

Características fisiológicas e isoenzimáticas de *Phomopsis anacardii* e *Phomopsis mangiferae*

Luciana Mélo Sartori GURGEL¹; Maria MENEZES²; Rildo Sartori Barbosa COELHO³

RESUMO: O gênero *Phomopsis* envolve um grande número de espécies fitopatogênicas em culturas de importância econômica, como o cajueiro e a mangueira. Com o objetivo de comparar isolados de *P. anacardii* e *P. mangiferae*, foram realizados estudos fisiológicos e isoenzimáticos. Na análise fisiológica dos isolados, foram utilizados seis meios de cultura (Aveia, BDA, Czapek-levedura, Levedura, V8 e Czapek), sob o regime de alternância luminosa, à temperatura de 25°C, por um período de 15 dias; e em regime de luz contínua com ultravioleta em alternância luminosa, à temperatura de 25°C, por um período de 30 dias. O meio BDA promoveu um maior crescimento micelial em todos os isolados, nos dois períodos de incubação. Os isolados de *Phomopsis* apresentaram diferenças na coloração das colônias em função do substrato utilizado. No período de incubação de 30 dias foi constatada a formação de setos em alguns meios. A maior produção de picnídios e esporulação foi observada no meio BDA para *P. anacardii*, e no meio V8 para *P. mangiferae*, aos 15 dias de incubação, enquanto que no período de 30 dias de incubação, destacaram-se os meios de V8 e Czapek-levedura para *P. anacardii* e os meios BDA e Czapek para *P. mangiferae*. Nas análises eletroforéticas, *P. mangiferae* apresentou uma maior atividade esterásica e protéica em relação a *P. anacardii*, demonstrando haver variações fenotípicas e genotípicas entre os isolados.

Palavras chave: *Phomopsis anacardii*, *P. mangiferae*, luminosidade, meios de cultura, crescimento micelial, esporulação.

INTRODUÇÃO

O cajueiro e a mangueira são culturas frutíferas afetadas por diversas doenças de importância econômica e, em anos recentes, a ocorrência de lesões foliares, causadas por *P. anacardii* Early & Punithalingam (cajueiro) e *P. mangiferae* Ahmad (mangueira), tem sido bastante comuns em alguns Estados do Nordeste, Ceará, Paraíba e Pernambuco (Menezes et al., 1995).

Em cajueiro os sintomas caracterizam-se pela presença de pequenas lesões foliares circulares, de coloração parda escura, com halo amarelo, com aproximadamente 3mm de diâmetro. A inflorescência também pode ser afetada (Menezes et al., 1995). Nos frutos de mangueira, o fungo produz lesões pretas circumpeduncular, desenvolvendo-se lentamente e penetrando profundamente na polpa, com a produção de picnídios na superfície do fruto (Ploetz, 1994). Farr et al. (1989) relataram a ocorrência de *P. mangiferae* em mangueira causando "dieback".

O gênero *Phomopsis*, pertencente a subclasse *Coelomycetidae*, família *Sphaeropsidaceae*, envolve um grande número de espécies fitopatogênicas em culturas de importância econômica. O fungo caracteriza-se por apresentar dois tipos de conídios, alfa e beta (Hahn, 1930). Foi devido a esta característica que em 1905, Saccardo classificou os isolados fúngicos, antes identificados em *Phoma*, em um novo gênero, *Phomopsis* (Uecker, 1988).

De acordo com Cochrane (1958), o crescimento fúngico é influenciado por fatores genéticos, nutricionais e ambientais. Geralmente um substrato considerado bom para o crescimento não atende igualmente o processo de reprodução do fungo.

A dificuldade na identificação de espécies do gênero *Phomopsis* é devido ao uso de apenas técnicas tradicionais que se baseiam nos aspectos morfológicos do picnídio e conídio e nos caracteres culturais. Recentemente vem se utilizando sistemas de padrões enzimáticos que facilitam a diferenciação e agrupamento do gênero *Phomopsis* (Corrêa, 1995).

