

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Crinipellis
perniciosa* E *Moniliophthora roreri* UTILIZANDO
MARCADORES RAPD E SSR**

Ricardo Franco Cunha Moreira

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Crinipellis
perniciosa* E *Moniliophthora roreri* UTILIZANDO
MARCADORES RAPD E SSR**

Ricardo Franco Cunha Moreira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ruggiero

Co-orientadora: Dr^a. Karina Peres Gramacho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2006

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RICARDO FRANCO CUNHA MOREIRA – nascido aos 24 de outubro de 1969, na cidade de Coaraci-Ba. Formou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em março de 1994. Em agosto de 2000 concluiu o mestrado em Ciências Agrárias (Fitotecnia) pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Em 2002 ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

“É interessante contemplar a margem luxuriante de um rio, forrada de numerosas plantas que pertencem a distintas espécies, abrigando pássaros que cantam entre os arbustos, insetos variados que zumbem aqui e ali, vermes que circulam pela terra úmida, se imaginarmos que estas formas tão admiravelmente construídas, tão diversamente formadas e dependentes uma das outras de uma maneira tão complexa, foram todas produzidas por leis que agem ao nosso redor. (...) Não haveria uma grandeza verdadeira nessa maneira de considerar a vida, com seus poderes diversos atribuídos primitivamente pelo Criador a um pequeno número de formas, ou até mesmo a uma só? Ora, enquanto nosso planeta, obediente à lei imutável da gravidade, continua a girar sobre sua órbita, uma quantidade infinita de belas e admiráveis formas, saídas de um início tão simples, não deixou de se desenvolver e se desenvolve ainda”.

(A Origem das Espécies – Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi financiada pelo Common Fund for Commodities (CFC), International Cocoa Organization (ICCO) e Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) através do projeto “The use of molecular biology techniques in search for varieties resistant to witches’ broom disease of cocoa” e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Expresso os meus sinceros agradecimentos a estas instituições pelo permanente apoio.

Aos Drs. Uilson Vanderlei Lopes e João Louis Marcelino Pereira, coordenadores técnico e geral, respectivamente, do projeto CFC/ICCO/BIOMOL, pelo incentivo, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Carlos Ruggiero, por me conceder a oportunidade de ingressar em mais um nível na intelectualidade acadêmica e pela orientação e amizade.

A Dra. Karina Peres Gramacho pela competência, dinamismo, orientação, amizade e por me ensinar a ser profissional.

Ao Prof. Rinaldo Cesar Di Paula, coordenador do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela compreensão e amizade.

O reconhecimento a todas as pessoas que colaboraram no envio de isolados do fungo: Karina Solis (Instituto Nacional Autônomo de Investigaciones Agropecuárias – INIAP, Equador); Enrique Arévalo (Universidad Nacional Agrária de la Selva – UNAS, Peru); Jean Philippe (University of Pensilvany – PenState, Estados Unidos); Paulo Albuquerque (CEPLAC, Rondônia).

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Seção de Fitopatologia, Drs. José Bezerra, Edna Dora, Stela Dalva, Luiz Cordeiro, Olívia Cordeiro, da Seção de Genética, Drs. Milton Macoto, José Luiz Pires, Bonadie, da Seção de Fisiologia Vegetal, Dr. Raul Valle pelo convívio, presteza e amizade.

Gratidão, também, aos técnicos do CEPEC, Pacheco, José Carlos, Mará, Cenilda, Lurdinha e Reinaldo pelo apoio e amizade constantes.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Molecular do CEPEC, Nara, Lívia, Leila, Mônica, Walnize, Kaleandra, Tâmara, José Reis e Joselito pelo convívio, companheirismo e inestimável ajuda.

Aos colegas Acassi, Cássia, Ronaldo, Humberto, Edna, Ademildes, Márcia Paim, Márcia, Alfredo, George, Brena, Sandra, Conceição (CEPEC); Simone, Raquel, Gilmara, Gabriela, Natanael, Elma, Basílio, Rita, Franco, Edilma, Márcia Nozaki (UNESP, Jaboticabal); Leonardo (Ministério da Agricultura); Jorge Teodoro (Mars), pessoal da “República Tia Méri” (Jaboticabal).

Aos profissionais da hospedaria da CEPLAC, Alice, Eduardo, Raimunda, Lúcia e Marcelo e aos profissionais da UNESP (Jaboticabal) Nádia Lynn, Marisa, Neli Saccani e Fábio, pelo apoio, tratamento e amizade.

Finalmente, sou profundamente grato a minha família, meu filho Enzo, minha mãe Graça, Gilson, tia Rita, meus irmãos Roney, Tânia e Francisco, meu cunhado Luiz Alberto, meus sobrinhos e demais familiares, pelo amor, compreensão e contínuo apoio.

Esta tese é dedicada à memória de minha mãe Marlene Cunha Moreira.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O patossistema cacaueteiro x <i>Crinipellis</i> e <i>Moniliophthora</i>	3
2.1.1. Distribuição geográfica.....	6
2.1.2. Os fungos <i>Crinipellis perniciososa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i>	9
2.1.2.1. Ciclo de vida.....	9
2.1.2.2. Taxonomia.....	11
2.1.2.3. Sintomatologia.....	13
2.1.2.4. Controle.....	15
2.1.2.5. Hospedeiros.....	18
2.1.2.6. Relação taxonômica entre <i>Crinipellis perniciososa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i>	19
2.1.2.7. Variabilidade fisiológica de <i>Crinipellis perniciososa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i>	20
2.2. Estrutura genética de populações em fitopatógenos.....	23
2.2.1. Análise da estrutura genética com marcadores moleculares.....	24
2.2.1.1. Marcadores dominantes.....	30
2.2.1.2. Marcadores codominantes.....	31
2.3. Mecanismos de variabilidade genética em fungos.....	33
2.3.1. Mutação.....	33
2.3.2. Recombinação meiótica ou reprodução sexuada.....	34
2.3.3. Recombinação parassexual.....	34
2.3.4. Herança citoplasmática.....	35
2.3.5. Heterocariose.....	35
2.3.6. Transposons.....	35
2.3.2. Variabilidade genética de <i>Crinipellis perniciososa</i> e <i>Moniliophthora</i>	

<i>roreri</i>	36
3. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	40
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>Crinipellis pernicioso</i> DO CONTINENTE AMERICANO COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	42
RESUMO.....	42
SUMMARY.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1. Isolados utilizados.....	48
2.2. Extração de DNA.....	52
2.3. Reação de microssatélite.....	52
2.4. Análise de dados.....	54
3. RESULTADOS.....	55
3.1. Estatística descritiva do total de <i>loci</i> amplificados.....	55
3.2. Diferenciação de populações.....	56
3.3. Diversidade genética e diferenciação.....	58
4. DISCUSSÃO.....	63
CAPÍTULO 3 – TRANSFERIBILIDADE DE <i>PRIMERS</i> DE <i>Crinipellis pernicioso</i> PARA <i>Moniliophthora roreri</i> E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES	69
RESUMO.....	69
SUMMARY.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1. Isolados utilizados.....	76
2.2. Extração de DNA.....	77
2.3. Quantificação do DNA.....	77

2.4. Reação de RAPD.....	77
2.5. Reação de microssatélite.....	78
2.6. Análise de dados.....	79
2.6.1. Marcadores RAPD.....	79
2.6.2. Marcadores SSR.....	80
3. RESULTADOS.....	81
3.1. Marcadores RAPD.....	81
3.2. Marcadores SSR.....	82
3.2.1. Estatística descritiva do total de <i>loci</i> amplificados.....	82
3.2.2. Diferenciação de populações.....	84
3.2.3. Diversidade genética e diferenciação.....	84
4. DISCUSSÃO.....	88
4 – CONCLUSÕES GERAIS.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Crinipellis perniciosa* E
Moniliophthora roreri UTILIZANDO MARCADORES RAPD E SSR**

RESUMO - Vassoura-de-bruxa e podridão de *Moniliophthora*, causadas pelos fungos *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri*, respectivamente, são as doenças de maior impacto econômico da cultura do cacau e estão presentes na maioria dos países produtores do Continente Americano. Evidências biológicas e moleculares comprovam que estes fitopatógenos estão intimamente relacionados. O uso de resistência genética através de clones resistentes de cacau, é a medida mais eficiente no controle destas doenças. O conhecimento sobre as populações destes fungos é importante na geração de informações para o programa de melhoramento genético do cacau visando resistência. Marcadores moleculares RAPD e SSR foram usados para analisar a estrutura genética de populações destes fitopatógenos. No geral, as populações do Brasil, Equador, Peru e Trinidad agruparam-se de acordo com o país de origem, apresentando maior variabilidade dentro e não entre países, com presença de subpopulações. A população do Brasil apresentou maior diversidade genotípica em comparação com as demais. A transferibilidade de pares de primers SSR de *C. perniciosa* para *M. roreri* foi satisfatório. Populações de *M. roreri* do Equador e Peru apresentaram alta diferenciação genética interpopulacional, sendo que a do Peru apresentou maior variabilidade.

Palavras-Chave: vassoura-de-bruxa, podridão de *Moniliophthora*, marcadores moleculares, estrutura genética

**GENETIC STRUCTURE OF *Crinipellis perniciosa* AND *Moniliophthora roreri*
POPULATIONS USING RAPD AND SSR MARKERS**

SUMMARY - Witches' broom and frosty pod rot, caused by *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, are the most important diseases of cacao in the American Continent. Biological and molecular data have shown that these pathogens are closely related. Resistance is the most efficient method to control these diseases. Therefore, information about the population structure of these cacao pathogens is important to support the breeding program. Molecular markers such as RAPD and SSR were used to analyze the genetic structure of *C. perniciosa* and *M. roreri* from the American Continent. Populations of *C. perniciosa* clustered according to their country of origin, with more variability within than between countries, revealing the presence of subpopulations. *C. perniciosa* Brazilian populations presented higher genotypic diversity than *C. perniciosa* from other countries. The transferability of *C. perniciosa*-SSR to *M. roreri* was positive. On the contrary, high interpopulation variability was observed between Ecuador and Peru, being *M. roreri* from Peru much more diverse than Ecuador.

Keywords: witches' broom, frosty pod rot, molecular markers, genetic structure

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As doenças do cacau (*Theobroma cacao* L.) representam um importante fator na economia desta cultura face às perdas que elas causam na produção e aos elevados custos para o seu controle. A vassoura-de-bruxa causada pelo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer e podridão de *Moniliophthora* causada por *Moniliophthora roreri* (Ciferri) Evans et al. são as principais doenças de maior impacto econômico desta cultura, presente nos países produtores de cacau da América do Sul, Central e Ilhas do Caribe (PURDY & SCHMIDT, 1996).

Os efeitos devastadores destes fitopatógenos no cacau têm sido de grandes proporções e documentados em diferentes países e épocas. Do mesmo modo que a vassoura-de-bruxa, podridão de *Moniliophthora* tem se disseminado ao longo das regiões costeiras do norte e sul do Pacífico da América do Sul, e também mais recentemente próximo a Amazônia, sendo um perigo eminente para as plantações de cacau do oeste do Brasil (GRIFFITH et al., 2003).

Diversos métodos têm sido testados no controle a estas doenças, incluindo-se os controles cultural, biológico e químico. Entretanto, sua adoção por parte do agricultor tem sido limitada por sua baixa eficácia ou seu elevado custo. Uma alternativa para este quadro é a utilização de variedades resistentes, por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível aos agricultores.

Resistência genética a doenças é um dos principais componentes do sistema integrado de proteção de plantas (FLORIS & ALVAREZ, 1996) e em longo prazo é a medida de controle mais eficiente no combate a vassoura-de-bruxa e a podridão de *Moniliophthora*. Informações a respeito das populações destes fungos são importantes para melhor entender a dinâmica de epidemias e auxiliar no desenvolvimento de materiais resistentes a estas doenças.

Marcadores moleculares são ferramentas úteis na análise de variação genética em populações de fungos fitopatogênicos (McDERMOTT & McDONALD, 1993; MILGROOM & FRY, 1997). Desta maneira, o conhecimento da estrutura genética das populações de *C. pernicioso* e *M. royeri* nas principais regiões produtoras de cacau do Brasil e do exterior é importante na geração de informações para o programa de melhoramento genético do cacau no desenvolvimento de variedades resistentes a estas doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O patossistema cacauero x *Crinipellis* e *Moniliophthora*

As principais doenças do cacauero no Continente Americano são a vassoura-de-bruxa e a podridão de *Moniliophthora*. Ambas têm causado danos de até 100% em muitas plantações. A vassoura-de-bruxa é endêmica da planície Amazônica. A doença foi registrada oficialmente por Went em 1940, que relata sua ocorrência, em 1895, no Suriname, causando sérios prejuízos no município de Saramacca (HOLLIDAY, 1952). A doença manteve continuidade com seu invasivo comportamento pelo Continente Americano, sendo no ano de 1989 detectada no sul da Bahia (PEREIRA et al., 1989). Desde então, a produção de cacau na região vem reduzindo, levando ao abandono de muitas das propriedades, resultando em uma crise econômica e social sem precedentes nesta região. Atualmente a produção de cacau no Brasil está em torno de 169.000 toneladas de amêndoas, situando-se o país em quinto lugar na produção mundial (FAO, 2005). Podridão de *Moniliophthora* é endêmica do noroeste da América Latina e foi registrada pela primeira vez no Equador em 1918 (RORER, 1918) e posteriormente disseminada para a maioria dos países da América Central (EVANS, 1981; EVANS et al., 2003; GRIFFITH et al., 2003).

A vassoura-de-bruxa, juntamente com fatores estruturais e conjunturais (preço baixo no mercado interno, custo de produção elevado, defasagem do câmbio e falta de financiamento), reduziu a contribuição da produção de cacau brasileira no mercado mundial de 15% para 4,3%, entre os anos de 1989 e 1998 (PERES FILHO, 1998), tornando o Brasil, um país tipicamente exportador, em importador de cacau. Esta redução acentuada da produção nacional resultou no fechamento do quarto maior parque moageiro de sementes do Brasil, instalado no estado da Bahia (PERES FILHO, 1998).

A alta incidência e conseqüentemente perdas na produção provocadas pela podridão de *Moniliophthora* são alarmantes, a ponto de, em muitas áreas aonde a

mesma se faz presente, há o total desencorajamento e abandono das plantações de cacau pelos produtores (ENRIQUEZ et al., 1981). Enquanto o fungo causador da vassoura-de-bruxa infecta qualquer tecido em crescimento, o agente causal da podridão de *Moniliophthora infecta* somente frutos em qualquer estágio de desenvolvimento, não causando infecção na parte aérea do cacau como acontece com a vassoura-de-bruxa, além de não provocar frutos do tipo morango ou cenoura (RAM et al., 2004).

O cacau é uma planta alógama, diplóide ($2n = 20$), de pequeno genoma (genoma haplóide de 0,43 pg) (FIGUEIRA et al., 1992), nativa das florestas tropicais úmidas das Américas Central e do Sul, pertencente à família Sterculiaceae e gênero *Theobroma*, sendo que, recentemente foi proposto a sua mudança para a ordem Malvales, família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999; APG II, 2003). Esta espécie é a mais importante economicamente dentre as 22 que compreendem o gênero (COPE, 1976). Foi citado pela primeira vez em 1605 por Charles de L'Écluse que o denominou *Cacao fructus*. Em 1737, foi descrito por Carl Linnaeus como *Theobroma fructus*, sendo que essa classificação permaneceu até 1753, quando foi definitivamente designado como *Theobroma cacao* L..

Espécies selvagens do gênero *Theobroma* ocorrem do México ao Peru, com um centro de origem na Bacia Amazônica (URQUHART, 1961). Seu cultivo data desde os tempos pré-históricos pelos índios das Américas Central e do Sul (URQUHART, 1961; COPE, 1976).

Tradicionalmente *T. cacao* é dividido em três grupos com particularidades morfo-geográficas inerentes a cada um: Criollo, Trinitário e Forastero. Credita-se ao grupo Criollo o cacau original domesticado do México e América Central (CHEESMAN, 1944), que é constituído por árvores com frutos grandes, cuja casca é fina e rugosa, de coloração amarela ou alaranjada quando maduros. Possuem sementes grandes, densas, brancas ou róseas, com muita polpa, produzindo o chocolate de melhor qualidade (WHITLOCK & BAUM, 1999).

O grupo Forastero (Alto e Baixo Amazônico) produz frutos que apresentam variação na forma, de cabeça a melão, possuindo sementes achatadas de cor violeta-intensa, produzindo um cacau tipo básico. Junto aos materiais melhorados, este grupo

é responsável pela maior parte da produção mundial de cacau, predominando nas plantações da Bahia, Amazonas e países produtores da África (SORIA, 1966; MORA, 1958). Nesse grupo encontram-se as mutações da variedade comum, o Catongo e o Almeida, e é considerado o grupo que apresenta maior diversidade genética e melhor desempenho agrônômico (BARTLEY, 1967; MARITA, et al. 2001).

A dispersão da espécie a partir da região do Alto Amazonas enfrentaria grandes barreiras ao Norte e Oeste: a Cordilheira dos Andes. Nestas direções contou, com certeza, com o auxílio do homem, visto ser o período de viabilidade das sementes reduzido e a possibilidade de transporte por animais incompatível com as distâncias (BERGMAN, 1969; CHEESMAN, 1944).

Ao Norte, a introdução pode ter sido feita incluindo materiais de sementes brancas, ou ocorreram novas mutações dando início a constituição do tipo Criollo. Após a transposição da Cordilheira, o cacau deve ter continuado sua dispersão naturalmente e com algum auxílio humano (BERGMAN, 1969).

Uma segunda transposição dos Andes ocorreu no Equador, com material do tipo Amazônico. Da população formada foi gerada a variedade Nacional, que dominou completamente os cultivos comerciais no país até o início do século passado. No sentido Leste, a dispersão da espécie não encontrou barreiras naturais importantes e deve ter se servido de rios, animais e, também, do homem.

Na Amazônia, a dispersão ocorreu incluindo apenas cacaeiros com frutos verdes e sementes intensamente pigmentadas, características que distinguem o tipo Forastero Amazônico. Na década de 1730, o cacau tornou-se o principal produto de exportação desta região (ALDEN, 1974) e foi empregado para a expansão do cultivo em diferentes regiões do mundo, nos séculos XVIII e XIX e sua utilização em programas de melhoramento genético somente tomou impulso após as expedições realizadas por POUND (1938).

Na Bahia, o cacaeiro foi introduzido em 1746 pelo colono francês Luís Frederico Warneaux, que trouxe as sementes do Pará, doando-as a Antônio Dias Ribeiro. Estas sementes foram plantadas na fazenda Cubículo, situada à margem direita do Rio Pardo, no atual município de Canavieiras (GRAMACHO et al., 1992), sul da Bahia, com muito

sucesso. No final do século XIX, a Bahia já era um grande produtor mundial. A cultura expandiu-se e o cacaueteiro passou a ser cultivado, também, em mais oito estados brasileiros.

O Trinitário é outro grupo em que a espécie é dividida, sendo derivado entre os Criollos e Forasteros (CHEESMAN, 1944). As populações deste grupo não são encontradas no estado selvagem, mas estão presentes em cultivos no Caribe, Camarões e Papua Nova Guiné (WOOD & LASS, 1985). Os Trinitários foram considerados como de ampla variação, agrupando características e genes de Criollos e Forasteros Amazônicos.

Trabalhos com marcadores moleculares e caracteres morfológicos também distinguem os tipos Criollos, Trinitários e Forasteros (RUSSELL et al., 1993; RONNING & SCHENELL, 1994; BEKELE & BEKELE, 1996; LEACERTEAN et al., 1997; MARITA, 1998; MOTAMAYOR, 2000; N'GORAN et al., 2000; MARITA et al., 2001).

2.1.1. Distribuição geográfica

a) Vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa tem ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau da América do Sul e Central como o Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela, Panamá e nas Ilhas do Caribe, Trinidad, Tobago, Granada, Santa Lucia e São Vicente. Após o primeiro assinalamento da doença no Suriname, em 1895, ela foi reportada na Guiana Inglesa em 1906, na Colômbia, em 1917 e no Equador, em 1918 (HOLLIDAY, 1952). Stahel, em 1920, detectou a enfermidade no rio Cutari nas fronteiras entre o Brasil, Guiana Inglesa e o Suriname. Na mesma expedição, Stahel identificou a doença na região do rio Tapajós, afluente do rio Amazonas, na Amazônia brasileira, sugerindo que os cacauais do Vale do Amazonas estavam na sua maioria infectados pela doença. Essa hipótese, segundo BAKER & HOLLIDAY (1957) foi confirmada por POUND (1938). Segundo este autor, a doença estaria espalhada por

todo o vale do Amazonas e seus inúmeros afluentes, indo desde o leste no estado do Pará até os planaltos aos pés da cordilheira dos Andes. Assim, as terras baixas do Amazonas, da Bolívia, do Peru e da Colômbia estavam dentro da zona de ocorrência da vassoura-de-bruxa. Em 1928, a doença foi encontrada em Trinidad (STELL, 1928) e também na Venezuela. Data de 1939, a primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa em Tobago e de 1948, em Granada (DALE, 1946, 1949). No Panamá foi detectada em 1978 (PEREIRA, 2000).

