

Métodos de inoculação de *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de aceroleira e detecção do patógeno por marcadores moleculares

Eveline Nogueira Lima¹, Joilson Silva Lima¹, Maria Emília Bezerra de Araújo¹, Edson Souza Alves¹ e Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini¹

Resumo - O Nordeste brasileiro é a região do país onde a aceroleira melhor se adapta, o que incentiva a instalação de grandes empreendimentos agroindustriais desta cultura. Porém, um dos fatores limitantes nas áreas produtoras é a doença causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. A resistência genética é o método mais promissor no controle deste fitopatógeno. Entretanto, a seleção de clones de aceroleira resistentes em campo a essa fitomoléstia é onerosa e demorada. Portanto, a inoculação artificial em mudas se faz necessário para a superação desse problema. Aliado a isso, o uso de marcadores moleculares poderá permitir a caracterização, a detecção, o diagnóstico e o monitoramento da disseminação desse fungo. Com isso, objetivou-se neste trabalho definir uma metodologia de seleção de clones de aceroleira quanto à reação à *L. theobromae* através de inoculações artificiais e a identificação do fitopatógeno em caule de mudas dessa cultura através de marcadores SSR. Foram testados nos clones de aceroleira BRS 152 e BRS 236 três métodos de inoculação: Bisel, Furadeira e Palito. Para a identificação dos isolados de *L. theobromae* obtidos de aceroleira, estes foram submetidos à reação de PCR, com 13 iniciadores específicos, previamente descritos para o fungo. Os métodos do Palito e Furadeira se mostraram mais eficientes para a inoculação de *L. theobromae* em clones de aceroleira BRS 236. Foi possível a identificação do patógeno através de marcadores moleculares.

Palavras-Chave: *Malpighia emarginata*, SSR, PCR.

Abstract –The Brazilian Northeast is the region of the country where the acerola best fits and this encourages the installation of large agribusiness ventures of this culture. However, one of the limiting factors in producing areas is the disease caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. The genetic resistance is the most promising method to control this pathogen. However, the selection of resistant acerola clones in the field is expensive and time consuming. Therefore, the artificial inoculation of seedlings is needed to overcome this problem. Allied to this, the use of molecular markers may allow the characterization, detection, diagnosis and monitoring the spread of this fungus. Therefore, this study aimed to define a methodology for clones selection of acerola for resistance to *L. theobromae* through artificial inoculation and fungus identification in the stem by SSR markers. Were tested in the acerola clones BRS 152 and BRS 236 three methods of inoculation: bevel, drill and toothpick. For the isolates identification of *L. theobromae* obtained acerola, they were subjected to PCR with 13 specific primers, previously described for the fungus. Toothpick and Drill methods were more efficient for the *L. theobromae* inoculation in the acerola clone BRS 236. It was possible to pathogen identification through molecular markers.

Key words: *Malpighia emarginata*, SSR, PCR.

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n, CEP: 60 356-000, Campus do Pici, Fortaleza-CE. E-mail: evelinenlima@gmail.com

INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma importante frutífera tropical. Trata-se de uma planta rústica que cresce como arbusto ou arvoreta e produz frutos conhecidos pelo elevado conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) (Guedes et al., 2011).

Diversas doenças fúngicas são relatadas na cultura de aceroleira, destacando-se a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grove que trata-se da doença mais difundida no Brasil (Alves et al., 1995). No estado do Ceará, Holanda et al., (1997) realizaram o mapeamento das doenças da aceroleira nas zonas fisiográficas do Sertão, Litoral e Serras Úmidas, sendo constatado doenças fúngicas como a podridão dos frutos e a podridão seca das hastes causadas por *Rhizopus nigricans* Ehr. e *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.), respectivamente.

Um dos fatores limitantes nas áreas produtoras de aceroleira são as doenças causadas pelo fungo *L. theobromae*, o qual se trata de um fitopatógeno altamente polífago, possuindo mais de 500 hospedeiros (Punithalingam, 1976; Punithalingam, 1980). Segundo Freire & Cardoso (2003) citado por Lima et al., (2012), a podridão seca das hastes causada por *L. theobromae* em aceroleira, vem

assumindo considerável importância econômica, pois, provoca a morte de um grande número de plantas, tanto em pomares caseiros como em plantios comerciais. A seca do ramo inicia-se a partir da extremidade, avançando em direção ao caule. A infecção pode, raramente, se iniciar pelo sistema radicular. A morte descendente de um ramo pode demorar meses para atingir o caule e provocar a morte da planta.

