UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

JUREMA ROSA DE QUEIROZ SILVA

Caracterização da diversidade genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao*

Piracicaba
2007

Jurema Rosa de Queiroz Silva
Engenheira Agrônoma

Caracterização genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao*

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente
Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Jurema Rosa de Queiroz
Caracterização genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao* / Jurema Rosa de Queiroz Silva; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2007.
88 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cacau 2. ERIC 3. Fungos fitopatogênicos 4. Genética molecular 5. ITS 6. Marcador molecular I. Título

CDU 575.17:582.284

DEDICATÓRIA

Ao meu amado Edmilson Santos Silva, grande incentivador e companheiro de todas as horas...

Aos meus pais Antonio B. Queiroz e Valmira R. Queiroz e aos meus irmãos Juliana, Diego e Marcelo pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pela vida e oportunidade de realizar meus sonhos.

- Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela orientação, valiosas contribuições científicas e acadêmicas, e por ter me conduzido ao sonhado título de mestre.

- À Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey, pela amizade, pelo apoio e auxílio nas análises estatísticas e principalmente, pelo suporte na minha chegada à Piracicaba, quando tudo parecia tão difícil...

- Ao Dr. Gonçalo A. G. Pereira e à Dra. Johana Rincones por cederem os isolados da Bahia e pela fundamental contribuição em parte do trabalho.

- Aos Drs. Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque e Gildemberg Amorim Leal Júnior, pelas preciosas dicas e por cederem os isolados amazônicos e de outros hospedeiros analisados neste trabalho.

- À Dra. Karina Gramacho pela ajuda oferecida durante o estudo dos marcadores microssatélites.

- À Dra. Maria Imaculada Zucchi pelo auxílio nas análises dos microssatélites.

- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

- Aos amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMP) II, Aline Possignolo, Danielle Scotton, Deborah Nishimura, Felippe Campana, Janaina Albino, Jeanne Machado, João Felipe Oliveira, João Bortoleto, Ligia Santos, Lorena Sereno, Lucélia Borgo, Onildo Nunes, Raul Santin, Rebeca Siqueira, Tercílio Calsa, Fabrício, Renato Ferreira e Vagner Benedito, pelo companheirismo, incentivo e pela valiosa troca de experiências. Sentirei saudades...

- Aos funcionários do LAMP II, Myrian Raquel Orsy, Wlamir Aguiar de Godoy e Luis Eduardo Fonseca, pelo auxílio imprescindível nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho; e do LAMP I, Benedita Inês Rodrigues, José Alves e Paulo Cassieri, pela amizade.

- Aos amigos do Laboratório Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada, do departamento de Genética da ESALQ/USP, Aline Borges, Domingos Amaral, Eduardo Bressan, Fernanda Spironello, Kaio Pereira, Marcos Siqueira, Mariana Rosa e Ronaldo Rabello.

- À Sra. Marta Prosdocimi, Coordenadora do Serviço Médico da ESALQ, pela ajuda dada para que pudesse recuperar minha saúde, sem a qual não conseguiria conduzir meus experimentos.

- Às Sras. Alzira Adão, Cláudia Corrêa, Neuda Oliveira e Regina Freitas (*in memorian*), secretárias da Pós-Graduação do CENA/USP.

- Às Sras. Cleide Ferraz, Marília Henyei, Raquel Carvalho e Renata Mazzero, bibliotecárias do CENA/USP.

- Aos professores do CENA/USP, que compõem a área de concentração Biologia na Agricultura e no Ambiente, em especial à Profa. Dra. Marli Fiore, grande incentivadora a realizar o curso de Mestrado nesta instituição.

- A todos os professores que contribuíram na minha formação. Aos meus ex-orientadores de graduação Dr. Alfredo Alves, Dr. Anacleto dos Santos, Dr. Jailson Lopes e Dr. Manoel Teixeira, pelo incentivo e encaminhamento para a pós-graduação.

- Aos meus pais Antonio Queiroz e Valmira Queiroz e aos meus irmãos Diego, Juliana e Marcelo, pela dedicação, amizade e por amenizarem a dor da saudade, mesmo que distantes. A vocês todos a minha consideração.

- Ao meu esposo Edmilson S. Silva, que é meu porto seguro, meu amor e que me faz sorrir mesmo em momentos difíceis. Te amo demais.

- À toda a minha família, em especial às minhas avós Ceciliana Queiroz e Valdete Velame, às minhas tias Conce Peixoto e Elizene Queiroz, aos cunhados Vagner Fonseca e Márcia do Carmo, e ao meu sobrinho Felipe, pela generosidade e confiança.

- À família de Edmilson S. Silva, em especial aos meus sogros (Sr. José e Sra. Maria Silva), cunhados (Evanildes, Luís, Marinilda, Edvandro, Hélio, Gildete, Neide, Zeinho, Rosemary e José) e tios (Gilda e João) pelo incentivo.

- Aos amigo-irmãos da República "Caminho do Céu II", Alberto Guanilo, Eduardo Primiano, Fernando Silva, Geraldo Vasconcelos, Marcelo Miranda e Rodrigo Marques, por tornarem nossa vida em Piracicaba muito mais fácil e agradável.

- Aos amigos baianos e agregados: Alexsandro Brito, Amâncio Souza, Bruno Souza, Daniel Filgueiras, Daniele Turati, Denise Viola, Elaine, Eloise, Onildo Nunes, Melissa Oda, Roseli Pereira, Suane Coutinho, Taís, Tales Miller e Genelício Cruzoé. Adoro vocês.

- Aos grandes amigos Dr. Paulo Libardi e Sra. Cristina Libardi, pela constante atenção.

- Aos amigos da Acarologia, em especial Alberto Guanilo, Ana Elizabeth, Anibal Oliveira, Carlos Flechtmann, Denise Návia, Geraldo Vasconcelos, Gilberto de Moraes, Fábio Aquino, Eveline Calderon, Fernando Silva, Imeuda Furtado, Isabel Cobo, Luciana Oda, Marcos Bellini, Léia Bellini, Nora Mesa, Paula Lopes, Sheila Spongoski, Tatiane Castro e Vitalis Wekesa, pela amizade.

- Aos amigos da Nematologia, Andressa Machado, Luís Carlos Ferraz, Mário Inomoto, Melissa Tomazini, Rosângela Silva, Sônia Antedomênico e Viviane, pela amizade e carinho.

- Em especial ao amigo Laércio A. de Carvalho e família (Argemiro Carvalho, Angelita Carvalho, Rita Alves, Heraldo, Cristiane Carvalho e Agenor Carvalho).

- Aos amigos do coração, Marise Caribe, Rafael Marques, Valda Tosta, Sra. Raimunda, Raimundo Silva e Sra. Ieda, pelos sinceros votos de felicidades.

- Em especial aos grandes companheiros Anibal Oliveira, Soraia Nassif e Estela Oliveira, pela atenção e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO 10
ABSTRACT..... 12
LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS 14
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 A biologia do fungo *Crinipellis perniciosa* 18
2.2 A doença Vassoura-de-bruxa 21
2.3 Variabilidade do fungo *Crinipellis perniciosa* 27
3 OBJETIVOS 31
4 MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Obtenção de isolados de *Crinipellis perniciosa* 32
4.2 Cultivo dos isolados 36
4.3 Extração e quantificação de DNA total 36
4.4 Amplificação de regiões ITS e 5.8S do DNA ribossômico 37
4.4.1 Condições de amplificação e eletroforese 37
4.4.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) das regiões ITS ……..... 38
4.5 Avaliação de sequências teloméricas repetitivas 38
4.5.1 Condições de amplificação e eletroforese 39
4.6 Amplificação de seqüências do tipo ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) 39
4.7 Avaliação de microssatélites 40
4.7.1 Construção de iniciadores 40
4.7.2 Amplificação 41
4.7.3 Preparo das placas e do gel 42
4.7.4 Eletroforese 42
4.8 Análise dos resultados 43
4.8.1 Marcadores dominantes (ERIC e telomérico) 43
4.8.2 Marcadores codominantes (microssatélites) 43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Caracterização dos isolados como espécie 45
5.2 Caracterização dos isolados utilizando sequências teloméricas 47

5.3 Diversidade genética e estruturação populacional de *C. perniciosa* utilizando seqüências do tipo ERIC 55
5.4 Diversidade genética de *C. perniciosa* utilizando microssatélites 60
5.4.1 Caracterização de locos microssatélites para *C. perniciosa* 60
5.4.2 Variabilidade genética dos isolados de *C. perniciosa* 64
5.4.3 Diversidade genética populacional dos isolados 67
6 CONCLUSÃO 75
REFERÊNCIAS 76
ANEXO 87

RESUMO

Caracterização da diversidade genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao*.

A doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao*), causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*, levou a total destruição da lavoura sul-baiana, previamente cultivada principalmente com variedades altamente suscetíveis, tornando o Brasil, um país tipicamente exportador de cacau em importador em poucos anos. A perda da resistência do genótipo "Scavina 6", única fonte de resistência reconhecida contra *C. perniciosa*, está associada à variabilidade genética do patógeno. Diante disto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade genética de isolados de *C. perniciosa* derivados de tecido infectado de *Theobroma cacao* (vassoura vede), originalmente coletados na Amazônia (Amazonas, Pará e Rondônia), uma região de ocorrência endêmica do fungo, usando marcadores moleculares. A identificação de relações genéticas entre isolados amazônicos e da Bahia e a possível existência de isolados geográficos também foram objetos deste trabalho. Primeiramente, a confirmação de identidade dos isolados Amazônicos foi conduzida usando amplificação e digestão da região ITS do rDNA e marcadores teloméricos. Todos os isolados avaliados foram confirmados como *C. perniciosa*. O *primer* telomérico TeloC1, previamente apresentado para discriminar o biótipo C, permitiu a separação do biótipo C dos biótipos S e L, porém, revelou variabilidade genética nos isolados de Cametá, PA e Cacaulândia, RO. Usando marcadores telomérico amplificado com o *primer* TeloA1R e ERIC, uma grande diversidade foi encontrada para os isolados da Região Amazônica em comparação àqueles da Bahia. Dentro dos isolados Amazônicos, a maior diversidade foi detectada para os isolados de Rondônia (Ji-Paraná, Cacaulândia e Ariquemes) e Pará (Cametá), áreas com

ocorrência endêmica ou de instalação histórica (mais de 300 anos) do cacaueiro, respectivamente. Isolados coletados em municípios localizados na regiãoTransamazônica, tais como Anapú, Altamira, Brasil Novo, Medicilândia e Uruará apresentaram maior similaridade com aqueles de Santarém e municípios relacionados à Belém, como Cametá, Baião e Mocajuba. Estes resultados sugerem que isolados da região Transamazônica pode ter sido originados de Belém ou Santarém, Pará. Na Bahia, houve a formação de dois grupos de isolados como previamente demonstrado. Os marcadores moleculares Microssatélites, ERIC e teloméricos foram eficientes na detecção da variabilidade genética em *C. perniciosa*. A diversidade genética observada auxiliará na identificação e escolha de regiões com maior diversidade de isolados para serem usados na seleção para resistência à vassoura-de-bruxa em programas de melhoramento do cacau.

Palavras-chave: ERIC, ITS, marcadores moleculares, microssatélites, *Moniliophthora perniciosa*, sequências teloméricas.

ABSTRACT

Characterization of the genetic diversity of Amazonian isolates of *Crinipellis perniciosa* from infected tissues of *Theobroma cacao*.

Witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.), caused by the basidiomycete *Crinipellis perniciosa*, devastated the producing region of Southern Bahia, previously cultivated mainly with highly susceptible cultivars, forcing Brazil, a typical exporter country to become a cocoa importer. The loss of resistance of the genotype "Scavina 6", the unique source of resistance against *C. perniciosa* has been associated with pathogen genetic variability. Thus, the objective of this study was to characterize the genetic diversity of *C. perniciosa* isolated derived from infected tissues of *T. cacao* ('green-brooms'), originally collected in the Amazon (Amazonas, Pará and Rondônia states), a region with endemic occurrence of the fungus, using molecular markers. The identification of the genetic relationships among the Amazonian and Bahian isolates, and the possible existence of geographical isolates were also objectives of this work. First, the identification confirmation of the Amazonian isolates was conducted using amplification and digestion of the ITS region of the rDNA and telomeric markers. All isolates evaluated were confirmed as *C. perniciosa*. The telomeric primer TeloC1, previously shown to discriminate the C biotype, allowed the separation of biotype C from biotypes S and L, but it revealed genetic diversity for isolates from Cametá, PA and Cacaulândia, RO. Using another telomeric marker amplified with TeloA1 primer and ERIC, a large genetic diversity was detected for isolates from the Amazon in comparison to Bahian. Within the Amazonian isolates, more diversity was detected for isolates from Rondônia (Ji-Paraná, Cacaulândia and Ariquemes) and Pará (Cametá), areas with endemic occurrence of wild cacao or historical introduction and cultivation (over 300 years), respectively. Isolates colletected at the Transamazônica roadway,

such as from Anapú, Altamira, Brasil Novo, Medicilândia and Uruará presented more similarity with those from Santarém and locales nearer to Belém, such as Cametá, Baião and Mocajuba. These results suggested that isolates from the Transamazônica region might have originated from Belém or Santarém, Pará. In Bahia, there were two groups of isolates as previously demonstrated. Microsatellite, ERIC and telomeric markers were efficient in detecting the genetic variability of *C. perniciosa*. The genetic diversity observed will help in identifying and choosing regions with more diverse isolates to be used to screen for witches' broom resistance in cacao breeding programs.

Keyword: ERIC, ITS, microsatellite, molecular markers, *Moniliophthora perniciosa*, telomeric sequences.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	*Amplified Fragment Length Polymorphism*
AMOVA	Análise de variância molecular
CTAB	Hexadeciltrimetil amônia
CEPEC	Centro de Pesquisas do Cacau
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura do Cacaueiro
GDA	*Genetic Date Analysis*
ITS	*Internal transcribed spacers*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
RAPD	*Random Amplified Polymorphism DNA*
RFLP	*Restriction Fragment Length Polymorphisms*
SSR	*Simple Sequence Repeat*
TFPGA	*Tools for Population Genetic Analyses*
UPGMA	*Unweighted Pair Group Mean Average*

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (família Tricholomataceae), consiste numa importante enfermidade do cacaueiro, restrita a América do Sul e Caribe, que provoca perda de frutos e mal-formação de ramos e almofadas florais (PURDY; SCHMIDT, 1996). A doença é endêmica da região Amazônica e após a sua introdução em regiões produtoras de cacau, provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador (ANDEBRAHN et al., 1999), e mais recentemente no sul da Bahia (PEREIRA et al., 1989). A vassoura-de-bruxa levou a uma grande destruição da lavoura baiana, cultivada principalmente com variedades altamente suscetíveis (PINTO; PIRES, 1998), e tornou o Brasil, um país tipicamente exportador de cacau, em importador, reduzindo a contribuição do Brasil na produção mundial de 15% para 4,5% entre 1989 e 2002.

Além dos danos agronômicos e econômicos causados pela vassoura-de-bruxa à cultura do cacau na Bahia, prejuízos sociais e ambientais também foram verificados. Essa doença afetou diretamente pequenos e médios agricultores, que dispunham de baixa capacidade de reação tecnológica, chegando a abandonar a cultura por outra que não utilizava o sombreamento, como as pastagens. Em troca de valores irrisórios, várias árvores de sombra foram derrubadas, provocando uma verdadeira erosão do capital florestal regional.

O método mais eficiente de controle da doença vassoura-de-bruxa consiste no uso de variedades resistentes, sendo o genótipo ‘Scavina 6’ originalmente coletado na região

Amazônica, a única fonte de resistência reconhecida disponível para *C. perniciosa*. Entretanto, a resistência de 'Scavina 6' já foi quebrada no Equador e clones com este gene de resistência têm apresentado sintomas de infecção na Amazônia e sul da Bahia. A quebra da resistência está associada à variabilidade genética do patógeno e novas fontes de resistência têm sido buscadas na região Amazônica.

A recuperação da lavoura cacaueira baiana tem sido conduzida com base na substituição de plantações de materiais suscetíveis com clones resistentes recomendados pela CEPLAC, e mais recentemente com clones selecionados por produtores agrícolas. Entretanto, a origem da resistência desses clones parece derivar, na sua maioria, de plantas selecionadas de cruzamentos envolvendo 'Scavina 6' (PINTO; PIRES, 1998; ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998). Devido ao histórico de quebra de resistência pelo patógeno, principalmente considerando a origem Amazônica do fungo, é fundamental estabelecer a diversidade genética de isolados daquela região. Alguns estudos já foram realizados neste intuito, porém sempre abrangendo uma pequena e fortuita amostragem de isolados.

A busca de novas variedades resistentes se faz extremamente necessária e urgente. Todos os clones de cacau têm sido utilizados apenas contra dois tipos de patótipos da Bahia, o que constitui uma estratégia de alto risco, devido à possibilidade de introdução de novos isolados da Amazônia e à própria capacidade do fungo se modificar geneticamente.

O conhecimento da estrutura populacional de *C. perniciosa* é escasso e a maioria dos trabalhos realizados até o momento tem focalizado principalmente no entendimento da origem do fungo na Bahia e no estudo de isolados derivados de diferentes hospedeiros.

A consideração da capacidade adaptativa de isolados de fungos patogênicos em função da prevalência de biótipos genéticos ou de hospedeiros preferenciais, é uma questão que também

vem merecendo atenção principalmente no estudo da resistência ao patógeno. Portanto, entendendo que o conhecimento da variabilidade deste fungo é importante para auxiliar o programa de melhoramento do cacaueiro, procurar-se-á neste trabalho avaliar o grau de diversidade genética de uma maior amplitude de isolados amazônicos de *C. perniciosa* visando identificar suas relações genéticas e compará-las com isolados da Bahia, empregando diversas abordagens moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A biologia do fungo *Crinipellis perniciosa*

Crinipellis perniciosa (Stahel) Singer é o agente etiológico da doença vassoura-de-bruxa, que tem provocado trágicas perdas em cacau (*Theobroma cacao* L.), constituindo uma ameaça à produção na América do Sul (RUDGARD, 1986) e ilhas do Caribe (RUDGARD et al., 1993). É um basidiomiceto da ordem Agaricales, pertencente à família Tricholomataceae (EVANS, 1978), primeiramente nomeado como *Marasmius perniciosus*, em 1915 por Stahel, sendo posteriormente reclassificado por Singer em 1942 como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (GRIFFTH et al., 1994). Recentemente o fungo foi renomeado como *Moniliophthora pernciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005).