Desde a década de 1970, esforços foram empreendidos para impedir a introdução do patógeno nos cacauais da Bahia, região responsável por 84,5% da produção nacional que era então segunda maior do mundo. Contudo, em maio de 1989, a doença foi detectada no sul da Bahia (PEREIRA et al., 1989) e apesar das medidas de erradicação executadas em 12 ha, no município de Uruçuca, novos focos foram descobertos no mesmo ano, no município de Camacan, distante a 120 Km ao sul de Uruçuca, afetando uma vasta área. O aparecimento da doença em dois locais distintos e distantes, ocorrida no centro da região de cacau, sugere que mais de uma introdução aconteceu (ROCHA et al., 1993; PEREIRA et al., 1996; ANDEBRHAN et al., 1999b). Desta forma, a doença instalou-se nos dois maiores agrossistemas cacauzeiros do sul da Bahia – o do Almada, que abrange os municípios de Uruçuca, Ilhéus, Itabuna, Buerarema, São José da Vitória, Lomanto Júnior, Itajuípe, Coaraci, Almadina, Floresta Azul, Ibicaraí, Itapé e Jussari; e o de Camacã, com os municípios de Camacã, Pau Brasil, Mascote, Santa Luzia e Arataca. Conseqüentemente, a doença disseminou-se rapidamente para todas as regiões produtoras do estado. Doze anos após, em fevereiro de 2001, a doença foi constatada em duas fazendas no estado do Espírito Santo, no município de Linhares (SILVA et al., 2002).

b) Podridão de *Moniliophthora*

A doença foi primeiramente reportada pelo micologista J. B. Rorer, em 1914, nos arredores de Quevedo, província de Los Rios, no Equador (RORER, 1918). Posteriormente, a doença foi detectada na Colômbia, em 1930 (TORO, 1930), na região

de Zarzal Caldas, e NOLLA (1930) mencionou sua rápida disseminação no Vale de Cauca. Em 1941, a doença foi identificada na Venezuela, nos arredores do rio Catatumbo, Estado de Zulia, na região ocidental do país (MULLER, 1941). No Panamá, foi registrada em 1956, em Ailigandi e Paya, Província de Darién a 15 km da fronteira com a Colômbia (ORELLANA, 1956). Uma nova introdução de *M. royeri* aparentemente ocorrida na Costa Rica adentrou no lado ocidental do Panamá, na Província de Bocas del Toro em 1979 (ENRÍQUEZ & SORIA, 1981). Em 1978, podridão de *Moniliophthora* foi reportada em Cahuita, Província de Limón em 1978 (ENRÍQUEZ & SUÁREZ, 1978). A doença se dispersou muito rapidamente dentro da Costa Rica. Em dois anos, a mesma se tornou presente do litoral Atlântico ao Pacífico e da Fronteira Panamenha a Nicaragüense. Na Nicarágua, a doença surgiu em 1980 (LÓPEZ & ENRÍQUEZ, 1980). Em março de 1991 a doença foi detectada na região central do país na localidade de La Patriota (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DE NICARAGUA, 1992). No Peru, vários autores (DESROSIERS & DÍAZ, 1957; AMPUERO, 1967; THOROLD, 1975; GREGORY, 1978) têm mencionado a existência da doença neste país. Provavelmente muitos destes registros são baseados no trabalho de McLAUGHLIN (1950), no qual erroneamente registrou a doença em Jaén (Região de Cajamarca), Tingo Maria (Região de Huánuco) e Convención (Região de Cuzco). Estes registros permaneceram controversos até os trabalhos de Hernández e colaboradores (HERNÁNDEZ et al., 1988, 1990) os quais reportaram o surgimento do fungo em 1988, em Condorcanqui, na Região do Amazonas. Este é o primeiro registro considerado como válido sobre a origem da doença no Peru (EVANS et al., 1998). Entre abril e maio de 1997 a podridão de *Moniliophthora* foi detectada em Honduras, em Wampusirpi, acima do rio Patuca na Mosquita Hondurenha (região de Gracias a Dios) (PORRAS & ENRÍQUEZ, 1998). Alguns fazendeiros têm acreditado que esta doença se disseminou ao longo do rio Coco, através de viajantes, indo além das montanhas para outras regiões. Finalmente em 2002, podridão de *Moniliophthora* foi detectada na Guatemala, em plantações de cacau na região de Izabal, fronteira com Honduras (PHILLIPS-MORA, 2003).

2.1.2. Os fungos *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri*

2.1.2.1. Ciclo de vida

a. *Crinipellis perniciosa*

Crinipellis perniciosa (Stahel) Singer é considerado um organismo hemibiotrófico, devido a que uma parte do seu ciclo de vida se realiza sobre o tecido morto do seu hospedeiro, constando de uma fase biotrófica (n) ou parasítica e uma saprofítica (n + n) (SUÁREZ & DELGADO, 1993).

O fungo em sua fase biotrófica infecta unicamente tecido meristemático em crescimento ativo (brotos, botões florais, frutos), os basidiocarpos (estrutura sexual) liberam durante a noite os basidiósporos, os quais se dispersam através do vento e da chuva. Os basidiósporos germinam sobre a cutícula e base dos tricomas, emitindo tubos germinativos longos e vigorosos, não havendo formação de apressórios. Os tubos germinativos monocarióticos penetram nos tecidos meristemáticos de folhas e do tronco, atuando intercelularmente e causando inicialmente reações em forma de clorose, entumescimento a partir do ponto inoculado e, posteriormente, inchaços, provocando superbrotações e anomalias nos frutos e almofadas florais, processo que varia de 4 a 15 horas dependendo da temperatura e umidade relativa (PURDY & SCHMIDT, 1996). O micélio biotrófico do patógeno coloniza todo o tecido e cresce intercelularmente por aproximadamente três semanas. No broto atacado há também contínuo crescimento com aparência sadia; então o patógeno penetra o lúmen celular e, a partir da terceira até a décima quarta semanas, os sintomas são bem visíveis em forma de inchaços, deformações e ramificações, que por sua aparência se denominam “vassouras-de-bruxa” (SUÁREZ, 1993; SUÁREZ & DELGADO, 1993). Posteriormente os tecidos atacados se necrosam; no caso das vassouras vegetativas, as necroses avançam progressivamente desde as folhas e talos, sendo este o início da fase saprofítica, após três a nove semanas inicia-se a dicarionização, surgindo hifas com grampos de conexão. Durante a transição de vassouras verdes a secas, está presente

tanto o micélio biotrófico como o saprofítico dentro do tecido atacado (PURDY & SCHMIDT, 1996). O tecido morto permanece na árvore de maneira indefinida, enquanto o fungo vive sua fase saprofítica (SUÁREZ, 1993).

O micélio do fungo no interior da vassoura seca, forma massas sob condições de alta umidade relativa (menor que 80%), precipitação de 1000 a 2000 mm e temperaturas entre 22 a 28 °C desenvolvendo, desta maneira, os basidiocarpos (PURDY & SCHMIDT, 1996). Este é o estágio meiospórico do fungo. Os basidiocarpos são de cor púrpura intenso, cujo píleo apresenta um diâmetro de 5 a 30 mm com sucus radiais convexos e deprimidos no centro, a lamela é esbranquiçada com mais de 15 lamínulas correspondentes aos sucus do píleo, o estipe é oco de cor branco cremoso e mede de 5 a 10 mm, sua base é engrossada de coloração parda. As basídias produzem quatro basidiósporos uninucleados e o resto do himênio é similar aos outros basidiomicetos (SINGER, 1942; BAKER & HOLLIDAY, 1957; HOLLIDAY, 1970). Desta maneira, os basidiocarpos provém de esporos para o início de novas infecções sobre a geração de brotos e gemas florais durante o ciclo de vida da planta.

A liberação dos basidiósporos, processo reprodutivo do *C. pernicioso*, ocorre preferencialmente à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pela corrente dos ventos. Os basidiósporos são liberados através de um mecanismo explosivo. Os mesmos têm vida curta, de sensibilidade à luz e em condições naturais não sobrevivem mais que uma hora. A disseminação também pode ocorrer através da água e do transporte de material biológico contaminado (GARCES, 1947).

b. *Moniliophthora roreri*

Moniliophthora roreri (Ciferri) Evans et al. tem dois ciclos de vida, o ciclo primário e o secundário. Os esporos são os únicos propágulos infectivos do *M. roreri*, e os frutos dos hospedeiros suscetíveis são as únicas partes que o mesmo infecta (EVANS, 1981). Após um período de aproximadamente três meses, os frutos doentes tornam-se secos e mumificados e permanecem fixos ao tronco do hospedeiro por um longo período, sendo

a maior fonte de inóculo (AMPUERO, 1967; CASTAÑO, 1952). Os esporos são produzidos em grande quantidade nos frutos doentes, podendo alcançar uma densidade de 44 milhões de esporos por cm² (CAMPUZANO, 1981). RAM (1989) determinou que 20 períodos de esporulação sucessiva ocorrem em quatro ciclos durante 80 dias. Até mesmo frutos velhos mumificados nas árvores ou caídos no chão foram capazes de terem períodos de 13 a 16 esporulações, produzindo inóculo de *M. roreri* até os mesmos se decomporem. De acordo com WOOD & LASS (1985), os esporos são produzidos em grande número em poucas semanas, diminuindo gradativamente a quantidade em cerca de 10 semanas da infecção, após o qual o número torna-se insignificante. EVANS (1981) reportou que esporos têm sido coletados na superfície de frutos doentes durante mais de um ano após a infecção inicial. Após a liberação, considerável número de esporos infectivos se distribuem sobre os troncos das árvores e almofadas florais (RAM, 1989). Variações no número de esporos têm sido identificadas em função do tempo, em dias, e das estações do ano (EVANS, 1981).

Vários aspectos da dispersão da doença ainda não estão bem entendidos (WOOD & LASS, 1985). Os propágulos infectivos (esporos) de *M. roreri* são transportados pelo ar e principalmente têm grande facilidade de se dispersarem pelo vento (EVANS, 1981), embora a dispersão possa ocorrer também através da água, insetos e outros animais (NAUNDORF, 1954). Além do mais, estes são mais resistentes a luz e dissecação (EVANS, 1981) do que os de *C. perniciosus* (PURDY & SCHIMIDT, 1996).

2.1.2.2. Taxonomia

a. *Crinipellis perniciosus*

O agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero foi classificado inicialmente por Stahel em 1915 como *Marasmius perniciosus*. Em 1942, foi transferido para o gênero *Crinipellis* por Singer e, na revisão da sistemática do fungo, foi mantido o

binômio *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (SINGER, 1942). Este fungo pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, classe Basidiomycetes, subclasse Homobasidiomycetidae, ordem Agaricales e a família Tricholomataceae. As espécies pertencentes a esta família caracterizam-se por possuírem basidiomas pileados, estipitados, lignícolas, basidiósporos de cor branca e são capazes de revivescerem após o secamento quando são umedecidos (ALEXOPOULOS et al., 1996; EVANS, 1980). Reconhece-se três variedades do fitopatógeno com base na morfologia do basidioma: (i) *C. pernicioso* var. *pernicioso*, apresentando o píleo esbranquiçado nas margens e róseo-avermelhado no centro; (ii) var. *citriniceps*, com píleos amarelo-citrinos e (iii) var. *ecuadoriensis* possuindo píleos uniformemente vermelhos (PEGLER, 1978).

b. *Moniliophthora roreri*

De acordo com RORER (1918), Ralph E. Smith da Universidade da Califórnia identificou o fungo causador da podridão de *Moniliophthora* em 1917 através de frutos enviados por Holbert. Smith observou que o fungo parecia pertencer ao Gênero *Monília*, similar a *Monília fructigena*, muito comum nos Estados Unidos e outros lugares, mas não com *Phytophthora cactorum*, como foi mencionado em alguns relatórios recebidos com as amostras. CIFERRI & PARODI (1933) confirmaram a identificação feita por Smith e nomeou o fungo como *Monilia roreri* Ciferri em homenagem a J. B. Rorer, o qual foi pioneiro nas investigações desta doença. Eles classificaram o fungo como: Classe: Deuteromycetes, Ordem: Hyphales, Gênero: *Monília*, Espécie: *roreri*. Com o trabalho de EVANS et al. (1978) o fitopatógeno foi então identificado como o estado assexual de um fungo Basidiomiceto não conhecido. Assim, um novo gênero foi descrito, passando a ser chamado *Moniliophthora*.

2.1.2.3. Sintomatologia

a. *Crinipellis pernicioso*

A sintomatologia da vassoura-de-bruxa é bastante variada e foi descrita detalhadamente por HOLLIDAY (1952), BAKER & HOLLIDAY (1957), THOROLD (1975), EVANS (1981b), RUDGARD (1989) e TOVAR (1991). Recentemente foi feita redescritção dos sintomas, principalmente em plântulas inoculadas em diferentes estádios de desenvolvimento e a comparação com mudas infectadas naturalmente, além de alguns sintomas em plântulas e plantas adultas com resistência a *C. pernicioso* (SILVA et al., 2002).

Quando o fungo infecta ramos ou brotos vegetativos provoca inchaço da parte afetada, acompanhada da proliferação de pequenos brotamentos próximos um dos outros, onde se prendem as folhas grandes curvadas e retorcidas, que parecem vassoura-de-bruxa, advindo o nome da doença. Nas almofadas florais infectadas formam-se cachos de flores anormais, hipertrofiadas, com pedicelo grande e inchado, que podem não produzir frutos, ou que darão origem a frutos que morrem prematuramente, ou cujo crescimento são anormais. Nos frutos os sintomas variam em função da idade e o tamanho dos mesmos quando infectados e também quanto ao modo de infecção (SILVA et al., 2002). Quando a infecção se dá através do ponto de inserção da flor ou por infecção basidiospórica na inflorescência, surgem frutos partenocárpicos, deformados, de formato similar do morango e que morrem prematuramente, tornando-se negros, petrificados, com menos de 6 cm de diâmetro. Se a infecção ocorre em flores já polinizadas, resultam em frutos anormais, com aspecto de cenoura, os quais se tornam pretos e petrificados, com 15 cm de comprimento.

Nos frutos jovens, com 8 semanas, com 2 a 5 cm de comprimento, resultam órgãos com maturidade precoce, sobre os quais aparece uma mancha negra, dura e irregular, que corresponde, internamente, a tecidos e amêndoas afetados ficando as sementes ligadas entre si e inaproveitáveis. Frutos infectados por basidiósporos, com idade de aproximadamente 11 semanas, apresentam podridão setorial externa e internamente (ORCHARD et al., 1994). As sementes quando infectadas podem ser aproveitadas de acordo com o estágio de desenvolvimento em que o fruto foi infectado (SILVA et al., 2002). O fungo coloniza primeiramente os tecidos internos dos frutos e quando surgem os sintomas externos, as sementes já estão imprestáveis para o consumo.

b. Moniliophthora roreri

Os frutos são as únicas partes do cacaueteiro que são infectadas naturalmente por *M. roreri*. Os sintomas observados dependem da idade do fruto no momento da infecção. A maioria dos sintomas provocados por podridão de *Moniliophthora* nos frutos são parecidos com aos da vassoura-de-bruxa, no entanto a podridão de *Moniliophthora* não provoca frutos do tipo morango ou cenoura (RAM et al., 2004). Os frutos jovens até 90 dias de idade são mais suscetíveis, decrescendo a suscetibilidade com a idade do fruto. Nesse caso, podem ocorrer pequenas lesões localizadas que se restringem apenas à casca, podendo-se aproveitar todas ou a parte das sementes. Frutos menores que 5 cm de comprimento, o fungo provoca peco fisiológico. Frutos entre 5 a 10 cm apresentam deformações e protuberâncias brilhantes, manchas marrons que se tornam amarelas, sinal de amadurecimento precoce. Frutos de maior idade apresentam pontos necróticos de aparência oleosa, que se transformam em manchas de coloração chocolate ou marrom escuro, rodeadas ou não por uma zona amarelada. Infecções em frutos desenvolvidos, as sementes também são afetadas e formam uma massa compacta, unidas umas às outras e cheias de uma

substância aquosa, dificultando a remoção das sementes que ficam imprestáveis. Devido a este sintoma, a doença é conhecida como podridão aquosa do fruto do cacau (RAM et al., 2004). Podridão de *Moniliophthora* induz cerca de 10 tipos de sintomas nos frutos. Do ponto inicial de infecção, o fitopatógeno avança diretamente ao mesocarpo e endocarpo, colonizando e destruindo a parte interna do fruto. Posteriormente, os frutos apresentam os sintomas externos da doença e, nesse estágio, as sementes ficam total ou parcialmente comprometidas (RAM et al., 2004). A forma de infecção dos frutos por *M. roreri* é semelhante ao *C. pernicioso*, ou seja, externo para internamente. Na superfície da lesão necrosada apresentando bordadura irregular, em cerca de 5 a 7 dias surge uma massa micelial (pseudo-estroma) de cor branca, que tem cheiro de cogumelo. Entre 3 a 5 dias, este micélio se transforma em um pó de coloração cremosa ou cinzenta, contendo os esporos do fungo. Frutos doentes e cortados, esporulam rápida e abundantemente dentro de 3 a 4 dias em condições ambientais favoráveis. Frutos doentes que ficam na árvore, com o tempo se mumificam e endurecem devido a desidratação provocada pela produção de grande quantidade de esporos. Os frutos mumificados encolhem, apresentando um tamanho parecido com os dos bilros, podendo ficar pendurados e escondidos na copa do cacauzeiro por um período de cerca de dois anos. Estes frutos mumificados endurecem a tal ponto que fica difícil quebrá-los com a mão. Posteriormente, sob a influência da chuva, esporulam novamente, propiciando um novo ciclo (RAM et al., 2004).

2.1.2.4. Controle

a. *Crinipellis pernicioso*

Como parte do seu controle recomenda-se eliminar as vassouras secas a fim de reduzir a fonte produtiva de inóculo, combinada com uma poda anual de manutenção durante a estação seca (SUÁREZ, 1979). O controle biológico oferece alternativa através do fungo *Trichoderma stromaticum* que é a base do biofungicida Tricovab,

utilizado no controle de *C. pernicioso*, cuja consequência é a redução da esporulação do fungo (SAMUELS et al., 2000; GRIFFITH et al., 2003).

A aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos na lavoura é feita como um complemento a poda fitossanitária e a utilização de variedade resistentes, pois o uso dos mesmos isoladamente não mostra bom controle da vassoura-de-bruxa. Além disso, o patógeno ataca tecidos em crescimento, portanto, seu controle com fungicidas se torna difícil; situação que se complica devido a que o período de maior infecção coincide com a estação chuvosa (DESROSIERS et al., 1955) que podem facilmente lavar os fungicidas protetores e devido à baixa translocação dos produtos sistêmicos em um planta lenhosa (RESENDE et al., 2000).

Em 1990, o Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), em Ilhéus, Bahia, iniciou um programa de melhoramento genético para resistência a vassoura-de-bruxa, dos quais dentre vários materiais genéticos, com excelente potencial de resistência (LUZ et al., 2003; SILVA et al., 2003). Para tal, desenvolveu-se um sistema semi-automatizado de inoculação artificial com apoio do American Cocoa Research Institute (ACRI), o qual vem permitindo a avaliação de um grande número de progênies de cacau sob condições controladas. Com a utilização deste sistema, um total de 341 progênies de cacau já foram avaliadas quanto à resistência à VB. Paralelamente, a CEPLAC lançou vinte clones e três variedades híbridas (Theobahia, Theobahia I, e Theobahia II) resistentes, os quais vêm sendo distribuídos e plantados em diferentes agrossistemas da região cacaeira da Bahia. Infelizmente, a maioria destes clones é descendente de SCA-6, cuja resistência, segundo BARTLEY (1986), tem sido considerada monogênica dominante. No entanto, para a situação emergencial da Bahia, face ao desespero dos produtores, estes genótipos desempenharam o seu papel, baixando o potencial de inóculo na região.

b. *Moniliophthora roreri*

Atualmente a CEPLAC dispõe de pessoal técnico capacitado e laboratórios modernos para detectar a presença de *M. roreri* no Brasil e ao mesmo tempo orientar

os produtores sobre as medidas de prevenção e de controle da doença (RAM et al., 2004). O manejo integrado constituído de tratamentos culturais (roçagem, desbrota, podas, adubação dos cacaueiros, drenagem e raleamento de árvores de sombra); fitossanitários (remoção de frutos doentes, tratamento de casqueiros com anti-espulantes) e controle químico (aplicação de fungicidas a base de cobre) é eficiente no controle desta doença (RAM et al., 2004). No tocante a resistência genética, os clones descendentes de Scavina não apresentam resistência ao ataque de podridão de *Moniliophthora*. Contudo, alguns clones locais do Peru, Costa Rica (RAM et al., 2004), Colômbia (PHILLIPS-MORA, 2005) e Equador (SUÁREZ-CAPELLO, 1996) apresentaram certos níveis de resistência a doença.

A utilização de variedades resistentes é a alternativa mais promissora em longo prazo para o controle da vassoura-de-bruxa e podridão de *Moniliophthora* (SUÁREZ & DELGADO, 1993). Dessa forma, os testes para seleção de materiais resistentes são cruciais para o melhoramento de cultivares, pois, além do ambiente, o fitopatógeno exerce pressão, discriminando as condições e efetividade das seleções devido a sua variabilidade genética e provável gama de biótipos. O melhoramento para obter cacaueiros resistentes requer um conhecimento da estrutura das populações dos fitopatógenos e deve assegurar que as gerações obtidas são expostas a uma ampla gama de genótipos da população dos fungos (MILGROOM & PEVER, 2003).

O conhecimento das populações do patógeno e hospedeiro, faz-se necessário para entender os processos que dirigem as variações genéticas destas populações, e a partir do qual propor e desenvolver métodos adequados para o controle das enfermidades (McDONALD et al., 1989).

Em cacau, a identificação de genótipos resistentes se vê incompleta devido a falta de um método de seleção uniforme. Um dos fatores que complica esta seleção de germoplasma é a ampla variabilidade dos fitopatógenos (ANDEBRHAN & FURTEK, 1993).

2.1.2.5. Hospedeiros

a. *Crinipellis pernicioso*

Crinipellis pernicioso é parasita do cacau como também de outras espécies do gênero *Theobroma*, como *grandiflorum* (Spr.) K. Scum (cupuaçu), *bicolor* Humb & Bonpl., *calodesmis*, *glauca*, *obovatum* Klotz ex Bern (cacau cabeça-de-urubu), *microcarpa* Mart, *subincanum* Mart. (cupuí), *speciosum* Willd. (cacauí) e do gênero *Herrania*, como *albiflora* Gudot, *nítida* (Poepp) Shultes, *purpúrea* (Pitter) e os gêneros *Sterculia speciosa* Schum e *Entada gigas* (L) Falc & Rendle (HOLLIDAY, 1980; TOVAR, 1991; SUÁREZ & DELGADO, 1993). A espécie é subdividida em quatro biótipos de acordo com o hospedeiro que ataca: 1) biótipo-C que infecta predominantemente *Theobroma* spp., mais especificamente o cacau e *Herrania* spp. (EVANS, 1978; BASTOS et al., 1988); 2) biótipo-S que infecta as espécies da família Solanaceae (BASTOS & EVANS, 1985; BASTOS et al., 1988); 3) biótipo-L que é predominantemente saprofítico e coloniza diversos substratos (EVANS, 1978; HEDGER et al., 1987) e 4) biótipo-B que infecta *Bixa orellana* (BASTOS & ANDERBRHAN, 1986).

