obter amostras de DNA de *Anthomyces brasiliensis* que pudessem ser amplificadas pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Observou-se que a pré-germinação dos esporos em água destilada, seguida de lavagem também em água destilada, influenciou positivamente a quantidade, integridade e qualidade do DNA. Para obtenção de marcadores RAPD, verificou-se que o aumento do DNTP proporcionou melhor amplificação. Os ajustes realizados foram importantes para obtenção de bandas reprodutíveis de marcas RAPD, o que possibilitará o desenvolvimento de trabalhos genético-moleculares com *A. brasiliensis*.

ABSTRACT

Extraction and amplification of DNA are important steps to generate molecular markers of good quality. This paper aimed to obtain DNA samples of *Anthomyces brasiliensis* that could be amplified by the RAPD technique. Spore pregermination in distilled water, influenced quantity, integrity and quality of DNA. Increasing DNTP enhanced better amplification and detection of RAPD markers. Adjustments carried out were important to obtain reproducible RAPD bands necessary to molecular characterization of *A. brasiliensis*.

INTRODUÇÃO

O *Anthomyces brasiliensis* Dietel é o agente etiológico da ferrugem do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Como todo fungo causador de ferrugem este poderá vir a constituir limitação no cultivo racional do pau-brasil. A multiplicação e a preservação desta espécie arbórea tem sido buscada pelos poderes públicos e organizações privadas por representar um marco histórico da nossa nacionalidade, pela ameaça de extinção e por seu valor como planta ornamental. Em fevereiro de 2001, observaram-se mudas de pau-brasil em viveiro da Estação Experimental Pau-Brasil, da CEPLAC, município de Porto Seguro, apresentando lesões necróticas nos folíolos. Posteriormente, o mesmo

tipo de lesão foi observada em folíolos de plantas adultas com mais de dez anos. Verificou-se nessas lesões, a existência de urédios e télios de tamanho reduzido, sendo os teliósporos característicos da espécie *Anthomyces brasiliensis*, descrita sobre *Caesalpinia* sp. ou *Piptadenia* sp., no Rio de Janeiro, em 1899 (Bezerra, 2001).

O conhecimento da variabilidade genética do patógeno tem relevante importância em estudos de patogenicidade relacionados ao melhoramento genético das plantas visando sua resistência às doenças.

Dificuldades com a produção artificial de inóculo de *A. brasiliensis* representam um fator limitante para obtenção do DNA. A quantidade e a qualidade do DNA depende da quantidade e qualidade das pústulas, já que não se trata de um fungo cultivável. A obtenção de pústulas para extração de DNA de qualidade e em quantidade suficiente para as análises moleculares é fundamental para realização de estudo moleculares. Os protocolos de extração e purificação do DNA também influenciam na qualidade e na quantidade do DNA isolado. Diferentes métodos têm sido utilizados para a extração do DNA de fungos, pequenas variações nos métodos de extração de DNA são relatadas na literatura.

Para que se obtenham padrões nítidos e reprodutíveis de bandas de DNA, é necessário que o DNA molde apresente um razoável grau de pureza. Em fungos que se reproduzem “in vitro” pode-se obter facilmente um DNA puro. Entretanto, em *A. brasiliensis* a fonte disponível para obtenção do DNA são os esporos e estes são difíceis de serem coletados em quantidade suficiente para realização da extração.

Numerosos trabalhos descreveram procedimentos para a extração e purificação de DNA fúngico. Apesar das muitas técnicas disponíveis para a preparação de DNA fúngico, algumas amostras de esporos são recalcitrantes aos métodos empregados (Faleiro *et al.*, 1996). Diferentes tipos de marcadores moleculares e análises de seqüências vêm sendo utilizados na caracterização da variabilidade genética de diferentes fitopatógenos. A técnica de RAPD foi utilizada com sucesso em diversos trabalhos com tal finalidade (Crowhurst *et al.*, 1991; Guthrie *et al.*, 1992; Cobb & Clarkson, 1993; MaClean *et al.*, 1995; Kolmer *et al.*, 1995; Kosman *et al.* 2004).