Além de *T. cacao*, pertencente à família Malvaceae, o fungo *C. perniciosa* ataca várias outras plantas hospedeiras, embora com menor impacto econômico. De acordo com o hospedeiro que ataca, os isolados de *C. perniciosa* podem ser classificados em biótipos, incluindo o biótipo-C patogênico ao cacaueiro e a outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*; o biótipo-S quando afetam inúmeras espécies de Solanaceae (BASTOS; EVANS, 1985); o biótipo-B quando são isolados de *Bixa orellana* (BASTOS; ANDEBEHAN, 1986) (urucum); o biótipo-L quando isolados de lianas, geralmente assintomáticos (GRIFFITH; HEDGER, 1994b) e o biótipo-H isolados de *Heteropterys acutifolia* (RESENDE et al., 2000).

Crinipellis perniciosa é um patógeno hemibiotrófico, que exibe um tipo de micélio em cada fase do ciclo de vida. O ciclo biológico deste fungo inicia-se com a formação de basidiósporos nas lamelas do basidiocarpo, os quais constituem-se nas únicas estruturas, encontradas em condições de campo, capazes de infectar o cacaueiro (PURDY; SCHMIDT, 1996). Estes infectam tecidos meristemáticos (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento do cacaueiro), através de tubos germinativos por meio de estômatos, ferimentos (FRIAS et al., 1995) ou diretamente, induzindo uma série de sintomas, dependendo do órgão infectado e seu estágio de desenvolvimento (PURDY; SCHMIDT, 1996), exibindo o micélio é biotrófico, monocariótico, que apresenta hifas mais largas (5 a 8 μm de diâmetro), sem grampos de conexão e com crescimento intercelular. A partir de um determinado momento (2 a 3 meses), por razões ainda desconhecidas, o fungo persiste como um saprófita em tecido necrosado, revelando um micélio dicariótico obtido por meio da plasmogamia (fusão de hifas), com hifas mais finas (1,5 a 3 μm de diâmetro), grampos de conexão, sendo encontradas inter e intracelularmente (DELGADO; COOK, 1976; EVANS, 1978; 1980; BROWNLEE et al., 1990; GRIFFITH; HEDGER, 1994b).

Sob condições favoráveis de períodos intermitentes de umidade e seca e de luminosidade o micélio secundário sofre uma morfogênese para formar os corpos de frutificação ou basidiocarpos (PURDY; SCHMIDT, 1996) em vassouras necrosadas e frutos secos, completando o ciclo do patógeno. Destes emergem os basídios, os quais carregam os basidiósporos que irão infectar novos ramos.

Os basidiósporos são liberados de forma ativa e facilmente disseminados pelo vento (BASTOS, 1990). Entretanto, sua disseminação a longas distâncias torna-se inviável, uma vez que os basidiósporos são bastante sensíveis a desidratação, sendo a liberação noturna a garantia

de sobrevivência por mais tempo. Segundo Frias et al. (1991), os basidiósporos de *C. perniciosa* requerem uma superfície úmida para germinação e penetração. Por outro lado, o micélio saprofítico sobrevive por muitos anos no interior de vassouras vegetativas, frutos e folhas, que ao serem submetidos a condições alternadas de sol e chuva, podem funcionar como disseminadores da vassoura-de-bruxa, por favorecer a frutificação do fungo (BASTOS, 1990; NIELLA et al., 1999). A Bahia oferece condições climáticas para produção contínua de basidiósporos.

Foi observado *in vitro* por Delgado e Cook (1976) que o micélio monocariótico tem uma curta vida e perde viabilidade dentro de 24 h, porém, Meinhardt et al. (2006) conseguiram, através de um meio contendo metabólitos encontrados em tecidos doentes de *T. cacao*, manter a estabilidade do crescimento de hifas monocarióticas, que foram morfologicamente idênticas àquelas encontradas no micélio biotrófico do hospedeiro, prevenindo sua transformação até o micélio saprofítico. O micélio saprofítico pode ser prontamente isolado em meio artificial, mas é incapaz de infectar o cacaueiro (EVANS, 1980), não produzindo basidiocarpos em cultura (PURDY; SCHMIDT, 1996). A produção de basidiocarpos requer o crescimento de micélios em meio específico (GRIFFITH; HEDGER, 1993).

Segundo Baker e Crowdy (1943), os biótipos C, S e B do *C. perniciosa* são homotálicos, ou seja, a formação do micélio dicariótico se dá por meio de um único micélio monocariótico em que ocorre plasmogamia entre suas próprias hifas. Neste caso, um basidiósporo leva a formação de um micélio primário monocariótico que evolui para um micélio dicariótico com a formação de grampos de conexão sem a formação de anastomose entre hifas (DELGADO et al., 1976). De acordo com Griffith (1989) e Wheeler e Mepsted (1982; 1984) a ocorrência de clones dispersos geograficamente, bem como a avaliação por compatibilidade somática, sugerem a estratégia de homotalismo deste patógeno. Entretanto, anastomoses entre micélios de diferentes origens de basidiósporos poderiam promover o surgimento de heterocários no micélio saprofítico, com

subseqüente aumento da variabilidade na próxima geração de basidiósporos (FERREIRA, 2005; PEREZ, 2002).

A preponderância de heterotalismo entre os basidiomicetos é considerada uma indicação de que o heterotalismo seja a condição ancestral ao homotalismo neste grupo (COTOMACCI, 2004). Em seus estudos Griffith e Hedger (1994a) observaram que o biótipo-L do referido patógeno apresentou um mecanismo de cruzamento que consistia na união de hifas monocarióticas geneticamente diferentes, caracterizando um biótipo heterotálico. Este fato sugere que o biótipo-C (homotálico primário) evoluiu de um biótipo heterotálico.

2.2 A doença Vassoura-de-bruxa

Até meados da década de 20, o Brasil era o maior produtor de cacau do mundo. No final dos anos 80, ainda ocupava o segundo lugar, perdendo apenas para a Costa do Marfim, na África. Hoje, o Brasil contribui apenas com 4% da produção mundial, ficando em quinto lugar em produção e em consumo. O Brasil, antes considerado um dos principais exportadores mundiais de cacau, com o advento da vassoura-de-bruxa, passou a importar cacau para manter o funcionamento de suas indústrias.

A vassoura-de-bruxa é a doença mais destrutiva do cacaueiro (ALBUQUERQUE et al., 2005) originária da Bacia Amazônica, onde se manifesta de forma generalizada (BAKER; HOLLIDAY, 1957). O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, causando as vassouras, consiste no sintoma mais dramático. A infecção de almofadas florais leva a brotação de lançamentos vegetativos a partir desses meristemas e a produção de flores anormais e frutos partenocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a perda direta de sementes, sendo que a produção de frutos também é afetada indiretamente pela infecção de flores e pelo enfraquecimento generalizado das árvores.

O primeiro relato de ocorrência da vassoura-de-bruxa em cacaueiro foi realizado em 1785 (SILVA, 1987), porém apenas em 1895, no Suriname, foi feito o seu primeiro registro científico. Desde então a doença já foi identificada no Peru, Bolívia, Brasil, Venezuela (antiguidade); Guiana (1906); Colômbia (1917); Equador (1921); Trinidad (1928); Tobago (1939); Grenada (1948); São Vicente (1988); Panamá (1989) e Bahia (Brasil) (1989) (PURDY; SCHMIDT, 1996) (Figura 1). Além dessas introduções, outro agravante é a presença de *C. perniciosa* em outros hospedeiros considerados alternativos para a proliferação da doença.

Os cacaueiros da Bahia se desenvolveram e permaneceram isentos do *C. perniciosa* até o final da década de 80. No Brasil todos os registros e informações disponíveis dos órgãos encarregados da defesa fitossanitária vegetal indicavam que a vassoura-de-bruxa estava presente somente na Região Amazônica – seu local de origem (MAKI, 2006), onde já foram registradas perdas superiores a 70% da produção (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Em 1989, o patógeno foi detectado pela primeira vez no Sul da Bahia, região responsável por aproximadamente 85% da produção nacional de cacau da época (PEREIRA et al., 1989). Nesta região a devastação foi pior do que em qualquer outra região atacada pela vassoura-de-bruxa, devido principalmente à alta densidade de fazendas de cacau na região, às condições climáticas propícias ao desenvolvimento de epidemias e à presença de variedades suscetíveis (GRIFFITH, 2004). A queda do preço do cacau levou milhares de pessoas ao desemprego e ao abandono de inúmeras fazendas em busca de outras alternativas de renda (TREVISAN, 1996). Segundo Pereira et al. (1989) a introdução do *C. perniciosa* na Bahia ocorreu por intermédio da ação humana, pelo movimento de mudas infectadas vindas da Região Amazônica, uma vez que a viabilidade dos basidiósporos do patógeno não ultrapassa poucas horas. Em contrapartida, Evans e Barreto (1996) sugeriram que a introdução da vassoura-de-bruxa na Bahia foi originada por

solanáceas nativas. Além dessas introduções, outro agravante é a presença de *C. perniciosa* em outros hospedeiros considerados alternativos para a proliferação da doença.

Figura 1 - Área de ocorrência da doença vassoura-de-bruxa.

Em função dos danos econômicos e sociais causados pela vassoura-de-bruxa, principalmente no sul da Bahia, houve uma intensificação das pesquisas que além de objetivar

melhoria na produtividade do cacaueiro, passaram a dar maior ênfase para busca de métodos viáveis de controle dessa doença.

Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro incluem o manejo e poda fitossanitária, controle químico e biológico, e principalmente a resistência genética (PURDY; SCHIMDT, 1996). O manejo fitossanitário consiste na remoção de tecidos infectados antes da estação chuvosa, para redução de inóculo e possui um custo elevado em mão-de-obra e baixa eficácia, enquanto que o controle químico é ineficiente e de alto custo, além de existir o risco de contaminação das amêndoas. A adoção destas medidas de controle pelos fazendeiros é diretamente dependente do preço do cacau. O controle biológico, utilizando principalmente *Trichoderma stromaticum*, ainda não apresenta eficácia suficiente no controle de partes afetadas. A forma mais importante de controle consiste no emprego de variedades resistentes, por ser a mais econômica, estável e ambientalmente desejável.

O melhoramento para resistência iniciou-se no Equador a partir de 1918, através de seleção massal de plântulas originadas de árvores selecionadas sem sintomas, conhecidas como ‘refractarios’ (BARTLEY, 1986). A resistência também foi avaliada em cultivos comerciais em Trinidad na década de 1930, mas apenas pequenas variações de reação à infecção foram detectadas (BAKER; HOLLIDAY, 1957).

Na busca da resistência, cacaueiros silvestres foram coletados no vale Amazônico por via seminal em 1938, e por via clonal em 1942 (POUND, 1938; 1943). Esses materiais foram enviados para Trinidad, onde foram avaliados para resistência à vassoura-de-bruxa. Os clones ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ destacaram-se como altamente resistentes, enquanto o genótipo ‘IMC 67’ foi considerado como moderadamente resistente (BARTLEY, 1986). ‘Scavina 12’ era aparentemente heterozigoto para resistência, enquanto ‘Scavina 6’ foi considerado homozigoto, mas devido a suas características agronômicas inferiores, principalmente peso de sementes e

auto-incompatibilidade, esses genótipos não foram utilizados diretamente como clones, mas empregados como genitores de combinações híbridas.

O programa de melhoramento de Trinidad foi bem sucedido no desenvolvimento das séries de clones TSH (‘Trinidad Selected Hybrids’) e TSA (‘Trinidad Selected Amazonian’), derivadas de seleções realizadas em famílias de cruzamentos contendo ‘Scavina 6’ como genitor (BARTLEY, 1986). Esses clones foram usados comercialmente em Trinidad, e parecem ter contribuído para redução do nível de ataque da vassoura (LAKER et al., 1988). Clones dessas séries têm sido recomendados para substituição de material vegetal em fazendas de cacau no sul da Bahia, junto com outros clones de descendência de “Scavina 6” (ex. ‘EET 397’), e ‘Scavina 6’ é o genitor da série de híbridos varietais “TheoBahia” também recomendadas pela CEPLAC (PINTO; PIRES, 1998). ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ ainda têm sido considerados resistentes em Trinidad (LAKER et al., 1988; SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2003), entretanto ambos tem demonstrado sintomas de infecção desde 1976 (BARTLEY, 1986). No Pará, ‘Scavina 6’ foi considerado inicialmente resistente (EVANS; BASTOS, 1980), entretanto, essa resistência de ‘Scavina 6’ foi quebrada alguns anos após sua re-introdução no Equador e Colômbia (BARTLEY, 1986). Mais recentemente, na região Sul da Bahia, também se tem verificado um aumento da suscetibilidade à *C. perniciosa* de progênies de cacaueiro oriundas de cruzamentos com ‘SCA’ (ALBUQUERQUE, 2006).

A variação de resistência derivada da diversidade do patógeno, bem como a ausência de métodos consistentes para a avaliação precoce da resistência a *Crinipellis perniciosa* tem limitado a identificação de novas fontes de resistência e, conseqüentemente, a incorporação de novos genótipos de interesse ao programa de melhoramento (ANDEBRHAN et al., 1998). Assim, a determinação da diversidade genética do patógeno é um importante componente na seleção de genótipos resistentes ou tolerantes que poderiam ser usados em programa de melhoramento da

cultura do cacau. Uma outra alternativa que tem sido utilizada na luta contra a vassoura-de-bruxa é o emprego da engenharia genética na introdução de genes conferindo resistência a doenças e pragas. Guiltinan (2007) relata a utilidade do sistema de transformação de cacau em análises de funções gênicas.

A preservação e manejo dos recursos genéticos por meio da caracterização morfológica, tecnológica e agronômica além dos descritores botânicos, tem sido preocupação da maioria das instituições de pesquisa, visando evitar a erosão genética e conservar o germoplasma para uma futura utilização em programas de melhoramento (CASTRO et al., 1989; GOTSCH 1997; MAKI 2006). Os principais bancos de germoplasma de cacau são encontrados em Trinidad, Brasil (CEPLAC/CEPEC em Itabuna-BA e CEPLAC/ERJOH em Belém-PA), Costa Rica e Equador. A coleção disponível no Banco de Germoplasma do CEPLAC/CEPEC é considerada uma das mais completas, uma vez que contém acessos oriundos de diversos países, apresentando ampla variabilidade genética (ALMEIDA; DIAS, 2001; MAKI 2006).

Apesar da grande importância econômica do *C. perniciosa*, pouco se sabe sobre sua genética. A criação do projeto genoma deste patógeno (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura), sob coordenação do Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, tem permitido a aceleração dos estudos em busca do controle da doença. Este projeto teve o apoio do governo da Bahia, o qual através da Secretaria da Agricultura, mostrou-se favorável ao seu financiamento. Desta forma foi formada a Rede de Genômica do Estado da Bahia, composta inicialmente por 4 instituições: Universidade Estadual de Santa Cruz, CEPLAC, Universidade Estadual de Campinas e Centro Nacional de Recursos Genéticos da EMBRAPA. Com a inclusão de recursos disponibilizados pelo CNPq, essa rede ampliou-se com o ingresso da Universidade Estadual de Feira de Santana, Universidade Federal da Bahia e Universidade Católica de Salvador (SABHA, 2004).

2.3 Variabilidade do fungo *C. perniciosa*

O conhecimento da diversidade dentro de uma população de uma espécie de fungo depende do emprego de várias técnicas de caracterização dos isolados, como: sistemas de cruzamento (incompatibilidade somática); a análise de isoenzimas, visando identificar de forma mais rápida e precisa os agentes patogênicos, diferenciar raças e biótipos; bem como conhecer a diversidade genética entre e dentro de populações através do grau de similaridade dos indivíduos com o emprego de técnicas moleculares (FERREIRA, 2005; DAHLBERG, 1995).

O estudo da variabilidade em *C. perniciosa* tem sido baseado em características morfológicas e bioquímicas, compatibilidade somática, análises moleculares e reações bioquímicas em *Theobroma cacao* e outras espécies de *Theobroma* (ARRUDA et al., 2003a; ARRUDA et al., 2003b; GRIFFITH; HEDGER, 1994b; HEDGER et al., 1987; WHEELER; MEPSTED, 1988; FERREIRA, 2005).

A classificação de isolados do biótipo-C foi inicialmente baseada em estudos de patogenicidade (HEDGER et al. 1987; WHEELER; MEPSTED, 1988), e testes bioquímicos e de incompatibilidade somática em micélios saprofíticos (HEDGER et al., 1987; McGEARY; WHEELER, 1988; GRIFFITH; HEDGER, 1994b). Variabilidade morfológica pode ser observada em relação à cor do micélio, tamanho e cor dos basidiocarpos (PURDY; SCHMIDT, 1996). Wheeler e Mepsted (1988) concluíram que o biótipo-C poderia ser classificado em dois grupos principais de patótipos acordo com a capacidade de provocar sintomas em progênies de ‘Scavina 6’. Isolados de cacaueiros cultivados no Equador, Bolívia, e na maior parte da Colômbia causavam reações severas nas progênies de ‘Scavina 6’, enquanto que isolados de cacaueiros cultivados no Brasil, Trinidad e Venezuela induziam reações restritas no mesmo tipo de inoculação. Isolados do Equador, principalmente da região oriental, contida no centro presumível de diversidade de *Theobroma cacao* (CHEESMAN, 1944) apresentavam a maior diversidade

para patogenicidade. Estudos de incompatibilidade somática usando os mesmos isolados distinguiram 6 grupos, consistentes com a classificação de acordo com a reação do hospedeiro (McGEARY; WHEELER, 1988).

A separação entre isolados do Equador e Colômbia, e do Brasil, Venezuela e Trinidad foi corroborada por análises empregando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ANDEBRHAN; FURTEK, não publicado). Andebrhan e Furtek (1994) demonstraram a utilidade do uso de marcadores moleculares do tipo RAPD para distinguir isolados de *C. perniciosa* de diversos hospedeiros, sugerindo que a proximidade geográfica poderia ser mais importante do que hospedeiro para determinar a similaridade genética entre isolados do biótipo-C. Andebrhan et al. (1999) utilizaram RAPD para determinar a relação genética entre 46 isolados da região do sul da Bahia em relação ao aparecimento original de dois focos independentes em 1989. A hipótese de ter havido duas introduções independentes no sul da Bahia (ANDEBRHAN et al., 1999) foi corroborada por estudos de cariotipagem por gel eletroforese em campo pulsado (PFGE), com polimorfismo para comprimento de cromossomos, com dois grupos distintos de isolados de *C. perniciosa* identificados no sul da Bahia, e correlacionada com dados de análise por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (PLOETZ et al., 2005) e de seqüências teloméricas (RINCONES et al., 2003; 2006). Seqüências teloméricas também permitiram a separação dos biótipos C, L e S em grupos distintos (RINCONES et al, 2003; 2006). Rincones et al. (2006) sugeriram que os rearranjos cromossomais observados em *C. perniciosa* são gerados através de processos meióticos, que podem envolver a presença de múltiplas cópias de retroelementos, e revelaram ainda que a amplificação de seqüências teloméricas utilizando o *primer* TeloC1 poderia ser usada como indicador do biótipo C. A análise de seqüências repetidas do tipo ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) por PCR de diversos isolados de *Crinipellis perniciosa* de três hospedeiros (*T. cacao*; *Solanum lycocarpum*; e *Heteropterys*

acutifolia), pertencentes aos estados do Amazonas, Pará, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais e Rondônia, permitiu a clara separação entre isolados de acordo com hospedeiro (como biótipo-C ou -S), e uma correlação com origem geográfica (ARRUDA et al., 2003b). Arruda et al. (2003b) verificaram também a correlação de isolados da Bahia com isolados da Região Amazônica. Os mesmos isolados não apresentaram polimorfismo para seqüências de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA nuclear e para o gene da subunidade ribossomal pequena do rDNA de mitocôndria (mtDNA SSU rDNA) por digestão de produtos amplificados (ARRUDA et al., 2003a). Já a região IGS (*Inter Genic Spacer*) do gene rDNA apresentou polimorfismo, e permitiu a separação de isolados de acordo com hospedeiro por PCR-RFLP, e permitiu parcialmente por sequenciamento e análise filogenética, a separação por hospedeiro e origem geográfica. As seqüências da região ITS1 e ITS2 apresentaram níveis limitados de alterações, mesmo entre isolados coletados de hospedeiros distintos (biótipo-C e S) (LEAL JÚNIOR, 2002).