Uma das medidas de controle de doenças na cultura da aceroleira consiste na utilização de clones resistentes. Entretanto, o processo de obtenção desses materiais requer programas de melhoramento demorados e onerosos, e os primeiros sintomas são observados apenas a partir do segundo ano após o plantio (Paiva et al., 2002). A inoculação artificial, portanto, torna-se necessária para a superação desses problemas. Os primeiros testes visando definir uma metodologia de inoculação foram desenvolvidos recentemente (Costa, 2006), revelando aspectos preliminares para viabilização de uma metodologia padrão.

Os programas de melhoramento da aceroleira têm voltado suas atenções também para porta-enxertos com resistência a pragas e doenças (Manica et al., 2003), limitantes para a cultura na região Nordeste (International Board For Plant Genetic Resources, 1986).

O uso de marcadores moleculares poderá permitir a caracterização (“fingerprinting”), a detecção, o diagnóstico e o monitoramento da

disseminação de específicos ecótipos de *L. theobromae* entre pomares e até entre regiões. A detecção da presença de tipos patogênicos do fungo em propágulos assintomáticos poderá ser feito com absoluta segurança, usando esses marcadores através da PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O objetivo deste trabalho foi definir uma metodologia de inoculação de *L. theobromae* para auxiliar na seleção de clones de aceroleira e identificar o fungo em caules infectados através de marcadores SSR.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia (cultivo e esporulação do fungo), no Laboratório de Biologia Molecular (análise molecular) e em casa de vegetação (métodos de inoculação) da Embrapa Agroindústria Tropical, localizada no bairro Planalto Pici, Fortaleza-CE.

Para testar os métodos de inoculação de *L. theobromae* foram utilizados os clones de aceroleira BRS 152 e BRS 236. As mudas dos clones foram obtidas do campo experimental da Embrapa, localizada no município Pacajus-CE e levadas para a Embrapa Agroindústria Tropical, na cidade de Fortaleza-CE. Para a obtenção do isolado fúngico de *L. theobromae* foram feitas observações da incidência da podridão seca das hastes no jardim de sementes de aceroleira, localizado no campo experimental da Embrapa, município de Pacajus-CE, onde foi coletado material

vegetal infectado pelo patógeno. Posteriormente, esse material vegetal infectado foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, onde se procedeu ao isolamento do fungo em cultura pura. Após a identificação do mesmo, este foi usado no teste de patogenicidade em mudas de aceroleira depois de cultivado em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) durante sete dias. Foram testados três métodos de inoculação: Bisel, Furadeira e Palito. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial 2X3 (2 clones de aceroleira e 3 métodos de inoculação), com quatro repetições, cada muda de aceroleira constituindo uma unidade experimental.

Método do Bisel

Depois de cultivado por sete dias, um disco de 0,5 cm de diâmetro do micélio fúngico foi retirado da placa de Petri e introduzido em um corte na muda de aceroleira feito a 13 cm acima do ponto de enxertia a uma profundidade de corte de 5 mm (largura da lâmina do bisturi). Imediatamente após a inoculação, o caule cortado foi coberto com vaselina sólida e externamente protegido com fita Parafilm®.

Método do Palito

Palitos de *Pinus* sp. (tipo palito dente) esterilizado foram distribuídos na superfície

da placa de Petri contendo o meio de cultura BDA mais o fungo e depois foram acondicionados durante sete dias. Os palitos com crescimento fúngico em suas superfícies foram utilizados para a inoculação. As mudas de aceroleira foram furadas com auxílio de uma furadeira elétrica e broca de 2 mm, em uma altura de 13 cm acima do ponto de enxertia e com profundidade aproximada de 2 mm. No local perfurado foi colocado o palito de dente contendo *L. theobromae*, sendo depois coberto com vaselina sólida e externamente protegido com fita Parafilm®.