Também se tem reportado atacando espécies pertencentes às famílias Solanaceae (jiló, jurubeba, berinjela, caiçara), Bixaceae (urucum), Bignoniaceae (alguns cipós) e Malpighiaceae (cipó silvestre) (BASTOS & EVANS, 1985; BASTOS & ANDERBRHAN, 1986; GRIFITH & HEDGER, 1994; RESENDE et al., 2000; GRIFITH et al., 2003).

b. *Moniliophthora roreri*

Moniliophthora roreri tem sido reportado somente em espécies de *Theobroma* e *Herrania*. Frutos de *T. bicolor* Humb. & Bonpl. e *H. balaensis* Preuss foram atacados no Equador (RORER, 1918). Infecções em *T. gileri* Cuatr. pode ter contribuído para o ingresso da doença no lado ocidental da Colômbia, ao lado oriental do Panamá (BAKER et al., 1954). Em adição, EVANS (1981) reportou infecções de *M. roreri* em *T.*

mamosum Cuatr. & Leon, *T. simiarum* Donn. Smith, *T. sylvestre* Mart., *T. angustifolium* Mocino & Sesse, *H. nitida* (Poepp.) R. E. Schultes, *H. pulcherrima* Goudot. e quatro das cinco espécies identificadas de *Herrania*. Posteriormente, o fitopatógeno foi também identificado em *T. grandiflora* Wild. Ex Spreng.) Schum e *H. purpurea* (Pitt.) R. E. Schultes (ENRIQUEZ & SORIA, 1981).

2.1.2.6. Relação taxonômica entre *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri*

Moniliophthora roreri sempre foi motivo de discussão entre fitopatologistas e micologistas devido a sua semelhança com o *C. perniciosa*. A proximidade taxonômica entre estes fitopatógenos tem sido demonstrada em estudos prévios. Baseado em similaridades na biologia e sintomatologia, EVANS (1981) sugeriu que *M. roreri* está intimamente relacionado com o *C. perniciosa* e que estes compartilham de um ancestral comum, possivelmente um fungo arbóreo. *Moniliophthora roreri* evoluiu das montanhas ocidentais dos Andes e infectando espécies do gênero *Theobroma* ou *Herrania*, enquanto que *C. perniciosa* adaptou-se ao cacau (*T. cacao*) em seu centro de origem, no lado Amazônico da Cordilheira dos Andes. EVANS et al. (2003), com base em evidências morfológica, citológica e molecular confirmaram que *M. roreri* faz parte do gênero *Crinipellis* (Basidiomicota) e que duas variedades podem ser reconhecidas, *C. roreri* var. *roreri* e *C. roreri* var. *gileri*. GRIFFITH et al. (2003) produziram híbridos entre *M. roreri* e *C. perniciosa*, demonstrando razoável afinidade entre as espécies. Em trabalhos posteriores, PHILLIPS-MORA (2003) utilizou pares de *primers* de locus específicos amplificando dois segmentos de genes de RNA nuclear ribossomal. Os resultados geraram confirmação que *M. roreri* é um Basidiomiceto e sugere fortemente que o mesmo pertence à ordem Agaricales e possivelmente à família Tricholomataceae. Comparações de seqüências também indicaram que o fungo está intimamente relacionado com o *C. perniciosa*. AIME & PHILLIPS-MORA (2005) com base em análises filogenéticas de seqüências de DNA de cinco diferentes regiões nucleares do

gene (28S rDNA, 18s rDNA, ITS, RPB1 e EF1- α) confirmaram que *C. perniciosa* e *M. roreri* fazem parte do mesmo taxa, e propuseram um novo nome, *Moniliophthora perniciosa* Aime & Phillips-Mora comb. nov., ambos fazendo parte da família Marasmiaceae.

Apesar do exposto, os dois fitopatógenos têm sido constantemente classificados como duas espécies, muito embora morfologicamente outros fitopatógenos com diferenças em especificidade do hospedeiro tenham sido reconhecidos como raças, ou *forma specialis* (f.sp.). A introdução de técnicas de biologia molecular ofereceu uma nova dimensão na área de sistemática (BRIDGE & ARORA, 1998). Talvez, com o uso dos marcadores moleculares, as divergências taxonômicas entre as espécies *M. roreri* e *C. perniciosa* poderão ser resolvidas, pois o número de características disponíveis para comparação é de maior magnitude do que qualquer análise morfológica ou fisiológica. Assim, como complemento às análises feitas anteriormente poder-se-á descrever a proximidade genética entre estas espécies, com maior acuidade, e posterior classificação taxonômica.

2.1.2.7. Variabilidade fisiológica de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri*

a. *Crinipellis perniciosa*

PEGLER (1978) examinou uma gama de basidiocarpos atribuídos a *C. perniciosa* coletados na América do Sul e designou três variedades com base na cor do píleo e tamanho dos basidiósporos denominados: var. *perniciosa* (píleo de coloração carmesim a roxo escuro), var. *ecuadoriensis* (Stahel) Pegler (píleo de cor roxo carmesim sem áreas esbranquiçadas) e var. *citriniceps* Pegler (píleo amarelo).

WHEELER & MEPSTED (1988) inocularam em plântulas de cacao basidiósporos do patógeno coletados de basidiocarpos formados de vassouras secas importadas da Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Trinidad e Venezuela. A diversidade entre cultivos

se determinou em função da indução de sintomas pela enfermidade, concluindo-se que poderiam existir dois grupos na população de *C. pernicioso*. O grupo A inclui os isolados do Equador, Bolívia e a maioria dos originários da Colômbia. O grupo B inclui isolados de Trinidad, Venezuela e da Amazônia brasileira. Variações dentro dos grupos também foram observadas.

McGEARY & WHEELER (1988) compararam 87 isolados do fungo oriundos de 10 localidades da América do Sul e Caribe. Os isolados se agruparam em seis grupos somaticamente correspondentes a: (1) Equador (Pichilingue e Rio Palenque) e Colômbia (Chigorodo e Manizales), (2) Equador (Sucua), (3) Brasil ((Manaus), (4) Brasil (Ouro Preto), (5) Brasil (Castanhal) e (6) Trinidad e Tobago.

Estudos morfológicos em Trinidad, efetuados por LAKER (1989), assinalaram a diferença na taxa de crescimento *in vitro* de isolados cultivados em meio, classificando-os em dois grupos. Contudo, comparações entre isolados de *C. pernicioso* provenientes da Colômbia, Brasil e Equador através de espectros proteínicos totais, alfa-esterase, crescimento micelial em meio PDA e sensibilidade ao triadimefon, não reportaram diferenças significativas que indicassem uma diversidade genética ampla do patógeno (TOVAR, 1991).

A expressão de incompatibilidade somática, analisada por PEREZ et al. (1999), entre 14 isolados miceliais de *C. pernicioso* provenientes de diferentes hospedeiros de diversos estados brasileiros, mostrou uma grande diversidade e variabilidade entre os isolados amostrados, os quais, pela análise de agrupamento, foram divididos em quatro grupos: 1) grupo com isolado de Rondônia (cacau), altamente divergente dos demais, 2) grupo com isolados de cacau, de Belém (PA) e Santo Amaro (Ba), oriundos de regiões distintas 3) e 4) grupos formados pelos demais isolados, bastante diversificado, onde o isolado de lobeira (*Solanum grandiflorum*) ficou entre isolados de cacau e cupuaçu, sem haver relação entre as regiões de origem.

LOPES et al. (2001) procederam inoculação de plântulas entre seis e oito semanas empregando basidiósporos oriundos de vassouras secas e frutos infectados de *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *Somanum paniculatum*, determinando-se que *T. cacao* e *T. bicolor* foram suscetíveis ao inóculo dos quatro hospedeiros. S.

paniculatum foi suscetível ao seu próprio inóculo e ao de *T. cacao*. *T. grandiflorum* apresentou sintomas tanto ao seu inóculo como ao de *T. cacao* e *T. bicolor*. Finalmente, o inóculo de *T. cacao* foi o mais infeccioso em todos os hospedeiros.

Com a finalidade de adquirir informações para os processos de seleção de fontes resistentes, através de estudos de variabilidade patogênica e genética do fungo, VIANA-JÚNIOR et al., (2001b) confrontaram estudos de patogenicidade de *C. pernicioso* de vários hospedeiros procedentes da Bahia (cacao e cupuaçu) e Minas Gerais (*H. acutifolia* e *S. lycocarpum*), inoculando-os em diferentes espécies como *T. cacao* (Catongo), *T. bicolor*, *T. grandiflorum* (Cupuaçu). As colônias isoladas de *T. cacao* e cupuaçu foram as únicas patogênicas a todas as espécies. *S. lycocarpum* foi patogênico a cupuaçu. *H. acutifolia* mostrou sintomas no Catongo e Cupuaçu. Contudo, ainda se torna necessário identificar cultivares diferenciadoras e a possível existência de raças fisiológicas do fungo. VIANA-JÚNIOR et al. (2001a) também indicaram a existência de grande diversidade genética entre isolados brasileiros da Amazônia e Bahia e de Minas Gerais, analisados através de estudos de compatibilidade.

FERREIRA (2005) avaliou a diversidade genética de isolados de *C. pernicioso* provenientes de diferentes estados brasileiros e diferentes hospedeiros através de técnicas de compatibilidade somática, permitindo a classificação em 3 grupos: (i) isolados de Rondônia e Pará; (ii) isolados de Rondônia, Pará e Amazonas e, (iii) isolado de Mato Grosso.

b. *Moniliophthora roreri*

PHILLIPS-MORA (1996) avaliou cultivares de cacauero do banco ativo de germoplasma do CATIE (Tropical Agronomic Centre for Research and Education), na Costa Rica, em relação a resistência a podridão de *Moniliophthora*, utilizando sistema de inoculação artificial com isolados deste fitopatógeno. A maioria das cultivares foi suscetível a doença e apenas 2,6% apresentou um alto nível de resistência.

SUÁREZ-CAPELLO (1996) avaliou clones de cacauero da série EET com relação a resistência a *C. pernicioso* e *M. roreri*, no Equador. O clone EET-233 obteve

o melhor desempenho, principalmente quanto a resistência a *M. royeri*, sendo uma fonte promissora nos programas de melhoramento genético deste país.

ARÉVALO et al. (1996) avaliaram resistência em cacauzeiros das coleções de Huallaga e Ucayali, no Peru, contra *C. pernicioso*, *M. royeri*, *Phytophthora palmivora* e *Ceratocystis fimbriata*. Os clones da série Huallaga apresentaram grau de resistência satisfatório, principalmente em relação a *M. royeri*, sendo usados nos programas de melhoramento genético no Peru.

Estudos de patogenicidade (PHILLIPS-MORA, 2005) usando 7 isolados de fitopatógenos provenientes da Colômbia, e que representam os 4 maiores grupamentos genético do patógeno em cacau, demonstrou, no geral, elevada patogenicidade na maioria dos genótipos de cacauzeiro utilizados. Contudo, o clone ICS-95 apresentou níveis satisfatórios de resistência, sugerindo a sua introdução no programa de melhoramento visando resistência a esta doença.

2.2. Estrutura genética de populações em fitopatógenos

A análise de diversidade genética e relações entre e/ou dentro de “taxa” é uma tarefa de várias disciplinas da biologia. Historicamente, a filogenia, taxonomia e caracterização de fungos tem sido inferida por meio de várias características fenotípicas, tais como, morfologia, fisiologia, e/ou componentes químicos como os metabólitos secundários (MILLS et al., 1998).

As ferramentas para a análise de fungos foram sendo incrementadas ao longo dos anos, e incluem o aprimoramento de microscopia ótica e eletrônica, o desenvolvimento de meios de cultura diferenciais, o desenvolvimento de técnicas imunológicas, entre outras. Estes métodos, no entanto, avaliam características que são uma expressão fenotípica, e que podem ser, muitas vezes, sujeitos a inconsistência devido a variações fisiológicas e/ou ambientais (LEAL-BERTIOLI, 1998).

A introdução de técnicas de biologia molecular ofereceu uma nova dimensão na genética de populações de fungos filamentosos (BRIDGE & ARORA, 1998).

Marcadores moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para caracterizar populações de fungos fitopatogênicos (BELABID et al., 2004; JAMES et al., 2004; HENSEN et al., 2005; DAVIS et al., 2005). Marcadores podem ser usados para avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e inter específicas e identificar raças e patótipos (LEAL-BERTIOLI, 1998). Uma série de técnicas e marcadores genéticos têm sido desenvolvidos para estimar a estrutura genética de populações de fitopatógenos, porém nenhuma técnica é vista universalmente como ideal; cada uma exibe suas vantagens e desvantagens. Desta forma, a escolha da técnica depende das inferências biológicas inerentes a pesquisa em questão, assim como do recurso financeiro e pessoal técnico disponível (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999).

2.2.1. Análise da estrutura genética com marcadores moleculares

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos, no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (HAMRICK, 1982).

O estudo da variação genética em populações de uma espécie envolve basicamente duas questões: (i) quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e (ii) caracterizar o nível de estruturação genética entre populações (HAMRICK, 1982).

Os processos microevolutivos que promovem mudanças nas frequências gênicas e genotípicas podem ser divididos em duas classes: os “sistemáticos” (mutação, seleção e migração), que tendem a mudar a frequência gênica de uma maneira que pode ser predita, tanto em quantidade quanto em direção, e o “dispersivo” (deriva genética), que surge em pequenas populações pelos efeitos de amostragem, e pode ser predito em quantidade, mas não em direção (METTLER & GREGG, 1973; MAYR,

1977). Dentre estes fatores, a migração e a mutação aumentam a variabilidade genética dentro das populações.

Os parâmetros genéticos mais utilizados para quantificar variabilidade genética em populações de fitopatógenos têm sido o número de alelos por loco, porcentagem de locus polimórficos, heterozigosidade esperada e observada e índice de fixação (HAMRICK, 1983, McDONALD, 2004).

A estimativa da frequência de um alelo particular em uma população, chamada frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança das suas frequências gênicas (NEI, 1978). O número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostra. Deste modo, amostras grandes possuem maior chance de detectar alelos raros.

O conhecimento da frequência dos heterozigotos apresenta importância na medida que cada heterozigoto carrega diferentes alelos, os quais demonstram a existência de variação genética na população (WEIR, 1996).

Para analisar marcadores dominantes, EXCOFFIER et al. (1992) pela introdução da estatística ϕ , proporcionaram uma nova alternativa para esse tipo de marcadores. Informações sobre a divergência de DNA de dados provenientes de haplótipos foram incorporadas na forma de análise de variância, derivada da matriz de distâncias quadradas entre todos os pares de haplótipos. Esta análise de variância, denominada AMOVA, produz estimativas dos componentes de variância das análogas estatísticas F , que os autores chamaram de estatísticas ϕ , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Segundo os autores, a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares.

A base da análise apresentada por EXCOFFIER et al. (1992) é que as somas de quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de somas de quadrados de diferenças entre pares de observações. Desta forma, eles construíram uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos. Os autores estudaram dez populações

humanas, para as quais amplos conjuntos de dados são disponíveis na literatura. Estas populações representam cinco grupos regionais, com duas populações cada. O polimorfismo do material amostrado foi analisado através de cinco enzimas de restrição.

A caracterização da estrutura genética entre populações, a partir de dados de marcadores genéticos codominantes, pode ser abordada por três metodologias diferentes: (i) estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965, NEI, 1977); (ii) análise da diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1973, 1977, 1987); e (iii) análise da variância de frequências gênicas (COCKERHAM, 1969; VENCOVSKY, 1992; WEIR, 1996). As três abordagens apresentam bases genéticas similares, porém, são complementares em relação ao significado biológico das estimativas obtidas. Desta forma, as estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre populações (F_{ST}), assim como dos níveis médios de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e total (F_{IT}). Os coeficientes de coancestralidade (θ) possibilitam a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada. E a análise da divergência gênica em populações subdivididas permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ .

As estatísticas F foram inicialmente desenvolvidas para o caso de um loco com dois alelos (WRIGHT, 1965). Posteriormente, NEI (1977) adaptou esta metodologia para locos multialélicos, contrastando um alelo p contra os outros alelos ($1-p$), através dos conceitos de heterosigosidade observada e esperada. Esta estatística admite que todos os desvios de panmixia sejam exclusivamente devidos aos efeitos da deriva genética e do sistema de reprodução.

Assim, conforme WRIGHT (1965):

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

onde,

F_{IT} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão),

F_{IS} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo),

F_{ST} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações (devido à subdivisão).

A análise de freqüências gênicas (COCKERHAM, 1969) foi desenvolvida baseada na pressuposição de que as populações em estudo são oriundas de uma mesma população ancestral, permitindo assim a estimativa do coeficiente de parentesco (coancestralidade) e endogamia. Nesta metodologia, todos os desvios de panmixia também são considerados devidos a deriva genética e ao sistema de reprodução. Também neste caso, a análise de freqüências gênicas fornece os níveis de fixação médios dentro das populações (f), do conjunto das populações (F) e a divergência genética entre populações ou o coeficiente de parentesco entre dois indivíduos dentro de populações (θ_P), parâmetros relacionados por:

$$f = (F - \theta_P) / (1 - \theta_P)$$

A análise da diversidade genética em populações subdivididas foi desenvolvida por NEI (1973), com o intuito de obter uma medida de estrutura de populações que acomodasse locos multialélicos. Tal medida pode ser utilizada em qualquer população, independente do número de alelos por loco, sistema de reprodução e da atuação de forças evolutivas (seleção, migração, deriva e mutação). O grau de diferenciação entre subpopulações é estimado, decompondo-se a heterozigosidade total (H_T), referente ao conjunto das populações, em seus componentes:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

em que H_S corresponde a média ponderada dos valores de H calculados para subpopulações e representa a parte atribuída à variabilidade genética dentro de populações. D_{ST} é o componente de variabilidade atribuível à diferenciação entre subpopulações e é calculado como $D_{ST} = H_T - H_S$. A razão entre D_{ST} e H_T expressa a proporção da variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subdivisões da população:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Sob modelo aleatório, pode-se considerar que as populações amostradas representam a espécie tendo história evolutiva comum. Mesmo que as populações tenham se diferenciado com o decorrer do tempo, a análise é constituída sob a hipótese de que há uma única população de referência. A análise da diferenciação em modelos aleatórios é subordinada ao fato de que a amostragem genética faz com que os diferentes alelos na população sejam dependentes ou relacionados (WEIR, 1996).

Assim, quando o interesse está voltado ao quanto as populações se diferenciaram dentro de uma espécie, no decorrer do tempo, o modelo aleatório torna-se o mais adequado, uma vez que essas populações possuem uma origem comum onde o processo de diferenciação ocorreu ao acaso. Neste caso, o emprego das abordagens das estatísticas F de Wright ou das medidas análogas de Cockerhan é bastante adequado na estimação dos parâmetros de diferenciação genética das populações (WEIR, 1996).

No entanto, quando as populações sofrem algum tipo de perturbação, como no caso da ação antrópica, e que desta forma não possuem uma história evolutiva comum, as análises devem ser elaboradas sob modelo fixo. Neste caso, a abordagem da análise da diversidade em populações subdivididas de NEI (1973) torna-se a mais adequada, uma vez que essa abordagem independe das pressuposições das estatísticas de Wright e Cockerhan. Além disso, sob a abordagem de populações fixas, diferentes populações da mesma espécie são comparadas simplesmente pela comparação de frequências ou médias (WEIR, 1996).

A análise de agrupamento ou análise de *cluster* é uma técnica multivariada que visa classificar n itens diversos (populações, clones, variedades, indivíduos, etc.), avaliados por um conjunto de p caracteres ou variáveis, a partir de uma medida de distância entre os itens (DIAS, 1998). A técnica compõe-se de duas etapas: 1) geração de uma matriz de distâncias a partir da amostra dos n itens, totalizando $n(n-1)/2$ pares de distância; 2) aplicação de um algoritmo de agrupamento sobre essa matriz, de modo a identificar e conectar grupos homogêneos. Tais grupos são representados graficamente em um diagrama de árvore denominado dendograma.

A mais usual das medidas de dissimilaridade é a distância euclidiana e pode ser calculada a partir de dados de freqüências alélicas e de dados binários do tipo presença (1) ausência (0) de dado alelo (DIAS, 1998). Os coeficientes de dissimilaridade têm a função de representar a relação linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de p variáveis. Esses coeficientes em sua maioria, são calculados a partir de variáveis binárias representando presença e ausência, com valores de 1 e 0, respectivamente. Existem vários coeficientes de similaridade disponíveis (SOKAL & SNEATH, 1963; SNEATH & SOKAL, 1973; ROMESBURG, 1984; GOWER & LEGENDRE, 1986; BUSSAB et al., 1990; ALFENAS et al., 1991; EVERITT, 1993).

Em relação aos métodos de agrupamento, a literatura contém numerosos métodos para utilização nas mais diversas áreas da ciência (SNEATH & SOKAL, 1973; ROMESBURG, 1984; BUSSAB et al., 1990; EVERITT, 1993; CRUZ & REGAZZI, 1994). O princípio geral de todos os métodos tem sido o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

A partir de um dendograma, derivado dos índices de similaridade entre os indivíduos, não é possível determinar os limites de confiança para os agrupamentos. Uma análise de *bootstrap* consiste em uma estatística não paramétrica dos limites de confiança. Várias matrizes são criadas em função das unidades operacionais taxonômicas x variáveis do estudo. Os dendogramas são construídos para cada uma dessas matrizes novas e a freqüência com que cada agrupamento novo se repete, em todos os dendogramas, permite avaliar o grau de confiança desses grupos (DIAS, 1998).

A análise de componentes principais (*principal components analysis* – PCA) é uma técnica multivariada, proposta por Pearson em 1901 e desenvolvida por Hotelling em 1933, para aplicação, originalmente, em variáveis quantitativas (DIAS, 1998). O princípio desta análise está na rotação ortogonal dos eixos cartesianos, preservando a variância total contida nos dados originais.

A disponibilidade de softwares para processamento de análises multidimensionais é muito grande, e em relação a escolha do (s) programa (s) deve-se

considerar, sobretudo, a robustez, a simplicidade, a abrangência, o estabelecimento de conexões entre os procedimentos e a existência de manual.