Este trabalho teve por objetivo comparar isolados de *P. anacardii* e *P. mangiferae* através de caracteres fisiológicos e isoenzimáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados de *Phomopsis*: Os isolados utilizados neste estudo, foram obtidos de folhas de cajueiro e mangueira com sintomas típicos da doença, oriundos de Fortaleza-CE (*P. anacardii*) e de Recife-PE (*P. mangiferae*).

Crescimento micelial e características culturais: Os meios utilizados como substratos para o crescimento dos isolados foram: Aveia (20g de farinha de aveia, 20g de dextrose e 17g de ágar); BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 17g de ágar); Czapek (0.01g de FeSO₄.7H₂O, 30g de sacarose, 3g de NaNO₃, 1g de K₂HPO₄, 0.5g de MgSO₄.7H₂O, 0.5g de KCl e 17g de ágar); Czapek-Levedura (3g de extrato de levedura, 0.01g de FeSO₄.7H₂O, 30g de sacarose, 3g de NaNO₃, 1g de K₂HPO₄, 0.5g de MgSO₄.7H₂O, 0.5g de KCl e 17g de ágar); extrato de levedura (5g de peptona, 20g de glicerina, 3g de extrato de levedura e 17g de ágar); e V8 (100mL de suco de V8, 2g de CaCO₃ e 17g de ágar); todas as formulações em quantidade suficiente para 1000mL de meio.

De uma cultura pura do isolado, em desenvolvimento em meio BDA, sob o regime de luz contínua, à 25°C, com cinco dias de idade,

¹ Bolsista CNPq

² Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE

³ Pesquisador IPA - PE

retiraram-se discos de micélio e meio de cultura com 5mm de diâmetro, das extremidades da colônia de cada isolado. Os discos foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo 20mL dos diferentes meios de cultura. A incubação foi realizada sob o regime de alternância luminosa, à temperatura de 25°C, por um período de 15 dias; e em regime de luz contínua com ultravioleta em alternância luminosa, à temperatura de 25°C, por um período de 30 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com doze tratamentos, representados pelos dois isolados de *Phomopsis* e seis meios de cultura, com três repetições cada.

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, a cada 24 horas, obtendo-se uma média para cada repetição. Para as medições foi empregado uma régua milimetrada, onde a última medição foi finalizada aos 7 dias para *P. anacardii* e aos 12 dias para *P. mangiferae*.

As avaliações foram encerradas, quando o crescimento micelial de uma das repetições do tratamento, atingiu por completo o diâmetro da placa de Petri.

Os dados diários obtidos na avaliação do crescimento, foram usadas para a determinação da curva de crescimento de cada isolado, nos diferentes meios de cultura. A taxa de crescimento foi avaliada entre as leituras de 24 e 48 horas, de acordo com Lilly & Barnett (1951): $TC = C48 - C24 / T_2 - T_1$, onde: TC = Taxa de crescimento; C24 = Crescimento do isolado em 24 horas; C48 = Crescimento do isolado em 48 horas; T = Intervalo de tempo das leituras.

As características culturais foram avaliadas considerando a forma e a cor das colônias, crescimento do micélio e formação de setores.

Produção de picnídios: A avaliação da produção de picnídios foi feita aos 14 dias de incubação, através da contagem dos picnídios em cinco campos diferentes em cada colônia, visualizados por uma lupa estereoscópica, obtendo-se uma média de picnídios dentro de cada meio.

Nesta etapa do experimento foi observada a fertilidade dos picnídios e a formação de conídios alfa e beta, produzidos pelos isolados nos diferentes meios.

Esporulação: Para determinação da esporulação, foi feito o preparo da suspensão de conídios, que consistiu na adição de 20mL de água destilada esterilizada + tween em placa de Petri, com a remoção da superfície da colônia,