Método da Furadeira

Os caules das plantas foram furados com auxílio de uma furadeira elétrica e broca de 2 mm, 13 cm acima do ponto de enxertia e com profundidade de 2mm. Em cada orifício aberto foi colocado um disco de 2 mm de diâmetro com estrutura micelial do fungo, cultivado em meio de cultura BDA, retirado da periferia da placa de Petri contendo a cultura fúngica após 7 dias de cultivo, ficando o inóculo em contato com a estrutura vascular da planta. Após a inoculação, utilizou-se vaselina sólida para evitar ressecamento do disco de BDA com o inóculo, sendo o local envolvido com fita de Parafilm®.

Avaliação da infecção de *L. theobromae* em aceroleira

A avaliação da doença foi realizada 15 dias após a inoculação do fungo, medindo-se o comprimento das lesões internas observadas

nas plantas, mediante corte longitudinal do caule das mudas.

Os dados obtidos do comprimento das lesões em mudas de aceroleira inoculadas foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.3 (Ferreira, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Caracterização genética

Após a avaliação da infecção do patógeno nas plantas, amostras de caule de aceroleira foram levadas para o laboratório de Biologia Molecular onde foram realizadas as extrações de DNA segundo protocolo de Cavalcanti (2004). Os DNAs dos isolados de *L. theobromae* obtidos de aceroleira foram submetidos à reação de PCR, com 13 iniciadores específicos (Tabela 1), da marca IDT (Integrated DNA Technologies), previamente descritos para esse fungo (Burgess et al., 2003; Cardoso & Wilkinson, 2008).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de DNA genômico, 1 µL de cada primer, 0,4 µL de dNTPs, 0,6 µL MgCl₂, 2 µL de Tampão 10x “buffer”, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase e 12,8 µL de água ultra pura para completar o volume final. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo a 94 °C por 1 min., 35 ciclos, sendo cada um a 94 °C por 30 seg., 52 °C por 30 seg. e 72 °C

por 2 min., e um ciclo final de extensão de 72 °C por 7 min. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, sendo do modelo TC 512 da TECHNE.

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados nas reações de polimerase em cadeia para a identificação de isolados do *Lasiodiplodia theobromae* em caules de mudas de aceroleira

Pares de "primers" SSR	Sequência 5'	Temp. de anelamento (°C)	SSR
LT1 for LT1 rev	GAGGGTTTTGTGCTCCATGT GGAAAACGGTGGTCAAAGAA	52-62	(CA)6
LT2 for LT2 rev	ATTGGAAAGGAGGGAAAGGA GCGCGCTTCTCCAGAAA	55-60	(CA)8
LT3 for LT3 rev	GTAGATGTGGTCGCGGAGTT TCCCCATGTATACCAGGTC	55-62	(GGT)8
LT 4 for LT4 rev	GTAGATGTGGTCGCGGAGTT CTCGTTAGGAAGGAAAGCAT	54-62	(CCA)7
LT8 for LT8 rev	GAACTATCCCCGCATCTACT GGGAAAATAAAATGGTCTGG	54	(GGT)7
LT9 for LT9 rev	GAAACCCTTGTTCCATGC CAAGGATACGATGTGGACTG	55-57	(GA)9
LT3/4 for LT3/4 rev	GACTCATTACGGTCTCATG GTGGAGCGGAACTGTCTGCT	58	(CT)5
LT13/14 for LT13/1 rev	GAGTTGTTAGTGCGGGCGCC GCAGCCCCACAATTCACCAG	58	(GA)3
LT15/16 for LT15/16 rev	GCCAGATCCGTGCCACTG CATGCAGAGGTCGCAAAGTG	58	(CT)5
LT17/18 for LT17/18 rev	GATCTTCCAGCTCTTCGGCC GACTGCAGTAGGTTAGCG	58	(A)n
LT21/22 for LT21/22 rev	GGAAGATGATGGGATGGTTC GTACAAGAACGAACTCCGGT	58	(CA)5

LT27/28 for LT27/28 rev	CGAACAGGGTTTCGTGACGT CTCATATCTCGCCGGTTGCC	58	(CG)4
LT29/30 for LT29/30 rev	GACGAGGTCAAGGGCGACA CCTCCATGTCGGATTCCTTG	58	(CAA)7