Com as novas técnicas de genética molecular, os marcadores moleculares de DNA, têm contribuído como ferramenta para incrementar o conhecimento dos patógenos e o melhoramento genético de plantas cultivadas.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de amostras de DNA de *A. brasiliensis* que pudessem ser amplificadas pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético:

Seis amostras de ferrugens da família Raveneliaceae, sendo quatro de *Anthomyces brasiliensis* Dietel, (*Caesalpinia echinata*), uma de *Sphenospora kevorkiani* Linder, (*Catasetum fimbriatum*), uma de *Diorchidiella verlandii* (*Mimosa schomburgkii*) e uma de *Puccinia* sp. (hospedeiro indeterminado) foram utilizados neste estudo (Tabela 1). As amostras de *Anthomyces* foram obtidas de folhas de *Caesalpinia echinata* naturalmente infectadas, na estação Experimental de Pau Brasil (CEPLAC), no município de Porto Seguro, BA; a amostra de *Diorchidiella* foi coletada na Mata do Departamento de Biologia (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, a amostra de *Sphenospora* foi coletada no Rio de Janeiro e cedida pelo Herbário da UFRJ (VIC 26509) e a amostra de *Puccinia* sp. foi coleta no Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC). Uma mostra de DNA do basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer foi incluída neste estudo para fins de comparação do método de extração e amplificação.

Extração do DNA e obtenção dos marcadores RAPD

Os esporos para os testes de DNA foram obtidos à partir da metodologia de Hu e Amerson (1991) análise molecular foi feita a partir de DNA genômico extraído de esporos (télios e/ou urédios).

O material utilizado para a extração de DNA da amostra 1 de *A. brasiliensis* foi fresco. As pústulas foram então lavadas com água destilada estéril, os esporos pré-germinados por 2 horas também em água destilada estéril e filtrados em papel de filtro Whatman nº 1, a amostra de *Puccinia* sp. foi fresca, as demais amostras foram obtidas de folhas herborizadas e não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento.

A extração do DNA foi realizada a partir de aproximadamente 20-30mg de esporos. As pústulas foram individualmente retiradas de folíolos doentes com auxílio de microscópio estereoscópico Olympus. Pústulas foram resfriadas com N₂ líquido e maceradas em cadinho de porcelana em contato com areia estéril para otimização da lise celular. Após, o macerado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 700 µl de tampão de lise constituído por Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, SDS 1%, NaCl 250 mM e 2-mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos foram mantidos em banho-maria (70° C) por uma hora, sendo agitados a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a desproteinização, adicionando-se 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 min, por suaves inversões, e centrifugadas a 4° C, 18.845 rpm, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 ml limpos e o processo de desproteinização foi repetido. O DNA foi então precipitado, 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20° C por 2 h e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70 % (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 150 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e colocados em banho-maria a 37° C para a completa ressuspensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 150 µl de água, como já descrito. A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989) e posteriormente diluída para 10 ng/µl.

A relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. Após esse processo, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/ μ L.

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 μ l, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 μ M de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Foram utilizados os "primers" H₄, H₃, H₂₀, C₅, C₁₃, I₃, I₁₈, N₄, para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μ l de uma mistura de azul de bromofenol (0,25 %), glicerol (60 %) e água (39,75 %). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2 %), submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, 3 h, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a lavagem das pústulas seguidas da pré-germinação dos esporos aumentaram consideravelmente a quantidade e a qualidade de DNA, a qual foi medida em espectrofotômetro e está apresentada na (Tabela 1). Em geral as amostras 1 e 2 lavadas e postas a germinar apresentaram DNA de melhor qualidade. A pré-germinação dos esporos permitiu um aumento no DNA genômico, provavelmente, devido a maior quantidade de células. O mesmo ocorreu quando se extraiu DNA de urediniósporos de *Uromyces appendicutatus* (Faleiro, 1996). Outro componente que pode ter influenciado na quantidade e qualidade do DNA foi o estágio das pústulas. Geralmente DNA extraído à partir de amostras novas de folhas ou micélios fornecem maior quantidade de DNA.

Com relação à quantidade dos produtos de amplificação via PCR para obtenção de marcadores RAPD, verificou-se que o aumento da concentração de DNTP proporcionou melhor amplificação. Dos oito “primers” usados, seis apresentaram um certo polimorfismo (Tabela 2), confirmando que o DNA extraído pelo método descrito, apresentou boa qualidade/quantidade para futuros estudos moleculares.

Quantificação DNA

Amostras	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA/ul
Anthomyces1	0.0234	1.98	117
Anthomyces2	0.0246	1.82	123
Anthomyces3	0.0209	1.31	105
Anthomyces4	0.0042	2.80	21
Sphenospora	0.0131	1.05	66
Diorchidiella	0.0022	1.467	11
Puccinia	0.0155	1.05	66

Tabela. 1. Quantificação e qualidade do DNA das amostras de ferrugens

Primers	Bandas polimórficas
H4	14
H3	4
H20	11
C5	14
I3	17
N4	10
Total	70

Tabela. 2. Número total de bandas polimórficas obtidas á partir da amplificação de DNA genômico de amostras 7 de ferrugem e uma amostra de CP.