através do auxílio de uma escova de cerdas macias. O material removido foi levado ao agitador magnético por um minuto, para que os picnídios removidos fossem macerados. Em seguida, a suspensão obtida foi filtrada em duas camadas de gaze e a concentração de conídios determinada em câmara de Neubauer. Esta metodologia foi utilizada para avaliação da esporulação aos 15 dias de incubação dos isolados, nos diferentes meios de cultura. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Análise Eletroforética: Foram transferidos discos de micélio (5mm de diâmetro), retirados das extremidades de colônias jovens desenvolvidas em BDA, para Erlenmeyers de 125mL, contendo 50mL de BD (200g de batata, 20g de dextrose e água destilada para 1000mL de meio). Com oito dias de incubação, sob regime de luz contínua, as amostras foram preparadas para obtenção do extrato. A massa micelial foi filtrada, lavada com água destilada esterilizada e colocada para secar a temperatura ambiente. Após a secagem procedeu-se a pesagem de 2g do micélio, e a sua maceração através de um almofariz, mantido em banho de gelo, adicionando 2,5mL de solução tampão tris-glicina (0.125M, pH 8,2), 300mg de sacarose e 300mg de polivinilpirrolidona. Após a maceração do micélio, o material foi deixado em repouso a 4°C, durante quatro horas, para completa extração enzimática. Ao final deste período as amostras foram filtradas e mantidas à temperatura de 0°C até a sua utilização (Alfenas *et al.*, 1998). As corridas eletroforéticas foram conduzidas em gel de poliacrilamida (5%), a uma temperatura de 4°C, mantendo a corrente em 110v entre 5-12mA, durante 4 horas (Alfenas & Brune, 1998). Foi utilizado como marcador, o corante azul de bromofenol. Ao final do período, procedeu-se a coloração do gel para detecção de esterase e proteínas totais, seguindo a metodologia descrita por Brune *et al.* (1998). Os géis foram preservados em papel celofane, e sua secagem ocorreu à temperatura ambiente, em um período de dois dias (Alfenas & Brune, 1998).

Para interpretação dos zimogramas, tomou-se como base o número e posição das bandas formadas e a intensidade da coloração, para auxiliar a diferenciação enzimática dos isolados. Os valores da mobilidade relativa (Rf) foram calculados pela fórmula: $Rf = d/D \times 100$, onde d é a distância percorrida pela molécula, e D é a distância percorrida pela linha frontal (marcada por azul de bromofenol) (Brune & Alfenas, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento micelial e características culturais: Os resultados, obtidos aos 15 e 30 dias de incubação, revelam uma variação no crescimento micelial dos isolados de *Phomopsis*, em função do substrato utilizado. Ficou demonstrado que os meios de BDA e Czapek-levedura destacaram-se como os meios de cultura mais utilizados pelos isolados, não diferindo estatisticamente entre si, mas diferindo dos demais meios. O meio de Czapek foi o menos satisfatório ao desenvolvimento do fungo (Figura 1 e 2).

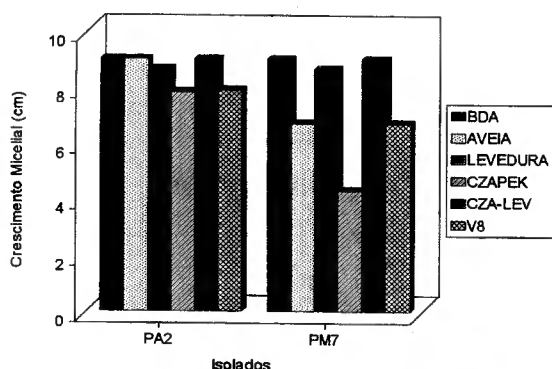


Figura 1- Crescimento micelial de *Phomopsis anacardii* e de *Phomopsis mangiferae* em diferentes substratos aos 6 dias de incubação (PA2= *P. anacardii* e PM7= *P. mangiferae*).

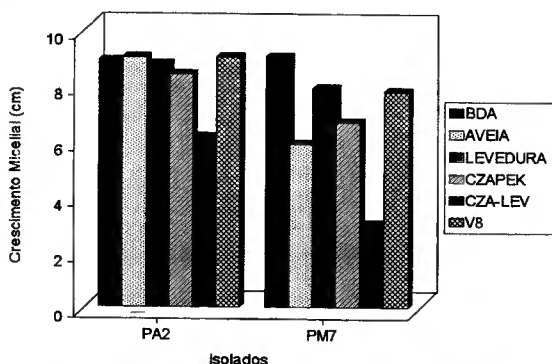


Figura 2 - Crescimento micelial de *Phomopsis anacardii* e de *Phomopsis mangiferae*, aos 5 e 3 dias de incubação, respectivamente, nos diferentes substratos (PA2= *P. anacardii* e PM7= *P. mangiferae*).

