

JILDETE KARLA DOS SANTOS

**OBTENÇÃO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Crinipellis  
perniciosa*, AGENTE ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA NO  
CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para a  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

## RESUMO

SANTOS, Jildete Karla, MS. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa no cacaueiro (*Theobroma cacao* L.)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Conselheiras: Elza Fernandes de Araújo e Célia Alencar de Moraes.

Este trabalho teve por objetivo definir os parâmetros para a obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis perniciosa*. O melhor estabilizador osmótico para a liberação de protoplastos foi KCl 0.8M em tampão fosfato 10 mM, pH 5.8, contendo 20 mg.mL<sup>-1</sup> da enzima lítica Glucanex e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA, após 1 a 2 horas de digestão enzimática do micélio. Os protoplastos foram liberados nestas condições, na ordem de 2,0 x 10<sup>7</sup> por mL de estabilizador osmótico, a partir de 300mg de micélio secundário de *C. perniciosa* crescido em meio BDA. A melhor frequência de regeneração obtida foi de 2,0% quando sacarose 0,5M foi utilizada como estabilizador osmótico. A coloração de núcleos dos protoplastos revelou que 58,8% dos protoplastos eram anucleados, 37,5% uninucleados e 3,7% binucleados. Uma análise genética por RAPD de *C. perniciosa* e das colônias regeneradas a partir de protoplastos não revelou polimorfismos entre elas, embora diferenças, como crescimento lento e aspecto morfológico do micélio de algumas colônias tenham sido observadas. O micélio do isolado de *C. perniciosa*, bem como das colônias regeneradas a partir de protoplastos, são dicarióticas e apresentam gramplos de conexão.

## ABSTRACT

SANTOS, Jildete Karla, MS. Universidade Federal de Viçosa, august 2001.

**Production and regeneration of protoplasts from *Crinipellis pernicios*, causative agent of the witches' broom in cacao (*Theobroma cacao* L.).**

Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Célia Alencar de Moraes.

The conditions for the production and regeneration of protoplasts from the fungus *Crinipellis pernicios* were studied. The highest release of protoplasts was obtained with 0.8 M KCl in phosphate buffer, pH 5.8, as an osmotic stabilizer; 20 mg.mL<sup>-1</sup> of the lytic enzyme Glucanex; 10 mg.mL<sup>-1</sup> of BSA and 1 to 2 hours of enzymatic digestion. Under these conditions, about  $2.0 \times 10^7$  prtoplast.mL<sup>-1</sup> were released from the secondary mycelium of *C. pernicios* grown in BDA. The best regeneration frequency was achieved when 0.5M sucrose was used as an osmotic stabilizer. Nuclear Giensa staining revealed that 58,8% of the protoplasts were anucleate, 37,5% uninucleate, and 3,7% binucleate. Although differences in colony growth and mycelial aspect had been observed, RAPD analysis of colonies regenerate from protoplasts did not reveal any genetic polymorphism. The mycelium of *C. pernicios* as well as those from colonies regenerate from protoplasts were dikaryotic and possessed clamp connections.