2.2.1.1. Marcadores dominantes

A técnica do RAPD (Random amplified polymorphic DNA) consiste na amplificação *in vitro* de regiões de DNA flanqueadas por iniciadores (*primers*) arbitrários (WILLIAMS et al., 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990; CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991). É um método baseado na reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita por SAIKI et al., (1988), envolvendo três estágios: desnaturação do DNA alvo pela elevação da temperatura para 94 °C por 60 segundos, ligação do primer ao DNA alvo, ocorrendo a uma temperatura de 36 °C por 60 segundos, e extensão enzimática da fita de DNA recém amplificada, ou seja, neste passo, dNTPs são adicionados às bases complementares da fita de DNA alvo pela enzima *Taq* polimerase a uma temperatura de 72 °C por 60 segundos (LEAL-BERTIOLI, 1998). Este ciclo é repetido em torno de 40 vezes, para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado.

Os componentes da reação são: DNA alvo, *primers*, que são pequenos fragmentos de DNA de fita simples com normalmente 10 pares de bases de comprimento com 50% de conteúdo dos nucleotídeos guanina e citosina; *Taq* polimerase, que é a enzima isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988), dNTPs, ou seja, os quatro deoxinucleotídeos e tampão de reação da enzima (LEAL-BERTIOLI, 1998). Os produtos desta reação são visualizados por meio de eletroforese, utilizando géis de agarose corados com brometo de etídeo e observados na luz ultravioleta e, dependem da complementaridade entre as seqüências dos oligonucleotídeos (*primers*) e do DNA em estudo, da distância entre os oligonucleotídeos e das condições de reação (WILLIAMS et al., 1990).

Marcadores RAPD são dominantes, ou seja, não é possível distinguir se a presença de uma determinada banda é proveniente de um locus homozigoto (AA) ou

heterozigoto (Aa) (WILLIAMS et al., 1990), contudo esta característica pode ser prevista sem nenhuma influência sobre a eficácia do método para revelação de bandas.

A análise de divergência de indivíduos baseia-se na presença ou ausência de bandas, que pode advir de inúmeros fatores, dentre eles pode-se citar: a inexistência do sítio de homologia para o iniciador ou a modificação deste por alguma mutação, não sendo mais reconhecido; a ocorrência de uma inserção entre os sítios, distanciando-os, o que leva a não amplificação, ou mesmo ocorrendo, o fragmento amplificado terá tamanho diferente aparecendo a banda em outra posição; a existência de um sítio alternativo, semelhante, porém não igual ao sítio real, mas que é reconhecido pelo iniciador levando à amplificação de fragmentos inteiramente diferentes (WILLIAMS et al., 1990).

Marcadores RAPD possuem várias vantagens: um grande número de iniciadores pode ser utilizado; não há necessidade de trabalhos preliminares, tais como, o isolamento de sondas, a marcação e a digestão do DNA; cada marcador equivale a um sítio alvo da seqüência de DNA, simplificando a informação; é um método que pode ser automatizado, levando à obtenção mais rápida e eficiente de mapas genéticos; é uma técnica mais simples, barata e rápida do que os RFLPs (WILLIAMS et al., 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990; CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991). Além do mais, diversos trabalhos têm sido conduzidos, com sucesso, utilizando marcadores RAPD visando caracterizar diversidade genética em microrganismos (MA et al., 2001; WEEDS et al., 2003; BELABID et al., 2004; JAMES et al., 2004; HENSEN et al., 2005; DAVIS et al., 2005).

2.2.1.2. Marcadores codominantes

Os microssatélites também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeats) são poderosos marcadores moleculares com comportamento Mendeliano e consistem de trechos de DNA de unidades mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídica repetidas ao acaso, dispersas por todo o genoma eucarioto (HAMADA et al., 1982).

O polimorfismo de locos microssatélites é revelado pela amplificação via PCR do DNA total usando um par de *primers*, compostos de 18 a 24 nucleotídeos que flanqueiam e definem o loco microssatélite (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989). O notável valor desta classe de marcadores resulta da sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para análise genética. Outra vantagem é a facilidade de troca de informações entre laboratórios, visto que as seqüências dos primers proporcionam uma linguagem comum e a identificação alélica em estudos populacionais é direta e objetiva, em contrapartida às dificuldades observadas com RFLP (POWELL et al., 1996; STEPHAN & CHO, 1994). A alta taxa de mutações encontrada nestas regiões ocorre devido à alta incidência de “escorregamento” na replicação e “crossing-over” desigual, como foi demonstrado *in vitro* por SCHLOTTERER & TAUTZ (1992), gerando locos multialélicos devido ao número variável de repetições.

O conteúdo informático de um loco SSR é bastante alto justamente por se tratar de seqüências de alta taxa evolutiva. Quanto à acessibilidade apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de *primers* informativos, que serão utilizados na reação da PCR para amplificar alelos de cada loco. No entanto, uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (BUSO, 1998).

Locos microssatélites têm sido descritos para uma grande variedade de fitopatógenos, como *Russula brevipes* (BERGEMANN & MILLER, 2002), *Phytophthora infestans* (KNAPOVA & GISI, 2002), *Orobanche crenata* (ROMÁN et al., 2002), *Phialophora gregata* (HARRINGTON et al., 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* (ATALLAH et al., 2004) e *Erysiphe necator* (CORTESE et al., 2004).

2.3. Mecanismos de variabilidade genética em fungos

As interações hospedeiro-patógeno podem ser visualizadas como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. De um lado o patógeno mobiliza suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, enquanto este último, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura defender-se do patógeno (PASCHOLATI et al., 1998). Estas interações são marcadas por íntimas relações geneticamente controladas denominadas de coevolução, onde modificações genéticas na população de um dos componentes são acompanhadas por modificações genéticas na população do outro (CAMARGO, 1995).

A existência de uma relação gene-e-gene em sistemas hospedeiro-patógeno foi demonstrada por FLOR (1942) no patossistema *Linum usitatissimum-Melampsora lini*. Essa relação estabelece que para cada gene de resistência no hospedeiro existe um gene correspondente de virulência no patógeno. Alterações nas populações de patógenos, em resposta aos genes de resistência no hospedeiro, foram encontradas em interações de plantas com vírus, bactérias, nematóides e insetos (ROBINSON, 1976).

2.3.1. Mutação

A mutação é o principal mecanismo gerador de novos genes (CAMARGO, 1995) sendo a mais importante fonte de variabilidade genética em fungos fitopatogênicos (CASELA & GUIMARÃES, 1996). A ocorrência de mutações é devida a erros na duplicação cromossômica tanto na meiose, mutação germinal presente em fungos de reprodução sexuada, como na mitose, mutação somática que ocorre em fungos e bactéria durante os processos de reprodução assexuada (CAMARGO, 1995).

As mutações podem também ser classificadas em mutações gênicas ou cromossômicas. Existem, no entanto, várias causas que podem provocar tais mutações, porém, todas afetam a seqüência de bases nitrogenadas do DNA. As causas são:

substituição, deleção, adição de um ou mais nucleotídeos e inversão de um ou mais segmentos de DNA. As mutações cromossômicas correspondem a quebra de fragmentos cromossômicos e podem ser deleções de segmentos, inserções e duplicações, inversões e translocações, ocorrendo a troca de segmentos entre cromossomos não homólogos (CAMARGO, 1995).

2.3.2. Recombinação meiótica ou reprodução sexuada

A recombinação meiótica é um processo que atua ampliando a variabilidade genética em populações de fungos fitopatogênicos, pela quebra de combinações já existentes e pela formação de novas combinações genéticas (CASELA & GUIMARÃES, 1996). Na reprodução de fungos existem dois sistemas de ciclo sexual: o sistema heterotálico, onde cruzamentos acontecem entre indivíduos de grupos diferentes e o sistema homotálico, onde os cruzamentos ocorrem entre quaisquer indivíduos (CAMARGO, 1995).

2.3.3. Recombinação parassexual

Este processo ocorre em fungos imperfeitos que não apresentam o ciclo sexuado, e consiste basicamente da formação de um núcleo diplóide pela fusão ao acaso de dois núcleos haplóides, seguido de *crossing over* mitótico (CASELA & GUIMARÃES, 1996). Ainda que sejam infreqüentes os recombinantes num ciclo parassexual, em comparação com o ciclo sexual, o processo pode ser significativo para a evolução dos fungos assexuados (DAVIS et al., 1973).

2.3.4. Herança citoplasmática

A herança citoplasmática é importante como fonte de variabilidade em fungos fitopatogênicos, onde há presença de um sistema genético nas organelas do citoplasma (CAMARGO, 1995) e pela ocorrência de RNA de fita dupla com atividade genética (CASELA & GUIMARÃES, 1996). Na fusão de dois citoplasmas, fato que ocorre tanto no ciclo sexual como no parassexual, há novas combinações de núcleos e citoplasmas podendo resultar em combinações inéditas de genomas contendo genes determinantes de patogenicidade ou virulência.

2.3.5. Heterocariose

O processo consiste na coexistência de dois núcleos geneticamente distintos em uma única hifa (CAMARGO, 1995). Em fungos, este processo pode também ocorrer em virtude de anastomoses entre células vegetativas de linhagens geneticamente diferentes. A estabilidade da heterocariose varia conforme a classe de fungo, ocorrendo em ferrugens, carvões himenomicetos e deuteromicetos. Os basidiomicetos conservam sua condição heterocariótica, sendo que a capacidade de dissociação em componentes homocarióticos é bastante limitada. Os ascomicetos e deuteromicetos apresentam comumente a dissociação de heterocarios.

2.3.6. Transposons

Transposons são fragmentos de DNA que podem mover-se de um sítio a outro em uma molécula de DNA ou cromossomo, podendo ocorrer no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes (CASELA & GUIMARÃES, 1996).

2.3.2. Variabilidade genética de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri*

a. *Crinipellis perniciosa*

ANDEBRHAN & FURTEK (1994) usando 177 locos de marcadores RAPD, dos quais 56 foram polimórficos, mostraram que a variabilidade genética foi maior entre oito isolados de *C. perniciosa*, coletados a partir de vassouras secas em diferentes origens geográficas, na Amazônia do que entre isolados de diferentes espécies hospedeiras (*Sterculiaceae*, *Solanaceae* e *Bixaceae*). Os resultados indicaram que a proximidade geográfica para a determinação da relação genética entre isolados foi mais importante que as espécies das plantas hospedeiras. Esses autores também detectaram que padrões de bandas de RAPD entre basidiomas na mesma vassoura foram similares, entretanto, foram detectadas diferenças entre padrões de bandas de culturas monospóricas do mesmo basidioma.

YAMADA et al. (1998) determinaram as relações por análise RAPD entre duas classes de isolados de *C. perniciosa* obtidos de quatro espécies de solanáceas (*Athenaea aff pogogena*, *Solanum gilo*, *S. paniculatum*, *S. rugosum*) crescendo junto ao cacauero, comparando-se com isolados de *T. caçãõ*. Nesse estudo foram distinguidos três grupos provenientes das solanáceas: 1) *S. rugosum* de Manaus, 2) *S. paniculatum* de Camacã e 3) Resto de cepas coletados na Bahia. Os isolados de cacau da Bahia foram distintos das solanáceas, exceto um de *S. paniculatum* que se agrupou com os de cacau.

ANDEBRHAN et al. (1999b) analisaram 46 isolados de *C. perniciosa*, com 20 *primers* RAPD, obtendo 258 loci, dos quais 108 foram polimórficos. Análises de agrupamento originaram quatro grupos de similaridade genética: 1) grupo contendo isolados de Ariquemes (RO); 2) grupo contendo isolados de Ouro Preto (RO); 3) grupo contendo isolados da região sul da Bahia e 4) grupo com isolados da região norte da Bahia. Pelo fato do grupo de isolados do sul da Bahia ter sido mais similar aos isolados

da Amazônia, do que aos isolados no norte da Bahia, os autores sugeriram que pode ter ocorrido dois pontos focais independentes de introdução do patógeno na Bahia.

GOMES et al. (2000) analisaram a diversidade genética de *C. perniciosa* proveniente de 20 municípios da Bahia, com 13 *primers* decâmeros, gerando 100 marcadores RAPD. Pelas análises de agrupamento e dispersão foram definidos três grupos: isolados do sul, isolados do norte e isolados com características intermediárias, evidenciando a variabilidade genética do patógeno e uma tendência de regionalização dos isolados obtidos na região cacaueteira baiana.

A variabilidade genética entre 10 isolados monospóricos de *C. perniciosa*, sendo cada isolado monospórico proveniente de diferentes estados brasileiros (BA, MG, AM, MT, PA e RO) e de diferentes hospedeiros (*Theobroma cacao*, *Solanum lycocarpum* e *Heteropterys acutifolia*), por marcadores RAPD, também foi objeto de estudo de NIELLA et al. (2000). Esses autores evidenciaram a formação de um grupo principal com três isolados da Bahia e um do Pará, os demais isolados foram distintos dos isolados do grupo principal, sendo que os isolados de Mato Grosso (*T. cacao*) e Minas Gerais (*S. lycocarpum* e *H. acutifolia*) foram os mais divergentes.

GRAMACHO et al. (2002a) usando marcadores moleculares RAPD, detectaram quatro populações de *C. perniciosa* em *T. cacao*, a partir de 25 isolados coletados em almofadas florais, flores, ovários, gemas apicais e frutos de uma mesma árvore. Em outro trabalho, esses autores caracterizaram por análise molecular (RAPD e rDNA) e por teste de patogenicidade, isolados de *C. perniciosa* a partir de diversos hospedeiros. Isolados provenientes de *Stigmaphyllon blanchetii* C. E. Anderson (*Malpighiaceae*) e *Solanum rugosum* foram separados dos isolados de *C. perniciosa* de *T. cacao*, sendo sugerido por eles, que esses isolados possuem um genótipo diferente daqueles de *T. cacao*, na Bahia. Nos testes de patogenicidade entre isolados de *C. perniciosa* de *T. cacao* e de *S. blanchetii* não ocorreu infecção nas inoculações cruzadas (GRAMACHO et al., 2002b).

ARRUDA et al. (2003a) analisando 120 isolados de *C. perniciosa* procedentes da Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal e região Amazônica, infectando *T. cacao*, *H. acutifolia* e *S. lycocarpum*, analisaram variações genéticas através de análises de DNA

ribossomal das regiões ITS, IGS e mitocondrial (SSUrDNA). Os produtos da PCR foram digeridos com três enzimas de restrição e se detectou polimorfismo nas análises das regiões IGS e rDNA permitindo separação em dois grupos: 1) Cacao e *Solanum* e 2) *H. acutifolia*. A caracterização molecular de 50 isolados de *C. pernicioso* originados de *T. cacao*, *H. acutifoliae* *S. lycocarpum*, através de ERIC-PCR revelou através das análises dos padrões de bandas uma separação de isolados em função do hospedeiro de origem. Considerável variabilidade intraespecífica foi observada dentro de isolados provenientes de *T. cacao*, com grupos distintos, observando correlação com origem geográfica (ARRUDA et al., 2003b).

GRAMACHO et al. (2003), usando marcadores do tipo RAPD, determinaram a estrutura genética de populações de *C. pernicioso* da Bahia, coletadas de plantações de cacao infectadas naturalmente e localizadas em três zonas agroecológicas em uma mesma época. Reportaram que a população de *C. pernicioso* infectando plantações apresentou diferenças na sua estrutura populacional, havendo regionalização de grupos de isolados.

Mapeamento molecular de cromossomos de *C. pernicioso* foi desenvolvido por RINCONES et al. (2003). Esses autores relatam pela primeira vez o número de cromossomos, o tamanho do genoma e o polimorfismo cromossomal para o biotipo C, cacao de *C. pernicioso*, pela técnica de eletroforese por *pulse-field* (PFGE). Os autores relataram que isolados analisados de *C. pernicioso* apresentaram um genoma de aproximadamente 30 Mb, contendo 6 a 8 cromossomos. Nos experimentos de hibridização, a partir de seqüências de telômeros, foi mostrado que dos quatro isolados de *C. pernicioso* de *T. cacao* da Bahia, três apresentaram seis bandas cromossomais com repetições de rDNA hibridizados no cromossomo 2, enquanto no único isolado de *C. pernicioso*, com oito bandas cromossomais, essa região do rDNA hibridizou no cromossomo 1.

IGNACCHITI et al. (2003), com base em seqüências disponibilizadas do genoma do *C. pernicioso* desenharam oligonucleotídeos para amplificar possíveis seqüências pertencentes a transposons da Classe II. Duas dessas seqüências apresentaram homologia a dois diferentes elementos pertencentes a família *Ac* e foram denominados

Ac1 e Ac2. Com a hibridização de enzimas de restrição com o fragmento Ac1 da maioria dos isolados de *C. pernicioso* testados, foi observada variação no número e tamanho das bandas encontradas, estando de acordo com a presença de elementos ativos, capazes de mudar de posição.

PEREIRA et al. (2003) detectaram e analisaram seqüências putativas de transcriptase reversa no banco de dados do genoma do *C. pernicioso*. DNAs de diferentes isolados deste fitopatógeno foram amplificados por PCR e foi observada a presença da putativa seqüência de transcriptase reversa. Muitas bandas foram constituídas de mais de um tipo de seqüência, sugerindo a ocorrência de sub-famílias do possível elemento em *C. pernicioso*.

LANA (2004), utilizando marcadores RAPD avaliou 37 isolados de *C. pernicioso* provenientes de diversos hospedeiros e regiões do Brasil. A análise de agrupamento separou os isolados em 8 grupos e constatou que isolados obtidos de uma mesma planta não se agruparam, reforçando a hipótese de que isolados geneticamente diferentes podem ocupar a mesma planta hospedeira.

SOLIS (2005), utilizando marcadores RAPD, analisou a diversidade genética de isolados de *C. pernicioso* provenientes de regiões produtoras de cacau do Equador e comparou a proximidade genética desses isolados com isolados da Bahia, Brasil. Os isolados do Equador, formaram cinco grupos distintos correspondentes a diferentes áreas: Costa Norte, Costa, Costa Central, Sierra e Oriente. Através da análise de componentes principais 3 isolados da Bahia se relacionaram com isolados do grupo da Costa Central.

PLOETZ et al. (2005) analisaram a variação genética de 40 isolados de *C. pernicioso* com base em marcadores AFLP. Os isolados foram agrupados em dois grupos distintos: isolados do biótipo C (patogênico ao cacau) provenientes da Bolívia, Brasil, Equador e Trinidad e isolados do biótipo S (patogênico a hospedeiros de solanáceas) e *M. subcuneiformis*. Os resultados corroboram com a hipótese de que *C. pernicioso* foi provavelmente introduzido na Bahia através de isolados da base do Amazonas.

b. *Moniliophthora roreri*

Estudos sobre diversidade genética em *M. roreri* ainda são muito incipientes. Diversidade genética foi estudada através de marcadores moleculares em isolados coletados da América Central, centro do Equador e Peru (PHILLIPS-MORA, 2003). Análises das seqüências de AFLP, ISSR e ITS revelaram que o fitopatógeno tem uma considerável variação genética. Uma alta variabilidade foi observada na região norte-oriental da Colômbia indicando que esta região representa o centro de diversidade do fitopatógeno. Isolados do Equador mostraram níveis de diversidade genética intermediários, e os da América Central exibiram baixos níveis de diversidade genética. Foram identificados cinco grupos específicos: (i) Colômbia Central, (ii) Colômbia (El Carmen Chucuriu), (iii) *T. gileri* (Equador), (iv) Equador Central, e (v) Colômbia, Santander, áreas periféricas do Equador, Peru e Venezuela.

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. Objetivo geral

Estudar a estrutura genética de populações de *C. pernicioso* e *M. roreri* oriundas do Continente Americano advindas de cacauzeiros com diversas origens de cruzamentos (híbridos) por meio de marcadores moleculares RAPD e microssatélites.

3.2. Objetivos específicos

(i) Comparar as metodologias de caracterização genética populacional de *C. pernicioso* e *M. roreri* por marcadores dominantes (RAPD) e por marcadores codominantes (microssatélites);

(ii) Seleccionar *primers* de marcadores microssatélites para *M. roleri* a partir de *primers* desenvolvidos para *C. perniciososa*.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Crinipellis pernicioso* DO CONTINENTE AMERICANO COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO - O fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer é o agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau. A doença se constitui num dos maiores entraves para o desenvolvimento desta cultura, sendo um fator limitante à produção de cacau em regiões produtoras nas Ilhas do Caribe e Continente Americano. Basicamente, os estudos descritos envolvendo genética populacional até agora examinaram a diversidade genética em isolados de *C. pernicioso* em populações regionais, não havendo especificadamente análise genética da estrutura de populações deste patógeno em diferentes níveis. Além do mais, a maioria destes trabalhos tem focado o estudo de isolados em diferentes biótipos e o entendimento da origem do fungo na Bahia. A estrutura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* oriunda do Brasil, Equador, Peru e Trinidad foi avaliada usando marcadores microssatélites ou SSR. Sete loci SSR distribuídos por todo o genoma do *C. pernicioso* foram genotipados utilizando gel de prata e os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da estrutura genética entre as populações. A análise de variância molecular (AMOVA) dos dados genotípicos revelou que, do total da variabilidade, 80,02% foi encontrada dentro de países. As estimativas da estatística F de Weir & Cockerham (1994) e Nei (1973) revelaram moderados níveis de diferenciação genética dentro de populações do Brasil ($\phi_{ST} = 0,15$; $p \leq 0,0001$) e Peru ($\phi_{ST} = 0,11$; $p < 0,0001$), e baixos níveis, dentro de populações do Equador ($\phi_{ST} = -0,09$; $p > 1,000$). O mesmo padrão foi observado ao nível de populações individualmente. Análise genética intrapopulacional revelou baixo a alto nível de diferenciação genética ($G_{ST} = -0,22$ a $0,48$) entre regiões, assim como dentro de regiões, com diversidade alélica (H_S) variando de 0,28 a 0,61. Maior diversidade genética foi encontrada nas populações do Brasil ($H' = 0,62$). Por outro lado, a diversidade alélica (H_S) foi alta variando de 0,28 a 0,61. Estes resultados reforçam as conclusões de estudos anteriores com base em dados patogênicos e confirmam que as populações de

C. perniciosus estão estruturadas a nível regional, e que a dispersão do fitopatógeno a longa distância não ocorre com alta frequência. A presença de populações de *C. perniciosus* tem implicações práticas importantes, principalmente no manejo da doença nas diferentes áreas aonde a mesma se encontra, devendo-se enfatizar medidas quarentenárias e aos trabalhos de resistência à doença.