A taxa média de crescimento nos diferentes meios de cultura demonstram uma maior velocidade de crescimento micelial para *P. mangiferae*, nos meios de BDA e Czapek-levedura, aos 15 dias de incubação, e no meio BDA aos 30 dias de incubação. O crescimento mais lento foi observado no mesmo isolado, no meio Czapek, aos 15 e 30 dias de incubação (Tabela 1). Fuentes *et al.* (1995) obteve o mesmo resultado, com relação ao meio Czapek, trabalhando com espécies de *Cylindrocladium*.

Tabela 1 – Taxa média de crescimento micelial (mm) dos isolados de *Phomopsis*, em diferentes substratos, aos 15 e 30 dias de incubação

Meios de Cultura	Isolados			
	15 dias		30 dias	
	PA	PM	PA	PM
BDA	0,11 a	0,15 a	0,09 a	0,13 a
Aveia	0,09 b	0,08 c	0,09 a	0,09 b
Levedura	0,08 bc	0,10 b	0,06 b	0,09 b
Czapek	0,07 bc	0,04 d	0,04 c	0,03 c
Cza-Lev	0,12 a	0,15 a	0,07 b	0,11 ab
V8	0,07 c	0,08 c	0,09 a	0,11 ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Médias de três repetições.

A análise estatística revelou diferenças significativas da taxa média de crescimento com o meio de cultura utilizado.

Os isolados de *Phomopsis* apresentaram diferenças na coloração das colônias em função do substrato utilizado. Inicialmente o crescimento micelial foi de coloração branca, onde com o período de incubação de 30 dias, foi constatado a mudança de cor da colônia, com a formação de setores em alguns meios (Tabela 2 e 3). Os picnídios encontravam-se distribuídos aleatoriamente, em grupo ou isolados, na superfície da colônia ou imersos no substrato. No meio de aveia foi verificado a presença de cirros envolvidos em uma mucilagem de cor amarelada.

Tabela 2 – Características culturais de isolados de *Phomopsis* em diferentes meios de cultura aos 15 dias de incubação, sob regime de alternância luminosa

Meios	Características culturais	
	PA	PM
BDA	Micélio branco. Centro da colônia de cor cinza escuro; com bordas cinza claro. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.	Micélio branco. Centro da colônia de cor cinza-castanho; com bordas cinza claro. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.
Aveia	Micélio creme com zonas de cor cinza. Centro da colônia escuro; com bordas creme levemente alaranjada. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.	Micélio branco. Centro da colônia de cor cinza; com bordas creme. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa, uniforme.
Lev	Micélio branco. Centro da colônia de cor laranja escuro; com bordas amarelo-laranja claro. Crescimento micelial frouxo.	Micélio branco. Colônia de cor castanho uniforme. Crescimento micelial frouxo.
Cza	Micélio branco. Centro da colônia de cor creme; com bordas escuras. Crescimento micelial denso, concentrado.	Micélio apresentando dois setores, um de cor branca e outro cinza escuro. Centro da colônia de cor cinza escuro; com bordas castanho escuro. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.

Lev-Cza	Micélio branco. Centro da colônia de cor castanha; com bordas creme-amarelo. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.	Micélio branco. Colônia de cor creme com pontiações pretas. Crescimento micelial denso, concentrado, Colônia felposa.
V8	Micélio branco. Colônia de coloração creme. Crescimento micelial frouxo, superficial e uniforme.	Micélio branco. Colônia de cor creme. Crescimento micelial frouxo, superficial e uniforme.

