

# Produção de Soros Policlonais com Alta Afinidade contra o Biotipo ‘C’ e o Biotipo ‘S’ de *Crinipellis pernicioso*

Gildemberg A. Leal Júnior<sup>1\*</sup>, Keila M. R. Duarte<sup>2</sup>, Paulo S. B. Albuquerque<sup>3</sup>,  
Flávio C. A. Tavares<sup>2</sup> & Antonio Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Melhoramento de Plantas, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CEP 13400-970, Piracicaba, SP, email: galeal@cena.usp.br; <sup>2</sup>Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, <sup>3</sup>Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Cx. Postal 46, CEP 67105-970, Marituba, PA

(Aceito para publicação 07/07/2005)

Autor para correspondência: Gildemberg A. Leal Jr

LEAL JÚNIOR, G.A., DUARTE, K.M.R., ALBUQUERQUE, P.S.B., TAVARES, F.C.A. & FIGUEIRA, A. Produção de soros policlonais com alta afinidade contra o biotipo ‘C’ e o biotipo ‘S’ de *Crinipellis pernicioso*. Fitopatologia Brasileira 30:482-488. 2005.

## RESUMO

A obtenção de soros policlonais contra fitopatógenos tem por finalidade a elaboração de imunoenaios que permitam identificar e caracterizar os mesmos com rapidez e a custos baixos. Soros policlonais foram produzidos contra extratos das hifas de isolados de *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa, coletados de cacauero (*Theobroma cacao*) nos estados do Pará e Bahia para identificação e caracterização de isolados de diversas regiões e hospedeiros. O soro denominado de 1 foi produzido a partir do isolado ESJOH-1 (originário do Pará), e o soro 2 foi produzido com o isolado CP-85 (originário da Bahia). Não houve reação cruzada dos soros contra extratos protéicos das espécies *Alternaria solani*, *Marasmius* sp., *Oudemansiella canarii* e *Verticillium fungicola*. Os soros apresentaram reação cruzada de alta afinidade com extratos de *Moniliophthora roreri* e de baixa a média afinidade com *Marasmius cladophyllus*. A caracterização dos isolados foi feita com amostras do biotipo-C coletados no Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Rondônia e Pará. As reações sorológicas dos dois soros não permitiram diferenciar os isolados do Pará e da Bahia, contra os quais foram produzidos, e também não reagiram diferencialmente com isolados de outros estados. O reconhecimento dos antígenos entre os soros foi variável, pois o soro 1 e soro 2 apresentaram reação sorológica diferenciada para alguns isolados. Os soros produzidos apresentaram alta afinidade contra isolados dos biotipos-C e S, independente de sua origem geográfica, podendo ser usados para identificação.

**Palavras-chave adicionais:** ELISA, *Moniliophthora roreri*, variabilidade, vassoura-de-bruxa, cacauero, *Theobroma*.

## ABSTRACT

### Production of high affinity polyclonal sera against *Crinipellis pernicioso* biotypes ‘C’ and ‘S’

The production of polyclonal sera against plant pathogens allows the development of immunoassays to quickly identify and characterize the pathogens at low cost. Polyclonal sera were produced against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches’ broom disease of cacao (*Theobroma cacao*) using hyphae extracts from isolates collected in Pará and Bahia states, to identify and distinguish isolates from various regions and hosts. Serum 1 was produced from isolate ESJOH-1 (collected in Pará) and serum 2, from isolate CP-85 (from Bahia). There was no cross reaction between the two sera with mycelia extracts from *Alternaria solani*, *Marasmius* sp., *Oudemansiella canarii* and *Verticillium fungicola*. The sera presented high affinity cross reaction with *Moniliophthora roreri* and medium- to low cross-reaction against *Marasmius cladophyllus*. The sera were evaluated against isolates from biotype-C, collected in the states of Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Rondônia and Pará. The serological reaction of both sera did not allow to distinguish the isolates’ site of origin (Pará and Bahia), nor did they differentiate isolates of biotype C. The antigen binding sites were different for serum 1 and 2, because both exhibited different response to the same strains. However, these differences in affinity did not allow for differentiating the origin of collection, host or biotype, but allowed for the identification of *C. pernicioso* belonging to biotypes C and S.

**Additional keywords:** ELISA, *Moniliophthora roreri*, variability, witches’ broom disease, cacao, *Theobroma*.

## INTRODUÇÃO

A doença “vassoura-de-bruxa” do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, representa um grande problema fitossanitário da cultura nas Américas, com imenso

dano econômico. *Crinipellis pernicioso* estende sua gama de hospedeiros para outras espécies do gênero *Theobroma*, pelo menos *T. bicolor* Humb. & Bonpl., *T. grandiflorum* (Willd ex. Spreng) Shum, *T. microcarpum* Bern., *T. obovatum* Klotzsch ex Bernoulli, *T. subincanum* Mart., e *T. speciosum* (Willd ex. Spreng), *Herrania* [(*H. albiflora* Goudot, *H. nitida*