A variação genética entre isolados de *C. perniciosa* do cacaueiro de várias regiões da Amazônia brasileira foi estudada através de análise de compatibilidade micelial permitindo a identificação de dois grupos de patótipos em Rondônia: o grupo dos isolados de Ouro Preto D'Oeste e Jarú e o grupo de Cacoal e Ariquemes (ALMEIDA; ANDEBRHAN, 1984). Diferentes respostas de agressividade foram encontradas por isolados pertencentes ao biótipo C de *C. perniciosa* nos de Rondônia, Amazonas, Pará (BASTOS, 1990) e Bahia (NIELLA et al., 2001) quando confrontados com os mesmos clones de cacaueiro.

A variabilidade genética deste fitopatógeno também tem sido avaliada por meio de análises de microssatélites, que constituem marcadores genéticos altamente informativos para estudos de genética de populações em microrganismos, devido a sua natureza co-dominante, multi-alélica e pela ampla distribuição no genoma. Um grupo de locos microssatélites polimórficos, desenhados a partir de seqüências derivadas do banco de dados do genoma do *C.*

perniciosa, mostraram-se adequados para o estudo da diversidade genética em populações naturais e para diferenciação entre biótipos do referido patógeno (GRAMACHO et al., 2006). Gramacho et al. (2006) verificou que os isolados da Bahia apresentaram um grau de variação genética superior a esperada.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a diversidade e estrutura genética de populações de isolados de *Crinipellis perniciosa*, oriundos da Região Amazônica, coletados de tecido infectado de *Theobroma cacao*.

3.2 Específicos

- Caracterizar os isolados amazônicos ao nível de espécie e biótipo utilizando regiões ITS do rDNA e seqüências teloméricas, respectivamente;

- Desenvolver e validar locos microssatélites obtidos a partir seqüências derivadas do banco de dados do genoma de *C. perniciosa*.

- Estudar a estrutura genética populacional por meio de marcadores do tipo ERIC, microssatélites e seqüências teloméricas.

- Estabelecer relações genéticas entre isolados provenientes da Região Amazônica (Pará, Rondônia e Amazonas) e isolados da Bahia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

4.1 Obtenção de isolados de *Crinipellis perniciosa*

Foram utilizados 50 isolados de *C. perniciosa*, obtidos do hospedeiro *Theobroma cacao*, sendo 24 isolados provenientes do Pará, 17 de Rondônia, cinco do Amazonas e quatro isolados da Bahia. Foram também analisados cinco isolados oriundos de outros hospedeiros, sendo um isolado de *Herrania* sp., um de *Solanum paniculatum* (jurubeba), um de *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta) e dois de Lianas (cipós) (Tabela 1).

Os isolados amazônicos de *C. perniciosa* utilizados neste estudo fazem parte da coleção da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura do Cacaueiro) e foram coletados em plantios de *Theobroma cacao* de áreas cultivadas no Pará, Amazonas e Rondônia, em julho, setembro e outubro de 2004. Estes isolados foram transportados mediante autorização do Grupo de Defesa Sanitária Vegetal, da Coordenadoria de Defesa Agropecuária, em Ofício GDSV/CDA nº 12/2005. Os isolamentos foram realizados a partir de tecidos infectados (vassoura verde), em meio seletivo (meio BDA – 200 g batata, 20 g ágar, 20 g dextrose; 1000 ppm benlate – benzamidazol; 100 ppm estreptomicina), com a posterior desinfecção utilizando solução de hipoclorito de sódio a 5% e obtenção de micélio.

Os isolados pertencentes ao biótipo C, oriundos da Bahia, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (UNICAMP/SP) e os isolados provenientes de outros hospedeiros pelo Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior (ESALQ/USP). Tanto os isolados da Bahia quanto aqueles oriundos de diferentes hospedeiros foram obtidos de uma cultura monospórica de diferentes basidiomas coletados em campo.

Tabela 1 - Relação dos isolados de *C. perniciosa* oriundos da Região Amazônica e do Estado da Bahia, provenientes do hospedeiro *Theobroma cacao*

(continua)

Código	Biótipo presumível	Hospedeiro	Latitude	Longitude	Localidade
C1	**C**	*Theobroma cacao*	S 03º 28’ 51,4”	W 051º 10’ 38,7”	Anapú-PA
C2	**C**	*T. cacao*	S 03º 13’ 17,2”	W 052º 16’ 30,8”	Altamira-PA
C33	**C**	*T. cacao*	S 03º 16’ 13,7”	W 052º 23’ 43,5”	Altamira-PA
C4	**C**	*T. cacao*	S 03º 17’ 16,8”	W 052º 29’ 27,2”	Brasil Novo-PA
C5	**C**	*T. cacao*	S 03º 21’ 58,4”	W 052º 38’ 38,3”	Brasil Novo-PA
C6	**C**	*T. cacao*	S 03º 23’ 29,5”	W 052º 42’ 39,4”	Medicilândia-PA
C7	**C**	*T. cacao*	S 03º 26’ 02,5”	W 052º 52’ 32,0”	Medicilândia-PA
C8	**C**	*T. cacao*	S 03º 27’ 29,4”	W 052º 55’ 35,4”	Medicilândia-PA
C9	**C**	*T. cacao*	S 03º 30’ 53,3”	W 052º 57’ 45,6”	Medicilândia-PA
C10	**C**	*T. cacao*	S 03º 30’ 01,2”	W 053º 02’ 51,1”	Medicilândia-PA
C11	**C**	*T. cacao*	S 03º 30’ 04,0”	W 053º 07’ 05,8”	Medicilândia-PA
C12	**C**	*T. cacao*	S 03º 39’ 23,4”	W 053º 30’ 14,9”	Uruará-PA
C13	**C**	*T. cacao*	S 03º 41’ 47,5”	W 053º 37’ 09,1”	Uruará-PA
C14	**C**	*T. cacao*	S 03º 44’ 16,4”	W 053º 48’ 33,5”	Uruará-PA
C15	**C**	*T. cacao*	S 01º 55’ 48,0”	W 054º 42’ 57,0”	Alenquer-PA
C16	**C**	*T. cacao*	S 01º 50’ 10,6”	W 054º 41’ 15,8”	Alenquer-PA
C018	**C**	*T. cacao*	S 01º 52’ 37,9”	W 054º 42’ 36,9”	Santarém-PA
C19	**C**	*T. cacao*	S 02º 33’ 37,7”	W 054º 39’ 58,5”	Santarém-PA
C47	**C**	*T. cacao*	S 02º 02’ 10,1”	W 049º 19’ 52,1”	Cametá-PA
C49	**C**	*T. cacao*	S 02º 11’ 01,6”	W 049º 21’ 20,9”	Cametá-PA
C50	**C**	*T. cacao*	S 02º 24’ 51,5”	W 049º 29’ 03,5”	Cametá-PA
C51	**C**	*T. cacao*	S 02º 40’ 45,3”	W 049º 39’ 48,0”	Baião-PA
C52	**C**	*T. cacao*	S 02º 33’ 14,0”	W 049º 31’ 24,0”	Mocajuba-PA
C53	**C**	*T. cacao*	S 02º 31’ 07,8”	W 049º 29’ 99,7”	Mocajuba-PA
C21	**C**	*T. cacao*	S 03º 06’ 23,8”	W 060º 00’ 87,7”	Manaus-AM
C23	**C**	*T. cacao*	S 03º 38’ 80,8”	W 058º 38’ 51,5”	Manaus-AM

(continuação)

Código	Biótipo presumível	Hospedeiro	Latitude	Longitude	Localidade
C24	**C**	*T. cacao*	S 03º 05’ 06,8”	W 058º 17’ 01,5”	Manaus-AM
C25	**C**	*T. cacao*	S 03º 06’ 23,8”	W 058º 19’ 25,8”	Manaus-AM
C22	**C**	*T. cacao*	S 02º 38’ 80,8”	W 059º 38’ 51,5”	Boa Vista-AM
C26	**C**	*T. cacao*	S 09º 57’ 15,2”	W 062º 57’ 11,8”	Ariquemes-RO
C27	**C**	*T. cacao*	S 09º 55’ 00,5”	W 062º 53’ 93,8”	Ariquemes-RO
C28	**C**	*T. cacao*	S 09º 55’ 91,3”	W 062º 51’ 87,6”	Ariquemes-RO
C29	**C**	*T. cacao*	S 09º 47’ 53,2”	W 063º 02’ 99,0”	Ariquemes-RO
C30	**C**	*T. cacao*	S 10º 04’ 21,9”	W 062º 56’ 79,0”	Ariquemes-RO
C31	**C**	*T. cacao*	S 10º 20’ 49,9”	W 062º 52’ 68,1”	Cacaulândia-RO
C32	**C**	*T. cacao*	S 10º 20’ 57,3”	W 062º 50’ 43,5”	Cacaulândia-RO
C17	**C**	*T. cacao*	S 10º 20’ 67,2”	W 062º 48’ 19,2”	Cacaulândia-RO
C34	**C**	*T. cacao*	S 10º 26’ 41,1”	W 062º 28’ 00,6”	Jarú-RO
C38	**C**	*T. cacao*	S 10º 43’ 52,2”	W 062º 14’ 98,8”	Ouro Preto D´Oeste-RO
C39	**C**	*T. cacao*	S 10º 32’ 78,7”	W 062º 05’ 35,1”	Ouro Preto D’Oeste-RO
C40	**C**	*T. cacao*	S 10º 38’ 41,7”	W 062º 09’ 92,1”	Ouro Preto D’Oeste-RO
C41	**C**	*T. cacao*	S 10º 41’ 90,0”	W 062º 14’ 37,4”	Ouro Preto D’Oeste-RO
C03	**C**	*T. cacao*	S 10º 46’ 52,2”	W 062º 04’ 72,7”	Ji-Paraná-RO
C44	**C**	*T. cacao*	S 11º 24’ 88,1”	W 061º 27’ 47,8”	Ji-Paraná-RO
C45	**C**	*T. cacao*	S 10º 55’ 23,2”	W 061º 58’ 54,1”	Ji-Paraná-RO
C42	**C**	*T. cacao*	S 11º 28’ 38,8”	W 061º 21’ 77,8”	Cacoal-RO
C01	**C**	*T. cacao*	S 14º 40’ 41,0”	W 039º 22’ 30,0”	Itajuípe-BA
C08	**C**	*T. cacao*	S 14º 47’ 08,0”	W 039º 16’ 49,0”	Itabuna-BA
C15	**C**	*T. cacao*	S 14º 47’ 20,0”	W 039º 02’ 58,0”	Ilhéus-BA
C18	**C**	*T. cacao*	S 15º 57’ 03,0”	W 039º 32’ 02,0”	Itapebi-BA
C83	**C**	*Herrania* sp.	-	-	Indeterminada
S1	**S**	*Solanum paniculatum*	-	-	BA
S2	**S**	*Capsicum frutescens*	-	-	BA
L1	**L**	Liana	-	-	Indeterminada
L2	**L**	Liana	-	-	BA

4.2 Cultivo dos isolados

Os isolados amazônicos foram mantidos em meio MYEA + G (*Malt-Yeast Extract Agar* 2% + Glicerol) em placas de petri (9 cm) a 28ºC. Após 15 dias de crescimento, hifas da borda das colônias foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido MYE + G (extrato de malte 0,17%, extrato de levedura 0,5% e glicerol 5%). Os frascos foram incubados sem agitação por 10-15 dias a 28ºC, quando então o micélio foi recolhido por filtração, lavado com água destilada esterilizada para eliminação de resíduos ainda presentes no micélio e armazenado a –80ºC.

4.3 Extração e quantificação de DNA total

O DNA total dos 55 isolados foi extraído a partir de micélio previamente lavado e armazenado a –80ºC, empregando-se o método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990). Cerca de 100 mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido em almofariz e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 650 μL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaC; 2% CTAB; 1% PVP; 0,2% β-Mercaptoetanol; 50 $\mu g.mL^{-1}$ Proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55ºC por 1 hora em banho-maria, agitando-se a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e um volume 650 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A misturada foi agitada manualmente por 2 minutos e em seguida centrifugada a 12.000 *g* por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, e um volume igual de isopropanol gelado (cerca de 600 μL) foi acrescentado. A solução foi incubada a –20ºC por 4 h. Posteriormente procedeu-se centrifugação a 12.000 *g* por 5 minutos, descartando-se em seguida a fase líquida. O DNA que já se encontrava aderido ao fundo do tubo, foi lavado duas vezes com 1

mL de etanol 70%. O *pellet* foi ressuspenso em 50 μL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10μg.mL^{-1} RNase. A concentração do DNA foi estimada por fluorimetria (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Biociences, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.4 Amplificação de regiões ITS e 5.8 S do DNA ribossômico

A amplificação e digestão das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do gene ribossômico e o gene 5.8S foram realizadas para confirmação de identidade dos 46 isolados coletados na Região Amazônica (Rondônia, Pará e Amazonas). Foram incluídos os quatro isolados da Bahia e os cinco isolados oriundos de diversos hospedeiros (Tabela 1) como controle positivo.

4.4.1 Condições de amplificação e eletroforese

Para a amplificação das regiões foram usados dois iniciadores: ITS1-18S- 5' CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG 3' e ITS4 – 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3', baseados em White et al. (1990). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 μL, contendo 25 ng de DNA; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 μM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μM de cada *primer* e 1,0 unidade de Taq polymerase. As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer modelo 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94ºC por 10 min, seguido de 35 ciclos, sendo que cada ciclo consistirá de uma etapa de desnaturação (1 min a 94ºC), uma etapa de anelamento (1 min a 58ºC) e uma etapa de alongamento (2 min a 72ºC), e finalmente uma extensão final a 72ºC por 10 min. Estes *primers* foram usados em combinação para amplificar um produto de aproximadamente 750 bp.

4.4.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) das regiões ITS

O produto da amplificação de ITS1+5,8S+ITS2 foi digerido separadamente com as enzimas *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Pst*I, *Msp*I e *Hinf*I. Cada reação de digestão continha 10 μL do produto de amplificação, 5 unidades de enzima, 2 μL de tampão de enzima num volume total de 20 μL, sendo encubadas a 37ºC por 1 h.

Tanto os produtos de PCR, quanto os fragmentos de digestão foram separados por meio de eletroforese em gel de 1,5% agarose, em tampão 1X TAE (Tris base; ácido acético glacial; 0,5M EDTA pH 8,0) a 5 $V.cm^{-1}$. Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotodocumentados.

4.5 Avaliação de sequências teloméricas repetitivas

Seqüências teloméricas repetitivas foram empregadas para comprovação de identidade de biótipo dos 46 isolados coletados na Região Amazônica, presumivelmente pertencentes ao biótipo C. Foram também analisados cinco isolados da Bahia, também provenientes de *T. cacao*, que serviram de controle positivo, já que foram os mesmos utilizados por Rincones et al. (2006). Como controle negativo foram incluídos 5 isolados oriundos de outros hospedeiros como *Herrania* sp. (biótipo C), *Solanum paniculatum* e *Capsicum frutescens* (biótipo S); e Liana (biótipo L). Os isolados foram analisados a partir da amplificação de seqüência repetitiva do telômero com o emprego do iniciador TeloC1. Para verificar a existência de variabilidade genética nos 46 isolados amazônicos do biótipo C também foram amplificadas seqüências teloméricas, utilizando o *primer* TeloA1R.

4.5.1 Condições de amplificação e eletroforese

As amplificações foram conduzidas empregando os *primers* TeloC1 (5' TTTACGGTTTACGGTTTACGG 3'), de acordo com Rincones et al. (2006) ou TeloA1R (5' CCC TAA CCC TAA CCC TAA 3'), proposto por Meinhardt et al. (2002a,b) separadamente, em volume final de 20 μL, contendo 25 ng de DNA; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 μM de cada dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 pM de cada *primer* e 1,0 unidade de *Taq* polymerase , utilizando termociclador Perkin Elmer modelo 9700, programado para realizar uma desnaturação inicial a 94ºC por 10 min, seguido de 35 ciclos, sendo que cada ciclo consistirá de uma etapa de desnaturação (1 min a 94ºC), uma etapa de anelamento (1 min a 42ºC) e uma etapa de alongamento (2 min a 72ºC), e finalmente uma extensão final a 72ºC por 10 min. O resultado foi avaliado por meio de eletroforese em gel 0,8% agarose em tampão 1X SB a 4 $volt.cm^{-1}$ com observação sobre luz U.V. e fotodocumentação.

4.6 Amplificação de sequências do tipo ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

O grau de diversidade entre os isolados amazônicos e baianos também foi investigada através de seqüências do tipo ERIC. A região ERIC foi amplificada via PCR, utilizando os *primers* ERIC1R (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3') e ERIC2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') baseados em Arruda et al. (2003b). As reações de PCR possuíram um volume de 20 μL, contendo 25 ng de DNA; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 μM de cada dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$, 2μM de cada *primer* e 1,0 unidade de *Taq* polymerase. As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer modelo 9700, programado para realizar uma desnaturação inicial a 95ºC por 7 min, seguido de 30 ciclos, sendo que cada ciclo consistirá de

uma etapa de desnaturação (1 min a 94ºC), uma etapa de anelamento (1 min a 52ºC) e uma etapa de alongamento (8 min a 65ºC), e uma extensão final a 65ºC por 15 min. A preparação do gel e das placas foi a mesma descrita previamente para a avaliação de microssatélites. O resultado foi avaliado por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7% e corados com nitrato de prata, de acordo com procedimento descrito por Creste et al. (2001).

4.7 Avaliação de Microssatélites

Seqüências repetidas em tandem (SSR) foram utilizadas visando identificar a variabilidade intra- e interpopulacional dos 50 isolados de *C. perniciosa*, oriundos de Rondônia, Amazonas, Pará e Bahia.