Palavras-Chave: seqüência simples repetida, diferenciação genética, marcadores moleculares, cacau, vassoura-de-bruxa, basidiomiceto

GENETIC STRUCTURE OF *CRINIPELLIS PERNICIOSA* POPULATIONS FROM THE AMERICAN CONTINENT BASED ON SSR

SUMMARY – *Crinipellis pernicios*a (Stahel) Singer, the causal agent of witches' broom disease of cacao is a destructive pathogen in the cacao plantations of the Caribbean Islands and American Continent. While much research has been conducted on population structure of fungal plant pathogens knowledge on the population structure of *C. pernicios*a is still sparse and most work has been focused primarily to study isolates of the different biotypes and to understand the origin of the fungus in Bahia. The population structure of *C. pernicios*a from Brazil, Ecuador, Peru and Trinidad was investigated using seven microsatellite data. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that overall variability 80,02% was found within region indicating clusterization at the country level. The same pattern was observed at the population level. Estimative of Weir & Cockerham and Nei (1973) showed moderated level of differentiation within Brazilian ($\phi_{ST}= 0,15$; $p \leq 0,0001$) and Peruvian ($\phi_{ST}= 0,11$; $p < 0,0001$) populations, whereas Ecuadorian populations presented low levels of genetic differentiation ($\phi_{ST}= -0,09$; $p > 1,000$). Genetic subdivision analysis revealed a low to high level of genetic differentiation ($G_{ST}= -0,22$ to $0,48$) among regions, as well as within regions. On the other hand, within population diversity (H_S) was very high with values ranging from 0,28 to 0,61. However, overall genetic diversity was very similar. These results support conclusions from previous pathogenicity studies and confirms that the population structure of *C. pernicios*a is at the regional level, indicating that long-distance dispersal by natural factors does not occur at high frequencies. The disponibility of genetic material has important practical implications, as available host resistance genes are likely to be effective in controlling the disease in diverse geographical areas.

Keywords: simple sequence repeats, genetic differentiaton, molecular markers, cacao, witches' broom, basidiomycete

1. INTRODUÇÃO

Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer é o agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Esta se constitui numa das principais doenças desta cultura, sendo um fator limitante na produção de cacau em regiões produtoras das Américas do Sul e Central e nas Ilhas do Caribe (PURDY & SCHMIDT, 1996). No sul da Bahia a vassoura-de-bruxa é a principal responsável pela limitação da produção de cacau desde o fim dos anos 80 (PEREIRA et al., 1989), constituindo-se em sérios prejuízos econômicos, sociais e ecológicos para a cacauicultura sul baiana (PEREIRA, 1996a,b). Atualmente a produção de cacau no Brasil está em torno de 169.000 toneladas de amêndoas, situando-se o país em quinto lugar na produção mundial (FAO, 2005).

O centro de origem do *C. pernicioso* é a planície Amazônica. Este fungo foi encontrado pela primeira vez no Suriname, em 1895 (STAHEL, 1919), havendo rápida disseminação para o Equador, em 1921 e em 1928 para Trinidad (BAKER & HOLLIDAY, 1957) e Colômbia (ARANZAZU & BURITICÁ, 1993). Na década de 70, coincidentemente com o extensivo desflorestamento e exploração de óleo na Amazônia Equatoriana, a doença se espalhou através dos Andes, provavelmente via migração de fazendeiros (GRIFFITH et al., 2003), sendo que no ano de 1951 a doença foi constatada no Peru (BAZÁN DE SEGURA, 1952). Acontecimentos similares no Brasil levaram ao estabelecimento de plantações de cacau nos estados de Rondônia e Acre e a inevitável ocorrência da doença nestas regiões (RUDGARD, 1986), chegando, finalmente, na Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1989).

Resistência genética a doenças é um dos principais componentes do sistema integrado de proteção de plantas (FLORIS & ALVAREZ, 1996), e a longo prazo é a medida de controle mais eficiente no combate a vassoura-de-bruxa. Informações a respeito das populações deste fungo são importantes para melhor entender a dinâmica de epidemias e auxiliar no desenvolvimento de materiais resistentes a doença.

Diversos caracteres têm sido usados para descrever a estrutura populacional do fungo *C. pernicioso*. GRIFFITH & HEDGER (1994) reconheceram quatro biótipos de *C. pernicioso* baseado no hospedeiro que ataca. O biótipo-C que infecta predominantemente *Theobroma* spp. e *Herrania* spp.; o biótipo-S que infecta as espécies da família Solanaceae; o biótipo-L que é predominantemente saprofítico e coloniza diversos substratos e o biótipo-B que infecta *Bixa orellana*. Vários caracteres genéticos e fenotípicos têm sido utilizados no estudo de isolados em diferentes biótipos (McGEARY & WHEELER, 1988; WHEELER & MEPSTED, 1988; LAKER, 1989; ANDEBRHAN & FURTEK, 1994; YAMADA et al., 1998; ANDEBRHAN et al., 1999; ARRUDA et al., 2003a,b; RINCONES et al., 2003; FERREIRA, 2005).

Não obstante, a importância de *C. pernicioso*, pouco se conhece sobre a genética deste patógeno e, só recentemente, pesquisas envolvendo técnicas moleculares indicaram diversidade genética entre isolados do fungo. ANDEBRHAN et al. (1999), estudando a similaridade genética dos isolados de *C. pernicioso* provenientes da Bahia e da Amazônia, identificaram quatro grupos distintos. Dois grupos continham isolados provenientes de Ariquemes e de Ouro Preto - Rondônia, e os outros dois grupos, isolados provenientes da região norte e sul da Bahia. Com base na distribuição geográfica dos isolados da Bahia foi sugerido que duas introduções ocorreram na região. GOMES et al. (2000) analisaram a diversidade genética de *C. pernicioso* proveniente de 20 municípios da Bahia. Pelas análises de agrupamento e dispersão foram definidos três grupos: isolados do sul, isolados do norte e isolados com características intermediárias, evidenciando a variabilidade genética do patógeno e uma tendência de regionalização dos isolados obtidos na região cacaueteira baiana. Fato reportado, também por MELO (2000) e NIELLA et al. (2000). ARRUDA et al. (2003a), utilizando 120 isolados de *C. pernicioso* procedentes da Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal e região Amazônica, infectando *T. cacao*, *H. acutifolia* e *S. lycocarpum*, analisaram variações genéticas através de análises de DNA ribossomal das regiões ITS, IGS e mitocondrial (SSUrDNA), detectando polimorfismo, permitindo separação em dois grupos: 1) Cacao e *Solanum* e 2) *H. acutifolia*. Contudo, estes estudos focalizaram basicamente a origem da doença na Bahia e não foram direcionados a estudar a

dinâmica populacional do fitopatógeno. Assim, estudos para se determinar se as populações estão ou não subestruturadas não foram conduzidos.

LANA (2004), utilizando marcadores RAPD, analisou 37 isolados de *C. pernicioso* provenientes de diversos hospedeiros e regiões do Brasil. Mediante análise de agrupamento separou os isolados em 8 grupos e constatou que isolados obtidos de uma mesma planta não se agruparam, reforçando a hipótese de que isolados geneticamente diferentes podem ocupar a mesma planta hospedeira. SOLIS (2005), utilizando marcadores RAPD, analisou a diversidade genética de isolados de *C. pernicioso* provenientes de regiões produtoras de cacau do Equador e comparou a proximidade genética de isolados entre este país e os do Brasil. Os isolados se agruparam em cinco diferentes grupos correspondentes a diferentes áreas: Costa Norte, Costa, Costa Central, Sierra e Oriente. Através da análise de componentes principais 3 isolados da Bahia se relacionaram com isolados do grupo da Costa Central. Recentemente, PLOETZ et al. (2005), com base em marcadores AFLP, analisaram a variação genética de 40 isolados de *C. pernicioso*. Os isolados foram agrupados em dois grupos distintos: isolados do biótipo C (patogênico ao cacau) provenientes da Bolívia, Brasil, Equador e Trinidad e isolados do biótipo S (patogênico a hospedeiros de solanáceas) e *M. subcuneiformis*. Os resultados também corroboram com a hipótese de que *C. pernicioso* foi provavelmente introduzido na Bahia através de isolados da base do Amazonas.

O entendimento da estrutura populacional deste fungo e os processos que afetam sua mudança são importantes para desenvolver estratégias satisfatórias no controle desta doença e no desenvolvimento de cultivares resistentes. Marcadores moleculares são ferramentas úteis na análise de variação genética em populações de fungos fitopatogênicos. O uso de marcadores de DNA, na análise da dinâmica de patógenos de plantas, provém de níveis de precisão nunca imaginados e está revolucionando a análise de biologia de populações de fitopatógenos (McDERMOTT & McDONALD, 1993; MILGROOM & FRY, 1997). Seqüência simples repetida (SSR) ou microssatélites são seqüências relativamente abundantes em microrganismos (FIELD & WILLS, 1996) e estão distribuídas por todo o genoma do fitopatógeno (WEISING et al.,

1995). As diferenças e similaridades entre isolados podem ser avaliadas em regiões satélites do cromossomo e os dados podem ser usados para monitorar a epidemia da doença, a dinâmica populacional e a composição de raças das populações do patógeno. O polimorfismo de *loci* microssatélites é revelado pela amplificação via PCR do DNA total usando um par de *primers* que flanqueiam e definem o *locus* microssatélite (LITT & LUTY, 1989). O valor notável desta classe de marcadores resulta da sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para análise genética (JOHANSSON et al., 1992). Eles podem ser usados para mapeamento genômico, estudos evolucionários e de populações, assim como análises de *fingerprinting* e pedigree (ZANE et al., 2002).

Basicamente, os estudos descritos até agora examinaram a diversidade genética em isolados de *C. pernicioso* em populações regionais, não havendo especificadamente análise genética da estrutura de populações deste patógeno em diferentes níveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura genética de populações de *C. pernicioso* provenientes dos principais países produtores de cacau do Continente Americano, com base em marcadores microssatélites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados utilizados

Um total de 71 isolados foi usado nesse estudo (Tabela 1). Os isolados foram obtidos de cacauzeiros comuns (híbridos) de diversas regiões dos principais países produtores de cacau do Continente Americano: Brasil, Equador, Peru, Trinidad e Colômbia. Os isolados oriundos do Norte do Brasil e dos demais países foram adquiridos através de intercâmbio de DNA, cedidos pelos pesquisadores Paulo Albuquerque(CEPLAC, Brasil),

Tabela 1 – Origem e fenótipos multi-locos de *Crinipellis perniciososa* usados neste estudo.

País	Localidade	Isolado	Locos										Fenótipo		
			15	19	14	23	64	22							
Brasil (região Norte)	Marituba	356	192188	242242	206206	213213	206206	311311	201201						1
Brasil (região Norte)	Rondônia	69-03	192188	254254	200200	213213	202202	311311	201201						2
Brasil (região Norte)	Amazonas	73-64	192188	258258	200200	213213	206206	311311	201201					3	
Brasil (região Norte)	Amazonas	92-07	192188	258258	200200	213213	206206	311311	201201					3	
Brasil (região Norte)	Amazonas	92-09	192188	258258	200200	213213	206206	311311	201201					3	
Brasil (região Norte)	Rondônia	786	192188	258258	200200	213213	206206	311311	201201					3	
Brasil (região Norte)	Ji-Paraná	431	192188	262262	200200	213213	206206	311311	198198					4	
Brasil (região Norte)	Rondônia	73-45	197197	254254	200200	213213	202202	311311	201201					5	
Brasil (região Norte)	Rondônia	69+05	197197	254254	200200	213213	206206	311311	201201					6	
Brasil (região Norte)	Alta Floresta	433	197197	262262	200200	213213	202202	311311	198198					7	
Brasil (região Norte)	L Griffith	412	197197	262262	200200	213213	202202	311311	198198					7	
Brasil (região Norte)	Altamira	439	197197	262262	200200	213213	202202	311311	201201					8	
Brasil (região Norte)	Belém	Niella (9)	197197	262262	200200	213213	202202	311311	201201					8	
Brasil (região Norte)	Ariquemes	362	197197	262262	200200	213213	206206	311311	198198					9	
Brasil (região Norte)	CacauNativo	340	197197	262262	200200	213213	206206	311311	198198					9	
Brasil (região Norte)	Manaus	357	197197	262262	200200	213213	206206	311311	201201					10	
Brasil (região Norte)	West of Amazonas	428	197197	262262	200200	213213	206206	311311	201201					10	
Brasil (região Norte)	West of Amazonas	411	197197	262262	200200	213213	000000	311311	198198					11	
Brasil (região Norte)	Jaru	439	197197	262262	200203	213213	206206	311311	201201					12	
Brasil (região Norte)	Rondônia	69-05	200200	254254	200200	213213	206206	311311	201201					13	
Brasil (região Norte)	Canavieiras	1081	197192	262262	200200	213213	202202	311311	198198					14	
Brasil (Bahia)	Almada	241	197197	262262	200200	213213	206206	311311	198198					9	
Brasil (Bahia)	Valença	254	197197	262262	200200	213213	206206	311311	201201					10	
Brasil (Bahia)	Ipiaú	1082	197197	262262	200200	000000	206206	311311	201201					15	
Brasil (Bahia)	Camacan	273	197197	262262	200200	213213	206206	311311	201201					10	
Brasil (Bahia)	Almada	240	197197	262262	200200	213213	000000	311311	198198					11	
Brasil (Bahia)	Recôncavo	1173	197197	262262	200200	213213	000000	311311	198198					11	
Brasil (Bahia)	Camacan	250	197197	262262	200200	213213	202202	311311	198198					16	
Brasil (Bahia)	Caravelas	703	197197	262262	200200	213213	202202	311311	201201					17	
Brasil (Bahia)	Jiquiriçá	896	197197	262262	200200	213213	202202	311311	201201					17	
Brasil (Bahia)	Santo Amaro	ST	197197	262262	200200	213213	000000	311311	000000					18	

continuação Tabela 1

Brasil (Bahia)	Medeiros Neto	1189	197197	262262	200200	217217	202202	311311	198198	19
Brasil (Espírito Santo)	Linhares	L	203203	250250	197197	216216	210210	314314	204204	20
Colômbia		Co1	197197	254254	200200	213213	202202	311311	198198	21
Equador (Costa Central)		Ver403	200200	254242	200200	213213	206206	311311	201201	13
Equador (Costa Central)		Vrg404	200200	262238	200200	213213	206206	311311	000000	22
Equador (Costa Central)		Pch705	200200	262262	200200	213213	206206	311311	198198	23
Equador (Costa Central)		Pch704	200200	262262	200200	000000	206206	311311	000000	24
Equador (Costa)	Manabi	Mnb202	197197	254242	200200	213213	206206	311311	201201	25
Equador (Costa)	Manabi	Mnb206	200200	254242	200200	209209	206206	311311	201201	26
Equador (Costa)	Manabi	Mnb208	200200	262262	200200	213213	206206	311311	198198	23
Equador (Costa Norte)	Esmeraldas	Esm502	200200	254242	200200	209209	206206	311311	198198	27
Equador (Costa Norte)	Esmeraldas	Esm505	200200	262238	200200	213213	206206	311311	201201	28
Equador (Costa Norte)	Esmeraldas	Esm503	200200	262262	200200	213213	206206	311311	201201	29
Equador (Sierra)	Cotopaxi	Vrg426	200200	262262	200200	213213	206206	311311	198198	23
Equador (Sierra)	Cotopaxi	Vgr425	200200	262262	200200	000000	206206	311311	201201	30
Peru (La Isla)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP22	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (La Isla)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP15	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (La Isla)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP15	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Shamiro)	(Am Cajamarca Juanjui)	CpP16	200200	258258	206206	213213	206206	311311	201201	31
Peru (La Isla)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP22	200200	258258	200200	217217	206206	311311	201201	32
Peru (La Isla)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP22	200200	262262	206206	213213	206206	311311	201201	33
Peru (Shamiro)	(Am Cajamarca Juanjui)	CpP16	200200	262262	200200	217217	206206	311311	201201	34
Peru (Tingo de Saposoa)	(Amazonas cajamarca-Saposoa)	CpP9	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Bajo Almendras)	SanMartin	CpP8	200200	258258	206206	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP54	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP56	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP51	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP54	200200	258258	200200	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP55	200200	258258	203203	213213	206206	311311	201201	31
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP55	200200	262262	200200	213213	206206	311311	201201	29
Peru (Tingo María Huanuco)	SanMartin	CpP45	200200	262262	200200	213213	206206	311311	201201	29

continuação Tabela 1.

Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP51	200200	262262	200200	213213	206206	311311	201201	29
Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP54	200200	262262	203203	213213	206206	311311	201201	35
Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP38	200200	262262	203203	213213	206206	311311	201201	35
Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP45	200200	262262	203203	213213	206206	311311	201201	35
Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP56	200200	262262	206206	213213	206206	311311	201201	33
Peru (Tingo Maria Huanuco)	SanMartin	CpP56	000000	258258	200200	213213	206206	311311	201201	36
Trinidad	Trinidad	603	197197	254242	200200	213213	206206	311311	201201	25
Trinidad	Trinidad	812PR	197197	254242	203203	213213	206206	311311	201201	25
Trinidad	Trinidad	60302	200200	242242	200200	213213	206206	311311	201201	37

Karina Solis (INIAP, Equador), Enrique Arévalo (UNAS, Peru) e Jean Philippe (Universidade da Pensilvânia, Estados Unidos).

2.2. Extração de DNA

Para extração do DNA genômico os isolados oriundos da Bahia, Brasil, foram cultivados por no máximo 10 dias em meio líquido Malte 3% (30 g de Malte, 10 g de dextrose) em B. O. D. à temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, filtrado em papel de filtro e lavado com água gelada estéril. Após este período, a massa micelial de cada isolado foi coletada e colocada em tubos de 1,5 mL, liofilizadas e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior. O DNA foi extraído de acordo com o método de ZOLAN & PUKILLA (1986) com algumas modificações no tampão de extração (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0). A massa micelial de cada isolado foi macerada em nitrogênio líquido, o qual foi transferida para tubos de polipropileno onde foram adicionados 800 μL de clorofórmio-isoamílico (24:1) para desproteinização. A fase aquosa obtida após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos foi removida e transferida para tubos de 1,5 mL e adicionado isopropanol gelado numa quantidade equivalente ao volume do sobrenadante, para precipitação do DNA, sendo as amostras incubadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. O DNA foi peletizado através de centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm e lavado com 95% de etanol gelado, após o qual o *pellet* foi secado em ambiente e ressuspenso com 100 μL de água Milli-Q esterelizada e destilada contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase.

2.3. Reação de microssatélite

O volume utilizado para reação foi de 20 μL , contendo 5 ng de DNA, 0,2 mM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP (Ludwig Biotecnologia Ltda.), 1X de tampão e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda.) (GRAMACHO et al., 2003). Os produtos de PCR foram primeiramente checados através

de gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo. As amplificações foram conduzidas em um Eppendorf Mastercycler Gradient, com “Touch Down” PCR. Na reação, a temperatura de anelamento dos *primers* variou de acordo com os mesmos, havendo 10 ciclos para denaturação a 94 °C por 4 min, anelamento do *primer* a 60-48 °C para os *primers* 14, 15, 19, 22, 23, 64 e 61-54 °C para o *primer* 45, usando 1,0 °C de decréscimo, e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final de 4 minutos a 72 °C. Os fragmentos obtidos após amplificação foram separados por eletroforese em gel de acrilamida a 6%, tendo como tampão de corrida TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA). O gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata de acordo com CRESTE et al. (2001) e GRAMACHO et al. (2003). Utilizou-se como marcador de peso molecular o ladder 10 pb. Os *primers* utilizados neste trabalho foram previamente otimizados e definidos com base no trabalho de GRAMACHO et al. (2003) e estão descritos na Tabela 2. A genotipagem foi baseada no comprimento dos alelos amplificados em cada *loco*, registrados em géis de poliacrilamida escaneados, tomando por base os pesos moleculares do ladder 10 pb colocados nas laterais de cada gel.

Tabela 2. Estimativa das estatísticas de Nei nos locos amplificados em isolados de *Crinipellis pernicioso*.

Locos	Motivos	Tamanho (pb)	Amplitude alélica	Número de alelos por locos	Poder discriminativo	H _e ^a	H _T ^b
msCEPEC-Cp14	(AGAT) ₅	213	209-217	4	0,28	0,11	0,28
msCEPEC-Cp15	(GAA) ₆	197	188-203	5	0,63	0,29	0,63
msCEPEC-Cp19	(GAT) ₈	200	197-206	4	0,31	0,15	0,31
msCEPEC-Cp22	(CTT) ₆	201	198-204	3	0,53	0,32	0,54
msCEPEC-Cp23	(TCAG) ₁₀	206	202-210	3	0,43	0,13	0,45
msCEPEC-Cp45	(AGAT) ₅	262	238-262	6	0,92	0,40	0,73
msCEPEC-Cp64	(TGG) ₆	311	311-314	2	0,14	0,01	0,14
				3,86	0,46	0,20	0,44

^adiversidade esperada

^bdiversidade genética total

2.4. Análise de dados

A partir da leitura dos dados nos géis o polimorfismo genético de cada *locos* foi medido através da amplitude alélica em pares de bases (pb), número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) (NEI, 1978), usando o programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999).

A estrutura genética das populações de *C. perniciosus* foi analisada utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) dos dados genotípicos em níveis hierárquicos (entre e dentro de países, entre estados dentro de países, entre municípios dentro de estados e dentro de municípios). Os parâmetros estatísticos, que se seguem, foram calculados (WEIR & COCKERHAM, 1984) para estimar diferenciação genética das populações de acordo com o nível hierárquico estabelecido: o índice de fixação F_{ST} para entre países e entre estados em cada país, o índice de fixação F_{IS} para entre municípios dentro de estados e o F_{IT} para dentro de municípios. O nível de significância, valor “p”, do teste foi testado como a proporção de permutações que proporcionam um F_{ST} maior ou igual ao observado.