Tabela 3 – Características culturais de isolados de *Phomopsis* em diferentes meios de cultura aos 30 dias de incubação, sob regime de alternância luminosa

Meios	Características culturais	
	PA	PM
BDA	Micélio branco. Centro da colônia de cor cinza, com um setor marrom, atingindo 7cm da placa; com bordas cinza claro. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.	Micélio branco com setores verde escuro. Centro da colônia de cor creme; com bordas cinza com pigmentos escuros irregulares. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.
Aveia	Micélio branco-amarelo. Centro da colônia de cor marrom escuro; com bordas creme alaranjada. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.	Micélio branco-cinza. Centro da colônia de cor cinza; com bordas creme. Crescimento micelial denso, concentrado. Colônia felposa.
Lev	Micélio branco. Centro da colônia de cor marrom alaranjada; com bordas bege. Crescimento micelial denso e irregular.	Micélio uniforme de cor verde-cinza. Colônia de cor escura com pigmentos escuros irregulares. Crescimento micelial denso, uniforme e concentrado.
Cza	Micélio branco amarelo. Centro da colônia de cor cinza-creme; com bordas cinza. Crescimento micelial denso, irregular e concentrado. Colônia felposa	Micélio branco nas bordas e com o centro cinza. Centro da colônia de cor escura; com bordas creme-alaranjado. Crescimento micelial denso e irreglar. Colônia felposa.
Lev-Cza	Micélio branco-cinza. Centro da colônia de cor cinza-escuro; com bordas creme-amarelo. Crescimento micelial denso, concentrado e irregular. Colônia felposa.	Micélio branco-cinza. Colônia de cor bege-marrom com pigmentos escuros irregulares. Crescimento micelial denso, uniforme.
V8	Micélio branco. Colônia de coloração creme uniforme com pigmentos escuros. Crescimento micelial frouxo, superficial e uniforme.	Micélio branco. Colônia de cor marom claro uniforme com pigmentos escuros. Crescimento micelial frouxo, superficial e uniforme.

Produção de picnídios: Aos 15 dias de incubação, *P. mangiferae*, apresentou uma maior produção de picnídios nos meios de Czapek e Levedura, diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Porém, foi verificado a presença de picnídios

inférteis em todos os meios, com exceção do meio V8. Nas médias de *P. anacardii*, não foi constatado diferenças significativas, pelo mesmo método, nos diferentes meios utilizados, verificando-se uma melhor produção para os meios de Czapek-Levedura e BDA. Com relação, a fertilidade, o meio V8 apresentou uma maior fertilidade, de 100%, seguido do meio Levedura com 66% e dos meios BDA, Aveia, Czapek-levedura e Czapek, com 33% (Tabela 4).

Tabela 4 – Produção e fertilidade de picnídios de *Phomopsis anacardii* (PA) e *Phomopsis mangiferae* (PM) aos 15 e 30 dias de incubação

15 Dias				
Meios de Cultura	Picnídios		Fertilidade (%)	
	PA	PM	PA	PM
BDA	70,3	15,6	33,3	0
Aveia	18,3	13,6	33,3	0
Levedura	35,3	300,0	66,6	0
Czapek	37,3	160,0	33,3	0
Cza-Lev	85,0	35,3	33,3	0
V8	39,0	48,3	100,0	66,6

30 Dias				
Meios de Cultura	Picnídios		Fertilidade (%)	
	PA	PM	PA	PM
BDA	406,1	886,8	26,7	40
Aveia	77,2	268,3	46,7	0
Levedura	209,8	50,5	53,3	0
Czapek	71,9	860,0	0	26,7
Cza-Lev	1192,0	1000,0	100	0
V8	656,0	582,8	100	33,3

Aos 30 dias de incubação, *P. anacardii*, apresentou maior produção de picnídios nos meios de Czapek-Levedura e V8, ocorrendo diferenças estatísticas entre os meios de cultura, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os meios Czapek e Aveia, apresentaram uma pequena produção de picnídios. Na avaliação da fertilidade, foi possível verificar a produção de picnídios férteis em todos os meios, com exceção do meio de Czapek. Em geral, os meios apresentaram conídios α e β , com uma maior concentração de conídios β , no meio de Levedura. Para *P. mangiferae*, observou-se uma produção de picnídios superior, nos meios de Czapek-Levedura, BDA e Czapek, não tendo ocorrido diferenças significativas, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, nestes substratos. Com relação a fertilidade, observa-se que nos meios de Czapek-Levedura, Levedura e Aveia, os picnídios foram inférteis, ao contrário dos meios de Czapek, BDA e V8, em que foi detectado a presença de conídios α e β nestas estruturas (Tabela 4). Este comportamento, confirma a influência dos substratos, na produção e na fertilidade dos picnídios.