4.7.1 Construção de iniciadores

Um total de doze pares de iniciadores para amplificação de locos microssatélites com di- $(AC)_{20}$; tri- $(TCA)_7$, $(GAC)_8$, $(CAG)_8$, $(CAG)_7$, $(CCA)_{11}$, $(ACC)_8$, $(GAG)_{11}$; e tetra-nucleotídeos $(TGAC)_4$ repetidos foram desenvolvidos neste estudo, a partir de seqüências derivadas do banco de dados de *C. perniciosa* (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/) por meio de buscas aleatórias. O desenho dos iniciadores direto e reverso obedeceu aos seguintes critérios: ser constituídos por 18 a 20 nucleotídeos; conter uma percentagem de CG de 50 a 55%; apresentar temperatura de anelamento de 50 a 60ºC, com diferença de 3 a 4ºC, de forma que pudessem ser utilizados na mesma reação e que não sofressem auto-hibridização, ou hibridizassem entre si; produzir fragmento esperado de 100 a 300 pb. Os programas *Primer*3 (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/*primer*3/*primer*3_www.cgi) e Net*Primer* (www.premierbiosoft.com/net*primer*/netprlaunch/netprlaunch.html) foram utilizados para

desenhar e analisar os iniciadores, respectivamente. No processo de otimização, os fragmentos amplificados foram analisados em gel 3,5% agarose, visualizado em luz UV e fotodocumentado.

4.7.2 Amplificação

Reações microssatélites foram conduzidas empregando-se iniciadores específicos para dezessete locos microssatélites, sendo doze locos desenhados neste projeto e cinco desenvolvidos por Gramacho et al. (2006) (Tabela 2).

Para a realização da PCR foram utilizados 25 ng de DNA para uma reação de 20 μL, contendo: 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 μM de cada dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μM de cada loco e 1,0 unidade de *Taq* polymerase. As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer modelo 9700, empregando-se um programa ´touchdown´, com ciclo inicial de 94ºC por 10 min, seguido de 40 s a 94ºC; 40 s a 60ºC, 60 s a 72ºC, reduzindo um grau a cada ciclo, num total de 10 ciclos, seguido de 35 ciclos de 40 s a 94ºC, 40 s a 50ºC, 60 s a 72ºC e finalmente uma extensão final a 72ºC por 10 min.

Tabela 2 – Descrição de locos microssatélites de acordo com Gramacho et al. (2006)

Código	Acesso	Sequência (5´- 3´)	A	Alelos (pb)	H_o	H_e
MsCepec_Cp14	AM183147	F: CAGCTCGTACGGATCAACAA R: TACCGATGGTGTGAGGTCAA	2	235-239	0,06	0,18
MsCepec_Cp15	AM183148	F: AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT R: TGTCGAGCACTAGCATGTGA	6	177-200	0,13	0,40
MsCepec_Cp16	AM183149	F: CGCACTTTGGCTGATGTAAA R: GTCCCAGAGGGAAAGAGGAT	2	212-221	0,03	0,09
MsCepec_Cp19	AM183150	F: TCCCACAACCCCAAAGATAG R: CCCCTTCAAGGTCGTATCCT	2	197-200	0,01	0,06
MsCepec_Cp45	AM183157	F: ATGACCAGACAAATGAAAC R: CAAAGAGAAATCACAGAGC	6	234-266	0,00	0,79
Total			18		0,05	0,30
Média			3,6			

Número total de alelos por loco (A); Heterozigosidade observada (Ho); Heterozigosidade esperada (He).

4.7.3 Preparo das placas e do gel

Para a realização da eletroforese, a preparação das placas de vidro obedeceu ao seguinte procedimento: aplicação de 2 mL a 2% de dimetildiclorosilano em octametil ciclo-octasilano (PlusOne Repel Silane ES, Amersham Biosciences) sobre a placa maior (33,3 x 41,9 cm). Na placa menor (33,3 x 39,4 cm) foi aplicado 2 μL de metacriloxipropil-trimetoxisilano (PlusOne Repel Silane ES, Amersham Biosciences) diluído em 1 mL de uma solução composta por 0,5% de ácido acético glacial e 95,5% de etanol. Após secagem, ambas as placas foram montadas. Para o preparo do gel foram utilizados 60 mL de solução de acrilamida 7% (233,4 mL acrilamida 30%, 320 mL formamida, 100 mL de 10 X TBE, 336 g de uréia); 240 μL 10% de persulfato de amônia; 130 μL TEMED. A solução de acrilamida 7% foi aplicada no gel com auxílio de uma seringa plástica descartável.

4.7.4 Eletroforese

Após 60 min de polimerização, as placas foram colocadas em cuba vertical Hoefer SQ3 da Amersham Biosciences, onde os géis eram pré-aquecidos por 60 minutos a 60 W de potência constante. Uma alíquota de 10 μL das amostras, previamente desnaturada com 12 μL de tampão de carregamento (95% formamida; 0,05% xylenicyanol; 0,05% azul de bromofenol; 12,5% sacarose; 10mM NaOH) a 94ºC por 5 minutos, foi aplicada em cada poço do gel. Em seguida, procedeu-se a corrida propriamente dita a uma potência constante de 50 W durante duas horas. A coloração foi realizada com nitrato de prata, segundo metodologia proposta por Creste et al. (2001).

4.8 Análises dos resultados

4.8.1 Marcadores dominantes (ERIC e Telomérico)

Os produtos da amplificação visualizados em gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo. Por meio desses escores, obteve-se uma matriz binária que foi utilizada para o cálculo dos coeficientes de similaridade. A similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de Jaccard, e para visualizar a forma de agrupamento dos isolados, foi elaborado o dendograma empregando o método UPGMA, utilizando o software NTSYSpc versão 1.70 (ROHLF, 1992). A estabilidade dos agrupamentos dentro do dendograma foi testada a partir de reamostragens utilizando 1.000 reamostragens *bootstraps*, usando o programa Winboot.

4.8.2 Marcadores codominantes (Microssatélites)

A partir da leitura dos dados de fragmentos nos géis foram obtidas as freqüências alélicas e genotípicas de todos os 46 isolados amazônicos e dos quatro isolados da Bahia, em cada loco. A diversidade genética dentro de cada população foi medida através do número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, seguindo a estimativa não viesada de Nei e as estatísticas F de Wright (F_{IS}, F_{ST} e F_{IT}) utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000). O coeficiente de fixação (F_{IS}) foi calculado por $F_{IS} = (H_S - H_I)/H_S$ e utilizado para estimar a redução mínima em heterozigosidade de um indivíduo devido ao cruzamento aleatório dentro da população. O índice F_{ST} foi calculado por $F_{ST} = (H_T-H_S)/H_T$ e utilizado para estimar a extensão da diferenciação genética entre as subpopulações (agrupamentos). O índice de

fixação geral (F_{IT}) foi calculado por $F_{IT} = (H_T\text{-}H_I)/H_T$ e utilizado para estimar a redução média de heterozigosidade de um indivíduo em relação à população total.

A estrutura genética molecular entre populações foi analisada mediante parâmetros estatísticos (H_T, H_S, D_{ST} e G_{ST}) de Nei (1973), os quais foram calculados a partir do programa GENETIX 4.02 (BELKHIR, 2001), tendo a significância testada pela re-amostragem do tipo *bootstrap*, utilizando 10.000 re-amostragens sobre locos. Também foram calculadas as distâncias genéticas não viesadas de Nei (1978). O programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para o cálculo da estimativa da distância genética entre populações e para a construção de dendogramas empregando-se o método UPGMA (*Unweighted pair proup mean average*). A estabilidade dos agrupamentos dentro do dendograma foi testada a partir de reamostragens utilizando 1.000 reamostragens *bootstraps*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos isolados como espécie

Os 46 isolados de *C. perniciosa* da Região Amazônica foram coletados de tecido infectado de *Theobroma cacao* e, portanto, foi necessário confirmar suas identidades enquanto espécie, para descartar possíveis contaminações por outros fungos nas amostras avaliadas. Para tanto, procedeu-se a amplificação das regiões espaçadoras transcritas do gene ribossomal (rDNA) ITS1 e ITS2, incluindo o gene 5.8S, usando os *primers* ITS1 e ITS4. A amplificação com esses iniciadores gerou um único produto de aproximadamente 750 pb a partir do DNA de todos os isolados examinados (Figura 2A). Como controle positivo na reação de amplificação das regiões ITS e 5.8S do rDNA foram incluídos isolados obtidos de culturas monospóricas oriundos de *T. cacao* e de outros hospedeiros.

Para confirmação da identidade de seqüência, foi realizada a digestão das regiões amplificadas de ITS-5.8S do rDNA usando enzimas de restrição, de forma a verificar a existência de qualquer padrão de banda discrepante entre os isolados, um indicativo de polimorfismo de nucleotídeos nos sítios de reconhecimento das enzimas, conforme utilizado por Arruda et al. (2003a). Dentre as sete enzimas de restrição testadas, *Hin*fI e *Msp*I foram selecionadas por digerirem os fragmentos amplificados. A restrição por *Hin*fI produziu três fragmentos de aproximadamente 290, 190 e 135 pb (Figura 2B), e *Msp*I gerou dois fragmentos de aproximadamente 450 e 300 pb (Figura 2C). Provavelmente, a enzima de restrição *Hin*fI gerou dois fragmentos de 135 pb, já que a soma dos três fragmentos visualizados em gel (Figura 2B) não equivale ao total de 750 pb. As demais enzimas testadas não digeriram os produtos amplificados.

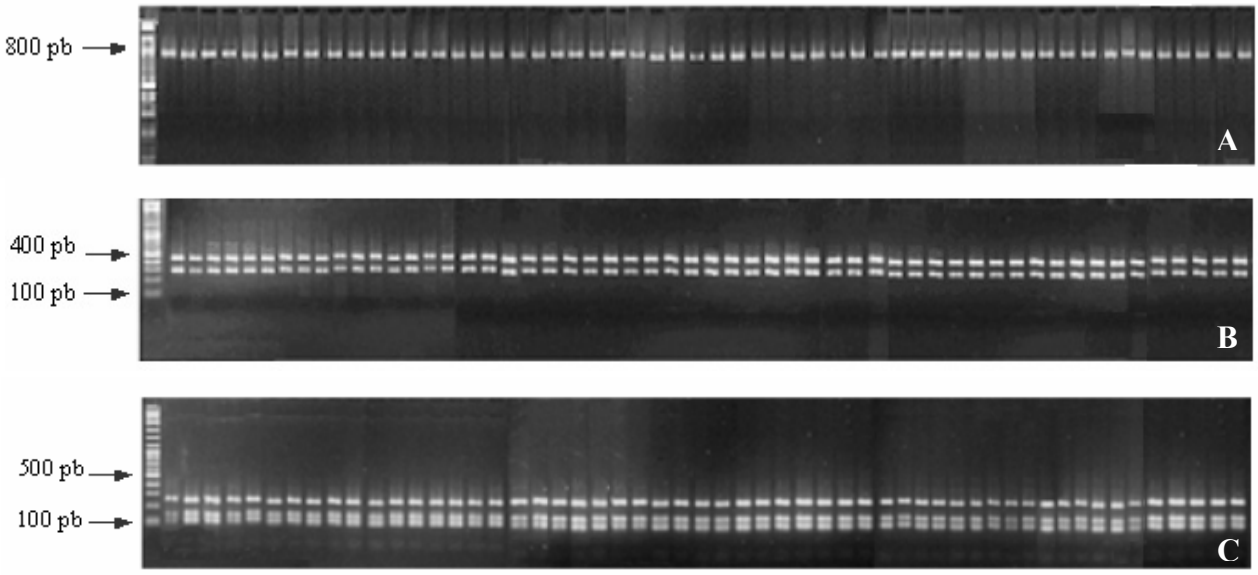

Figura 2 - Amplificação e RFLP das regiões espaçadoras ITS e do gene 5.8S em 55 isolados de *C. perniciosa*. **A**. Amplificação utilizando os *primers* ITS1 e ITS4. **B**. RFLP com a enzima *Hin*fI. **C**. RFLP com a enzima *Msp*I.

As digestões das regiões ITS e de 5.8S amplificadas produziram perfis de bandas idênticos para todos os isolados quando analisados em eletroforese em gel de agarose a 1%. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Arruda et al. (2003a) que ao analisarem o tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir das amplificações das regiões de ITS e 5.8S não encontraram nenhuma variabilidade para os 120 isolados testados. Da mesma forma, Leal Jr. (2002) não observou nenhuma variação na seqüência das regiões ITS e 5.8S para isolados de diversas origens e hospedeiros.

O polimorfismo de seqüência e/ou de tamanho das regiões ITS do rDNA pode ser usado para caracterizar fungos patogênicos como espécie (WAALWIJK et al. 1996, FATEHI; RIDGE 1998, ARORA et al. 1996, MILLER et al. 1999), mas não demonstrando eficiência para detectar variabilidade intra-específica (ARRUDA et al., 2003a). Segundo Leal Jr. (2002) a especificidade no tamanho do fragmento gerado permite que os iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990)

possam ser utilizados como sonda para diagnóstico molecular por técnica de PCR e identificar isolados como *C. perniciosa*.

Diante dos resultados obtidos, pode-se confirmar que todos os isolados amazônicos analisados pertencem à espécie *C. perniciosa* e que as regiões ITS acrescidas do gene 5.8S foram ineficientes na detecção de variabilidade genética intraespecífica.

5.2 Caracterização dos isolados utilizando seqüências teloméricas

Após a confirmação da identidade dos isolados como *C. perniciosa*, procedeu-se a análise de confirmação de biótipo e análise da variabilidade genética dos isolados. A amplificação de seqüências teloméricas repetitivas foi empregada para a comprovação da categorização como biótipo dos 46 isolados amazônicos (24 do Pará, 17 de Rondônia e 5 do Amazonas), tendo como controle positivo os quatro isolados da Bahia e como controle negativo os cinco isolados oriundos dos demais hospedeiros (Tabela 1).

Esta análise foi baseada no método proposto por Rincones et al. (2006), que ao analisarem 38 isolados de *C. perniciosa*, pertencentes aos biótipos C, -S e -L oriundos de diversas regiões do Brasil (Bahia, Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso e Minas Gerais) e Equador, utilizando o iniciador TeloC1 diferenciaram os isolados dos biótipos S e L daqueles do biótipo C, que apresentaram padrão de bandas invariável. Diante deste resultado, estes autores sugeriram que o padrão de amplificação monomórfico obtido empregando o *primer* TeloC1 poderia ser utilizado como indicador do biótipo C para isolados de *C. perniciosa*.

Os isolados da Bahia utilizados no presente estudo foram parte daqueles analisados por Rincones et al. (2006). Estes isolados da Bahia (biótipo C) revelaram perfil de bandas idêntico àquele descrito previamente por Rincones et al. (2006) quando da amplificação utilizando o *primer* TeloC1. A maioria dos isolados oriundos da Amazônia apresentou perfis idênticos aos

obtidos a partir de isolados da Bahia. No gel esse padrão está representado pela amplificação obtida a partir do DNA do isolado C32 (Figura 3). Entretanto, outros isolados amazônicos quando avaliados, além do perfil de bandas verificado por Rincones et al. (2006) para o biótipo C, também foram encontrados mais dois perfis distintos: um perfil para o isolado C17 de Cacaulândia, Rondônia; e outro para os isolados C31 e C50, ambos oriundos de Cacaulândia, Rondônia e C49 de Cametá, Pará. Já para os outros biótipos testados (biótipo -S e -L) foi observado polimorfismo superior, corroborando os resultados encontrados por Rincones et al. (2006) (Figura 3). Os ensaios de amplificação e a eletroforese foram repetidos pelo menos cinco vezes com resultados idênticos.

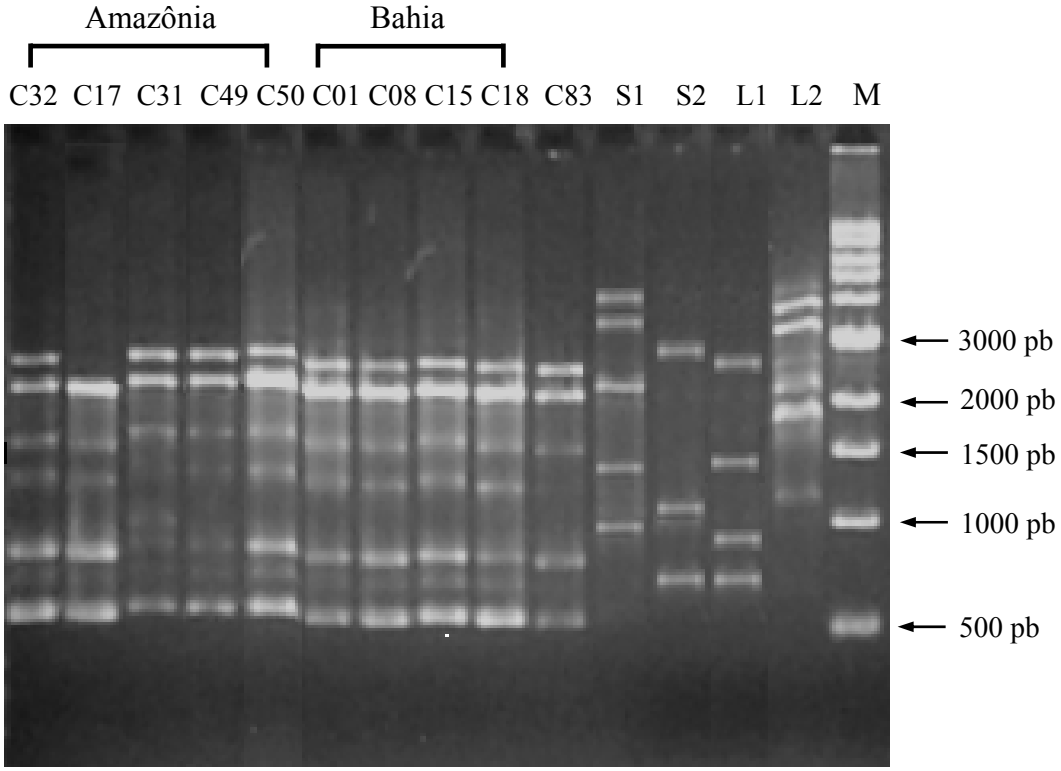

Figura 3 - Resultado da amplificação de seqüências teloméricas com o *primer* TeloC1. Perfis de bandas encontrados em isolados do biótipo C na Região Amazônica (C32-C50); em isolados do biótipo C da Bahia (C01-C18); e para diversos hospedeiros (*Herrania* sp. – C83, *Solanum paniculatum* – S1, *Capsicum frutescens* – S2 e Lianas – L1 e L2); M. Marcador 1 Kb.