As estimativas da estrutura genética de cada população de *C. perniciosus* foram estudadas através da análise do número de amostras (n), número de haplótipos (g), índice de Shannon (H') (LEWONTIN, 1972), porcentagem de *locos* polimórficos (r), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) (NEI, 1978), índice de fixação (f) (WEIR & COCKERHAM, 1984), número médio de alelos (n_a), frequência alélica, diversidade alélica (H_s), diversidade genética total (H_T) e diversidade genética da subpopulação com relação ao total da população (G_{ST}) (NEI, 1973). O índice de Shannon foi calculado através do programa Popgene 1.31 (YEH et al., 1997). As demais estimativas foram obtidas pelo programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999). Coeficientes de correlação foram determinados com o programa SAS (The SAS System for Windows, Ver. 7.0., 1999).

A estruturação da variabilidade das populações foi visualizada através do dendograma construído no programa Darwin (Ver. 5.0) (PERRIER et al., 2003) com base nas frequências fenotípicas de cada população dada pelo programa Arlequin e

pelo critério de agrupamento UPGMA (SNEATH & SOAKAL, 1973). A estabilidade dos agrupamentos também foi testada por intermédio do procedimento de reamostragem por 1000 bootstrap.

PCA (principal component analysis) foi usada para investigar as distribuições das populações em relação ao total da variabilidade representada em cada eixo principal do diagrama com base nas frequências alélicas dos indivíduos em cada população. Utilizou-se o programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999).

3. RESULTADOS

3.1. Estatística descritiva do total de *locos* amplificados

Todos os *primers* apresentaram perfis polimórficos (Figura 1). Sete *locos* polimórficos foram identificados, apresentando uma média de 2 a 6 alelos por *locos*. Os alelos foram designados pelo tamanho do fragmento (s), em pares de bases, identificados em cada *locos* (Tabela 2).

Entre os 71 isolados analisados obteve-se um valor médio de 3,86 alelos por *locos* e tamanhos que variaram de 188 pb até 314 pb (Tabela 2). No total, 37 diferentes fenótipos foram encontrados, sendo 20 no Brasil, 9 no Equador, 6 no Peru, 1 em Trinidad e 1 na Colômbia (Tabela 1).

O poder discriminativo por *locos* variou de 0,14 no *locos* 64 a 0,92 no *locos* 45. Dentre os 7 pares de *primers* utilizados neste trabalho, os mais polimórficos foram 45, amplificando 6 alelos, o 15, amplificando 5 alelos, o 14 e 19, amplificando 4 alelos, enquanto os *primers* 22 e 23 amplificaram 3 alelos, e o 64 apenas 2 alelos (Tabela 2).

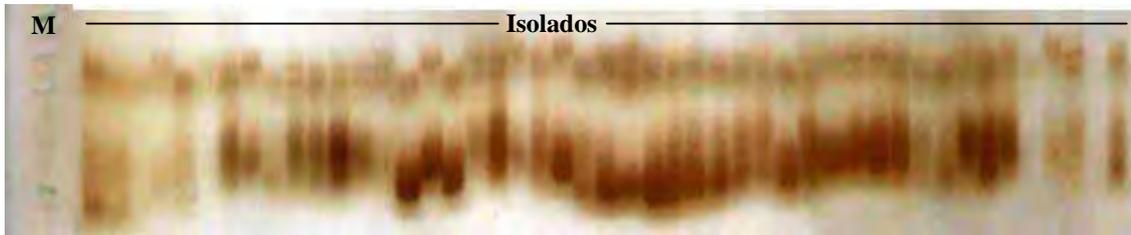


Figura 1 - Perfil de um gel de microssatélite utilizando o *primer* msCEPEC-Cp22 em isolados de *Crinipellis pernicioso* provenientes do Continente Americano; à esquerda está o padrão de peso molecular de um ladder de 10 pb.

A média da diversidade genética total (H_T) para todas as populações foi de 0,44, e a média da diversidade esperada (H_e) de 0,20 (Tabela 2).

A frequência de alelos em todos os *loci* variou grandemente. Nas populações oriundas do Brasil, só o isolado do Espírito Santo apresentou alelos raros, não tendo nenhuma similaridade com outra população estudada (Tabela 3). Em relação às populações do Equador e Peru, os *locos* 19 e 45 permitiram a diferenciação entre estas populações (dados não mostrados).

3.2. Diferenciação de populações

Com base nos resultados da AMOVA e dos índices de fixação (F_{ST}) verifica-se diferenciação significativa entre as populações estudadas, as quais

Tabela 3 – Tamanho do alelo e frequências de sete locos microsatélites de isolados de *Crinipellis perniciososa* do Continente Americano.

	15(70) ^a		45(70)		19(70)		14(70)		23(70)		64(70)		22(70)	
	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência	Tamanho	Frequência
188 ^d	0,039	238	0,022	197	0,077 ^c	209	0,051	202	0,199	311	0,923	198	0,319	
192 ^d	0,043	242	0,112	200	0,827	213	0,846	206	0,724	314	0,077 ^c	201	0,605	
197	0,069	250	0,077 ^c	203	0,053	216	0,077 ^c	210	0,077 ^c			204	0,077 ^c	
200	0,473	254	0,195	206	0,043	217	0,026							
203	0,077 ^c	258	0,140											
		262	0,454											

^a Tamanho da amostra

^b Em pares de base

^c Alelo raro

^d Alelo privado

foram agrupadas de acordo com o país de origem (Tabela 4). Infelizmente retirou-se os isolados de Trinidad e Colômbia por não constituírem populações. Ainda assim pode-se verificar variabilidade genética entre os isolados de Trinidad (Tabela 5). Considerando todas as populações observou-se que 19,98% da variabilidade genética está entre as populações entre países de modo que 80,02% concentrou-se dentro de países (Tabela 4). O mesmo padrão foi observado ao nível de populações individualmente. No caso do Brasil, verificou-se a presença de subpopulações ao nível de estado e municípios, e no Peru apenas em nível de estado.

Tabela 4. Análise de variância molecular de fenótipos de microssatélites em três populações de *Crinipellis pernicioso*.

Fonte de Variação	GL	Componentes de variância	% de Variância total	ϕ Estatística	p-valor
Entre países	2	0,99	19,98	0,20	$\leq 0,001$
Dentro de países	131	0,39	80,02		$\leq 0,001$
Brasil					
Entre estados	4	0,06	14,65	0,15	$\leq 0,001$
Entre municípios (dentro de estados)	28	0,22	52,64	0,62	$\leq 0,001$
Dentro de municípios	33	0,14	32,71	0,67	$\leq 0,001$
Equador					
Entre estados	3	-0,03	-9,03	-0,09	$>1,000$
Entre municípios (dentro de estados)	8	0,10	30,92	0,28	$=0,052$
Dentro de municípios	12	0,25	78,11	0,22	$<0,130$
Peru					
Entre estados	3	0,05	11,40	0,11	$>0,457$
Entre municípios (dentro de estados)	18	0,38	88,60	1,00	$\leq 0,001$
Dentro de municípios	22	0,00	0,00	0,00	$\leq 0,001$

3.3. Diversidade genética e diferenciação

A porcentagem de *locos* polimórfico está correlacionada com o número de haplotipos, quanto maior este número maior a

Tabela 5. Estimativas de diversidade genética de quatro populações de *Crinipellis perniciososa* de diferentes países com base em marcadores microsatélti

População	n ^a	g ^b	H ^c	r ^d (%)	H _e ^e	H _o ^f	f ^g	na ^h	H _s ⁱ	H _T ^j	G _{ST} ^k
Brasil	33	20	0,62	0,86	0,32	0,39	0,88	3,57	0,28	0,53	0,48
Trinidad	3	1	0,27	0,43	0,19	0,10	0,52	1,43	0,61	0,61	0,00
Equador	12	9	0,36	0,57	0,22	0,07	0,68	1,85	0,51	0,42	-0,22
Peru	22	6	0,30	0,43	0,17	0,00	1,00	1,57	0,41	0,42	0,03
Total*	70	37	...	0,85	0,34	0,03	...	27,00	0,25	0,43	0,42

a= número de amostra

a= tamanho da amostra

b= número de haplótipos

c= índice de Shannon

d= % locus polimórfico

e= heterozigiosidade esperada

f= heterozigiosidade observada

g= índice de fixação (déficit de heterozigiosidade dentro da população)

h= número médio de alelos

i= diversidade alélica

j= diversidade genética total

k= diversidade genética da subpopulação com relação ao total da população (Nei, 1973)

*índices foram calculados em todos os loci e populações

porcentagem de polimorfismo nos *loci*, sendo o total de 0,85%, variando de 0,43% (Trinidad e Peru) a 0,86% (Brasil) (Tabela 5).

Com base no índice de Shannon (S) a diversidade genotípica variou entre populações (Tabela 5), de 0,27 (Trinidad) a 0,62 (Brasil). Uma significativa associação ($P \leq 0,01$) foi encontrada entre este índice e a porcentagem de *locos* polimórficos. Quanto maior o índice de Shannon maior a porcentagem de polimorfismo nos *locos*.

A heterozigosidade observada (H_o), no conjunto das quatro populações variou de 0,00 (Peru) a 0,39 (Brasil) com um total de 0,03 enquanto a estimativa da heterozigosidade esperada (H_e) foi mais elevada, sendo o menor valor da população do Peru (0,17) e o maior da população do Brasil (0,32). Em razão da heterozigosidade média observada (H_o) ter sido inferior a heterozigosidade esperada em todas as populações, ficou caracterizado a presença de excesso de homozigotos.

O índice de fixação médio (f) das populações que compõem isolados de *C. perniciosus* confirmou um nível relativamente alto de endogamia. Dentre as populações a do Peru apresentou maior índice de fixação (1,00), sendo o menor índice (0,52) apresentado pela população de Trinidad.

A diversidade alélica (H_s) variou entre as populações, de 0,28 (população do Brasil) a 0,41 (população do Peru), assim como a diversidade genética total (H_T), variando de 0,42 (populações do Equador e Peru) a 0,61 (população de Trinidad) e a diversidade genética da subpopulação (G_{ST}), sendo de -0,22 (população do Equador) a 0,48 (população do Brasil) (Tabela 5).

A análise de agrupamento efetuada com isolados das populações de *C. perniciosus* com base nas freqüências fenotípicas permitiu visualizar a proximidade das populações do Brasil e Equador e o distanciamento das populações do Peru (Figura 2).

A Figura 3 mostra os resultados do PCA. A distribuição das populações de *C. perniciosus* utilizada neste estudo encontra-se nos planos (eixos) fatoriais, com as respectivas porcentagens da variação genética.

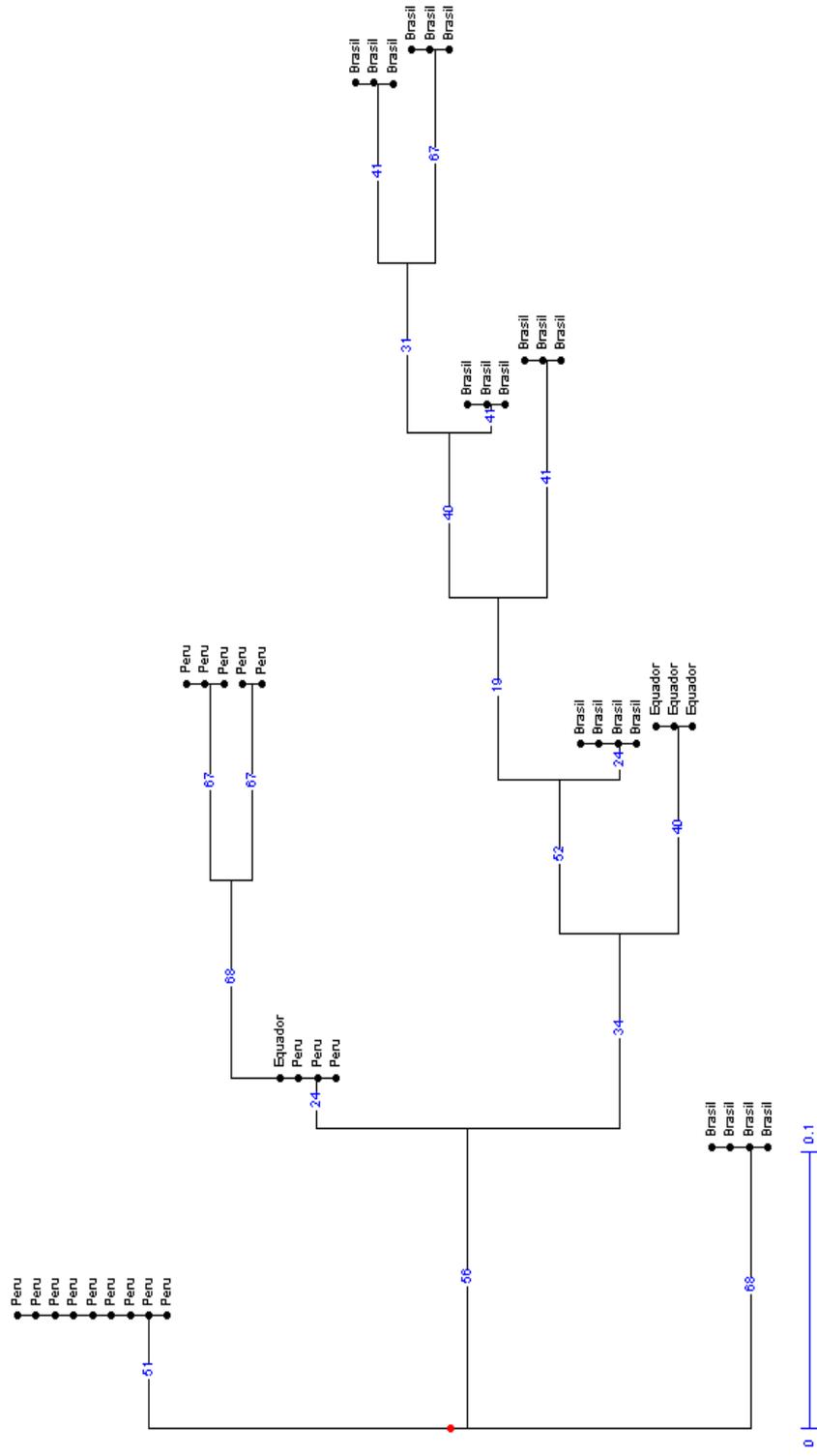


Figura 2. Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) baseado nas freqüências fenotípicas entre populações de *Crinipellis perniciosus* de três países.

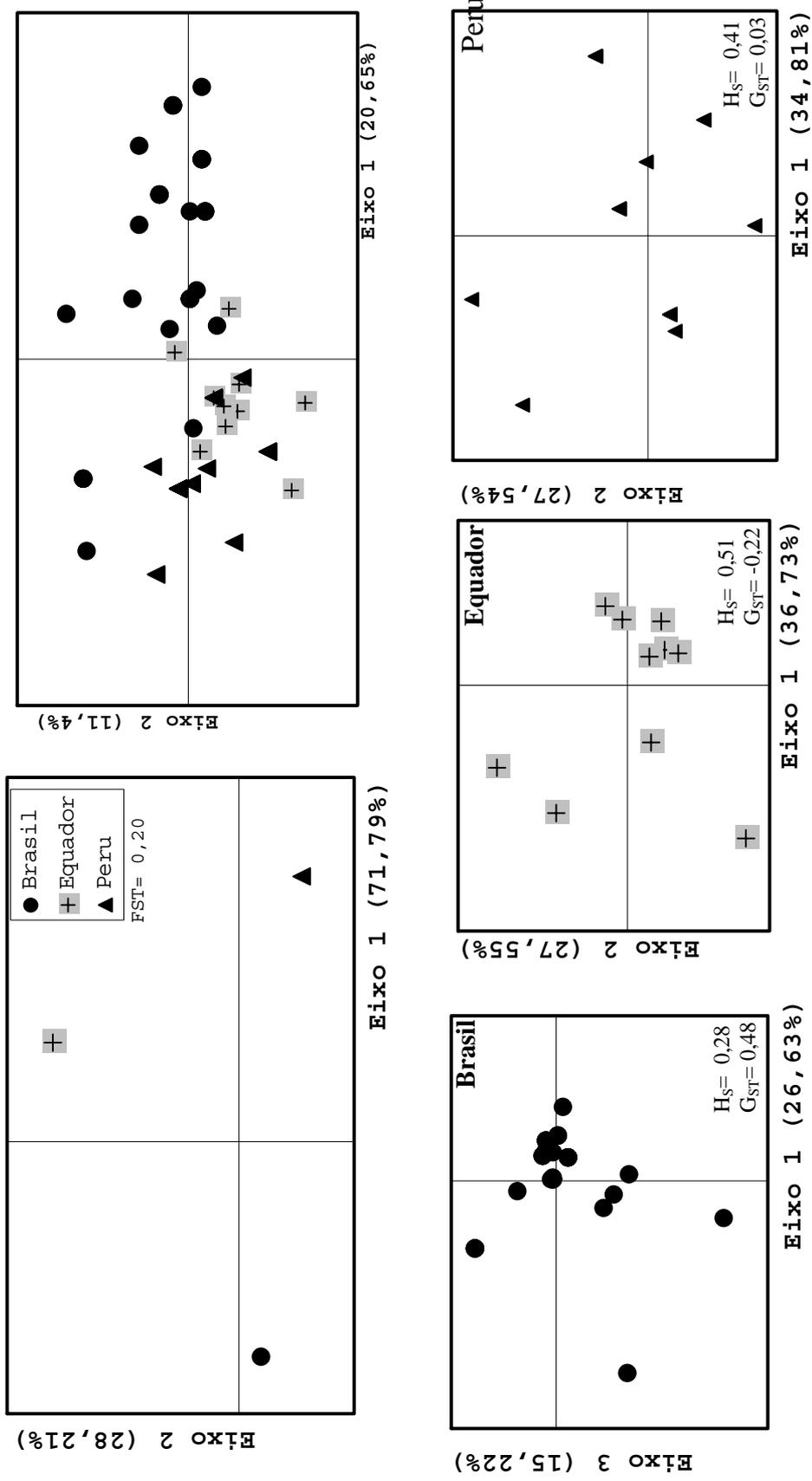


Figura 3. Análise de componente principal de três populações de *Crinipellis perniciosus* usando marcadores SSR.

Os valores de F_{ST} entre pares de populações foram significativamente diferentes de zero ($P \leq 0,10$) exceto entre as populações do Brasil e Trinidad e Equador e Trinidad (Tabela 6).

Tabela 6. Matriz de distância interpopulacional F_{ST} das populações de *Crinipellis pernicioso*.

Populações	CpBrasil	CpEquador	CpPeru	CpTrinidad
CpBrasil	...	0.25 ^{***}	0.39 ^{***}	0.19 ^{NS}
CpEquador		...	0.24 ^{***}	0.28 ^{NS}
CpPeru			...	0.37 ^{***}
CpTrinidad				...

^{NS} não significativo
^{***} $p < 0,10$

4. DISCUSSÃO

O conhecimento e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações de *C. pernicioso* é essencial para adoção de estratégia de controle da doença e manutenção de uma resistência durável. Marcadores moleculares têm sido muito utilizados para estudos de populações em fitopatógenos (MA et al., 2001; CHEN et al., 2002; KUBISIAK et al., 2004). O uso de marcadores microssatélites é agora uma rotina em genética de populações de plantas e animais (GOLDSTEIN & SCHLÖTTERER, 1999). Em *C. pernicioso*, a utilização deste marcador foi recentemente introduzida, e conseqüentemente se dispõem de poucos estudos para este fitopatógeno (GRAMACHO et al., 2003).

Através de sete *loci* microssatélites investigou-se a estrutura de populações deste basidiomiceto, e foram tomadas conclusões em relação aos prováveis eventos evolucionários acontecidos em várias escalas regionais. Os níveis de diferenciação genética das quatro populações de *C. pernicioso* provenientes do Brasil, Trinidad, Equador e Peru revelaram diferenciação entre as populações estudadas e elevados

níveis de variação genética dentro de populações, com presença de subpopulações dentro de país

Os *loci* de microssatélites utilizados foram suficientes para detectar 37 diferentes genótipos multilocus entre os isolados de *C. pernicioso* analisados. Desta maneira, se confirmou o poder de resolução deste tipo de marcador para determinar a diversidade genotípica em *Crinipellis* e seu subsequente uso na análise da estrutura genética deste fitopatógeno.

Este estudo confirma os resultados obtidos por PLOETZ et al. (2005) em que existem populações geneticamente distintas do fitopatógeno agrupadas de acordo com o país de origem. Entretanto, ao contrário do apontado por estes autores, observou-se que a estruturação genética ocorre não somente entre, mas dentro de países, entre e dentro de estado e entre municípios, indicando a existência de subpopulações. Talvez este resultado deve-se ao uso de marcadores microssatélites, pois estes são altamente informativos, mais sensíveis, dispersos por todo o genoma eucarioto (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; TARMINO & TINGEY, 1996) e são codominantes (JOHANSSON et al., 1992). Alia-se a isso a estratégia de amostragem usada, a qual se considerou os eventos geográficos, o meio ambiente e o histórico da doença.

A diferenciação genética entre populações (Tabela 6) pode ser atribuída às barreiras topográficas, de vegetação, às diferenças climáticas existentes entre países, às barreiras genéticas seguidas de eventos de colonização do fungo, ou a combinação destes fatores, influenciando no fluxo gênico. Os produtos da meiose dos grupos sexuais, os basidiósporos haplóides, são responsáveis por iniciar o ciclo da doença. Os mesmos são transportados pelo vento e pelo ar (PURDY & SCHIMIDT, 1996), mas são vulneráveis à luz e dissecação limitando a gama de dispersão (freqüentemente a poucos quilômetros de distância), exceto sob condições meteorológicas não usuais, o que neste nível hierárquico ocorre diminuição do fluxo gênico, pois são muito sensíveis às condições ambientais, além das irregularidades topográficas em cada país, atuando como barreiras genéticas (genetic drift). Por outro lado, não foi encontrada diferenciação genética entre as populações de Trinidad com os demais países, provavelmente devido ao baixo número de isolados.

Com base na AMOVA (Tabela 4), a maior parte da variação total foi detectada dentro de populações de *C. perniciosa*, divergindo dos dados obtidos por PLOETZ et al. (2005) os quais encontraram praticamente a mesma variabilidade dentro e entre populações. Pode-se atribuir esta diferença de resultados ao fato de que as populações estudadas eram diferentes e também ao maior número de isolados usados no presente trabalho. Resultados similares a este estudo foram observados para *Mycosphaerella graminicola* com marcador do tipo RFLP (LINDE et al., 2002).