As reações foram preparadas isoladamente. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (1,8%) corados com brometo de etídeo (0,5 µg/µL) e submetidos a 90 volts por 2 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador digital Canon PowerShot A620.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos sintomas internos nas plantas de aceroleira inoculadas com *L.*

theobromae houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores clone e método de inoculação. Entretanto, não houve diferença no comprimento da lesão interna dos tratamentos que fizeram uso de inoculações artificiais sobre o clone BRS 152 (Tabela 2). Sendo que para o clone BRS 236, os métodos de inoculação Palito e Furadeira foram mais eficientes que o método do Bisel (Tabela 2). Apenas para o método do Bisel, foi possível observar diferenças entre os clones, sendo este método de inoculação mais eficiente no clone BRS 152 (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento médio da lesão interna (cm) em dois clones de aceroleira infectadas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* através de três métodos de inoculação.

Clones	Métodos de inoculação		
	Bisel	Furadeira	Palito
BRS 152	10,67 Aa	13,95 Aa	16,87 Aa
BRS 236	3,82 Bb	14,02 Aa	18,53 Aa

CV (%) = 20,16

¹Médias de cada clone seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e médias de cada método de inoculação seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Smith et al. (1991), trabalhando com *Phytophthora* spp., em citros, ressaltaram que o método do Bisel é severo, devido ao alto potencial de inóculo, pois a densidade do inóculo pode afetar a susceptibilidade da planta ao patógeno, fato que não foi comprovado no clone de aceroleira BRS 236,

visto que este método foi o que apresentou menor comprimento da lesão. Entretanto o autor supra citado trabalhou com um patossistema diferente do que foi aqui estudado, ocorrendo variações na metodologia de inoculação.

O método do Palito mostrou-se bastante agressivo, esse método pode ter provocado uma injúria no tecido da planta, causando um maior estresse e, conseqüentemente, uma maior severidade dos sintomas. Cardoso et al. (2010), relataram que esse método apresenta um inconveniente prático decorrente da dificuldade de penetração desse no caule lenhoso das mudas de cajueiro. Contudo, a adaptação feita no presente trabalho sana este problema, uma vez que é feita uma previa perfuração no hospedeiro antes da introdução do palito carregando o patógeno a ser inoculado.

Como os três métodos foram eficazes quanto à distinção entre clone BRS 152 e os métodos Furadeira e Palito entre o clone BRS 236, a escolha do método a utilizar segundo alguns autores, deve obedecer a critérios como facilidade de execução, rapidez e

possível repetição dos sintomas (Pastor-Corrales et al., 1981; Opió et al., 1994).

As metodologias de inoculação e de avaliação, em condições de casa de vegetação são de grande importância, principalmente nos programas de melhoramento de plantas visando resistência a patógenos, pois podem ser executados em quaisquer épocas do ano, agilizando, viabilizando e reduzindo os custos destes programas. Entretanto eles necessitam ser ajustados para cada patossistema (Sousa et al., 2003).

Os DNAs extraídos pelo protocolo Cavalcanti (2004), apresentou boa qualidade e quantidade suficiente para realização de todas as reações (Figura 1).

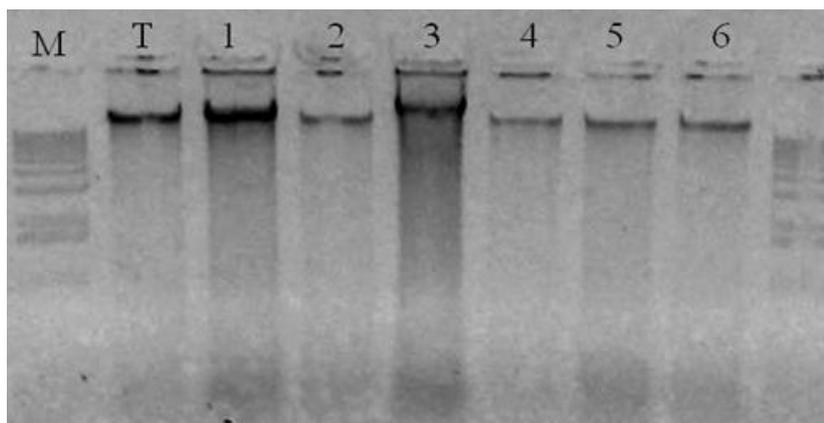


Figura 1. Fragmentos de DNA extraídos utilizando-se o protocolo Cavalcanti (2004), e visualizados em gel de eletroforese a 1 % de agarose. A primeira coluna da figura corresponde ao marcador 1Kb da invitrogen. As demais colunas são amostras de DNA de isolados do *Lasiodiplodia theobromae* extraídos de caules de mudas de aceroleira.