Poepp. e *H. purpurea* (Pittier) R. E. Schult e *Sterculia* (Evans, 1978)]. O fungo também infeta as espécies urucum (*Bixa orellana* L.), *Capsicum frutescens* L., pimentão (*C. annuum* L.), *Solanum rugosum* Rich. ex Poir., *S. lasiantherum* Heurck & Muell. Arg., *S. paniculatum* L., *S. lycocarpum* St. Hil., *S. gilo* Raddi, caiçara (*S. stipulatum* Willd. ex Roem & Schutt), beringela (*S. melongena* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Bastos & Evans, 1985; Bastos & Andebrahn, 1986; Silva et al., 1992; Resende et al., 1998). Há relatos sobre esse fungo colonizando lianas da família Malpighiaceae nas espécies *Heteropterys acutifolia* A. Juss. (Resende et al., 2000) e *Mascagania sepium* A. Juss. (Bastos et al., 1998).

A “vassoura-de-bruxa” é endêmica na região Amazônica, sendo um dos maiores entraves para o desenvolvimento do cultivo do cacau na América do Sul. A introdução da doença, ocorrida no sul da Bahia em 1989 causou sérios prejuízos à lavoura cacauera, que utilizava, principalmente, variedades altamente suscetíveis (Pereira et al., 1989).

A grande variabilidade de hospedeiros do *C. pernicioso* permite separar os isolados em grupos de acordo com o gênero que infetam, denominados biotipos (Griffith & Hedger, 1994). Desta forma, os isolados são caracterizados em três biotipos: o biotipo Cacau (biotipo-C), que tem como hospedeiro as espécies do gênero *Theobroma*, principalmente o *T. cacao*; o biotipo Solanacea (biotipo-S) agrupando isolados que infetam as espécies da família Solanaceae, e o biotipo Liana (biotipo-L) com isolados que são encontrados em lianas e cipós das famílias Malpighiaceae e Bignoneaceae. O biotipo *Bixa* é considerado o quarto biotipo e foi relatado por Bastos & Andebrahn (1986), mas não foi notificada a produção de basidiocarpos nos ramos infetados. Um quinto biotipo, o biotipo-H, foi sugerido por Griffith et al. (2003) reunindo isolados coletados de *Heteropterys acutifolia* A. Juss.

A análise de polimorfismo por restrição dos fragmentos amplificados das regiões codificadoras e espaçadores (ITS, *internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal e mitocondrial (Arruda et al., 2003b) não detectou diferenças entre isolados dos biotipos C e S. Entretanto, reações distintas de incompatibilidade somática entre os biotipos foram relatadas (Griffith et al., 2003). Estudos de diversidade genética baseados na análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Yamada et al., 1998) e regiões repetitivas de DNA (ERIC-PCR) (Arruda et al., 2003a), indicaram diferenças entre os biotipos-C e S, demonstrando maior polimorfismo no biotipo-C. Em geral, a patogenicidade cruzada entre os isolados dos biotipos não ocorre, mas há relatos de isolados do biotipo-S e biotipo-L induzindo sintomas em cacau (Silva et al., 1992; Resende et al., 2000; Lopes, 2001; Viana Junior, 2001), sugerindo que as divergências dos grupos por compatibilidade somática e marcadores moleculares não refletiriam a especificidade do fungo em infetar um hospedeiro. Andebrahn & Furtek (1994), baseados em análise de RAPD com isolados de diferentes localidades e hospedeiros, observaram maior similaridade entre isolados mais próximos geograficamente, mesmo de

diferentes hospedeiros, do que os coletados do mesmo tipo de hospedeiro de localidades distantes.

Entre os isolados do biotipo-C coletados da região amazônica, há predominância de duas populações diferenciadas pela patogenicidade ao Scavina 6 (Wheeler & Mepsted, 1988), e que são distintos somaticamente, apresentando subgrupos de incompatibilidade em cada população (McGeary & Wheeler, 1988). Os isolados de *C. pernicioso* da Bahia foram agrupados, por análise de RAPD, em duas populações que apresentaram características de patogenicidade e incompatibilidade somática semelhante à de duas populações da Amazônia brasileira, reforçando a idéia da possível introdução independente de isolados originados desta localidade (Andebrahn et al., 1999).

Métodos imunológicos, baseados em anticorpos específicos para antígenos correspondentes, têm sido aplicados para identificação e classificação de fungos e bactérias (Dewey et al., 1991). Entre as alternativas de anticorpos específicos, estão os soros policlonais (Kozlova et al., 2001). O objetivo desse trabalho foi produzir soros policlonais contra isolados do biotipo-C coletados de cacau da Bahia e Pará, utilizando extrato de hifas dicarióticas, seguido da utilização deste soro em teste ELISA para identificação e caracterização de isolados de *C. pernicioso* de diferentes localidades e hospedeiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados de *Crinipellis pernicioso* e outros fungos

Todos os isolados isolados neste estudo (Tabela 1) foram mantidos em meio batata-dextrose-agar 2% (BDA) à temperatura ambiente (28 °C). O micélio, crescido no meio líquido batata-dextrose, foi separado da fase líquida por filtração a vácuo, lavado três vezes com água destilada, armazenado a -70 °C e liofilizado. O extrato proteico liofilizado do isolado de *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par) Evans et al. foi cedido pelo Dr. Gareth Wyn Griffith, University of Wales, Reino Unido e mantido a -20 °C.