Esporulação: Aos 15 dias de incubação, o meio de BDA, destacou-se no isolado *P. anacardii*, como um dos substratos que proporcionou uma

maior produção de conídios, em relação aos demais meios. Resultados semelhantes foram relatados por Athayde Sobrinho (1994), estudando *Plenodomus destruens*, enquanto que Corrêa (1995), observou uma maior esporulação no meio Oatmeal-Ágar, em isolados de *Phomopsis* de espécies florestais. No isolado *P. mangiferae*, o meio V8 apresentou uma maior esporulação, juntamente com o meio de Levedura. Não foi observado a presença de conídios nos meios de BDA, Czapek, Aveia e Czapek-Levedura. Analisando os processos fisiológicos, crescimento radial e esporulação, dos isolados de *Phomopsis*, nos diferentes substratos, observa-se que para o isolado *P. anacardii*, as exigências do fungo foi a mesma para os dois processos. No isolado *P. anacardii*, o fungo obteve um melhor desempenho, com relação a estes dois processos, no meio de BDA, o mesmo não acontecendo com o isolado *P. mangiferae*, onde obteve um melhor aproveitamento de crescimento nos meios de Czapek e de BDA, com uma menor esporulação do fungo. O meio de Czapek não apresentou uma boa utilização do fungo, nos processos de crescimento e esporulação. Estes resultados confirmam a teoria de Cochrane (1958), onde afirma que um substrato considerado bom para o crescimento, atende igualmente aos dois processos, como foi observado no isolado *P. anacardii*, com algumas exceções, justificando os resultados do isolado *P. mangiferae*. Com relação aos dados obtidos na produção de picnídios, fertilidade e esporulação, observa-se que não houve uma interação entre esses processos, onde provavelmente não houve uma amostragem adequada na fertilidade dos picnídios, ou seja, a amostragem não foi representativa para o número de picnídios presentes na placa, como também não houve uma relação direta entre uma alta produção de picnídios e alta esporulação (Figura 3).

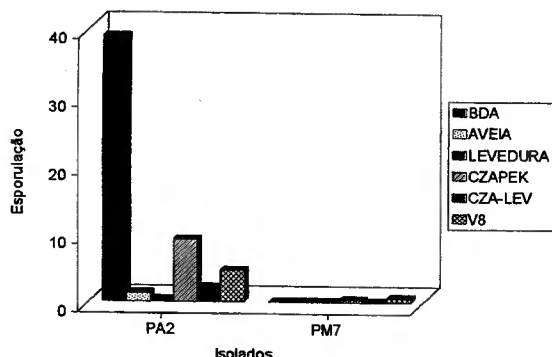


Figura 3 - Esporulação ($\times 10^5$ con/mL) de *Phomopsis anacardii* (PA2) e *Phomopsis mangiferae* (PM7), aos 15 dias de incubação.