Baseado em estudos prévios de estrutura genética de populações de fungos, valores médios de F_{ST} de 0 a 0,5 expressam baixo a moderado níveis de diferenciação genética dentro de populações (WRIGHT, 1951). Paralelamente ao F_{ST} , valores de G_{ST} têm sido usados em fitopatógenos para inferir variabilidade dentro de populações (LEUNG & WILLIAMS, 1986; BOEGER et al., 1993; GOODWIN et al., 1993). Níveis de diferenciação genética intrapopulacional de fitopatógenos têm sido usados para fazer inferências acerca da sua biologia. Por exemplo, níveis moderados de diferenciação genética foram detectados entre populações de *Phytophthora infestans* e *Rhynchosporium secalis* sendo atribuído a provável introdução destas populações uma fonte comum estabelecendo um fluxo gênico entre as mesmas (GOODWIN et al., 1992; 1993). Altos níveis de diferenciação genética ($G_{ST}= 0,51$) entre populações de *Peridermium harknessii* foram imputadas a seleção de populações do patógeno em diferentes hospedeiros (TUSKAN et al., 1990), enquanto que, entre populações de *Pyrenophora teres* da América do Norte e Alemanha ($G_{ST}= 0,46$) foram conferidas a barreiras genéticas combinadas com a migração restrita entre subpopulações (PEEVER & MILGROOM, 1994).

No caso do *Crinipellis*, foram encontrados moderados níveis de diferenciação genética dentro de populações do Brasil ($G_{ST}= 0,48$; $\phi_{ST}= 0,15$; $p \leq 0,0001$), baixos níveis dentro de populações do Peru ($G_{ST}= 0,03$; $\phi_{ST}= 0,11$; $p < 0,0001$), e ausência de subestruturação nas populações do Equador ($G_{ST}= -0,22$; $p \leq 0,0001$), fato demonstrado, também, na AMOVA, ($\phi_{ST}= -0,09$; $p > 1,0000$). Talvez, uma provável explicação para o ocorrido possa estar na estratégia de amostragem da população deste país, que não foi muito eficiente, ou que de fato não exista tanta diferenciação, uma vez que os isolados

coletados basicamente pertencem ao lado ocidental do país, não detectando variação. O mesmo padrão foi encontrado por SOLIS (2005) analisando a diversidade genética de isolados de *C. pernicioso* do Equador com base em marcadores RAPD, atribuindo à distribuição uniforme da população observada em seus estudos, à origem comum dos isolados utilizados, concentrados na região da Costa Norte deste país. Concluí-se, portanto que, no geral, através dos dados da AMOVA e análise de diversidade genética, observa-se a presença de subpopulações de *C. pernicioso* geograficamente heterogêneas. Além do mais, estes resultados são também reforçados pela diversidade genética total (H_T variou de 0,42 a 0,61) e o índice de Shannon (H' variou de 0,27 a 0,62) observados (Tabela 5), cuja maior variabilidade foi verificada dentro de isolados do Brasil.

A evolução de uma população envolve processos concomitantes de diversificação, diferenciação e partição da variação genética. Variação pode ser introduzida dentro de uma população por mutação, recombinação (sexual ou parasexual) e migração. Existindo variação, atuam-se os processos de seleção e barreira genética. O alto nível de variação ($H_T = 0,43$) encontrada em *C. pernicioso* sugere a influência da reprodução sexual em populações deste fungo. Por exemplo, para *Cronartium ribicola*, um patógeno basidiomiceto de reprodução sexual, o valor de H_T encontrado foi de 0,39 em média, em populações do leste do Canadá (ET-TOUIL et al., 1999).

Parasitas obrigatórios podem adaptar-se a hospedeiros "locais" a nível de indivíduo, população ou região, dependendo das propriedades e dinâmica dos sistemas analisados (KALTZ & SHYKOFF, 1998). Em relação ao *C. pernicioso*, o fitopatógeno é hemibiotrófico, homotálico (autofértil), com duas fases distintas, a biotrófica ou parasítica (n), onde o patógeno é intercelular, e a saprofítica ($n + n$), onde o patógeno é intracelular (PURDY & SCHMIDT, 1996). Os basidiósporos são resultados de meiose, podendo, portanto, haver recombinação. Nas populações de *C. pernicioso* podem estar atuando diferentes formas de dispersão dos basidiósporos entre fragmentos florestais, ou havendo pressões de seleção divergentes nas mesmas (por exemplo, adaptação local). É então, provável que o patógeno tenha uma grande habilidade de se adaptar a

diferentes condições a cada ciclo de vida. Além do mais, elementos transponíveis foram detectados no genoma deste patógeno (IGNACCHITI et al., 2003; PEREIRA et al., 2003).

Heterocariose, uma outra possível fonte de variação, é aceito amplamente como uma fonte importante de variação genética em muitos fungos (NEWHOUSE & McDONALD, 1991; ESSER & BLAICH, 1994; GLASS et al., 2000), mas seu papel neste patossistema ainda não está bem entendido. Heterocariose é necessário para que a recombinação parasexual ocorra, entretanto parasexualidade aparentemente não tem sido ainda reportado para *C. pernicioso*. Um sistema de incompatibilidade foi demonstrado neste fitopatógeno através de pareamento (GRIFFITH & HEDGER, 1994) sugerindo que infecções múltiplas de basidiósporos geneticamente distintos poderiam prover de uma oportunidade para que ocorresse heterocariose no biótipo C (que ataca o cacau) de *C. pernicioso*. LANA (2004) utilizando marcadores RAPD analisou 37 isolados de *C. pernicioso* provenientes de diversos hospedeiros e regiões do Brasil, onde, mediante análise de agrupamento separou os isolados em 8 grupos e constatou que isolados obtidos de uma mesma planta não se agruparam, reforçando a hipótese de que isolados geneticamente diferentes podem ocupar a mesma planta hospedeira.

É bem provável que a estruturação do *C. pernicioso* está relacionada ao histórico da introdução de genótipos de cacau em cada país e à adaptabilidade local das populações do fungo a estes genótipos e ao ambiente. O cacau é originário da cabeceira da bacia Amazônica, de onde se dispersou em duas direções, para o leste, ao longo do rio Amazonas, dando origem ao tipo denominado 'Forastero', e para o norte e oeste, cruzando os Andes e avançando para a América Central, até o sul do México, dando origem ao tipo 'Criollo' (CHEESMAN, 1944). O centro de origem do *C. pernicioso* é a planície Amazônica e o mesmo possui ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau das Américas Central e do Sul e nas Ilhas do Caribe (PURDY & SCHIMIDT, 1996), sendo reportada na Colômbia, em 1917 e no Equador, em 1918 (HOLLIDAY, 1952), em Trinidad, em 1928 (EVANS, 1981), no Peru, em 1951 (BAZÂN DE SEGURA, 1952) e no Brasil mais precisamente na Bahia, em 1989 (PEREIRA et al., 1989). Estes eventos levam a crer que o fungo encontrou condições ótimas de se

reproduzir, exibindo uma ampla gama de populações diferentes em resposta às diferentes introduções e dispersão espacial do cacau em cada país.

Não há nenhum relato consistente da interação hospedeiro-patógeno com o ambiente no patossistema cacau/*Crinipellis*. Contudo, o que se sabe é que a resistência do hospedeiro é herdada quantitativamente (QUEIROZ et al., 2003). Porém, poucas fontes altamente de resistência são utilizadas em larga escala. A ocorrência de adaptações graduais do patógeno a estas fontes não podem ser excluídas, principalmente porque a resistência do *Crinipellis* a estas fontes é herdada por poucos genes (QUEIROZ et al., 2003). O uso expansivo de tais fontes pode resultar no aumento em patogenicidade das populações de *Crinipellis*, ao contrário, se direcionando para um amplo *background* genético específico do hospedeiro. Evidente que, a velocidade de adaptação pode ser aumentada através da recombinação sexual entre os isolados mais agressivos. A frequência de genes de agressividade que atuam no hospedeiro influenciando na adaptação sem preferência de genótipos particulares pode aumentar sobremaneira vários ciclos de recombinação (McDONALD et al., 1999). Devido à grande diversidade das populações de *C. pernicioso* ser encontrada dentro de pequenas escalas espaciais, vários genes de resistência de diferentes origens deveriam ser piramidizados no mesmo genótipo do hospedeiro. E deve-se ter cuidado com a introdução de materiais resistentes oriundos de outros países.

CAPÍTULO 3 - TRANSFERIBILIDADE DE *PRIMERS* SSR DE *Crinipellis perniciosa* PARA *Moniliophthora roreri* E ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

RESUMO - Podridão de *Moniliophthora* e vassoura-de-bruxa são as doenças mais importantes e destrutivas do cacaueteiro no Continente Americano, podendo causar perdas totais na produção e são causadas pelos fungos *Moniliophthora roreri* e *Crinipellis perniciosa*, respectivamente. Evidências biológicas e moleculares comprovam que estes fitopatógenos estão intimamente relacionados. Marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de filogenia e estrutura genética de populações de vários fitopatógenos. São ferramentas adicionais e importantes para desenvolver estratégias satisfatórias no controle destas doenças e no desenvolvimento de cultivares resistentes. O presente trabalho utilizou a transferibilidade para *M. roreri* de pares de *primers* SSR desenvolvidos em *C. perniciosa*, visando a caracterização de marcadores microssatélites em populações de podridão de *Moniliophthora* do Equador e Peru e, juntamente com marcadores RAPD descrever a estrutura destas populações. Com base na análise de variância molecular (AMOVA), foi observado que apenas 0.03% ($\varphi = 0,00$; $p > 0,477$) foi a variação genética entre estas duas espécies não sendo estatisticamente diferentes, confirmando a íntima relação evolucionária entre estas espécies. A estrutura genética das populações de *M. roreri* do Equador e Peru foi analisada utilizando a AMOVA, e foi detectada alta diferenciação genética entre as populações ($G_{ST} = 0,65$; $p \geq 0,001$). Baseado em dados de SSR foi observado que 65.93% da variabilidade genética se encontra entre países. A população do Peru apresentou maior diversidade genética total ($H_T = 0,42$) do que a população do Equador ($H_T = 0,26$). O dendograma, com base nas frequências fenotípicas, evidenciou a presença de dois distintos grupos de isolados em nível de país.

Palavras-Chave: cacau, podridão de Moniliophthora, microssatélite, RAPD, vassoura-de-bruxa, marcadores moleculares

**CRINIPELLIS PERNICIOSA MICROSATELLITE TRANSFERITABILITY AND
POPULATION STUDIES OF *MONILIOPHTHORA RORERI* WITH RAPD AND
MICROSATELLITE MARKERS**

SUMMARY – *Moniliophthora roreri* and *Crinipellis perniciosa* causes the most destructive disease on cacao plantations in the American Continent. According to previous molecular and biological analysis, they are very closely related despite differences in their life cycles. In order to design effective strategies against these pathogens, it is essential to have information on genetic diversity and population composition. The present study reports tests on 11 *primers* pairs designed for *C. perniciosa*, of which 7 proved to be polymorphic and transferable to *M. roreri* confirming their relatedness. Based on analysis of molecular variance (AMOVA) we showed that a low level of genetic differentiation occurs among populations of both *M. roreri* and *C. perniciosa* ($\phi = 0,00$; $p > 0,477$), confirming their evolutionary relatedness. Further, two populations of Monilia pod rot, from Ecuador and Peru are investigated for population differentiation based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and microsatellite (SSR) markers. Nei's coefficient of gene differentiation ($G_{ST} = 0,65$; $p \geq 0,001$) revealed highly significant genetic differentiation among populations. Overall, based on SSR data only, 65,93% of the variation was found between countries indicating significant differentiation between populations from Ecuador and Peru ($p < 0,001$). Peruvian populations were presented more diversity ($H_T = 0,42$) than Ecuadorian populations ($H_T = 0,26$). Phenograms of qualitative similarities among isolates, confirmed the presence of two distinct clusters of isolates at country level.

Keywords: cacao, *Moniliophthora* pod rot, microsatellite, RAPD, witches' broom, molecular markers

1. INTRODUÇÃO

Os fungos *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer e *Moniliophthora roreri* (Ciferri) Evans et al. são, respectivamente, agentes causadores da vassoura-de-bruxa e podridão de *Moniliophthora* do cacau (*Theobroma cacao* L.). Estas se constituem nas principais doenças desta cultura, sendo fator limitante na produção de cacau em regiões produtoras das Américas do Sul e Central e nas Ilhas do Caribe (PURDY & SCHMIDT, 1996). No sul da Bahia não ocorre a presença de podridão de *Moniliophthora*, sendo a vassoura-de-bruxa a principal responsável pela limitação da produção de cacau nesta região, desde o fim dos anos 80 (PEREIRA et. al, 1989). Atualmente a produção de cacau no Brasil está em torno de 169.000 toneladas de amêndoas, situando-se o país em quinto lugar na produção mundial (FAO, 2005).

O centro de origem do *C. perniciosa* é a planície Amazônica. Este fungo foi encontrado pela primeira vez no Suriname, em 1895 (STAHEL, 1919), havendo rápida disseminação para o Equador, em 1921 e em 1928 para Trinidad (BAKER & HOLLIDAY, 1957) e Colômbia (ARANZAZU & BURITICÁ, 1993). Na década de 70, coincidentemente com o extensivo desflorestamento e exploração de óleo na Amazônia Equatoriana, a doença se espalhou através dos Andes, provavelmente via migração de fazendeiros (GRIFFITH et al., 2003). Acontecimentos similares no Brasil levou ao estabelecimento de plantações de cacau nos estados de Rondônia e Acre e a inevitável ocorrência da doença nestas regiões (RUDGARD, 1986), chegando, finalmente, na Bahia em 1989 (PEREIRA et., 1989). O fitopatógeno tem sido encontrado infectando plantas de espécies diferentes como Solanaceae (BASTOS & EVANS, 1985), Bignoniaceae (GRIFFITH & HEDGER, 1994), Bixaceae (BASTOS & ANDEBRHAN, 1986) a Malpigiaceae (RESENDE et al., 2000). O fitopatógeno, que ataca tecidos meristemáticos na planta, é um basidiomiceto da ordem Agaricales, homotático, hemibiotrófico, com duas fases distintas, a biotrófica ou parasítica, onde o patógeno é intercelular, e a saprofítica, onde o patógeno é intracelular.

Moniliophthora rorei é endêmico do noroeste da América Latina e foi relatado pela primeira vez no Equador em 1918 (RORER, 1918), sendo posteriormente descrito na Colômbia em 1930, Venezuela em 1941, Panamá em 1949, Costa Rica em 1978, Nicarágua em 1980, Peru em 1988, Honduras em 1997 e na Guatemala em 2002 (EVANS, 1981; EVANS, 2002; GRIFFITH et al., 2003). O fitopatógeno, assim como o *C. pernicioso*, ataca outras espécies dos gêneros *Theobroma* (*T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. gileri*) e *Herrania* (*H. nítida*, *H. purpúrea*) (RAM et al., 2004). Do mesmo modo que a vassoura-de-bruxa, podridão de *Moniliophthora* tem se disseminado ao longo das regiões costeiras do norte e sul do Pacífico da América do Sul e também mais recentemente próximo a Amazônia, sendo um perigo eminente para as plantações de cacau do oeste do Brasil (GRIFFITH et al., 2003).

C. pernicioso e *M. rorei* estão intimamente relacionados e provavelmente compartilham de um ancestral comum (EVANS, 1981). Estudos recentes evidenciaram que ambos pertencem à classe dos basidiomicetos e que *M. rorei* faz parte da ordem Agaricales e possivelmente à família Tricholomatacea, evidenciando a sua íntima relação com o *C. pernicioso*, podendo ser o estado assexual deste (PHILLIPS-MORA, 2003). Conseqüentemente, foi sugerida a classificação de *C. pernicioso* para *C. rorei* (EVANS et al., 2003), como também para *Moniliophthora pernicioso* Aime & Phillips-Mora comb. nov., ambos fazendo parte da família Marasmiaceae (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Enquanto *C. pernicioso* infecta qualquer tecido em crescimento, *M. rorei* infecta somente frutos em qualquer estágio de desenvolvimento, não causando infecção na parte aérea do cacau como acontece com a vassoura-de-bruxa, além de não provocar frutos do tipo morango ou cenoura (RAM et al., 2004).

Várias estratégias de controle (cultural, químico e biológico) têm sido testadas no combate destas doenças. No entanto, embora algumas destas medidas tenham se mostradas eficientes em escala experimental (BARROS, 1980; PORRAS et al., 1990; ARGÜELLO, 2000a; KRAUSS & SOBERANIS, 2002), nenhuma dessas foi adotada amplamente pelos cacauicultores. A freqüência de aplicação e os custos dessas práticas são os fatores mais limitantes, principalmente durante longos períodos de

baixos preços da cultura. Similar situação tem sido descrita para outras doenças do cacau (PEREIRA, 1996).

A melhor forma de controle a estas doenças é o emprego da resistência genética. O conhecimento a respeito da estrutura genética de populações destas espécies é importante para o entendimento da dinâmica espacial dos fitopatógenos, provendo informações que contribuirão no desenvolvimento de materiais com resistência às doenças.

Assim como para *C. pernicioso* (GRIFFITH & HEDGER, 1994; McGEARY & WHEELER, 1988; WHEELER & MEPSTED, 1988; LAKER, 1989; ANDEBRHAN & FURTEK, 1994; YAMADA et al., 1998; ANDEBRHAN et al., 1999; ARRUDA et al., 2003a,b; RINCONES et al., 2003; FERREIRA, 2005; LANA, 2004; SOLIS, 2005), caracteres fenotípicos e moleculares têm sido usados para descrever a estrutura populacional em *M. royeri*. Diversidade genética foi estudada através da aplicação de marcadores moleculares em isolados coletados da América Central, centro do Equador e Peru (PHILLIPS-MORA, 2003). Análises das seqüências de AFLP, ISSR e ITS revelaram que o fitopatógeno tem uma considerável variação genética. Uma alta variabilidade foi observada na região norte-oriental da Colômbia, indicando que esta região representa o centro de diversidade do fitopatógeno. Foram identificados cinco grupos específicos: (i) Colômbia Central, (ii) Colômbia (El Carmen Chucuriu), (iii) *T. gileri* (Equador), (iv) Equador Central, e (v) Colômbia, Santander, áreas periféricas do Equador, Peru e Venezuela (PHILLIPS-MORA, 2003). Estudos de patogenicidade (PHILLIPS-MORA, 2005) usando 7 isolados de *M. royeri* provenientes da Colômbia, e que representam os 4 maiores agrupamentos genético do patógeno em cacau, demonstrou, no geral, elevada patogenicidade na maioria dos genótipos de cacauzeiro utilizados. Contudo, o clone ICS-95 apresentou níveis satisfatórios de resistência a todos os isolados em estudo, sugerindo a sua introdução no programa de melhoramento visando resistência a esta doença.

O surgimento dos marcadores moleculares possibilitou a ampliação dos conhecimentos sobre populações de fitopatógenos (McDERMOTT & McDONALD, 1993). Dentre os diversos tipos de marcadores atualmente disponíveis, os marcadores

RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990) destacam-se pelas vantagens que apresentam em termos de simplicidade (por exemplo, a visualização das marcas RAPD pode ser realizada sem o uso de sondas radioativas), pelo fato de serem aplicáveis a um grande número de espécies, e por permitirem a análise de um grande número de locos (WEISING et al., 1995). A técnica do RAPD consiste na amplificação *in vitro* de regiões de DNA flanqueadas por iniciadores (*primers*) arbitrários (WILLIAMS et al., 1990), baseado na reação de PCR (Polymerase Chain Reaction). A principal desvantagem do uso deste marcador é devido à dominância, que impede distinguir o homocigoto dominante do heterocigoto. Contudo, esta característica pode ser prevista sem nenhuma influência sobre a eficácia do método para revelação de bandas (WILLIAMS et al., 1990).

Os marcadores microssatélites apresentam grandes vantagens devido à codominância, por serem altamente polimórficos e multialélicos. Microssatélites ou SSR (Short Sequence Repeats) são definidos como sequências repetidas compostas de número variável de motivos com 1 a 6 pb, encontrados no genoma de vertebrados, insetos, plantas e são relativamente abundantes em microrganismos (FIELD & WILLS, 1996). As diferenças e similaridades entre isolados podem ser avaliadas em regiões satélites do cromossomo e os dados podem ser usados para monitorar a epidemia da doença, a dinâmica populacional e a composição de raças das populações do patógeno. O polimorfismo de locos microssatélites é revelado pela amplificação via PCR do DNA total usando um par de *primers* que flanqueiam e definem o loco microssatélite (LITT & LUTY, 1989).

Entretanto, avanços na utilização de microssatélites têm sido dificultados devido ao custo elevado e ao tempo para o desenvolvimento de *primers* específicos para cada loco de espécies. A chance do sucesso na transferibilidade (amplificação heteróloga) de sequências de DNA por PCR é inversamente relacionada com a distância evolucionária entre as duas espécies. Muitos estudos têm mostrado a possibilidade de usar pares de *primers* desenhados para uma espécie pertencente ao mesmo gênero (HWANG et al., 2001; MOLINA et al., 2001; MOLINA & KAHL 2004), ou até mesmo entre gêneros diferentes (CHANG et al., 2000; HANTULA et al., 2002).

O presente trabalho utilizou a transferibilidade para *M. royeri* de pares de *primers* SSR desenvolvidos em *C. pernicioso*, visando a caracterização de marcadores microssatélites em populações de podridão de *Moniliophthora* do Equador e Peru e, juntamente, com marcadores RAPD descrever a estrutura destas populações a fim de permitir a geração de informações para o programa de melhoramento do cacaueteiro no desenvolvimento de variedades resistentes a esta doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados utilizados

Um total de 50 isolados foi utilizado nesse estudo, sendo 25 proveniente do Equador e 25 do Peru (Tabela 1). Os isolados foram obtidos de cacaueteiros comuns (híbridos) de diversas regiões desses países e foram adquiridos através de intercâmbio de DNA, cedidos pelos pesquisadores Karina Solis (INIAP, Equador) e Enrique Arévalo (UNAS, Peru).

Tabela 1 - Origem e designações dos isolados de *Moniliophthora royeri* usados neste estudo.