### Extração de proteínas solúveis e preparo do antígeno para imunização

As soluções de antígeno inoculadas nos animais foram preparadas com os isolados de cacau ESJOH-1 (Pará) e CP-85 (Bahia) obtidos na ESJOH-CEPLAC, Marituba, PA, e no CEPEC-CEPLAC, Itabuna, BA, respectivamente. Dois gramas de micélio foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspensos em 25 ml de tampão salino PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por litro, pH 7,4). O extrato foi posteriormente centrifugado por 2 min a 2.000 g e o sobrenadante, com antígenos solúveis em PBS, foi coletado e armazenado a -20 °C.

### Imunização e produção do soro policlonal

Cada solução de antígeno foi utilizada para imunizar três coelhas da raça Nova Zelândia de dois meses de idade, com injeções subcutâneas no dorso e nos membros inferiores.

TABELA 1 - Isolados de *Crinipellis pernicioso* e outras espécies de fungos utilizados

Espécie	Código	Hospedeiro	Localidade
<i>Crinipellis pernicioso</i>	ESJOH -1	<i>Theobroma cacao</i>	Marituba/PA
	ESJOH -2	<i>T. cacao</i>	Ouro Preto/RO
	ESJOH -3	<i>T. cacao</i>	Belém/PA
	ESJOH -4	<i>T. cacao</i>	Altamira/PA
	ESJOH -5	<i>T. cacao</i>	Medicilândia/PA
	ESJOH -6	<i>T. cacao</i>	Ariquemes/RO
	ESJOH -7	<i>T. cacao</i>	Manaus/AM
	ESJOH -8	<i>T. cacao</i>	Ji-Paraná/RO
	ESJOH -9	<i>T. cacao</i>	Alta Floresta/MT
	ESJOH -10	<i>T. subincanum</i>	Belém/PA
	ESJOH -11	<i>T. bicolor</i>	Belém/PA
	ESJOH -12	<i>T. grandiflorum</i>	Belém/PA
	CP-6	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-12	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-27	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-30	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-36	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-60	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-80	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-85	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-93	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-98	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-102	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-106	<i>T. cacao</i>	Bahia
	CP-21	<i>T. cacao</i>	Manaus/AM
	CP-22	<i>T. cacao</i>	Altamira/PA
	CP-23	<i>T. cacao</i>	Belém/PA
	CP-24	<i>T. cacao</i>	Tomé-Açu/PA
	CP-83	<i>Herrania</i>	Bahia
	CP-20	Solanaceae	Bahia
	CP-37	<i>Solanum paniculatum</i>	Bahia
	CP-104	<i>Capsicum frutescens</i>	Bahia
	CP-114	<i>S. paniculatum</i>	Bahia
CP-108	<i>Stigmaphyllon</i> sp.	Bahia	
<i>Oudemansiella canarii</i>	CCB 214	Desconhecido	
<i>O. Canarii</i>	CCB 179	Desconhecido	
<i>Marasmius cladophyllus</i>	CCB 378	Desconhecido	
<i>Marasmius</i> Sp.	CCB 361	Desconhecido	
<i>Alternaria solani</i>		Desconhecido	
<i>Verticillium fungicola</i>		Desconhecido	

A primeira imunização foi realizada no dorso e foi administrado o volume de 200 µl da mistura de solução de antígeno (100 µg.ml<sup>-1</sup>) com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na proporção de 1:1, e a cada 15 dias foram repetidas imunizações injetando, via subcutânea, 200 µl do extrato de antígeno em cada membro inferior. No total foram realizadas quatro imunizações e o sangue foi coletado antes de cada imunização e mantido a 37 °C por 1 h. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 2.000 g durante 2 min e o sobrenadante, contendo o soro bruto, foi purificado em coluna de sefarose-proteína A (Affi-gel protein A agarose, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), quantificado a 280 nm em espectrofotômetro e alíquotado.

#### Preparo do extrato de micélio para imunoenensaio

Para todos os isolados de fungos disponíveis, o preparo

dos extratos foi realizado de forma similar à dos extratos inoculados nos coelhos. Os extratos foram mantidos em alíquotas de 10 ml e armazenados a -20 °C.

#### Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) do tipo PTA (plate trapped antigen)

Placas de polivinil de fundo chato com 96 orifícios foram sensibilizadas com 100 µl do extrato do antígeno (100 µg.ml<sup>-1</sup>) por orifício e incubadas por 1 h a 37 °C. Após a sensibilização, os sítios ativos remanescentes de cada orifício foram inativados com 200 µl de tampão de bloqueio (PBS e 1% BSA, albumina sérica bovina) e a placa foi novamente incubada por 1 h a 37 °C. Para a próxima etapa do ELISA, o tampão foi descartado e em seguida foi adicionado 100 µl de anticorpo (1 µg.ml<sup>-1</sup>) contra *C. pernicioso*, adicionados às placas em três repetições e incubados por 1 h a 37 °C. Os

orifícios foram então lavados com 200 µl da solução contendo PBS, 0,5% Tween 20 e 0,25% Gelatina (PBS-T-G) por três vezes. A placa foi então seca e fez-se a incubação por 1 h a 37 °C com o conjugado anti-coelho (IgG) marcado com fosfatase alcalina. Após três lavagens com PBS-T-G conforme descrito anteriormente, a ação enzimática do conjugado foi ativada na presença do substrato 3 M P-nitrofenil fosfatase (ImunPure PNPP, Pierce, Rockford, IL, EUA) em solução tampão (10 mM de dietanolamina e 0,05 M de MgCl<sub>2</sub> em água). A leitura foi feita em leitor de microplacas modelo 550 (BioRad) a 405 nm após 1 h de reação. Os ensaios foram realizados separadamente para cada soro produzido. Os valores da absorbância obtidos para os isolados testados foram avaliados pelo programa estatístico SAS como experimento inteiramente casualizado, usando-se o teste Tukey para comparação de médias de três repetições. A afinidade do soro com os isolados foi analisada tendo como referência de alta afinidade a reação do soro com o isolado contra o qual foi produzido. Reações com outros isolados que representassem valores relativos de 40% e 70% do registrado para a referência foram consideradas como reações de média afinidade do soro, valores entre 20 e 40% fraca afinidade e inferiores que 20%, afinidade nula.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram produzidos dois soros policlonais utilizando hifas dicarióticas de dois isolados do fitopatógeno *C. pernicioso*, que foram empregados em imunoenaios do tipo ELISA para identificação e caracterização de isolados coletados de diferentes localidades e hospedeiros. Os soros policlonais produzidos reconheceram antígenos do extrato de *C. pernicioso* demonstrando que imunizações em coelhos com extratos de hifas dicarióticas de *C. pernicioso* foram suficientemente alergênicas para produção de soro. Os dois soros policlonais foram produzidos contra os isolados ESJOH-1, originário do Pará, denominado de soro 1, e o outro contra o isolado CP-85, coletado na Bahia, denominado soro 2. Os dois soros também apresentaram reação positiva contra basidiósporos do fungo em ensaio ELISA, demonstrando a existência de antígenos comuns entre hifas dicarióticas e esporos meióticos (dados não mostrados).

As absorbâncias dos dois soros contra os próprios isolados com os quais foram produzidos serviram como referência para os ensaios ELISA. O soro 1 foi mais imunoreativo que o soro 2 contra os isolados ESJOH-1 e CP-85, sendo os valores de absorbância para o soro 1 superiores aos valores obtidos com o soro 2 (Tabela 2). No ensaio de ELISA utilizando os extratos de espécies saprófitas [*Marasmius* sp., *M. cladophyllus* Berk. e *Oudemansiella canarii* (Jungh.) v. Höhnel], os soros 1 e 2 não apresentaram reação cruzada contra as espécies *O. canarii* e *Marasmius* sp., pois os valores de absorbância não diferiram estatisticamente da leitura obtida com o branco (tampão PBS) (Tabela 2). A reação do soro 1 com *M. cladophyllus* foi considerada de fraca afinidade pois equivale a 17% da reação

do soro 1 contra o isolado ESJOH-1 e o soro 2 apresentou uma afinidade mediana com *M. cladophyllus*, o valor de absorbância equivale a 45% da obtida com CP-85. Os soros produzidos apresentaram diferentes reações contra os extratos dos isolados ESJOH-1 e CP-85 e distinguem a espécie *C. pernicioso* das espécies dos gêneros *Marasmius* e *Oudemansiella* ambas da família Tricholomataceae, a mesma família de *C. pernicioso*.