Nas análises de reações de amplificação realizadas utilizando os 13 iniciadores (Tabela 1), oito iniciadores (LT1, LT3, LT4, LT8, LT 13/14, LT 15/16, LT 17/18 e LT 21/22) foram positivos para detecção de *L. theobromae* no tecido do hospedeiro.

Estes resultados foram diferentes de Melo (2010), estudando a variabilidade genética do fungo *L. theobromae* em mudas de cajueiro.

Segundo o autor, não foi possível obter nenhuma amplificação nas reações, sendo que o mesmo utilizou os mesmos iniciadores aqui em estudo, porém com espécie diferente. Os padrões de bandas relativos aos isolados mostraram-se extremamente semelhantes, comprovando a presença do fungo nas mudas (Figura 2).

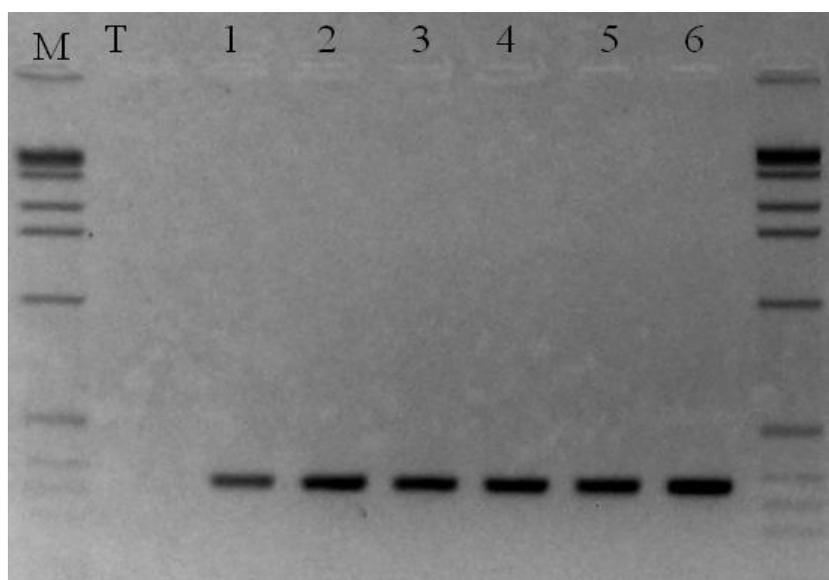


Figura 2. Padrão de amplificação de isolados do *Lasiodiplodia theobromae* em caules de mudas de aceroleira com o iniciador LT21/22. Nas linhas laterais estão os marcadores de 1kb e as outras linhas correspondem há: T (Testemunha), 1 (BRS 152 bisel), 2 (BRS 152 Palito), 3 (BRS 152 Furadeira), 4 (BRS 236 Bisel), 5 (BRS 236 Palito) e 6 (BRS 236 Furadeira).

As informações contidas neste trabalho devem ser úteis em trabalhos de melhoramento genético visando obter a extração de DNA do fungo *L. theobromae* diretamente do caule da muda da aceroleira, para detecção do mesmo via PCR, proporcionando assim melhores estudos de resistência do patógeno em questão. Esta técnica requer pequenas quantidades de DNA, é de

rápida execução e permite trabalhar com um número grande de isolados de uma população de patógeno (Manners et al., 1992). Além disso, estas informações ainda podem dar um indicativo na eficiência do controle de doenças, uma vez que populações de patógenos com alta diversidade genética se adaptam mais rapidamente a medidas de controle.