CONCLUSÃO

O ajuste nos processos de extração e amplificação do DNA de *A. brasiliensis* permitiu a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de marcas RAPD. As amostras pré-tratadas apresentaram melhor amplificação.

LITERATURA CITADA

BEZERRA, J. L. & COSTA, J. C. B. *Anthomyces brasiliensis* parasitando folhas de pau-brasil, na Bahia. Fitopatologia Brasileira (Suple.), 314: 351-352. 2001.

COBB, B. D. & CLARKSON, J. M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters 112:319-324.1993.

CROWHURST, R. M.; HAAWTHORNE, B. T.; RIKKERINK, E. H. A. & TEMPLETON, M. D. Differentiation of *Fusarium solani* f. spp. Cucurbitae races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. Curr. Gen. 20:391-396.1991.

FALEIRO, F.G., BARROS, E.G., VILARINHOS, A.D., CORRÊA, R.X., PAULA JÚNIOR.,T.J. & MOREIRA, M.A. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. Fitopatologia Brasileira 21:304- 307. 1996.

GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P., FALEIRO, F.G., SILVA, S.D.M., ARAÚJO, I.S., BAHIA, R.C., VALLE, R.R., MORAES, M.G. & AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Proceedings, vol.1, 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 2000a. pp.605-612.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A. & ODVODY, G. N. Random Amplified Polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. Phytopatology 82:823-835.1992.

KOLMER, J. A.; LIU, J. Q. & SIES, M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *Triticici* in Canada. Phytopatology 85:276-285.1995.

KOSMAN, E.; PARDES, E.; ANIKSTER, Y.; MANISTERSKI, J.; YEHUDA, P. B.; SZABO, L. J. & SHARON, A. Genetic Variation and Virulence on *Lr26* in *Puccinia triticina*. *Phytopatology* 94:632-640. 2004

MACLEAN, D. J.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A.; MANNERS, J. M.; GROTH, J. V. Random Amplified Polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. *Phytopatology* 85:757-767.1995.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.3. 1989.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218. 1990.

ZOLAN, M. E. and PUKKILA, P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6(1), 195-200.