Soros policlonais produzidos especificamente contra patógenos também tem mostrado reações cruzadas com outros fungos que apresentam hospedeiros em comum (Holtz *et al.*, 1994). Nos ensaios de ELISA para avaliação da especificidade, a reação cruzada dos soros foi observada com uma espécie de fungo patogênica ao cacau, *M. roreri*. Os isolados de *Alternaria solani* e *Verticillium fungicola* foram utilizados como controles negativos e os isolados de CP-85 e ESJOH-1 de cacau como controles positivos do ensaio. As reações dos soros contra as espécies *A. solani* e *V. fungicola* foram negativas, não diferenciando estatisticamente dos valores de absorbância obtidos com os isolados de *O. canarii* e *Marasmius* sp. (Tabela 2). Entretanto, contra a espécie *M. roreri*, os soros apresentaram alta afinidade, com valor de absorbância maior do que a obtida para a espécie *M. cladophyllus* e similar a registrada para *C. pernicioso*. O valor de absorbância obtido com soro 1 contra *M. roreri* representava 90,7% da leitura do isolado ESJOH-1 e a do soro 2 representava 75% da leitura registrada com o isolado CP-85. A forte afinidade dos soros com *C. pernicioso* e *M. roreri* provavelmente está associada a uma suposta estreita relação filogenética entre os gêneros. Evans *et al.* (2002; 2003) e Griffith *et al.* (2003) discutiram a classificação de *M. roreri*, baseado no estudo do ciclo biológico e da filogenia com seqüências de ITS, propondo a reclassificação do fungo *M. roreri* para *Crinipellis roreri* (Cif.) HC Evans. Os estudos do ciclo biológico indicam que a espécie *M. roreri* é um basidiomiceto e os estudos de filogenia demonstram alta

**TABELA 2** - Valores de absorbância do ensaio de ELISA referente ao teste de reação cruzada dos soros policlonais 1 e 2 produzidos contra *Crinipellis pernicioso* e outras espécies de fungo

Espécie de fungo	Soro 1 <sup>(*)</sup>	Soro 2 <sup>(*)</sup>
<i>Crinipellis pernicioso</i> (CP-85)	2,008 <sup>a (**)</sup>	1,077 <sup>a (**)</sup>
<i>C. pernicioso</i> (ESJOH-1)	1,880 <sup>b</sup>	1,551 <sup>b</sup>
<i>Monilophthora roreri</i>	1,705 <sup>c</sup>	0,815 <sup>c</sup>
<i>Marasmius cladophyllus</i> (CCB 378)	0,330 <sup>d</sup>	0,489 <sup>d</sup>
<i>Marasmius</i> sp. (CCB 361)	0,136 <sup>e</sup>	0,150 <sup>e</sup>
<i>Alternaria solani</i>	0,092 <sup>e</sup>	0,082 <sup>e</sup>
<i>Oudemansiella canarii</i> (CCB 179)	0,091 <sup>e</sup>	0,059 <sup>e</sup>
<i>O. canarii</i> (CCB 214)	0,079 <sup>e</sup>	0,073 <sup>e</sup>
<i>Verticillium fungicola</i>	0,085 <sup>e</sup>	0,074 <sup>e</sup>
Branco (PBS)	0,069 <sup>e</sup>	0,058 <sup>e</sup>

(\*) Valores representam a média de três repetições;

(\*\*) Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey (p > 0,001).

similaridade entre as seqüências de ITS das duas espécies (Evans *et al.*, 2003). Reações cruzadas com alta afinidade de soros policlonais entre espécies do mesmo gênero são frequentes (Delfosse *et al.*, 2000) e neste estudo, indicam que o soro não é específico para a espécie *C. pernicioso*. A alta afinidade também pode ser atribuída ao fato de ambos compartilharem antígenos constitutivos em comum relacionados à interação patógeno-hospedeiro. Esta suposição é fundamentada nas seguintes características similares apresentadas pelos dois patógenos: especificidade ao cacau, ocorrência de uma fase biotrófica e indução de sintomas de hiperplasia no hospedeiro (Evans, 1981).

Nos ensaios de ELISA, conduzidos para a caracterização dos isolados de diversas localidades foram incluídos isolados do biotipo-C originários de cacau. Os isolados foram coletados das duas principais regiões produtoras de cacau do Brasil, tendo sido 12 coletados nos estados da região Norte e 12 de diferentes localidades do sul da Bahia, com exceção de um isolado originário da região Centro-Oeste (Tabela 3). Com o soro 1, os valores de absorvância obtidos para os isolados da região Norte não diferiram estatisticamente entre si, não sendo possível separar pela afinidade do soro os isolados de Rondônia, Pará e Amazonas. Também não houve diferença entre os valores obtidos dos isolados da região Norte e dos isolados da Bahia; e destes com o isolado do Mato Grosso (Tabela 3). O soro 1 produzido contra o isolado do Pará, no ensaio de ELISA, apresentou uniformidade nos valores de absorvância e o soro 2, produzido contra o isolado da Bahia, também apresentou valores de absorvância uniforme, não sendo específico aos isolados da Bahia. Neste ensaio, foi verificado que o soro 2 tem menor poder discriminatório, pois apenas diferenciou estatisticamente um isolado, enquanto o soro 1 distinguiu quatro isolados no mesmo grupo. Os valores de absorvância do soro 2 quando comparados com o soro 1 também foram inferiores confirmando que o soro 2 é menos reativo que o soro 1 (Tabela 3). Os resultados indicaram que quatro isolados (CP-21, CP-22, CP-27 e CP-80) apresentam antígenos reconhecidos pelos soros em quantidade reduzidas, que possibilitaram valores de absorvância diferenciados da maioria dos isolados. Esta variabilidade está presente nos isolados de ambas as regiões, estando entre os isolados de baixa afinidade espécimes coletados no Amazonas, Bahia e Pará.