Na análise dos dados, aos 30 dias de incubação, observa-se que os isolados apresentaram diferenças, com relação a esporulação e ao substrato utilizado. No isolado *P. anacardii*, os meios de Czapek-Levedura e V8 apresentaram uma maior esporulação, destacando-se dos demais meios. No meio de Czapek não foi verificado a produção de conídios. Com relação ao isolado *P. mangiferae*, os meios de BDA e Czapek, destacaram-se com uma boa produção de conídios, o que não foi observado, em outros meios de cultura, devido a infertilidade dos picnídios. Os resultados obtidos no isolado *P. anacardii*, não confirmam a indicação de Fuente *et al.* (1995), quanto a utilização do meio de Czapek para uma boa esporulação de conídios em espécies de *Cylindrocladium*, ao contrário do isolado *P. mangiferae*, onde foi observado uma boa produção de conídios, neste meio de cultura. Como se trata de dois gêneros diferentes, talvez as exigências nutricionais para o processo de esporulação também sejam diferentes. O fato do meio V8 apresentar uma fertilidade de 33%, na análise de fertilidade dos picnídios, e não observar esporulação, provavelmente, é devido a característica dos picnídios se encontrarem imersos no substrato, dificultando a sua remoção, pois de acordo com a metodologia, é feito a raspagem da superfície da colônia, impedindo a retirada dos picnídios imersos. Analisando os dados de produção de picnídios, fertilidade e esporulação, do isolado *P. anacardii*, verifica-se uma interação positiva linear destes processos. Este resultado pode ser confirmado observando-se todos os substratos utilizados, com exceção do meio Czapek, que apresentou picnídios inférteis. Diferindo, desta maneira, dos resultados obtidos aos 15 dias de incubação, no regime de alternância luminosa. Com relação ao isolado *P. mangiferae*, não houve esta interação positiva, onde a maior produção de conídios, não caracterizou uma maior fertilidade e maior esporulação. É possível que apesar de um determinado meio tenha favorecido a formação de picnídios, ainda não estariam iniciando a indução da esporulação, no período de avaliação (Figura 4).

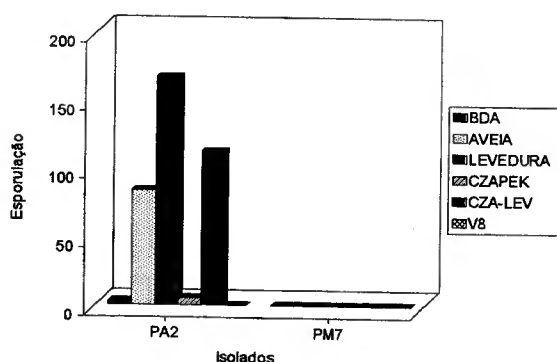


Figura 4 - Esporulação ($\times 10^5$ con/mL) de *Phomopsis anacardii* (PA2) e *Phomopsis mangiferae* (PM7), aos 30 dias de incubação.

Análise Eletroforética: Na análise do sistema de esterase, foram detectadas 5 regiões anódicas, denominadas EST1, EST2, EST3, EST4 e EST5, com as respectivas mobilidades relativas: 16,6; 25,0; 33,3; 60,04 e 62,5. Os isolados apresentaram três bandas de esterases, onde foram verificados duas bandas de intensidade média e uma de intensidade fraca, no isolado *P. anacardii*. Enquanto que no isolado *P. mangiferae* foi observada uma intensidade forte em todas as bandas. Nos isolados, foi constatado uma mobilidade relativa em comum, diferindo na largura e no comprimento das bandas (Figura 5a).

Na análise protéica, foram apresentadas um total de 11 regiões anódicas, denominadas PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6, PT7, PT8, PT9, PT10 e PT11, com as respectivas mobilidades relativas: 7,31; 10,97; 13,41; 17,07; 20,73; 25,60; 32,92; 34,14; 36,58; 43,90 e 48,78. Onde *P. anacardii* apresentou seis bandas, e *P. mangiferae* 8 bandas, sendo a maioria de média e fraca intensidade. Os isolados apresentaram o mesmo comportamento em três bandas protéicas, com uma intensidade mais fraca no isolado *P. anacardii*, com a mesma mobilidade relativa (Figura 5b).

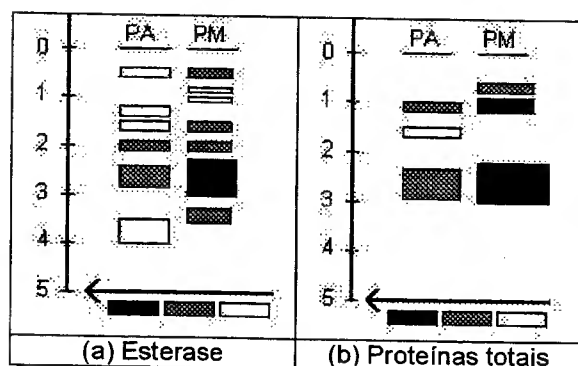


Figura 5 - Zimograma eletroforético de esterase (a) e proteínas totais (b) dos isolados de *Phomopsis anacardii* (PA) e *Phomopsis mangiferae* (PM).