De acordo com os resultados obtidos, pode ser sugerido que existe uma maior variabilidade genética para o biótipo C na Amazônia, principalmente para isolados oriundos de Rondônia (Cacaulândia), região de ocorrência silvestre de *Theobroma cacao*. Apesar disso, o *primer* TeloC1 revelou parcial especificidade em separá-lo dos demais biótipos, diferentemente ao proposto por Rincones et al. (2006).

O fato de Cacaulândia, Rondônia estar localizada numa área de ocorrência endêmica do *T. cacao* e do *C. perniciosa*, pode explicar a presença de maior variabilidade para o biótipo C. Assim como a presença de cacaueiros introduzidos sub-espontâneos, instalados há mais de 300 anos em Cametá, Pará poderia suportar a existência da variabilidade genética encontrada. A implantação do cacaueiro em Cametá se deu a partir da dispersão de sementes e frutos por meio de estímulo humano (SANTOS et al., 2004). Tal introdução pode ter sido originária do Alto Amazonas, região de possível centro de diversidade do cacaueiro (SERENO et al., 2005), ou mais provavelmente, de Belém, Pará (BARTLEY, 2005). Uma outra hipótese de introdução do cacau e do *C. perniciosa* neste município, seria por meio do cupuaçuzeiro, um outro hospedeiro do patógeno que se encontra de forma silvestre nesta região.

O grau de variação para o padrão de amplificação por TeloC1 encontrado na população de isolados amazônicos, contrastado com o resultado obtido por Rincones et al. (2006), também pode ser justificado pela maior quantidade de isolados amostrados (46) na Amazônia, abrangendo uma maior área geográfica, enquanto Rincones et al. (2006) analisaram apenas nove isolados amazônicos para o biótipo C. Um outro aspecto a ser analisado é a ausência de variação genética dos isolados da Bahia em comparação aos isolados amazônicos, a qual pode ser justificada pela recente introdução do *C. perniciosa* nesta região.

É importante ressaltar o risco de novas introduções de isolados amazônicos ao sul da Bahia, considerando a sua maior variabilidade genética, o que pode aumentar o risco de quebra

de resistência das cultivares em implementação. Portanto, a restrição destas introduções é extremamente necessária para evitar maiores danos à cacauicultura baiana.

Iniciador para uma outra seqüência repetitiva de telômero foi utilizado, conforme proposto por Rincones et al. (2003; 2006), visando a caracterização da diversidade genética dos mesmos 46 isolados amazônicos e dos quatro da Bahia. A amplificação foi realizada empregando o *primer* TeloA1R que gerou um total de sete bandas distintas entre os isolados (Figura 4). Os isolados Amazônicos foram separados em oito grupos e os da Bahia em dois grupos de acordo com o padrão de bandas obtido.

Os isolados amazônicos separaram-se principalmente em dois grupos maiores (G1 e G2), e em outros seis representados por apenas um único perfil de fragmentos amplificados (Figura 4). A maioria dos isolados amazônicos foi classificada no grupo G1 (Figura 4), incluindo a maior parte dos isolados do Pará (18 em 24 isolados; 75%), como C1 (Anapú); C2 e C33 (Altamira); C4 (Brasil Novo); C6, C7, C8, C9, C10 e C11 (Medicilândia); C12 e C13 (Uruará); C018 e C19 (Santarém); C47 (Cametá); C51 (Baião) e C52 e C53 (Mocajuba). Este grupo também continha isolados de Rondônia (10 em 17 isolados; 58,8%), como C26, C28, C29 e C30 (Ariquemes); C34 (Jarú); C38, C39, C40 e C41 (Ouro Preto D'Oeste); C44 (Ji-Paraná), assim como a quase totalidade dos isolados do Amazonas (4 em 5 isolados; 80%), (C21, C22, C24 e C25).

No grupo G2 a maior parte dos isolados foram oriundos de Rondônia, onde se verificou a presença dos isolados de Ariquemes (C27); Cacoal (C42); Ji-Paraná (C03 e C45) e Cacaulândia (C32). Os únicos representantes do Pará neste grupo foram todos os isolados C15 e C16, de Alenquer. Os isolados C5 de Brasil Novo (PA), C17 e C31 de Cacaulândia (RO), C49 e C50 de Cametá (PA) e C23 de Manaus (AM) agruparam-se isoladamente, cada um com perfil distinto.

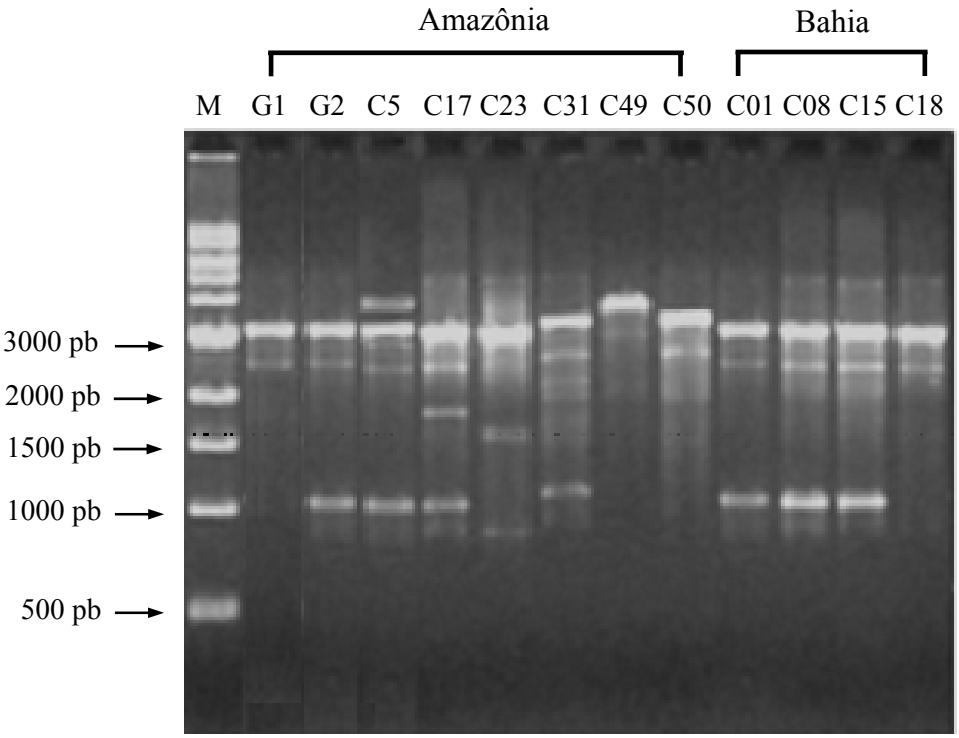

Figura 4 - Amplificação de seqüências teloméricas utilizando o *primer* TeloA1R. Representantes dos distintos perfis de isolados da Região Amazônica; Perfis de bandas dos isolados da Bahia; M. Marcador 1 Kb.

Como descrito anteriormente com o *primer* TeloC1, houve a formação de dois perfis de isolados amazônicos que se diferenciaram da grande maioria deles, sendo um perfil representado pelo isolado C17 de Cacaulândia e o outro perfil pelos isolados C31 de Cacaulândia, e C49 e C50 de Cametá. Entretanto, com a amplificação do *primer* TeloA1R, já foi possível visualizar diferenciação entre os isolados C31, C49 e C50, onde cada um exibiu um perfil de bandas diferente.

Nota-se, portanto, que no Pará, Cametá foi o maior destaque em variabilidade genética (3 perfis distintos) para o *C. perniciosa* (Figura 5), corroborando o resultado obtido na amplificação com o *primer* TeloC1. Todos os isolados oriundos da região produtora de cacau da Transamazônica (Anapú, Altamira, Brasil Novo, Medicilândia e Uruará) apresentaram perfis idênticos, similares àqueles de isolados de Santarém e também de diversos originados de

Rondônia, exceto para um isolado de Brasil Novo (C5). Esse fato sugere que a vassoura-de-bruxa possivelmente foi introduzida nessa região produtora junto com o cacaueiro, que não ocorre de forma silvestre nessa área. É possível que os isolados tenham vindo da região de Santarém (C18 e C19), Cametá (C47), Baião (C51) ou Mocajuba (C53). Os isolados de Rondônia exibiram 4 perfis distintos de produtos de amplificação por TeloA1, em que a maior contribuição para tal variação foi proveniente de isolados coletados em Cacaulândia, Ji-Paraná e Ariquemes, regiões de ocorrência endêmica de cacau. Os isolados coletados em Alenquer no Pará, que possui cacaueiro cultivado a mais de 300 anos, agruparam ao padrão de amplificação dos isolados de Rondônia, de onde esse fungo pode ter sido introduzido, de forma similar ao próprio cacaueiro (SERENO et al., 2005). O Estado do Amazonas foi o que menos se destacou na Região Amazônica em termos de diversidade genética dos isolados, apresentando apenas dois perfis diferentes.

Houve a formação de dois grupos de isolados na Bahia, ambos relacionados à isolados amazônicos. Um dos grupos está representado pela maior parte dos isolados (C01 de Itajuípe, C08 de Itabuna e C15 de Ilhéus) e exibiu perfil de bandas idêntico ao grupo G2 dos isolados amazônicos. O outro grupo, representado apenas pelo isolado C18 de Itapebi, agrupou-se com o G1. Conforme visto anteriormente, a maior parte dos isolados que compõe o grupo G2 originaram de Rondônia, sugerindo que esta região teve importante papel na introdução do *C. perniciosa* na Bahia. Já no grupo G1, a maior participação de isolados é do Estado do Pará, que também demonstra relação com a introdução do patógeno na Bahia (PLOETZ et al., 2005; ANDEBRAHN et al., 1999).

Vale ressaltar que a análise de *bootstrap* referentes aos agrupamentos formados, não revelou valores *P* com elevada robustez, possivelmente devido ao baixo número de bandas analisadas. Entretanto, houve coerência nos resultados aqui descritos, conforme justificativas apresentadas.

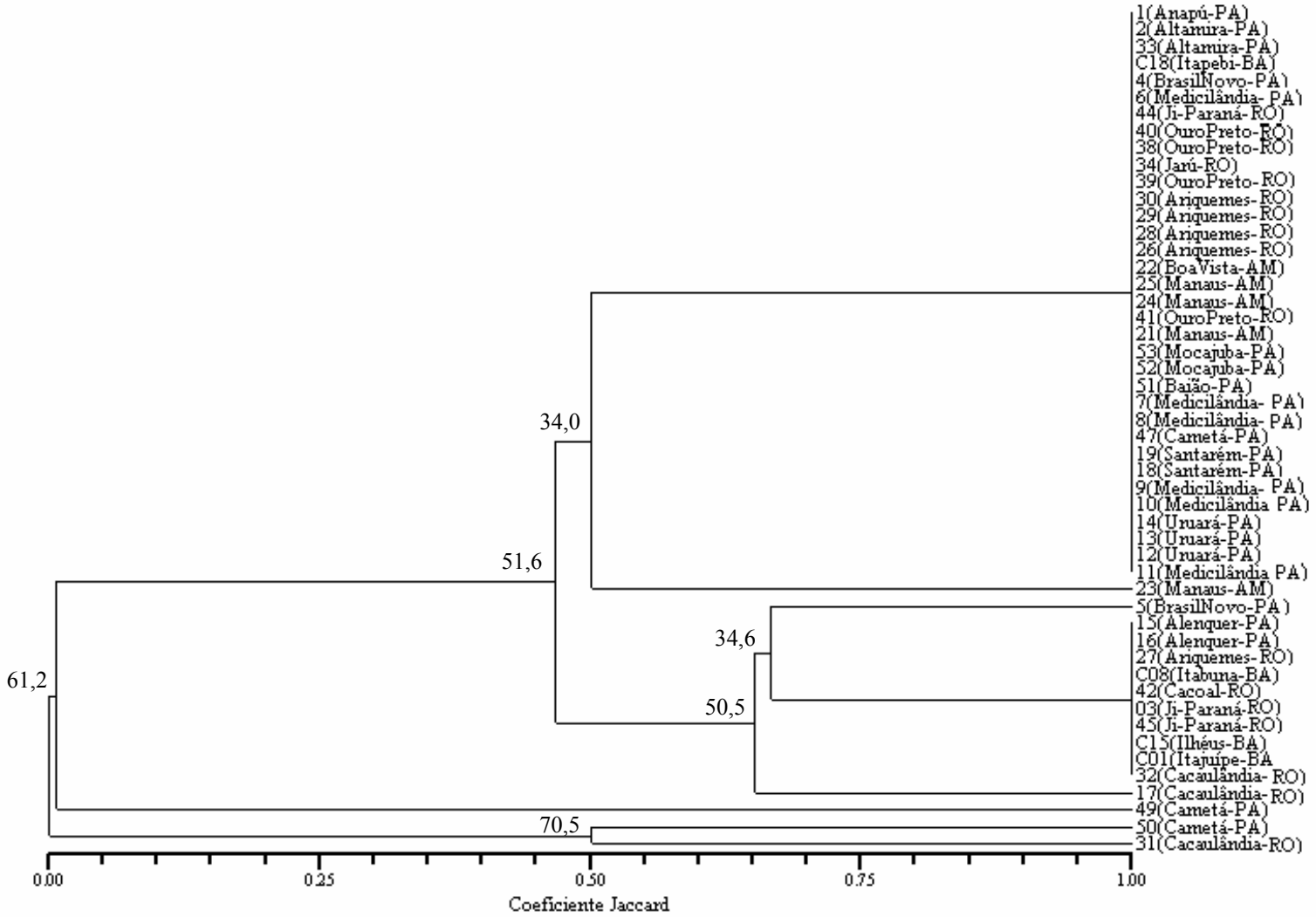

Figura 5 – Dendograma representando relações genéticas entre isolados de *C. perniciosa*, pelo método UPGMA, utilizando seqüências repetitivas teloméricas amplificadas a partir do *primer* TeloA1R. Valores *bootstrap* estão representados na árvore (1000 *bootstrap*).

Rincones et al. (2006) também observaram dois grupos de isolados na Bahia empregando o *primer* TeloA1R. Estes autores ainda investigaram a variabilidade genética dos mesmos isolados através de análise de cariótipo, e sugeriram que rearranjos cromossômicos constituem a primeira etapa na diferenciação populacional do *C. perniciosa*. Os autores citam que os rearranjos observados neste patógeno são gerados a partir de processos meióticos que podem envolver a presença de múltiplas cópias de retrotransposons. Os resultados foram correlacionados com resultados da amplificação com o *primer* TeloA1R na Bahia e para a maioria dos isolados da Amazônia avaliados, permitindo a separação destes últimos em sete grupos.

Utilizando outros marcadores moleculares Ploetz et al. (2005); Arruda et al. (2003a); Andebrhan et al. (1999) verificaram duas populações de *C. perniciosa* na Bahia e sugerem que duas introduções independentes deste fungo, advindas da Amazônia, foram responsáveis pela catástrofe causada pela vassoura-de-bruxa na cacauicultura do Estado. Nossos resultados corroboram esta hipótese, já que os isolados da Bahia agruparam-se com isolados do Pará, Rondônia e Amazonas.

5.3 Diversidade genética e estruturação populacional de *C. perniciosa* utilizando seqüências do tipo ERIC

Seqüências do tipo *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) têm sido utilizadas como alternativa para genotipagem e discriminação de bactérias (VERSALOVIC et al., 1991), e mais recentemente, também têm demonstrado eficiência na caracterização de eucariotos (EDEL et al., 1995; ARORA et al., 1996; JEDRYCZKA et al., 1999; TODA et al., 1999) inclusive *Crinipellis perniciosa* (ARRUDA et al., 2001; 2003b).

Os 50 isolados de *C. perniciosa* coletados de tecido infectado de *T. cacao* coletados em diferentes municípios do Pará, Rondônia, Amazonas e Bahia, também foram avaliados por meio de marcadores do tipo ERIC. O ERIC-PCR do DNA genômico dos isolados de *C. perniciosa* gerou um total de 10 bandas distintas e consistentes, medindo de 150 a 2000 bp (Figura 6). Assim como para os outros marcadores avaliados, foram consideradas apenas bandas mais definidas e que tiveram repetibilidade nas amplificações.

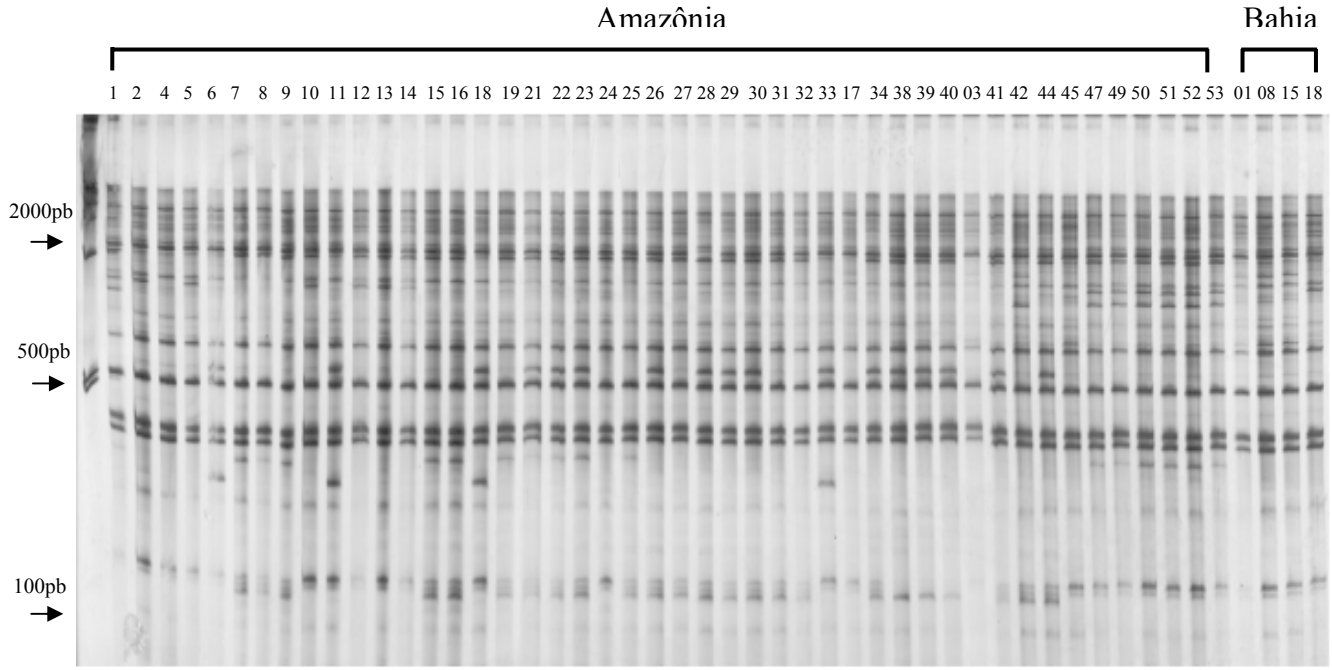

Figura 6 - Gel de poliacrilamida mostrando variabilidade por seqüências repetitivas do tipo ERIC, entre isolados de *C. perniciosa* coletados da Região Amazônica e da Bahia.