A caracterização sorológica dos isolados também foi realizada com isolados do biotipo-C coletados de *Herrania* sp., *T. bicolor*, cacau, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*; isolados do biotipo-S coletados de *C. frutescens*, *S. paniculatum* e de uma espécie não identificada da família Solanaceae. Um único isolado coletado de *Stigmaphyllon* sp. representa o biotipo-L (Tabela 3). Os dois soros não apresentaram afinidade com o biotipo-L (CP-108), sendo que o valor de absorvância foi similar aos registrados para as espécies *O. canarii*, *Marasmius* sp., *A. solani* e *V. fungicola*, contra os quais os soros não apresentaram reação cruzada (Tabela 2). O isolado CP-108 pode ser um isolado identificado erroneamente como *C. pernicioso* devido à falta de afinidade

dos soros com este isolado. Nos ensaios de ELISA empregando o soro 1, os isolados do biotipo-S apresentaram valores que diferenciavam estatisticamente, distinguindo isolados coletados da mesma espécie de hospedeiros, CP-37 e CP-104 (Tabela 3). Com os isolados do biotipo-C, o soro 1 não apresentou diferença na afinidade para os isolados coletados de diferentes espécies de *Theobroma* e *Herrania*. Na avaliação utilizando o soro 2 apenas o isolado do biotipo-S (CP-20) apresentou valor de absorvância significativamente diferente dos demais. Para os outros três isolados, os valores de absorvância não diferenciaram estatisticamente dos isolados do biotipo-C. Da mesma forma, não houve distinção para afinidade entre os isolados coletados das espécies de *Theobroma* e entre as espécies de *Theobroma* e *Herrania*. Entre os isolados do biotipo-S foi verificada uma variabilidade na constituição de antígenos reconhecidos pelo soro 1, que também foi detectada entre os isolados do biotipo-C coletados de cacau. Esta variabilidade não é característica de um único biotipo, está presente entre os isolados coletados da mesma espécie de hospedeiro, sendo constatada nos isolados coletados de *S. paniculatum* e cacau. Para os demais hospedeiros, não foi possível verificar esta variabilidade por haver apenas um único isolado por hospedeiro.

Arruda *et al.* (2003b) diferenciaram por análise de IGS (intergenic spacer region) os isolados do biotipo-L, S e C em grupos filogeneticamente distintos. Marcadores moleculares de regiões não codantes, do tipo RAPD e ERIC, também possibilitaram a distinção dos biotipos-S e C (Yamada *et al.*, 1998; Arruda *et al.*, 2003a), mas os soros não detectam esta distinção entre estes biotipos. A ausência de discriminação dos biotipos pelos soros se deve a diferenças constatadas por marcadores moleculares não refletirem a composição de antígenos, e que os soros policlonais produzidos contra extratos de proteínas totais de hifas abordam um amplo espectro de antígenos. Anticorpos monoclonais seriam uma abordagem alternativa de imunoensaio com maior especificidade.

Os dois soros não diferenciaram isolados do biotipo-C das regiões norte e da Bahia, possivelmente ocasionado pela estreita similaridade genética entre os dois isolados. A introdução do patógeno na Bahia aconteceu por meio de dois materiais, provavelmente originado de duas localidades da Amazônia brasileira, identificados por análise de RAPD (Andebrahn *et al.*, 1999), e corroborado por análise cariotípica por eletroforese em campo pulsado (Rincones *et al.*, 2003). A introdução de grupos distintos e o isolamento geográfico destes materiais da região de origem não possibilitou, até o momento, a geração de isolados geográficos e a ocasional variação no padrão de antígenos produzidos. Arruda *et al.* (2003a; 2003b), utilizando marcadores moleculares do tipo IGS e ERIC-PCR, confirmaram a similaridade dos materiais das duas regiões e os agrupamentos formados com os isolados da Bahia não foram bem definidos e homogêneos. Os soros produzidos contra isolados das duas localidades demonstram que o padrão dos antígenos reconhecidos por ambos não difere os isolados dentro e nem

**TABELA 3** - Valores de absorvância (D.O) referente ao ensaio de ELISA para verificar a reatividade dos soros policlonais 1 e 2 contra isolados de *Crinipellis pernicioso* coletados de *Theobroma cacao* de diferentes localidades, e outras espécies de hospedeiros