Em geral os isolados apresentaram uma variabilidade genética, de acordo com o número, intensidade e posição das bandas protéicas e de esterase. Esta variação de bandas, é normalmente provocada por diferenças na atividade enzimática dos isolados, podendo também estar influenciados por condições ambientais e de cultivo. Estes mesmos fatores podem promover ou não a formação de bandas mais largas ou arraste (Alfenas *et al.*, 1991).

ABSTRACT

Physiological and isoenzymatic characteristics of *Phomopsis anacardii* and *Phomopsis mangiferae*

The genera *Phomopsis* to involve a large number of phytopathogenic species in important economic cultures, how the cashew and mango trees. With the purpose to compare *P. anacardii* and *P. mangiferae* isolates were performed physiological and isoenzymatic studies. In the physiological analysis of the isolates, were used six culture media (OAT, PDA, CZAPEK-YEAST, V8 and CZAPEK), under alternating darkness/day light condition, at 25°C of temperature for fifteen days, and continuous light with ultraviolet light on the alternance luminous for thirty days. The culture media PDA promoted the best micelial growth in everyone isolates in the differents incubation periods. The *Phomopsis* isolates showed different coloration of the colonies in function of the culture media utilized. In the incubation period of thirty days was verified the sectors formation in some media. The highest picnidial production and sporulation was observed in PDA culture media for *P. anacardii* and V8 for *P. mangiferae* in the fifteen days of incubation as while that in the thirty day incubation period were detached the V8 and Czapek-Yeast culture media for *P. anacardii* and PDA and Czapek media for *P. mangiferae*. In the electrophoretic analysis, *P. mangiferae* showed a major proteic and stherasic activity in relation to *P. anacardii*, to have demonstrated phenotypic and genotypic variations among the isolates.

Key words: *Phomopsis anacardii*, *Phomopsis mangiferae*, light, culture media, micelial growth, sporulation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliácridamida. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p.151-182.
- 2 ALFENAS, A.C. et al. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa:UFV, 1998. p.85-114.
- 3 ALFENAS, A.C. et al. Eletroforese de proteínas isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- 4 ATHAYDE SOBRINHO, C. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de um isolado de *Plenodomus destruens* Harter, agente da podridão-do-pé da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 1994. 131f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1994.
- 5 BRUNE, W.; ALFENAS, A.C. Modalidades da eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p.25-83.

6

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa:UFV, 1998. p.201-328.

7

COCHRANE, V.W. Physiology of fungi. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1958. 524p.

8

CORRÊA, R.M.S. Caracterização de *Phomopsis* e *Phoma* obtidos de sementes de espécies florestais. 1995. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

9

EARLY, M.P.; PUNITHALINGAM, E. *Phomopsis anacardii* sp. Nov. on *Anacardium occidentale*. Transactions British Mycological Society, v.59, n.1-6, p.345-347, 1972.

10

FARR, D.F.; BILLS, G.F.; CHAMURIS, G.P.; ROSSMAN, A.Y. Fungi on plants and plant products in the United States. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989.

11

FUENTES, A.L.O. Análise comparativa de caracteres patogênicos, fisiomorfológicos e isoesterásicos para

identificação de espécies de *Cylindrocladium*. 1995. 151f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1995.

12

HAHN, G.G. Life-history studies of species of *Phomopsis* occurring on conifers. Part I. Transactions British Mycological Society, v.15, n.1, p.32-93, 1930.

13

LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. Physiology of fungi. New York: McGraw-Hill Book Co., 1951. 464p.

14

MENEZES, M.; HANLIN, R.T.; SANTANA, A.A.D. *Phomopsis anacardii*, agente etiológico de lesões foliares em cajueiro, *Anacardium occidentale*. Recife-UFRPE, Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, 1995 (Suplemento).

15

PLOETZ, R.C. Mango diseases caused by fungi. In: PLOETZ, R.C. et al. Compendium of tropical fruit diseases. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1994. p.39-40.

16

UECKER, F.A. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. The New York Botanical Garden, Bronx, 1988.