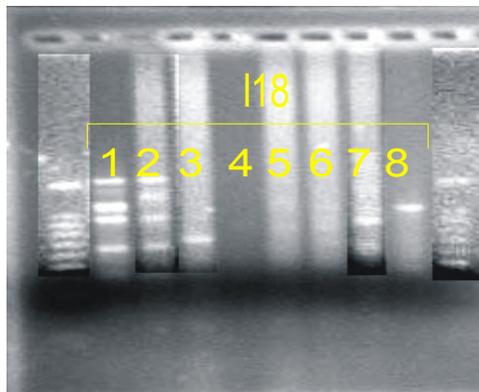
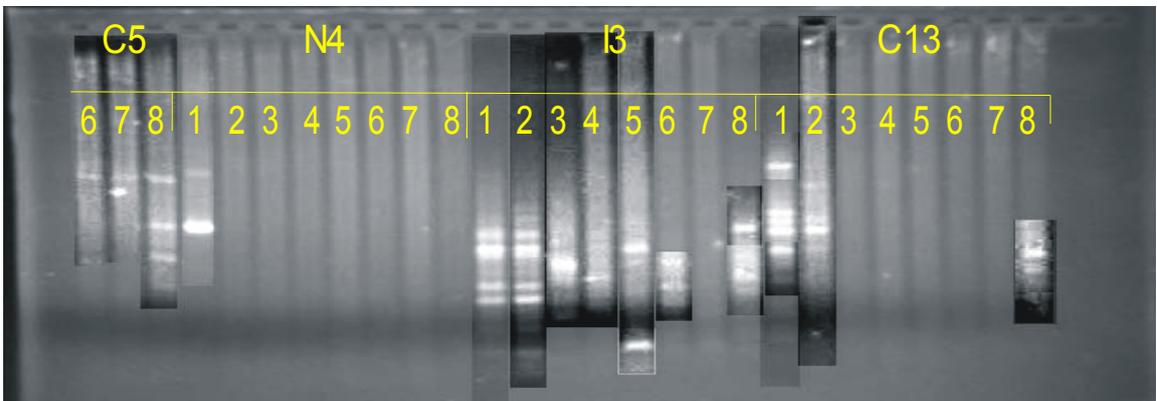
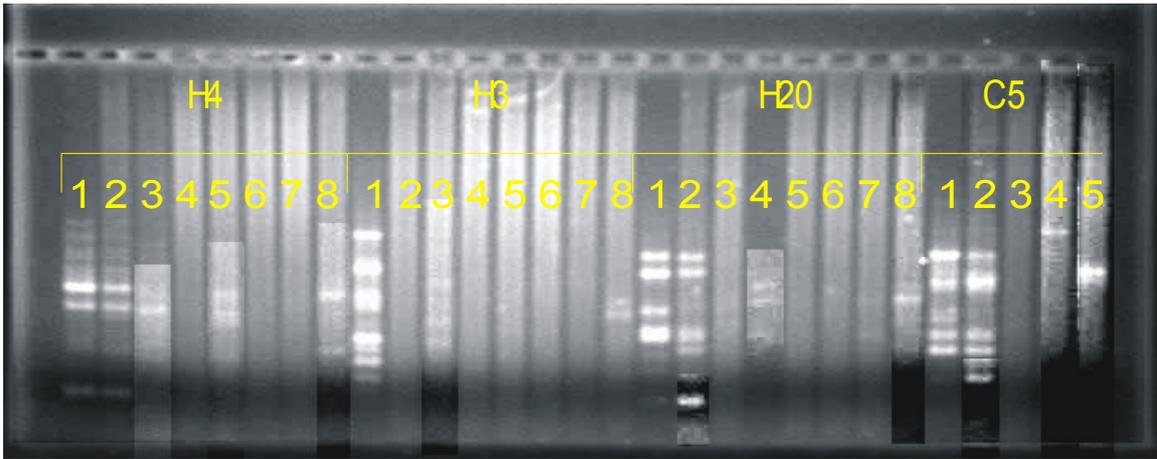


Figura. 1. Produtos de amplificação do DNA genômico de oito amostras, utilizando os “primers” H4, H3, H20, C5, N4, I3, C13, I18 .

CONCLUSÕES GERAIS

A. brasiliensis passa a ser definida como uma ferrugem macrocíclica, autóica, contendo os estádios de 0 a IV.

O ajuste nos processos de extração e amplificação do DNA de *A. brasiliensis* permitiu a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de marcas RAPD.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.. Introductory Mycology 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- ANON. Conservation and management of pau-brasil, *Caesalpinia echinata* – An action plan. Fauna and Flora International (UK), Botanical gardens of Rio de Janeiro (Brasil), Margaret Mee Foundation (Brasil). (Unpublished report).1997.
- ARTHUR, J. C. Terminology of the spore structures in the Uredinales. Bot. Gaz. 39:219-222, 1905.
- ARTHUR, J. C. Terminology of the Uredinales. Bot. Gaz. 80:219-223, 1925.
- ARTHUR, J. C. The plant rusts (Uredinales). John Wiley and Sons, New York, 1929.
- BEZERRA, J. L. & COSTA, J, C. B. *Anthomyces brasiliensis* parasitando folhas de pau-brasil, na Bahia. Fitopatologia Brasileira (Suple.), 314: 351-352. 2001.
- BRUZESSE, E. & HASAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. Plant Pathology 32:335-338. 1983.
- COBB, B. D. & CLARKSON, J. M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters 112:319-324.1993.
- CROWHURST, R. M.; HAAWTHORNE, B. T.; RIKKERINK, E. H. A. & TEMPLETON, M. D. Differentiation of *Fusarium solani* f. spp. Cucurbitae races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. Curr. Gen. 20:391-396.1991.

CUMMINS, G.B. & HIRATSUKA, Y. Illustrated Genera of Rust Fungi. Revised edn. The American Phytopathological Society of Minnesota U.S.A. 1959.

CUMMINS, G.B. & HIRATSUKA, Y. Illustrated Genera of Rust Fungi. Revised edn. The American Phytopathological Society of Minnesota U.S.A. 2003.

CUMMINS, G. B. Illustrated genera of rust fungi. Burgess Publ. Co., Minneapolis MN. 131p. 1959.

DIETEL, P. Uredineae brasilienses, a cl. E. Ule lectae. II. Hedwigia 38:248-246 1899.