A análise de agrupamento dos dados gerados revelou 15 perfis ERIC entre os 50 isolados analisados (Figura 7), caracterizando uma variabilidade relativamente maior que àquela observada com marcadores teloméricos. Os isolados oriundos do Pará e Rondônia produziram o maior número de perfis distintos (oito e sete, respectivamente), sendo os representantes da maior diversidade encontrada nos isolados de *C. perniciosa*. Por outro lado, uma menor variabilidade foi observada em isolados coletados no Amazonas (três perfis) e na Bahia (dois perfis). Em Rondônia, o maior número de perfis variáveis foi observado em isolados oriundos dos municípios de Ji-Paraná e Ariquemes. Já no Pará, destacaram-se em termos de variabilidade os isolados oriundos de Medicilândia. Os isolados C17 e C31 de Cacaulândia, Rondônia, e C49 e C50 de Cametá, Pará também agruparam-se separadamente, corroborando os resultados obtidos com os iniciador telomérico TeloA1R e reforçando a presença de diferenciação genética entre estes isolados.

Isolados coletados em municípios localizados na Transamazônica, como Anapú, Altamira, Brasil Novo, Medicilândia e Uruará apresentaram maior similaridade com isolados de Santarém, Cametá, Baião e Mocajuba (Figura 7). Como já descrito, na Transamazônica não há ocorrência de cacaueiros silvestres, e todo o cultivo existente foi introduzido pela CEPLAC de localidades mais próximas (região de Belém ou Santarém, Pará). Entretanto, em Cametá, Mocajuba e Baião, áreas circunvizinhas de Belém, existe cacau introduzido estimulado e cultivado há bastante tempo (mais de 300 anos) (BARTLEY, 2005). Similaridades entre os cacaueiros de Belém e Cametá também foram verificadas por Pound, em 1937, em uma expedição feita nestas regiões (BARTLEY, 2005). Esta forte relação sugere que os isolados da Transamazônica podem ter sido originados da região de Belém, Pará.

Pelo dendograma, foi possível ver uma separação geográfica grosseira entre os estados (exceto BA), mesmo que a análise do *bootstrap* não tenha revelado valores *P* muito robustos (*P* <

70%). Podem ser sugeridos cinco grupamentos de isolados: um grupo de isolados que podem ter sido advindos de Belém (Anapú – PA, Cametá – PA, Mocajuba – PA, Baião – PA); um grupo formado por isolados da Transamazônica (Altamira – PA, Medicilândia – PA, Brasil Novo – PA, Uruará – PA) e por um isolado da Bahia que podem ter sido oriundo desta região (Itapebi – BA); um grupo composto por isolados de Rondônia (Ji-Paraná e Cacaulândia) e por outros isolados que podem estar relacionados a este Estado (Brasil Novo – PA, Manaus – AM, Ilhéus – BA, Itajuípe – BA, Itabuna – BA); um outro grupo formado por isolado da Transamazônica/Amazonas (Altamira – PA, Medicilândia – PA, Alenquer – PA, Santarém – PA, Manaus – AM, Boa Vista – AM); e finalmente um outro grupo composto apenas por isolados de Rondônia (Ariquemes, Ouro Preto D'Oeste, Ji-Paraná, Jarú, Cacaulândia e Cacoal). Possivelmente, a análise de apenas 10 bandas polimórficas amplificadas pode ter propiciado a baixa robustez nos resultados. Os isolados oriundos de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia formaram um grupo significativamente (P = 88,3%) separado dos demais isolados.

Arruda et al. (2003b) utilizaram o marcador ERIC em isolados de *C. perniciosa* de *T. cacao*, *Solanum lycocarpum* e *Heteropterys acutifolia* oriundos da Bahia, Pará, Rondônia, Mato Grosso e Minas Gerais, e identificaram 15 perfis distintos, em que também houve a separação dos isolados conforme a origem geográfica.

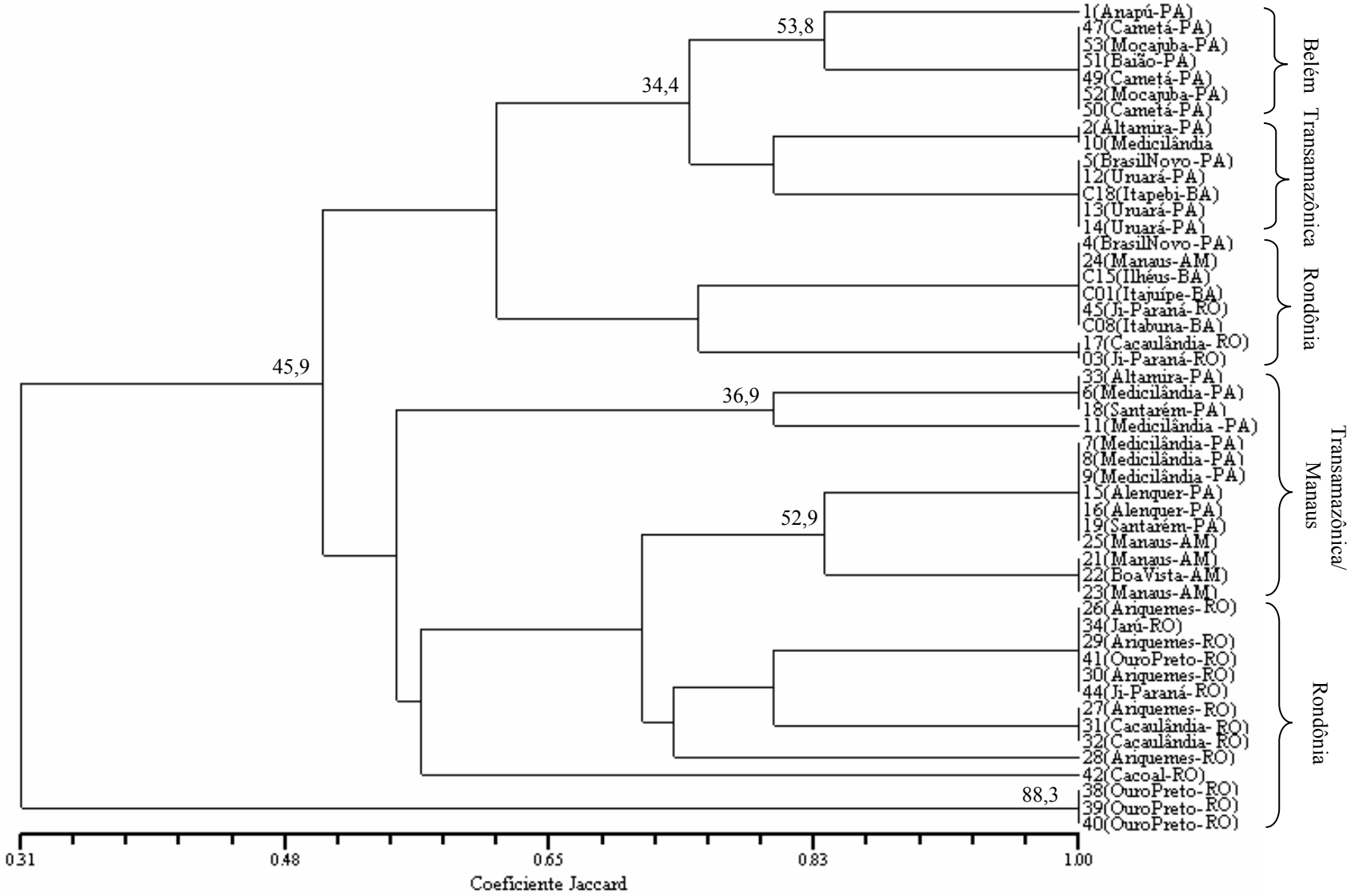

Figura 7 - Dendograma representando relações genéticas entre isolados de *C. perniciosa*, pelo método UPGMA utilizando seqüências ERIC. Valores *bootstrap* estão representados na árvore (1000 *bootstrap*).

De acordo com os resultados obtidos com o ERIC-PCR, pode-se sugerir que na Amazônia, os municípios de Medicilândia (PA) e Ji-Paraná e Ariquemes (RO) podem ser locais alternativos de investigação de isolados a serem testados nas variedades de cacau atualmente consideradas resistentes ao *C. perniciosa*, auxiliando ao programa de melhoramento desta cultura. A grande variabilidade desses dois municípios de Rondônia em isolados também foi revelada por amplificação com *primer* TeloA1R.

Vale ressaltar que no caso do Amazonas, a baixa diversidade de isolados poderia ser decorrente do baixo número de amostragem, quando comparado com Rondônia e Pará. Apenas 5 isolados do Amazonas foram avaliados, sendo 4 deles de Manaus e 1 de Boa Vista. Talvez com a ampliação do número e áreas de coleta no Amazonas fosse possível identificar uma variabilidade maior. Para população de isolados da Bahia, esse resultado pode estar condizente com a recente introdução do *C. perniciosa*, associada ao isolamento geográfico e estratégia de reprodução do patógeno.

5.4 Diversidade genética de *C. perniciosa* utilizando microssatélites

A fim de obter informações mais detalhadas a respeito da genética de populações do *Crinipellis perniciosa* na Região Amazônica e Bahia, foram utilizadas amplificações de microssatélites, por serem altamente informativos, devido sua natureza multi-alélica e co-dominante.

5.4.1 Caracterização de locos microssatélites para *C. perniciosa*

Sequências genômicas contendo motivos de microssatélites depositadas no banco de dados de *C. perniciosa* foram identificadas a partir de buscas arbitrárias usando sequências repetidas de di-, tri- e tetra-nucleotídeos. Em seguida, procedeu-se ao desenho de 12 pares de iniciadores complementares às regiões flanqueando as seqüências de microssatélites, usando os programas Pimer3 e Net*Primer*. Para validação dos locos e otimização da resolução dos fragmentos amplificados, houve a necessidade de aumentar a temperatura de anelamento para alguns locos (dados não apresentados).

Para a análise da diversidade genética, um total de dezessete locos microssatélites foi testado em 50 isolados de *Crinipellis perniciosa*, distribuídos nas populações do Pará, Rondônia, Amazonas e Bahia. Dentre estes locos, cinco foram identificados por Gramacho et al. (2006) (Tabela 2), e os outros doze foram desenhados neste estudo (Tabela 5).

Dentre os 12 pares de iniciadores desenhados e analisados empregando os 50 isolados, cinco (41,7%) mostraram-se polimórficos (*mCpCena3*, *mCpCena4*, *mCpCena8*, *mCpCena11*, *mCpCena12*); cinco (*mCpCena2*, *mCpCena5*, *mCpCena7*, *mCpCena9*, *mCpCena10*) foram monomórficos (41,7%), e apenas dois (16,7%) não amplificaram nenhum fragmento sob as diversas condições testadas (*mCpCena1*, *mCpCena6*).

Gramacho et al. (2006) desenhou um total de 64 pares de iniciadores para amplificação de microssatélites em *C. perniciosa*, dos quais 12 foram selecionados como polimórficos. Cinco destes foram utilizados no presente estudo, de forma a ampliar o acesso aos locos microssatélites do patógeno (Tabela 3). Destes cinco locos identificados por Gramacho et al. (2006), dois locos (40%) foram polimórficos (*MsCepec_Cp15* e *MsCepec_Cp19*) e os demais (60%) apresentaram perfis monomórficos entre os isolados. Para as estimativas de diversidade genética, optou-se por excluir todos os locos monomórficos e com ausência de amplificação.

Tabela 3 - Descrição dos locos desenhados neste trabalho especificamente para *C. perniciosa*

Loco	**Seqüência (5´- 3´)**	**Repetições**	**T_a(ºC)**	**Tamanho dos Alelos (pb)**
*mCpCena*1	F: TACTCCCTTGCCCGCTTGT R: GTGAGTTCTCCTGTGTCCT	$(AC)_{20}$	50	245
mCpCena2	F: GCTTTCTTGACTCGTGGTG R: TACGGAGGTGAGGTAGGTTT	$(GAC)_8$	50	156
mCpCena3	F: CGACAGGAGAGAGAGAAAAA R: CGTTATGGATTGGGCTTAC	$(CAG)_8$	52	146-152
mCpCena4	F: ATTTGGCTTCGTTGCTGGT R: AATCAGAGGCGGGATAGGG	$(CCA)_{11}$	52	292-298
mCpCena5	F: CACTCGTCAACTCCGCAAC R: GATACGCACACCGTCAATC	$(GAG)_{11}$	55	221
mCpCena6	F: TCACTGCCCACTACATTACA R: CTAAATCCTGAACGCCAGA	$(TGAC)_4$	50	234
mCpCena7	F: TAACATAACGACAGCGACAA R: TATCACACGCCACCAGAAA	$(TAC)_2TA(TAC)_6$	50	290
mCpCena8	F: TCGGAAACCAACCAAGAAG R: AGGAAGGAGTCAGAGAGCA	$(TCA)_7$	52	268-274
mCpCena9	F: CTCAGGTTTCTGCTGCTTC R: GTTGCTGTGTTTGTTGTTGT	$(CAG)_8$	50	253
mCpCena10	F: ATAGGCTCCACCATAACCA R: TCAGAGAAAACAAACCCAGA	$(CAG)_7$	50	224
mCpCena11	F: ATGCTGATGAAGAGGAAGAG R: TGGAAGAGAAGAGATGATGG	$(ACC)_8$	50	250-259
mCpCena12	F: GGGACCACCACCATAGAGA R: AACAACAGCCCTAACAACC	$(ACC)_8$	50	278-284

Temperatura de anelamento (T_a)

A partir dos sete locos que amplificaram produtos polimórficos, 19 alelos distintos foram obtidos, sendo 15 alelos oriundos dos locos desenhados neste estudo e apenas quatro alelos oriundos dos locos disponibilizados por Gramacho et al. (2006), com uma média de 2,71 alelos por loco (Tabela 4). O mais alto polimorfismo foi conseguido com o loco *mCpCena11* com quatro alelos e o mais baixo foi obtido com os locos *mCpCena4*, *MsCepec_Cp15* e *MsCepec_Cp19* com 2 alelos cada.

Tabela 4 – Descrição dos locos polimórficos para *C. perniciosa*.

Locos	**A**	H_o	H_e
mCpCena3	3	0,060	0,116
mCpCena4	2	0,000	0,498
mCpCena8	3	0,000	0,665
mCpCena11	4	0,000	0,187
mCpCena12	3	0,000	0,185
MsCepec_Cp15	2	0,000	0,347
MsCepec_Cp19	2	0,000	0,182
Total	19		
Média	2,71	0,010	0,311

Número total de alelos observados por loco polimórfico (A); Heterozigosidade observada (H_o); Heterozigosidade esperada (H_e).

A heterozigosidade só foi observada para o loco *mCpCena3*, com uma média de 0,01 para todos os locos. Em todos os locos a heterozigosidade observada foi inferior a esperada, a qual apresentou média de 0,311 (Tabela 4). O polimorfismo foi reduzido para todos os locos. Houve um grande número de isolados com o mesmo tipo de alelo e poucos variantes (Figura 8).

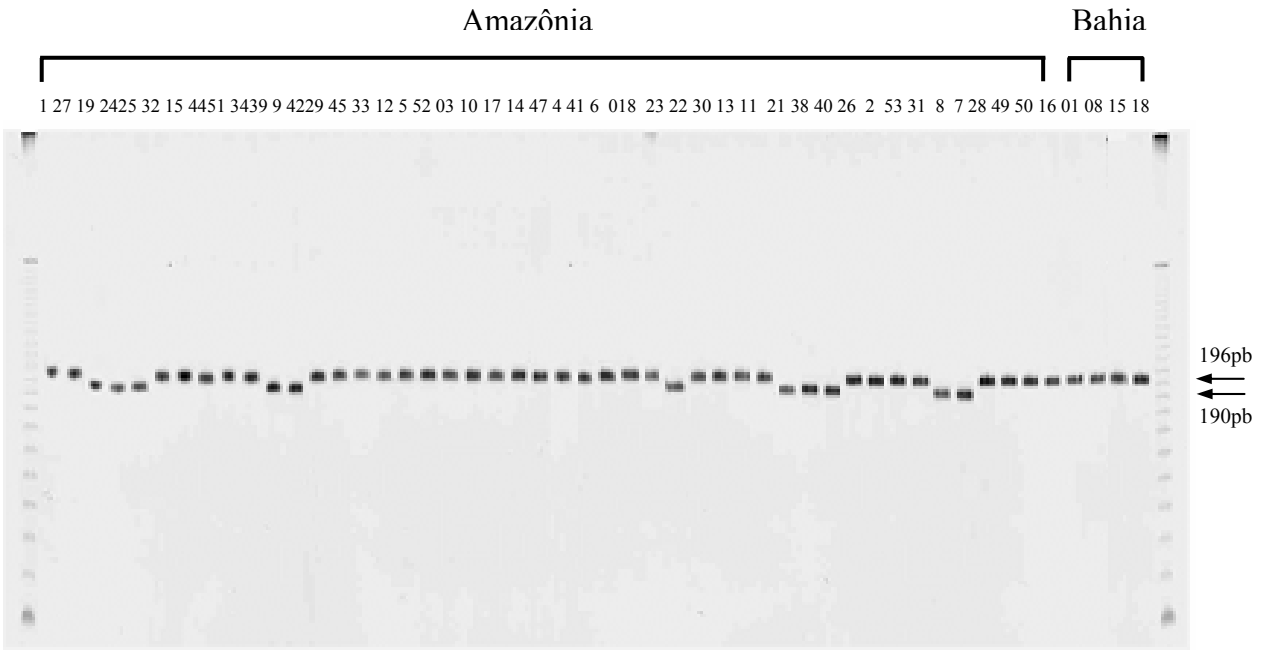

Figura 8 - Perfil de um gel de SSR utilizando o loco *MsCepec_Cp15* em 50 isolados de *C. perniciosa*.

Portanto, a baixa diversidade alélica, associada ao maior nível de homozigose encontradas nos 50 isolados de *C. perniciosa*, utilizando os sete locos de microssatélites apresentados, podem estar coerente com a estratégia de reprodução homotálica do patógeno.

5.4.2 Variabilidade genética dos isolados de *C. perniciosa*

A diversidade genética dos 50 isolados de *C. perniciosa* analisada com base nos sete locos de microssatélites gerou um dendograma, no qual o agrupamento dos isolados pode ser observado (Figura 9). Neste, percebe-se uma maior tendência dos isolados em separar-se geograficamente, em comparação aos demais marcadores analisados, porém ainda percebe-se uma certa mistura de isolados de diferentes Estados. Houve a formação de 13 grupos de isolados, porém com valor *P* baixo (inferior a 70%), possivelmente devido ao baixo número de alelos gerados e avaliados.