Código	Hospedeiro	Biotipo	Localidade	Soro 1		Soro 2	
				D.O <sup>(*)</sup>	Afinidade <sup>(**)</sup>	D.O <sup>(*)</sup>	Afinidade <sup>(**)</sup>
CP-12	<i>Theobroma cacao</i>	Cacau	Bahia	2,082 <sup>a (***)</sup>	+++	1,369 <sup>a (***)</sup>	+++
CP-60		Cacau	Bahia	2,068 <sup>a</sup>	+++	1,353 <sup>a</sup>	+++
CP-24		Cacau	Pará	2,067 <sup>a</sup>	+++	1,117 <sup>a</sup>	+++
CP-23		Cacau	Pará	2,057 <sup>a</sup>	+++	1,298 <sup>a</sup>	+++
CP-98		Cacau	Bahia	2,052 <sup>a</sup>	+++	1,464 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-3		Cacau	Pará	2,045 <sup>a</sup>	+++	1,346 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-2		Cacau	Rondônia	2,040 <sup>a</sup>	+++	1,304 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-4		Cacau	Par	2,039 <sup>a</sup>	+++	1,363 <sup>a</sup>	+++
CP-30		Cacau	Bahia	2,037 <sup>a</sup>	+++	1,321 <sup>a</sup>	+++
CP-36		Cacau	Bahia	2,031 <sup>a</sup>	+++	1,520 <sup>a</sup>	+++
CP-93		Cacau	Bahia	2,019 <sup>a</sup>	+++	1,442 <sup>a</sup>	+++
CP-106		Cacau	Bahia	2,008 <sup>a</sup>	+++	1,146 <sup>a</sup>	+++
CP-85		Cacau	Bahia	2,008 <sup>a</sup>	+++	1,077 <sup>a</sup>	+++
CP-102		Cacau	Bahia	2,004 <sup>a</sup>	+++	1,123 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-5		Cacau	Pará	2,002 <sup>a</sup>	+++	1,451 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-6		Cacau	Pará	1,994 <sup>a</sup>	+++	1,365 <sup>a</sup>	+++
CP-6		Cacau	Bahia	1,983 <sup>a</sup>	+++	0,920 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-7		Cacau	Amazonas	1,973 <sup>a</sup>	+++	1,323 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-8		Cacau	Rondônia	1,962 <sup>a</sup>	+++	1,378 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-9		Cacau	Mato Grosso	1,899 <sup>a</sup>	+++	1,369 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-1		Cacau	Pará	1,880 <sup>a</sup>	+++	1,551 <sup>a</sup>	+++
CP-27		Cacau	Bahia	1,696 <sup>b</sup>	+++	1,364 <sup>a</sup>	+++
CP-21		Cacau	Amazonas	1,006 <sup>c</sup>	++	0,726 <sup>a</sup>	+++
CP-80		Cacau	Bahia	0,861 <sup>d</sup>	++	1,384 <sup>a</sup>	+++
CP-22	<i>T. cacao</i>	Cacau	Pará	0,650 <sup>e</sup>	+	0,457 <sup>b</sup>	+
CP-104	<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae		2,039 <sup>a</sup>	+++	1,532 <sup>a</sup>	+++
CP-83	<i>Herrania</i>	Cacau		2,035 <sup>a</sup>	+++	1,617 <sup>a</sup>	+++
CP-85	<i>T. cacao</i>	Cacau		2,008 <sup>a</sup>	+++	1,007 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-10	<i>T. subincanum</i>	Cacau		1,986 <sup>a</sup>	+++	1,320 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-12	<i>T. grandiflorum</i>	Cacau		1,917 <sup>a</sup>	+++	1,243 <sup>a</sup>	+++
CP-37	<i>Solanum paniculatum</i>	Solanaceae		1,987 <sup>a</sup>	+++	1,297 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-11	<i>T. bicolor</i>	Cacau		1,898 <sup>a</sup>	+++	1,364 <sup>a</sup>	+++
ESJOH-1	<i>T. cacao</i>	Cacau		1,880 <sup>a</sup>	+++	1,551 <sup>a</sup>	+++
CP-20	Solanaceae	Solanaceae		1,298 <sup>b</sup>	++	0,887 <sup>b</sup>	++
CP-114	<i>S. paniculatum</i>	Solanaceae		0,490 <sup>c</sup>	+	1,492 <sup>a</sup>	+++
CP-108	<i>Stigmaphyllon</i> sp.	Liana		0,067 <sup>d</sup>	0	0,080 <sup>c</sup>	0
Branco (PBS)				0,065 <sup>e</sup>	0	0,075 <sup>c</sup>	0

(\*) Valores representam a média de três repetições;

(\*\*)+++ indica alta, ++ média e + fraca afinidade dos soros com os extratos dos isolados;

(\*\*\*) Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey (p > 0,001).

entre as regiões, devido a grande similaridade genética, evidenciada por estudos com marcadores moleculares.

Este trabalho relata a obtenção de dois soros produzidos contra *C. pernicioso* e que também reconhecem antígenos presentes na espécie *M. roreri* (*C. roreri*) (Evans, 2002; Griffith *et al.*, 2003). Os soros apresentam alta afinidade contra isolados do biotipo-S e contra os isolados do biotipo-C coletados em diversas localidades. Com estes soros, não foi possível a distinção sorológicas entre biotipos-S e C e a diferenciação de isolados de origem geográficas distintas. A produção de anticorpos policlonais de amplo espectro que reconhecem *C. pernicioso*, viabiliza o uso de imunoenaios do tipo ELISA para quantificação de micélio em tecidos doentes ou a aplicação da técnica de imunolo-

calização no estudo histológicos de tecidos infetados. Os soros por reagirem com basidiósporos podem ser utilizados, conjuntamente com anticorpos secundários marcados com fluoresceína, na identificação e contagem de esporos coletados em armadilhas caça-esporos ou realizando o ensaio ELISA com a suspensão de esporos recuperada das armadilhas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERBRAHN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M.M, CASCARDO, J. & FURTEK. D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreak's of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. European Journal of Plant Pathology 105:167-175. 1999.