ERIKSSON, J. & HENNING, E. Die Hauptresultate einer neuen Untersuchung über die Getreideroste. Z. PAKrankh. 4, 66-73.1894.

FALEIRO, F.G., BARROS, E.G., VILARINHOS, A.D., CORRÊA, R.X., PAULA JÚNIOR., T.J. & MOREIRA, M.A. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. Fitopatologia Brasileira 21:304- 307. 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. EMBRAPA, 3 ed. 1988.

GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P., FALEIRO, F.G., SILVA, S.D.M., ARAÚJO, I.S., BAHIA, R.C., VALLE, R.R., MORAES, M.G. & AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Proceedings, vol.1, 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 2000a. pp.605-612.

GRAMACHO, K. P. Disease resistance and pathogenic variability in the fusiform rust-slash pine pathosystem. PhD. Thesis. Univ. Fla., Gainesville. 147 p. 1999.

GROTH, J. V. Random Amplified Polymorphic DNA reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. Phytopatology 85:757-767.1995.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A. & ODVODY, G. N. Random Amplified Polymorphic DNA markers: a system for identifying and

differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopatology* 82:823-835.1992.

GRANDI, R. A. & SILVA, T. V. Hyphomycetes sobre folhas em decomposição de *Caesalpinia echinata* Lam.: ocorrências novas para o Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, V. 26, n.4, p. 489-493.

HIRATSUKA, Y. The nuclear cycle and the terminology of spore states in Uredinales. *Mycologia* 65:432-443, 1973.

HIRATSUKA, Y. Recent controversies on the terminology of rust fungi. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 12:99-104, 1975.

HIRATSUKA, Y.; CUMMINS, G. B. Morphology of the spermogonia of the rust fungi. *Mycologia* 55:487-507, 1963.

HOLM, L. Some notes on the rust terminology. *Rep. Tottori. Mycol. Inst.* 10:183-187, 1973.

HUGHES, S. J. Ontogeny of spore forms in Uredinales. *Can. J. Bot.* 48:2147-2157, 1970.

IBAMA. 1992. Lista oficial de espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção. (unpublished). 4pp. Sociedade Botânica do Brasil. Centuria plantarum Brasiliensium extinctionis minitata. Sociedade Botânica do Brasil. 175pp. 1992.

JACKSON, H. S. Present evolutionary tendencies and the origin of life cycles in the Uredinales. *Mem. Torrey Bot. Club* 18:1-108,1931.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F. & STALPERS, P. A.. *Dictionary of the Fungi*, 9^a edition, CABI Bioscience, 2001.

KOLMER, J. A.; LIU, J. Q. & SIES, M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *Tritici* in Canada. *Phytopatology* 85:276-285.1995.

KOSMAN, E.; PARDES, E.; ANIKSTER, Y.; MANISTERSKI, J.; YEHUDA. P. B.; SZABO, L. J. & SHARON, A. Genetic Variation and Virulence on Lr26 in *Puccinia triticina*. *Phytopatology* 94:632-640. 2004.

LORENZI, H. 1949. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil/ Nova Odessa, SP: Editora Plantarum 1992.

LOUNDON, G. F. Terminology in the rust fungi. *Trans, Br. Mycol. Soc.* 50:189-194, 1967a.

- LOUNDON, G. F. The taxonomy of the imperfect rusts. Trans. Br. Mycol. Soc. 50:349-353, 1967b.
- LOUNDON, G. F. Delineation of aecial from uredinial states. Trans. Br. Mycol. Soc. 50:189-194, 1972.
- MACLEAN, D. J.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A.; MANNERS, J. M.; STAKMAN, E. C., AND PIEMEISEL F.,S. Biologic forms of *Puccinia graminis* on Cereals and Grasses. J. Agric. Res. 9:429-495.1917.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F. & CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. EMBRAPA, Brasília, 1998.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.3. 1989.
- SILVEIRA, V. D. Lições de micologia. Livraria José Olympio Editora, Rio de Janeiro, 1968.
- STAKMAN, E. C., STEWART, D. M., and LOEGERING,W. Q. Identification of Physiologic Races of *Puccinia graminis* var. *Tritici*. U. S, Agric. Res. Serv. E-617:1-53.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.3. 1989.
- WARD, E. W. B. & CIURIESK, K. W. Somatic mitosis in *Neurospora crassa*. Am. J. Bot. 49, 393-399.1962.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218. 1990.
- ZOLAN, M. E. and PUKKILA, P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Molecular and Cellular Biology 6(1), 195-200.