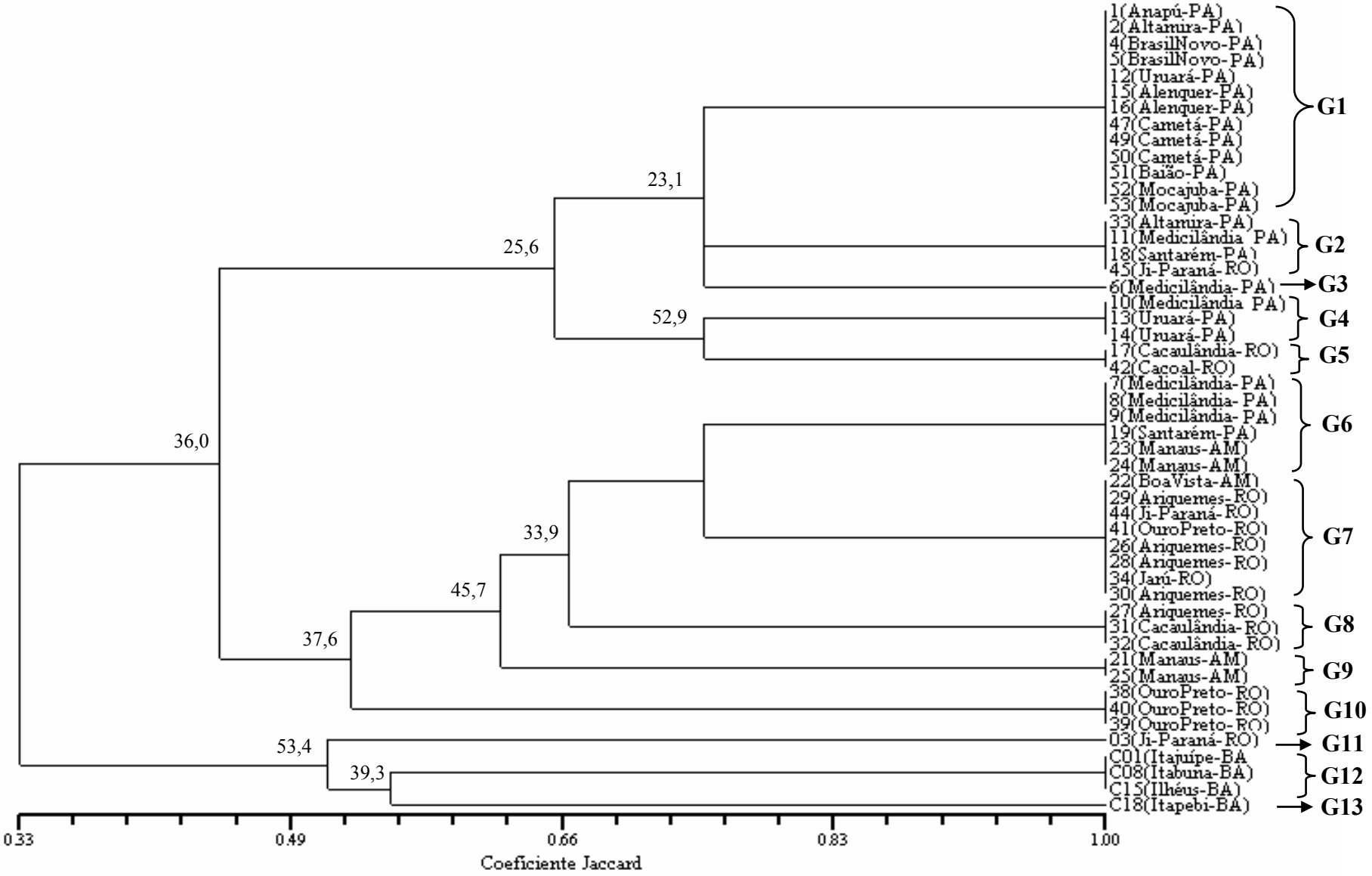

Figura 9 – Dendograma representando relações genéticas entre isolados de *C. perniciosa*, pelo método UPGMA utilizando microssatélites. Valores *bootstrap* estão representados na árvore (1000 *bootstrap*).

Os grupos G1 (13 isolados), G3 (1 isolado) e G4 (3 isolados) foram formados apenas por isolados do Pará, enquanto que os grupos G5 (2 isolados), G8 (3 isolados), G10 (3 isolados) e G11 (1 isolado), apenas por isolados de Rondônia. O grupo G2 apresentou 3 isolados do Pará e 1 isolado de Rondônia. Os isolados do Amazonas agruparam-se em três grupos: G6, G7 e G9, entretanto, no primeiro grupo aglomeraram-se com isolados do Pará, no segundo com isolados de Rondônia e no terceiro agruparam-se sozinhos. Os grupos G12 e G13 foram formados apenas por isolados da Bahia, sendo o G12 composto pelos isolados C01, C08 e C15 e o G13 apenas pelo isolado C18.

Numa visão espacial (Figura 10), referente à análise dos componentes principais (PCA), onde cada um dos 13 grupos está representado por pontos no gráfico, pode-se observar a formação de quatro subgrupos, sendo que três deles encontram-se interligados. As medidas PCA foram plotadas nos dois primeiros eixos (PC1 e PC2) que cumulativamente explicam 45,52% da variação genética. Verificou-se que os grupos compostos apenas de isolados do Pará (G1, G3 e G4), exibindo conexão com isolados do Amazonas (G6) e Rondônia (G2), formaram o subgrupo Pará. Grupos de isolados do Amazonas (G6, G7 e G9) que tiveram ligação com isolados do Pará e de Rondônia formaram o subgrupo Amazonas. Houve ainda a formação do subgrupo Rondônia, composto por grupos de isolados de Rondônia (G5 e G8) com ligação a isolados do Pará (G2) e Amazonas (G7) e por último a composição do subgrupo Bahia, com grupos de isolados da Bahia (G12 e G13). Dentre os grupos de Rondônia G10 (Ouro Preto D'Oeste) e G11 (Ji-Paraná) tenderam a ficar mais afastados dos demais.

Em resumo, verifica-se que a maior variabilidade genética em isolados de *C. perniciosa* está localizada em Rondônia (Ji-Paraná) e que os grupos de isolados amazônicos parecem estar interrelacionados.

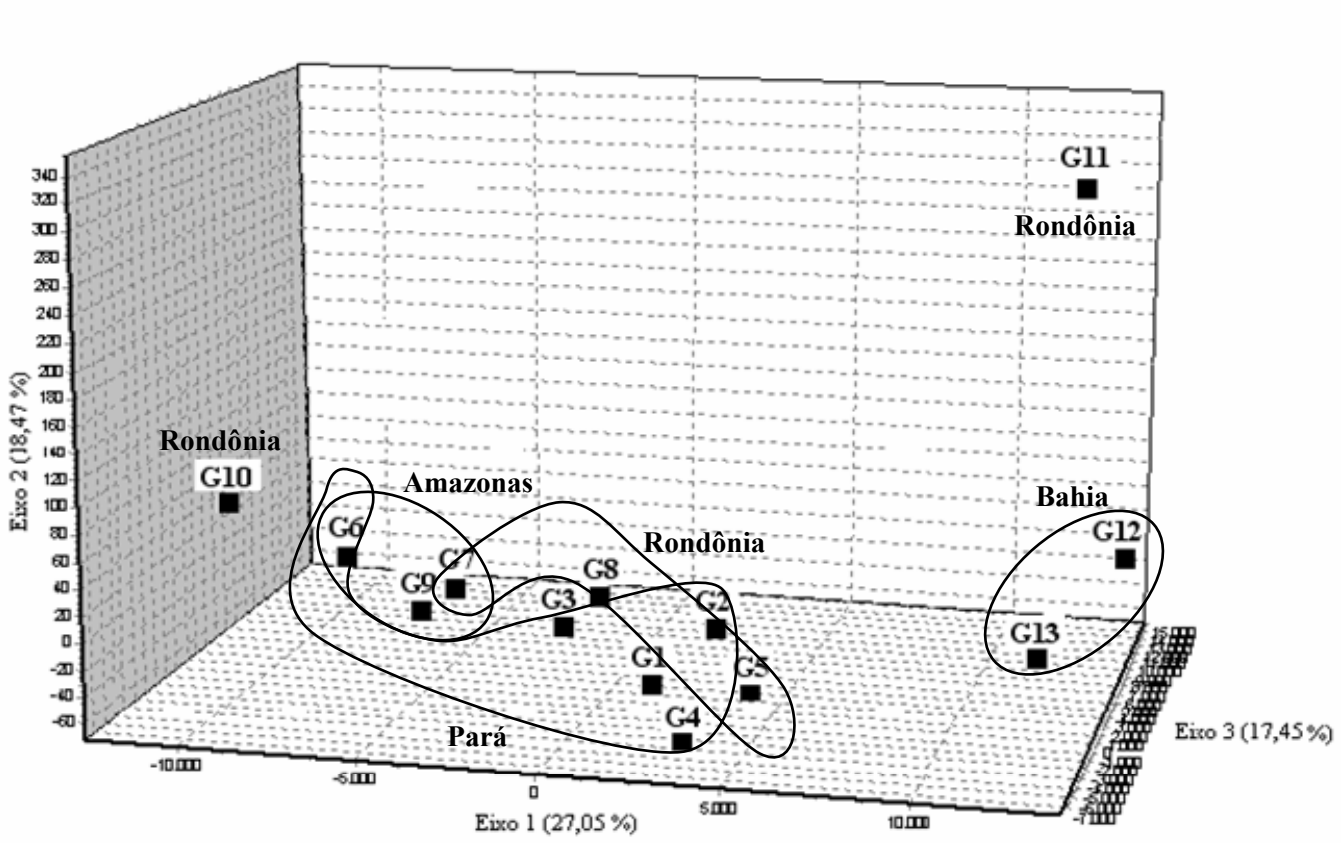

Figura 10 – Análise dos componentes principais (PCA) a partir do estudo dos sete locos microssatélites em 50 isolados de C. perniciosa, usando o programa GENETIX.

5.4.3 Diversidade genética populacional dos isolados

As estatísticas de diversidade gênica foram calculadas baseadas nos sete locos polimórficos microssatélites em um total de 50 isolados agrupados em quatro populações (Amazonas, Pará, Rondônia e Bahia) de acordo com a localização de coleta. Conforme visto na Tabela 5, a população de Rondônia foi a única a apresentar heterozigosidade, porém com uma estimativa muito baixa (0,025) e distante daquela esperada (0,275), indicando novamente a predominância de homozigotos em todos os locos e em todas as populações.

A população de Rondônia apresentou a maior média de alelos por loco (2,14), sendo sua riqueza gênica confirmada pela máxima percentagem de locos polimórficos (100%). Em contrapartida, as mais baixas e idênticas estimativas de locos polimórficos (28,6%) e número médio de alelos por loco (1,29) foram verificadas nas populações do Amazonas e da Bahia.

Uma análise comparativa indicou uma maior variabilidade genética para as populações de isolados amazônicos, principalmente de Pará e Rondônia, em relação aos da Bahia. Tal resultado foi corroborado pelos estudos de seqüências teloméricas empregando-se o *primer* TeloA1R e de seqüências do tipo ERIC. Em Rondônia, o município que apresentou maior variabilidade foi Ji-Paraná e no Pará foi Medicilândia (dados não apresentados).

Tabela 5 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em quatro populações de *Crinipellis perniciosa*

População	**N**	**A**	**P**	H_o	H_S	H_T	D_{ST}	G_{ST}	F_{IS}
Pará	24	1,71	0,571	0,000	0,185				1,000
Rondônia	17	2,14	1,000	0,025	0,275				0,911
Amazonas	5	1,29	0,286	0,000	0,127				1,000
Bahia	4	1,29	0,286	0,000	0,122				1,000
Média				0,006	0,177	0,370	0,193	0,522	

Número de isolados amostrados (N); número médio de alelos por loco (A); porcentagem de locos polimórficos (P); heterozigosidade observada (H_O); diversidade gênica intrapopulacional (H_S); diversidade gênica total (H_T); diversidade gênica interpopulacional (D_{ST}); magnitude relativa de diferenciação gênica entre os subgrupos (G_{ST}) e índice de fixação (F_{IS}).

Características peculiares na constituição da população de isolados de Rondônia, uma região de ocorrência endêmica do cacaueiro, pode explicar o maior número de alelos polimórficos, como também a presença de maior número de alelos raros (Tabela 6). Foram identificados alelos raros para os locos *mCpCena11* (alelo 259 pb) e *mCpCena12* (alelo 284 pb),

com uma freqüência de 0,059, aparecendo no isolado C03 coletado em Ji-Paraná, Rondônia (Tabela 6). A segunda menor freqüência (0,088) foi encontrada para os alelos 146 pb e 152 pb do loco *mCpCena3*, os quais se apresentaram apenas nos isolados C38, C39 e C40 de Ouro Preto D'Oeste, Rondônia. Para os isolados C01, C08 e C15, da Bahia, foram identificados alelos privados nos locos *mCpCena11* (alelo 256 pb) e *mCpCena12* (alelo 281 pb). O loco *mCpCena11* ainda revelou um alelo raro (253 pb) para o isolado C18, corroborando a constatação de variação genética deste em relação aos demais isolados da Bahia, obtida com marcadores teloméricos e ERIC.

Tabela 6 - Alelos exclusivos identificados por locos microssatélites, em 50 isolados de *C. perniciosa*

Locos	**Alelo (pb)**	**Freqüência**	**Isolados**	**Município**
mCpCena3	152	0,088	C38, C39 e C40	Ouro Preto D'Oeste (RO)
	146	0,088	C38, C39 e C40	Ouro Preto D'Oeste (RO)
mCpCena11	253	0,250	C18	Itapebi (BA)
	256	0,750	C01, C08 e C15	Itajuípe/Itabuna/Ilhéus (BA)
	259	0,059	C03	Ji-Paraná (RO)
mCpCena12	281	1,000	C01, C08, C15 e C18	Itajuípe/Itabuna/Ilhéus/Itapebi (BA)
	284	0,059	C03	Ji-Paraná (RO)

Na Região Amazônica, apenas a população de Rondônia apresentou alelos privados e raros (4), demonstrando novamente uma elevada diversidade de isolados neste Estado. No caso da Bahia, a presença de alelos privados pode ser reflexo da ausência de fluxo de materiais propagativos infectados do cacaueiro, como mudas ou sementes, com a Amazônia.

Conforme as estatísticas de Nei, a população de Rondônia apresentou a maior estimativa de diversidade gênica intrapopulacional (H_S = 0,275), seguida do Pará (H_S = 0,185). As estimativas do Amazonas (H_S = 0,127) e da Bahia (H_S = 0,122) foram semelhantes e mais baixas

(Tabela 6). A diferenciação gênica relativa entre populações (G_{ST} = 0,522) foi elevada, refletindo maiores diferenças genéticas entre populações. Nota-se também uma maior diversidade gênica entre populações (D_{ST} = 0,193) em relação ao valor médio da diversidade encontrada dentro das populações (H_S = 0,177).

O coeficiente de fixação (F_{IS}) foi absoluto (igual a 1,0) para as populações do Pará, Amazonas e Bahia, onde a heterozigosidade foi nula. Já no caso de Rondônia, este índice mostrou-se ligeiramente mais baixo, resultante do nível de heterozigotos detectados nesta população.

O coeficiente de diferenciação (F_{ST}) também foi estimado para todos os pares de populações (Tabela 7). A população que mais se diferenciou das demais foi a da Bahia, por apresentar maiores valores para F_{ST}. Esse fato pode estar relacionado ao baixo índice de indivíduos migrantes (N_m), que corresponde a uma medida indireta de fluxo gênico, das populações de fungos amazônicos para a Bahia, devido a maior distância geográfica existente entre eles. Segundo os dados obtidos neste estudo, possivelmente, esses indivíduos migraram para a Bahia na época da introdução (1989) e depois apenas se multiplicaram por clonagem.

Tabela 7 - Matriz mostrando na diagonal superior medidas de migração (N_m) de Wright (1969), e na diagonal inferior medidas do coeficiente de diferenciação (F_{ST}) de Weir e Cockerham (1984), entre as cinco populações de *Crinipellis perniciosa*, utilizando sete locos microssatélites

População	Pará	Rondônia	Amazonas	Bahia
Pará	-	0,62	0,30	0,16
Rondônia	0,288	-	1,03	0,19
Amazonas	0,457	0,195	-	0,07
Bahia	0,608	0,563	0,787	-

De acordo com Valva e Coelho (1998), quando o fluxo gênico é restrito, as populações tenderão a ter uma maior probabilidade de se diferenciarem ainda mais. Por outro lado, uma alta taxa de fluxo gênico homogeniza as diferenças genéticas entre populações, mesmo em presença de uma seleção intensa. No caso do *C. perniciosa*, a migração de isolados entre localidades ou regiões é intermediado por ação humana, haja vista a baixa viabilidade de sobrevivência de propágulos do patógeno a longas distâncias. De acordo com os resultados, entre as populações de isolados da Amazônia as interrelações foram mais freqüentes, onde o grau de divergência genética foi relativamente inferior, do que destes com os isolados da Bahia.

O mais elevado índice de divergência ocorreu entre os isolados da Bahia e do Amazonas, indicando que embora eles tenham exposto uma certa relação genética, torna-se quase descartada a possibilidade de que o Amazonas tenha contribuído com a introdução do *C. perniciosa* na Bahia.

Tabela 8 - Matriz mostrando medidas de distâncias não viesadas de Nei (1978) entre as quatro populações de *Crinipellis perniciosa*, utilizando sete locos microssatélites

População	Pará	Rondônia	Amazonas	Bahia
Pará	0,000	-	-	-
Rondônia	0,134	0,000	-	-
Amazonas	0,221	0,105	0,000	-
Bahia	0,442	0,597	0,979	0,000

A população da Bahia apresentou os valores de distâncias genéticas mais elevados quando comparada a qualquer outra população (Tabela 8). Os isolados de Rondônia e Amazonas são os mais semelhantes, corroborando com os dados de baixa divergência e maior número de migrantes

entre estes Estados. Esta estruturação pode ser visualizada através do dendograma (Figura 11), onde também fica evidente como as populações da Região Amazônica formaram um grupo mais homogêneo e geneticamente mais diferenciado da população da Bahia.

Conforme visto na Figura 10, com este marcador também foi possível identificar a ocorrência de fluxo gênico entre os isolados geograficamente mais próximos, ou seja, entre os isolados amazônicos.