CONCLUSÕES

1. Dependendo do Clone de aceroleira utilizado, as inoculações artificiais pelo método Bisel, Furadeira e pelo método do Palito podem produzir resultados diferentes;
2. No clone de aceroleira BRS 152, as inoculações artificiais tanto pelo método Bisel, Furadeira como pelo método do Palito produzem resultados semelhantes;
3. O método do Palito e Furadeira mostram-se superiores ao método do Bisel no clone de aceroleira BRS 236;
4. Foi possível identificar o fungo *L. theobromae* através de marcadores SSR.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R.E.; MENEZES, J.B.; SILVA, S.M. Colheita e pós-colheita da acerola. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. **Acerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1995. p.77-89.
- BURGESS, T.; WINGFIELD, M.J.E.; WINGFIELD, B.D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.91-94, 2003.
- CARDOSO, J.E.; WILKINSON, M.J. Development and characterisation of microsatellitemarkers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.55-57, 2008.
- CARDOSO, J.E.; CYSNE, A.Q.; COSTA, J.V.T.A.; VIANA, F.M.P. Método de avaliação da resistência de clones de cajueiro à resinose. **Summa Phytopathologica** (Impresso), v.36, p.295-299, 2010.
- CAVALCANTI, J.J.V. **Genetic mapping and QTL indentification in cashew (*Anacardium occidentale* L.)**. 2004. 178p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - The University of Reading, UR, Inglaterra,
- COSTA, J.V.T.A. **Metodologia de avaliação de clones de cajueiro para resistência à resinose**. 2006, 40p. Monografia (Graduação)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006. 40p.
- FERREIRA, D.F. **Programa de análises estatísticas (statistical analysis sotware) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3 (Build 75)**. Lavras: DEX/UFLA, 2008.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Embrapa, Cenargem, Brasília, DF, 1995. 220p.
- FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Doenças da aceroleira. In: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse**

agroindustrial. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2003. p.59-81.

GUEDES, R.S; ZANELLA, F.C.V.; MARTINS, C.F.; SCHLINDWEIN, C. Déficit de polinização da aceroleira no período seco no semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, p.465-471, 2011.

HOLANDA, Y.C.A.; PONTES, J.J. da; SILVEIRA FILHO, J. Doenças da acerola (*Malpighia glabra* L.) no Estado do Ceará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.452-453. 1997.

INTERNATIONAL BOARD PLANT GENETIC RESOURCES (Rome, Italy). *Malpighia emarginata* (Acerola). In: **International board for plant genetic resources (Rome, Italy)**. Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts (excluding musa). Rome, 1986. p.52-54.

LIMA, J.S.; CARDOSO, J.E.; MOREIRA, R.C.; ALVES, E.S.; MELO, J.G.M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.6, p.10-16, 2012.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; FIORAVANÇO, J.C.; PAIVA, J.R.; PAIVA, M.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Acerola - Tecnologia**

de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercado. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2003, 394p.

MANNERS, J. M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A. G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes* spp. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M. Jeger. (Ed.). **Colletotrichum, Biology, Pathology and Control**. CAB International, Oxford, UK. 1992. p.250-268.

MELO, J.G.M. **Diversidade genética de Lasiodiplodia theobromae associado ao cajueiro**, 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia)- Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OPIO, A.F., ALLEN, D.J.; TERI, J.M. Evaluation of inoculation methods and inoculum concentration for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.37, p.223-224, 1994.

PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALENCAR, E.S. **Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região semi-árida do Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002. 4p. (Embrapa

Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 78).

PASTOR-CORRALES, M.A.; BEEBE, S.E.; CORREA, F.J. Comparing two inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: Internacional conference on plant pathogenic bacteria, 5., 1981, Cali. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1981. p. 493-503.

PUNITHALINGAM, E. ***Botryodiplodia theobromae*. CMI. Description of Pathogenic Fungi and bacteria.** Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England, n.519, 1976. 3p.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*.** Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123p.

SMITH, G.S.; HUTCHISON, D.J.; HENDERSON, T. Comparative use of soil infested with chlamydospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars. **Plant disease**, v.75, p.402-405, 1991.

SOUSA, C.S.; SOUZA, C.S.; HABER, L.L.; SANTANA, D.G.; ARRUDA, A.S.; TAKATSU, A. Método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* pelo sistema radicular para avaliação rápida de resistência de repolho à podridão negra. **Bioscience Journal**, v.19, p.53-56, 2003.