- ANDERBRAHN, T. & FURTEK, D.B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. *Plant Pathology* 43:1020-1027. 1994.
- ARRUDA, M.C.C., MILLER, R.N.G., FERREIRA, M.A.S.V. & FELIPE, M.S.S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology* 52:236-244. 2003a.
- ARRUDA, M.C.C. de, FERREIRA, M.A.S.V., MILLER, R.N.G., RESENDE M.L.V. & FELIPE M.S.S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. *Mycological Research* 107:25-37. 2003b.
- BASTOS, C.N. & ANDERBRAHN, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie da Vassoura-de-Bruca (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. *Fitopatologia Brasileira* 13:963-965. 1986.
- BASTOS, C.N. & EVANS, H.C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology* 34:306-312. 1985.
- BASTOS, C. N., FONSECA, S.E.A. & MELO, W.F. *Mascagnia cf. sepium*, native liana of the Brazilian Amazon, as host of *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 23:504. 1998 (Resumo).
- DELFOSSÉ, P., REDDY, A.S., LEGERVE, A., DEVI, K.T., ABDURAHMAN, M.D., MARAITE, H. & REDDY, D.V.R. Serological methods for detection of *Polymyxa graminis*, an obligate root parasite and vector of plant viruses. *Phytopathology* 90:537-545. 2000.
- DEWEY, M., EVANS, D., COLEMAN, J., PRIESTLEY, R., HULL, R., HORSLEY, D. & HAWES, C. Antibodies in plant science. *Acta Botany Neerlandica* 40:1-27. 1991.
- EVANS, H.C. Witches' Broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador: 1. The fungus. *Annals of Applied Biology* 89:185-192. 1978.
- EVANS, H.C. Pod rot of cocoa caused by *Moniliophthora (Monilia) rozeri*. *Phytopathological Papers* 24:1-44. 1981.
- EVANS, H. C., HOLMES, K.A. & REID, A.P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology* 52:476-485. 2003.
- EVANS, H.C, HOLMES, K.A., PHILLIPS, W. & WILKINSON, M.J. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa?. *Mycologist* 16:1-4. 2002.
- GRIFFITH, G.W. & HEDGER, J.N. The breeding biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72:278-289. 1994.
- GRIFFITH, G.W., NICHOLSON, J., NENNINGER, A., BIRCH, R.N. & HEDGER, J.N. Witches' broom and frosty pods in cacao. *New Zealand Journal of Botany* 41:423-435. 2003.
- HOLTZ, B.A., KARU, A.E. & WEINHOLD, A.R. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 84:977-983. 1994.
- KOZLOVA, N.V., STRUNNIKOVA, O.K., LABUTOVA, N.M. & MUTOMTSEV, G.S. Production and specificity of polyclonal antibodies against soluble proteins from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 10:301-305. 2001.
- LOPES, J.R.M., LUZ, E.D.M.N. & BEZERRA, J.L. Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis pernicioso* obtidos de quatro hospedeiros diferentes do sul da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 26:601-605. 2001.
- McGEARY, F.M. & WHEELER, B.E.J. Growth rates of, and mycelial interaction between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. *Plant Pathology* 37:489-498. 1988.
- RESENDE, M.L.V., REZENDE, D.V. & BEZERRA, J.L. Variabilidade de *Crinipellis* sp. em diferentes hospedeiros no sul de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 23:275. 1998 (Resumo).
- RESENDE, M.L.V., NOJOSA, G.B.A., SILVA, L.H.C.P., NIELLA, G.R., CARVALHO, G.A., SANTIAGO, D.V.R. & BEZERRA, J.L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, e patogênico ao cacauzeiro. *Fitopatologia Brasileira*. 25:88-91. 2000.
- RINCONES, J., MEINHARDT, L.W., VIDAL, B.C. & PEREIRA, G.A.G. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research* 107:452-458. 2003.
- SILVA, S.D.V.M., GRAMACHO, K.P. & ALMEIDA, O.C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia. *Agrotropica* 4:17-20. 1992.
- VIANA JUNIOR, C.A.C. Compatibilidade somática e patogenicidade de *Crinipellis* sp. (Tese de Mestrado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2001.
- YAMADA, M.M., ANDERBRAHN, T. & FURTEK, D.B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. *Agrotropica* 10:123-126. 1998.
- WHEELER, B.E.J. & MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology* 37:475-488. 1988.