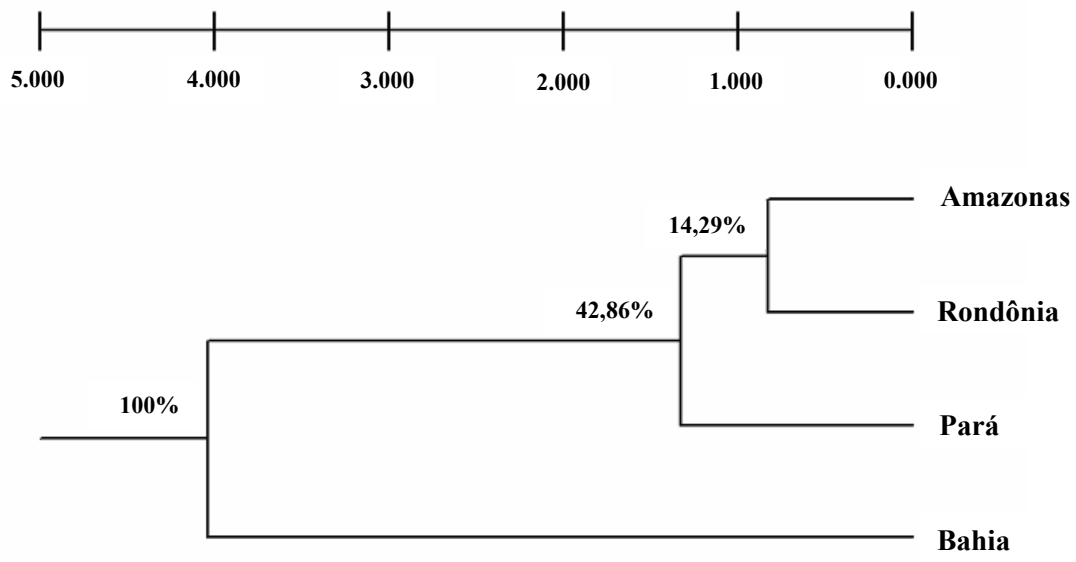

Figura 11 - Representação gráfica da análise de agrupamento, baseada nas distâncias genéticas não viesadas de Nei (1978) de quatro populações de *C. perniciosa*, pelo método UPGMA, utilizando microssatélites.

Este trabalho comprova a existência de variabilidade genética para o *Crinipellis perniciosa.* Já existem algumas especulações sobre a origem de tal variabilidade. A presença de alguns genes de sistema de auto-incompatibilidade sexual (*mating type*) identificados em *C. perniciosa*, poderia promover a ocorrência de cruzamentos entre isolados geneticamente diferentes, e com isso gerar diferenciação nas próximas gerações (COTOMACCI, 2004).

Segundo Rincones et al. (2006), uma outra hipótese que deve ser testada em estudos futuros é a ação de retrotransposons na geração de diversidade genética em *C. perniciosa*. Para estes estudos com locos microssatélites e com os isolados analisados, a segunda opção torna-se mais aceitável, já que o padrão de heterozigose observado em um único loco (*mCpCEN3*) para os isolados C38, C39 e C40, coletados em Ouro Preto D'Oeste, Rondônia, não parece ter sido derivado de um processo de recombinação com os isolados mais próximos (Figura 12). Além disso, o coeficiente de fixação foi praticamente absoluto, ou seja, próximo a 1,0, para todas as populações (Tabela 5). Isto sugere que o *C. perniciosa* sofre diferenciação genética, a qual é passada para gerações subseqüentes por clonagem e menos freqüentemente por processos de cruzamento.

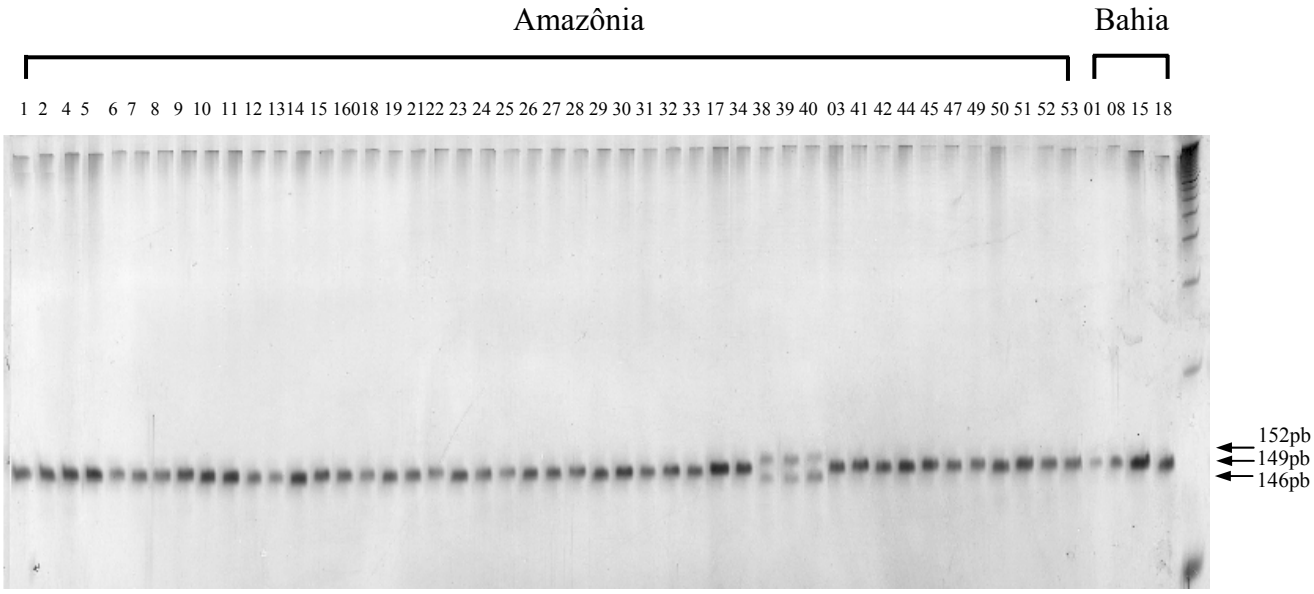

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 7% demonstrando o nível de heterozigose encontrada no loco *mCpCEN3* nos 50 isolados de *C. perniciosa*.

Possivelmente, devido ao pouco tempo de instalação e ao isolamento geográfico do *C. perniciosa* na Bahia, ainda não existam, ou ainda não foram descobertas, grandes diferenças entre

os isolados. Por esse motivo, os programas de melhoramento devem ser eficientes na busca de novas variedades de cacau que possam apresentar resistência durável a uma maior amplitude de patótipos, prevenindo a cacauicultura baiana de maiores danos.

Neste sentido, o presente estudo poderá contribuir no direcionamento em busca de maior concentração de variabilidade genética do *C. perniciosa*, e posterior emprego no melhoramento genético do cacaueiro, promovendo a otimização de tempo e custos.

6 CONCLUSÕES

O *primer* TeloC1, utilizado para amplificação de seqüências teloméricas repetidas do genoma de *C. perniciosa*, demonstrou parcial especificidade para a indicação do biótipo C na Região Amazônica, graças à variabilidade genética dos isolados.

Os marcadores moleculares teloméricos, ERIC e microssatélites foram eficientes em detectar variabilidade genética em isolados de *C. perniciosa*.

Os isolados da Bahia apresentaram maior homogeneidade genética em relação aos amazônicos para todos os marcadores analisados. Dois grupos de isolados foram identificados na Bahia, com similaridade para com os isolados da Amazônia.

Dentro da Região Amazônica, os Estados que demonstraram maior diversidade de isolados foram Rondônia (Ji-Paraná, Ariquemes e Cacaulândia) e Pará (Cametá, Brasil Novo e Medicilândia).

A diversidade genética observada auxiliará na identificação e escolha de regiões com maior diversidade de isolados para serem usados na seleção para resistência à vassoura-de-bruxa em programas de melhoramento do cacau.

REFERÊNCIAS

ABUQUERQUE, P. S. B. et al. Doenças do cacaueiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. cap. 18, v .2, p. 151-164.

ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência *Crinipellis perniciosa* em acessos de cacaueiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**. 2006. 133 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ALMEIDA, C. M. V. C.; DIAS, L. A. S. Recursos genéticos. In: DIAS, L. A. S. (Ed). **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap. 5, p. 163-216.

ALMEIDA, L. C.; ANDEBRHAN, T. **Reação de clones de cacau à *Crinipellis perniciosa***. Belém: CEPLAC/DEPEA, 1984. p. 73-146. (Informe de Pesquisas).

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 49-60, 1998.

ANDEBRHAN, T. et al. Molecular fingerprint suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, London, v. 43, p. 1020-1027, 1994.

ARORA, D. K.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. R. PCR-based molecular discrimination o *Verticillum chlamydosporium* isolates. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 801-809, 1996.

ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003a.

ARRUDA, M. C. C. et al. Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology,** London, v.52, p.236-244, 2003b.

ARRUDA, M. C. et al. Comparação de famílias de DNA repetitivos em populações de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma cacao, Solanumycocarpum* e *Heteropterys acutifólia*. In: Congresso Nacional de Genética, 47., 2001, Águas de Lindóia, **Annals…** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. p. 259.

BAKER, R. E. D.; CROWDY, S. H. Studies in the witches´ broom disease of coca caused by *Marasmius perniciosus* Stahel. Part 1. Introduction, symptoms and aetiology. **Tropical Agriculture**, London, v. 7, p. 1-28, 1943.

BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cocoa. **Phytopathological Paper**, London, n. 2, p. 1-42, 1957.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Cambrudge: CABI Publishing. 2005. 341 p.

BARTLEY, B. G. D. Cacao. Breeding for durable resistance in perennial crops. In: FAO. ***Theobroma cacao***. Rome, 1986. p. 25-42.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 963-965, 1986.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches´ broom disease) on Solanaceous host. **Plant Pathology**, London, v. 34, p. 306-312, 1985.

BASTOS, C. N. Patogenicidade e características do isolado de *Crinipellis perniciosa* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 344-346, 1990.

BASTOS, C. N. Efeito da radiação solar e do período pós-germinativo sobre a viabilidade de pasidiósporos de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 261-263, 1989.

BELKHIR, K. **GENETIX 4.02, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations**. Montpellier: Laboratoire Génome et Populations. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, 2001.

BROWNLEE, H. E. et al. Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p. 39-48, 1990.

CASTRO, G. C. T. et al. Caracterização de recursos genéticos do cacaueiro. III. Flor das seleções CEPEC, EEG, SIAL, MA, RB, CA e CAS. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p. 27-33, 1989.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. **Tropical Agriculture,** London, v. 21, p. 144-159, 1944.

COTOMACCI, C. **Análise genômica do sistema *mating type* de *Crinipellis perniciosa*, fungo causador da vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao***. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

DAHLBERG, A. Somatic incompatibility in ectomycorrhizas. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza**: structure, function, molecular and biotechnology. New York: Springer – Verlag, 1995. p. 115-136.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus,** Rochester, v. 12, n. 1 p. 13-15, 1990.

EDEL, V. et al. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 579-585, 1995.

EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. *Crinipellis perniciosa*: a much investigated but little undertood fungus. **Mycologist**, New York, v. 10, p. 58-61, 1996.

EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. Basidiospore germination as a mean of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, p. 525-536, 1980.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, p. 515-523, 1980.

EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 89, n. 2, p.
185-192, 1978.

FATEHI, J.; BRIDGE, P. D. Detection of multiple rRNA-ITS regions in isolates of Ascochyta. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 762-766, 1998.

FERREIRA, L. F. R. **Diversidade genética de isolados polispóricos de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 787-791, 1995.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 6, p. 552-556, 1991.

GOTSCH, N. Cocoa biotechnology: Status, constraints and future prospects. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, p. 333-352, 1997.

GRAMACHO, K. P. et al. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Ecology Notes**, Nottingham, v. 7, p. 153-155, 2006.

GRIFFITH, G. W. **Population structure of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Sing**. 1989. Ph.D. Thesis - University of Wales, Bangor, 1989.

GRIFFITH, G. W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **Biologist**, Aberystwyth, v. 51, n. 2, p. 71-75, 2004.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, London, v. 99, p. 227-230, 1993.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches´ broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, London, v.71, p.278-289, 1994a.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytologist**, London, v.127, n.2, p.243-259, 1994b.

GRIFFITH, G. W.; WILSON, J.; HEDGER, J. N. Population structure, breeding biology and evolutionary relationships in the biotypes of the witches' broom disease fungus *Crinipellis perniciosa*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11., 1993, Yamoussoukro, Ivory Coast. **Proceedings…** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 1994. p.48-51.

GUILTINAN, M. J. **Cacao**: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops, Berlin: Springer-Verlag, 2007. 30 p.

HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 88, p. 533-546, 1987.

JEDRYCZKA, M.; ROUXEL,T.; BALESDENT, M. H. Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 813-823, 1999.

LAKER, H. A.; SREENIVASAN, T. N.; RAJKUMAR, D. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management**, London, v. 34, p. 318-323, 1988.

LEAL JÚNIOR, G. A. **Diagnóstico de *Crinipellis perniciosa* em tecidos infectados de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e sorológica de isolados coletados de vários hospedeiros**. 2002. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data (software) 2001. Version 1.0 (d15), 2000. Disponível em: <http:www.alleyn.ee.uconn.edu/gda>. Acesso em: 04 nov. 2006.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

McGEARY, F. M.; WHEELER, B. E. J. Growth rates of and mycelial interaction between isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. **Plant Pathology**, London, v. 37, p. 489-498, 1998.

MEINHARDT, L. W. et al. Telomere and microsatellite *primer*s reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 211-215, 2002a.

MEINHARDT, L. W. et al. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic Rainforest region of São Paulo, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 259-267, 2002b.

MEINHARDT, L. W. et al. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 191-196, 2006.

MILLER, M. **Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3**: A windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997. Disponível em: <http:www.public.asu.edu>. Acesso em: 04 nov. 2006.

MILLER, R. N.; QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES C. A. Molecular comparation of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 149-155, 1999.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 70**,** n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NIELLA, G. R. et al. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 523-527, 1999.

NIELLA, G. R. et al. Diferenças na agressividade de isolados de *Crinipellis perniciosa* da região cacaueira baiana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília,v. 26, p. 346, 2001.

PEGLER, D. N. *Crinipellis perniciosa* (Agaricales). **Kew Bulletin**, London, v. 32, p. 731-736, 1978.

PEREIRA, J. L. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 1, p. 79-81, 1989.

PEREZ, J. O. **Caracterização de isolados de *Crinipellis perniciosa*, indução de resistência à vassoura-de-bruxa no cacaueiro e análise de peroxidases na interação planta-patógeno**. 2002. 81 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1998. 35 p. (Boletim Técnico, 181).

PLOETZ, R. C. et al. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis perniciosa* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 111, p. 317-332, 2005.

POUND, F. J. Cacao and witches' broom disease in South America. **Archives of Cocoa Research**, Brussels, v. 1, 1938.

POUND, F. J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius pernicious*). **Archives of Cocoa Research**, Brussels, v. 1, p. 73-92, 1943.

PURDY, L. H.; SCHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review Phytopathology,** Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

RESENDE, M. L. V. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis perniciosa* através de benzotiadiazole (BHT). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 149-156, 2000.

RINCONES, J. et al. Eletrophoretic kariotype analysis of *Crinipellis perniciosa* the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 452-458, 2003.

RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches'broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 821-832, 2006.

ROHLF, J. **NTSYS-pc**: numeral taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.70 (software). New York: Stony Brook, 1992.

RUDGARD, S. A. Witches' broom disease of coca in Rondonia, Brazil, pod losses. **Tropical Pest Management**, London, v. 32, p. 24-26, 1986.

RUDGARD S.A.; MADDISON A. C.; ANDEBRHAN, T. **Disease management in Cocoa:** comparative epidemiology of witches'broom. London: Chapman & Hall, 1993. 249 p.

SABHA, M. **Expressão e detecção de genes envolvidos com patogenicidade de *Crinipellis perniciosa***. 2004. 152 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for population data analysis. (software). Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000. Disponível em: <http//anthropologie.unige.ch/arlequin/>. Acesso em: 04 nov. 2006.

SILVA, P. Cacau e lagartão ou vassoura-de-bruxa: registros efetuados por Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos de 1785 a 1787 na Amazônia. **Boletim Técnico. CEPLAC/CEPEC**, Ilhéus, n. 146, p. 1-21, 1987.

SURUJDEO-MAHARAJ, S. et al. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*)**. Plant Pathology,** London, v.52, p.464-475, 2003.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, nov./dez. 2002. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/cacau.asp>. Acesso em: 03 dez. 2006.

TODA, T.; HYAKUMACHI, M.; ARORA, D. K. Genetic relatedness among and within different *Rhzoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. **Microbiological Research**, v. 154, p. 247-258, 1999.

TREVISAN, S. D. P. Mudanças no sul da Bahia associadas à vassoura-de-bruxa do cacau. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA DE CACAU, 8., 1996, Salvador, BA. **Trabalhos…** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 1996. p. 1109-1116.

VALVA, F. A.; COELHO, A. S. G. Estrutura genética de populações vegetais: estratégias adaptativas do cerrado. In: Congresso Nacional de Genética, 1998, Goiânia, **Annals...** Goiânia: 1998.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WAALWIJK, C. et al. Discordant groupings of *Fusarium* spp. From sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* base on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, p. 361-368, 1996.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution***,* Lancaster, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic races of *Crinipellis perniciosa*? In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8., 1981, Cartagena. **Proceedings…** Catagena: ICRC, 1981. p. 365-370.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED R. **Pathogenic races of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, the causal fungus of witches'broom of cocoa**. London: Imperial College, 1984. (Final Report to the Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance).

WHEELER B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao* L.) **Plant Pathology**, London, v. 37, p. 475-488, 1988.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. **PCR Protocols**: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. The theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago Press, 1969. v. 2, 511 p.

ANEXOS

Anexo A – Freqüências alélicas de sete locos microssatélites em quatro populações de *Crinipellis perniciosa*.

Loco	A	Pará	Rondônia	Bahia	Amazonas
mCpCEN3					
	1	1,0000	0,8235	1,0000	1,0000
	2	0,0000	0,0882*	0,0000	0,0000
	3	0,0000	0,0882*	0,0000	0,0000
mCpCEN4					
	1	0,8333	0,2353	1,0000	0,0000
	2	0,1667	0,8824	0,0000	1,0000
mCpCEN8					
	1	0,6667	0,0000	0,2500	0,4000
	2	0,2083	0,5882	0,0000	0,6000
	3	0,1250	0,4118	0,7500	0,0000
mCpCEN11					
	1	1,0000	0,9412	0,0000	1,0000
	2	0,0000	0,0588*	0,0000	0,0000
	3	0,0000	0,0000	0,7500*	0,0000
	4	0,0000	0,0000	0,2500*	0,0000
mCpCEN12					
	1	0,0000	0,0588*	0,0000	0,0000
	2	1,0000	0,9412	0,0000	1,0000
	3	0,0000	0,0000	1,0000*	0,0000
MsCepec_Cp15					
	1	0,8333	0,8235	1,0000	0,2000
	2	0,1667	0,1765	0,0000	0,8000
MsCepec_Cp19					
	1	0,8750	0,8824	1,0000	1,0000
	2	0,1250	0,1176	0,0000	0,0000

Número de alelos (A); Alelos privados (*)