Origem	Hospedeiro	Ano	Isolados
Equador	<i>Theobroma cacao</i>	2003	25
Peru	<i>Theobroma cacao</i>	2004	25
Total			50

2.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído de acordo com o método de ZOLAN & PUKILLA (1986) com algumas modificações no tampão de extração (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0). A massa micelial de cada isolado foi macerada em nitrogênio líquido, a qual foi transferida para tubos de polipropileno onde foram adicionados 800 μ L de clorofórmio-isoamílico (24:1) para desproteíntização. A fase aquosa obtida após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos foi removida e transferida para tubos de 1,5 mL e adicionado isopropanol gelado numa quantidade equivalente ao volume do sobrenadante, para precipitação do DNA, sendo as amostras incubadas a -20°C por 2 horas. O DNA foi peletizado através de centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm e lavado com 95% de etanol gelado, após o qual o *pellet* foi secado em ambiente e ressuspendido com 100 μ L de água Milli-Q destilada e esterilizada contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase.

2.3. Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada em géis de agarose 0,8% submetidos a eletroforese. Alíquotas de cada DNA foram aplicadas nos poços do gel ao lado de uma série de concentrações de DNA do fago λ (100 ng/ μ L). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA do fago λ . Os géis foram visualizados após a coloração com 10 μ L de brometo de etídeo (10 mg/mL) diluído em 100 mL de tampão TBE 1X.

2.4. Reação de RAPD

Foram testados 80 *primers* RAPD dos respectivos Kits A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, M, U da Operon Technologies Inc. Para verificação do perfil de amplificação de cada *primer* foram utilizados quatro DNAs de *M. roreri*, sendo dois do Equador e dois do

Peru. A partir da seleção de *primers* foram identificados os que geraram um maior número de bandas polimórficas e apresentaram repetibilidade de resultados, sendo eles: OPC-05, OPH-13, OPI-01, OPI-03 e OPI-05.

O volume utilizado para reação foi de 25 μ L, contendo 10 ng de DNA, 0.4 mM do *primer*, 2,4 mM de $MgCl_2$, 0.1 mM de cada dNTP (Ludwig Biotecnologia Ltda.), 1X de tampão e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda.) (GRAMACHO et al., 2003a). As reações foram realizadas em termociclador Perking-Elmer, GeneAmp PCR System 9600, programando-se 30 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 1 minuto a 92 °C, para denaturação do DNA; 1 minuto a 35 °C, para anelamento dos *primers*; e 2 minutos a 72 °C, para extensão. Após amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,2%, contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de aproximadamente quatro horas, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

2.5. Reação de microssatélite

Neste trabalho avaliou-se a transferibilidade de pares de *primers*, desenvolvidos para *C. pernicioso* em *M. roreri*. Foram utilizados 11 pares de *primers* desenvolvidos e otimizados para *C. pernicioso* por GRAMACHO et al. (2003). Esses pares de *primers* foram testados para amplificação em *M. roreri*, sendo descartados aqueles que não amplificaram. Os 11 *primers* testados foram classificados conforme a qualidade obtida pela PCR. Pela seleção foram identificados 7 pares de *primers* (msCEPEC-Cp14, msCEPEC-Cp15, msCEPEC-Cp19, msCEPEC-Cp22, msCEPEC-Cp23, msCEPEC-Cp45 e msCEPEC-Cp64) que foram utilizados para o estudo da estrutura genética populacional em *M. roreri*.

O volume utilizado para reação foi de 20 μ L, contendo 5 ng de DNA, 0,2 mM de cada *primer*, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (Ludwig Biotecnologia Ltda.), 1X de tampão e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda.)

(GRAMACHO et al., 2003). Os produtos de PCR foram primeiramente checados através de gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo. As amplificações foram conduzidas em um Eppendorf Mastercycler Gradient, com “Touch Down” PCR. Na reação, a temperatura de anelamento dos *primers* variou de acordo com os mesmos, havendo 10 ciclos para denaturação a 94 °C por 4 min, anelamento do *primer* a 60-48 °C para os *primers* 14, 15, 19, 22, 23, 64 e 61-54 °C para o *primer* 45, usando 1.0 °C de decréscimo, e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final de 4 minutos a 72 °C. Os fragmentos obtidos após amplificação foram separados por eletroforese em gel de acrilamida a 6%, tendo como tampão de corrida TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA). O gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata de acordo com CRESTE et al. (2001) e GRAMACHO et al. (2003). Utilizou-se como marcador de peso molecular o ladder 10 pb. A genotipagem foi baseada no comprimento dos alelos amplificados em cada *loco*, registrados em géis de poliacrilamida escaneados, tomando por base os pesos moleculares do ladder 10 pb colocados nas laterais de cada gel.

2.6. Análise de dados

2.6.1. Marcadores RAPD

Os padrões de fragmentos RAPD de cada isolado de *M. royeri* foram utilizados para a geração de uma matriz de valores binários, construída de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas em comuns nos diferentes isolados. Com esta matriz calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtido com cada *primer* utilizado através da fórmula:

$$P = \frac{nbp}{nbt}$$

Onde:

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

Com esta matriz de dados calculou-se a coeficiente de similaridade de Jaccard entre todos os indivíduos conforme a expressão abaixo:

$$S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

Onde:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

A diversidade alélica (H_S) (NEI, 1973) em cada população foi obtida pelo programa POPGENE (Ver. 1.31; YEH ET AL., 1997).

2.6.2. Marcadores SSR

A partir da leitura dos dados nos géis o polimorfismo genético de cada *locus* foi medido através da amplitude alélica em pares de bases (pb), número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) (NEI, 1978), utilizando o programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999).

A estrutura genética das populações de *M. roleri* foi analisada utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) dos dados genotípicos em níveis hierárquicos (entre espécies, entre e dentro de países, entre estados dentro de países, entre municípios dentro de estados e dentro de municípios). A diferenciação genética entre populações (F_{ST}) foi obtida pela permuta de genótipos multilocus entre as populações. O nível de significância, valor “p”, do teste foi testado

como a proporção de permutações que proporcionam um F_{ST} maior ou igual ao observado.

As estimativas da estrutura genética de cada população de *M. roleri* foram estudadas através da análise do número de amostras (n), número de haplótipos (g), índice de Shannon (H') (LEWONTIN, 1972), porcentagem de *locus* polimórfico (r), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) (NEI, 1978), índice de fixação (f) (WEIR & COCKERHAM, 1984), número médio de alelos (n_a), diversidade genética total (H_T) e diversidade genética da subpopulação com relação ao total da população (G_{ST}) (NEI, 1973). O índice de Shannon foi calculado através do programa Popgene 1.31 (YEH et al., 1997). As demais estimativas foram obtidas pelo programa Genetix (Ver. 4.05.2; BELKHIR et al., 1999). Coeficientes de correlação foram determinados com o programa SAS (The SAS System for Windows, Ver. 7.0., 1999).

A estruturação da variabilidade das populações foi visualizada através do dendograma construído no programa Darwin (Ver. 5.0) (PERRIER et al., 2003) com base nas freqüências fenotípicas de cada população dada pelo programa Arlequin e pelo critério de agrupamento UPGMA (SNEATH & SOAKAL, 1973). A estabilidade dos agrupamentos também foi testada por intermédio do procedimento de reamostragem por 1000 *bootstrap*.

O dendograma foi feito a partir dos índices médios de similaridade para cada população através do programa Darwin (Ver. 5.0) (PERRIER et al., 2003).

3. RESULTADOS

3.1. Marcadores RAPD

Conforme a Tabela 2, pode-se verificar a seqüência dos *primers* selecionados e o padrão de polimorfismo de cada um deles. Na Figura 1, pode se observar o perfil do *primer* OPI03. O *primer* que produziu um maior número de *loci* foi o OPI03 e de *loci* polimórficos foi o OPC05 e o que gerou um menor número de *loci* foi o OPH13 assim

como de *loci* polimórficos. A média da diversidade alélica (H_S) variou de 0,00 a 0,40 para a população do Equador e 0,04 a 0,48 para a população do Peru (Tabela 2).

3.2. Marcadores SSR

3.2.1. Estatística descritiva do total de *loci* amplificados

Dentre os 7 pares de *primers* utilizados neste trabalho, os mais polimórficos foram 45, que amplificou 4 alelos e os *primers* 14 e 15, ambos amplificaram 3 alelos, enquanto os *primer* 23 amplificou 2 alelos, e os *primers* 19 e 22, ambos amplificaram 1 alelo (Tabela 3).

Na Tabela 3 observa-se também que o total da heterozigosidade observada por *locos* para as populações de *M. roreri* variou de 0,00 a 0,21, sendo o *locos* 45 o que mais apresentou indivíduos heterozigotos, os demais *loci* constituíram-se de indivíduos homozigotos.

Tabela 2 - Análise RAPD de *Moniliophthora roreri*: seqüência de *primers*, número de fragmentos amplificados e diversidade alélica (H_S) estimada nos 50 isolados.

Primer	Seqüência 5'-3'	População	Número de Fragmentos		H_S
			Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	
OPC05	GATGACCGCC	Equador	11	5	0,38
		Peru	11	3	0,21
OPH13	GACGCCACAC	Equador	6	0	0,00
		Peru	6	1	0,48
OPI01	ACCTGGACAC	Equador	9	3	0,34
		Peru	9	2	0,04
OPI03	CAGAAGCCCA	Equador	13	2	0,40
		Peru	13	1	0,39
OPI05	TGTTCCACGG	Equador	9	3	0,31
		Peru	9	4	0,13
Total			96	24	...

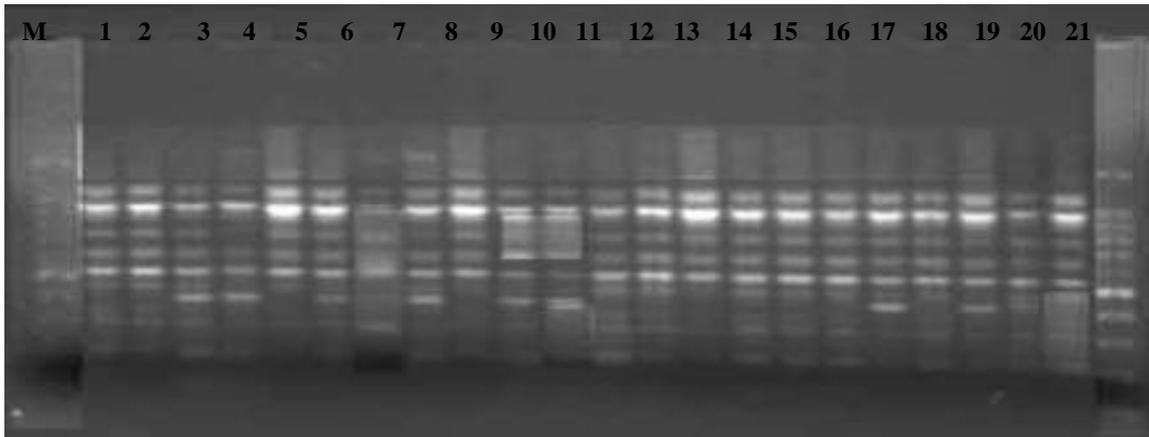


Figura 1. Perfil de um gel de RAPD utilizando o *primer* OPI03 em isolados de *Moniliophthora roreri* provenientes do Peru. Nas extremidades estão os padrões de peso molecular de um ladder 100 pb.

Tabela 3 – Estimativas das estatísticas de Nei nos locos amplificados em isolados de *Moniliophthora roreri*.

Locos	Motivos	Tamanho (pb)	Amplitude alélica	Número de alelos por locos	H _e ^a	H _o ^b
msCEPEC-Cp14	(AGAT) ₅	213	209-217	3	0,18	0,21
msCEPEC-Cp15	(GAA) ₆	197	188-203	3	0,28	0,00
msCEPEC-Cp19	(GAT) ₈	200	197-206	1	0,00	0,00
msCEPEC-Cp22	(CTT) ₆	201	198-204	1	0,00	0,00
msCEPEC-Cp23	(TCAG) ₁₀	206	202-210	2	0,07	0,00
msCEPEC-Cp45	(AGAT) ₅	262	238-262	4	0,47	0,00
msCEPEC-Cp64	(TGG) ₆	311	311-314	1	0,00	0,00
				2,14	0,14	0,03

^aheterozigosidade esperada

^bheterozigosidade observada

Os *loci* 15, 23 e 45 permitiram a diferenciação entre as populações do Equador e Peru (dados não mostrados).

Um total de 50 isolados compôs o tamanho das populações de *M. roreri* e promoveram informações a respeito da sua constituição genética, quando foram amplificados para os sete *loci* de microssatélites. Considerando estas populações

obteve-se um total de 15 alelos, com um valor médio de 2,14 alelos por *locus* e tamanhos que variaram de 197 pb até 314 pb (Tabela 3).

3.2.2. Diferenciação de populações

Com base nos resultados da AMOVA e dos índices de fixação (F_{ST}) verifica-se que houve uma pequena variação genética (0,03%) não significativa entre as espécies *C. perniciosus* e *M. roreri* reforçando a tese em que as duas espécies têm uma íntima relação (Tabela 4).

Considerando todas as populações de *M. roreri* observou-se que 65,93% da variabilidade genética está entre as populações entre países de modo que 34,07% concentrou-se dentro de países, sendo significativas (Tabela 5). Ao nível de populações individualmente, o Equador apresentou maior variação entre municípios dentro de estados (51,20%) do que entre estados (48,80%), não sendo significativamente diferentes. Ao contrário, a população do Peru apresentou maior variação entre estados (38,26%) do que entre municípios dentro de estados (26,22%), também não sendo significativamente diferentes. Além disso, houve variação significativa (35,52%) dentro de municípios.

3.2.3. Diversidade genética e diferenciação

Com base na amplificação utilizando 7 pares de *primers* de microssatélites, em média, as populações de *M. roreri* exibiram uma média de 7,5 haplótipos, sendo 6 provenientes da população do Equador e 9 da população do Peru. A porcentagem de *locus* polimórfico está correlacionada com o número de haplótipos, quanto maior este

Tabela 4 - Análise de variância molecular de fenótipos de microssatélites em populações de *Moniliophthora roreri*.

Fonte de Variação	Componentes de GL	variância	% de Variância total	ϕ Estatística	p-valor
Entre espécies (Cp ^a x MR ^b)	1	0,00	0,03	0,00	>0,447
MR					
Entre países	1	0,30	65,93	0,66	$\leq 0,001$
Dentro de países	98	0,16	34,07	-	$\leq 0,001$
Equador					
Entre estados	4	0,12	48,80	0,49	>0,020
Entre municípios (dentro de estados)	20	0,12	51,20	1,00	>0,000
Dentro de municípios	25	0,00	0,00	1,00	$\leq 0,001$
Peru					
Entre estados	9	0,15	38,26	0,38	>0,009
Entre municípios (dentro de estados)	15	0,10	26,22	0,42	>0,030
Dentro de municípios	25	0,14	35,52	0,64	$\leq 0,001$

^a*Crinipellis perniciosa*

^b*Moniliophthora roreri*

número maior a porcentagem de polimorfismo nos *loci*, sendo a média de 42,86%, cuja variação foi de 28,57% (Equador) e 57,14% (Peru) (Tabela 5).

Com base no índice de Shannon (S) a diversidade genotípica variou entre populações de *M. roreri* (Tabela 5), variando de 0,12 (Equador) a 0,38 (Peru), sendo a média de 0,25. Uma significativa associação ($P \leq 0,01$) foi encontrada entre este índice e a porcentagem de *loci* polimórficos. Quanto maior o índice de Shannon maior a porcentagem de polimorfismo nos *locus*.

A heterozigosidade observada (H_o), no conjunto das duas populações que compõem os isolados de *M. roreri* variou de 0,02 (Equador) a 0,04 (Peru), com uma média de 0,03. Por outro lado, a estimativa da heterozigosidade esperada foi mais elevada, sendo o menor valor de 0,07 (Equador) e o maior de 0,21 (Peru). Em razão da heterozigosidade média observada (H_o) ter sido inferior a heterozigosidade esperada em todas as populações, ficou caracterizado a presença de excesso de homozigotos (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativas da diversidade genética de duas populações de *Moniliophthora roreri* provenientes de diferentes países com base em marcadores microssatélites.

População	n^a	g^b	H^c	r^d (%)	H_e^e	H_o^f	f^g	na^h	H_tⁱ	G_{st}^j
Equador	25	6	0,12	28,57	0,07	0,02	0,75	1,29	0,26	0,56
Peru	25	9	0,38	57,14	0,21	0,04	0,81	2,00	0,42	0,74
Média	25	7,50	0,25	42,86	0,14	0,03	0,78	1,65	0,34	0,65

^a número de amostra

^b número de haplótipos

^c índice de Shannon

^d porcentagem de locus polimórfico

^e heterozigosidade esperada

^f heterozigosidade observada

^g índice de fixação (déficit de heterozigosidade dentro da população)

^h número médio de alelos

ⁱ diversidade genética total

^j diversidade genética da subpopulação com relação ao total da população

O aumento de homozigotos indica a possível existência de um processo endogâmico, decorrente de desvios de panmixia, e/ou deriva genética, ou a condição homotática do fungo (Tabela 5). De fato, o índice de fixação médio (f) das populações de *M. roreri* (0,78) confirmou um nível relativamente alto de endogamia. Dentre as populações a do Peru apresentou o maior nível de fixação (0,81), sendo o menor número mostrado pela população do Equador (0,75).

A diversidade genética total (H_T), foi de 0,26 (população do Equador) e 0,42 (população do Peru) e a diversidade genética da subpopulação (G_{ST}), sendo de 0,56 (população do Equador) e 0,74 (população do Peru) (Tabela 5).

A análise de agrupamento efetuada com isolados das populações de *M. roreri* com base nas freqüências fenotípicas permitiu visualizar a separação em dois grandes grupos entre as populações do Equador e Peru (Figura 2).

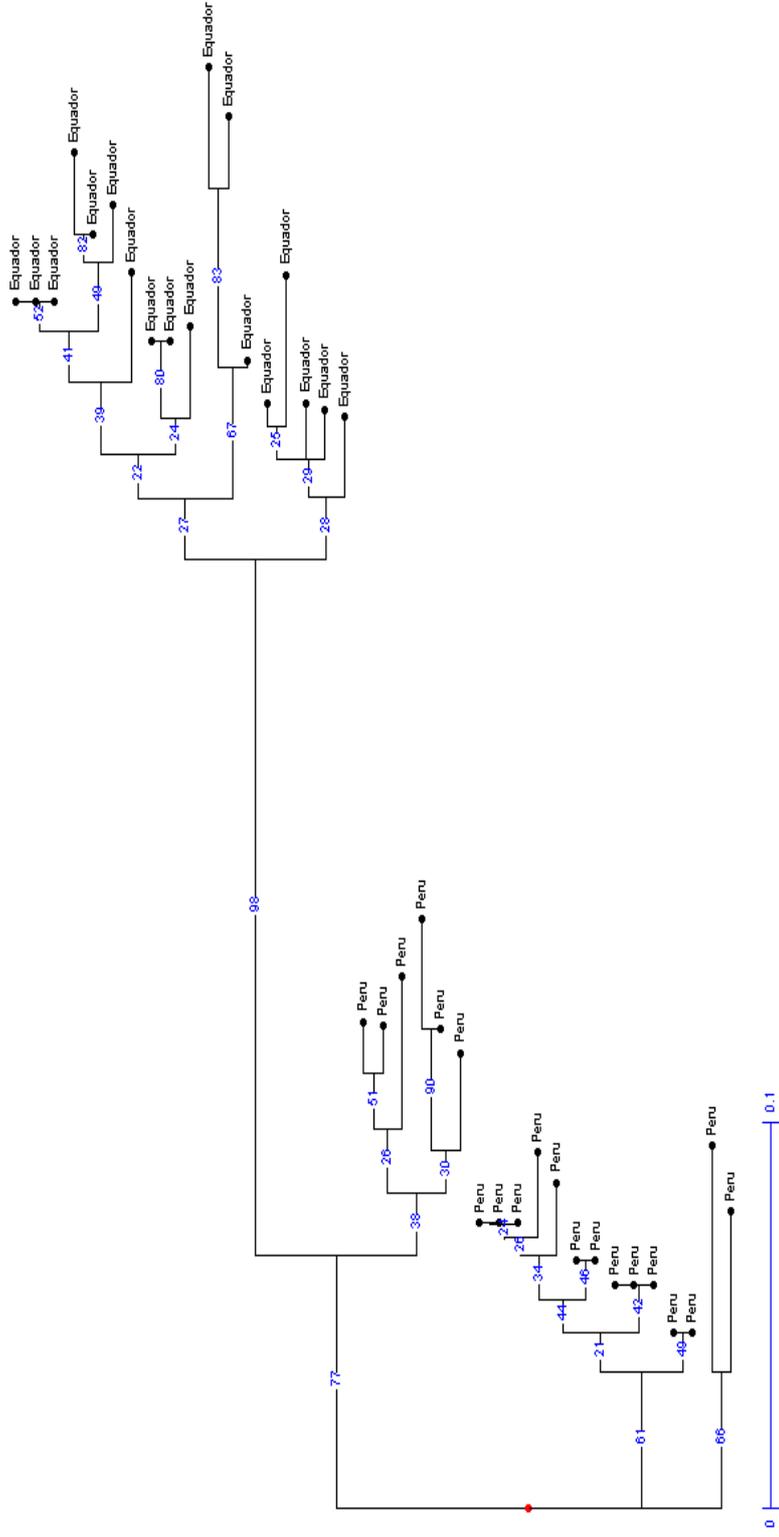


Figura 2 - Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) baseado nas frequências fenotípicas de *Monilophthora roerei* de dois países.

4. DISCUSSÃO

Conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações é essencial para a adoção de estratégias preventivas e mais eficientes em programas de melhoramento de cacaueteiro visando resistência a doenças. Fato enormemente facilitado com o uso de marcadores moleculares.

Neste estudo foram demonstrados o potencial de uso dos marcadores moleculares RAPD e microssatélites nas análises de estruturação populacional e filogenia de *Moniliophthora roreri* com o *Crinipellis perniciosa*, os mais destrutivos patógenos do cacaueteiro no Continente Americano. Ambos marcadores são baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction), uma técnica simples que requer pequenas quantidades de DNA. Análises RAPD não requerem processos de clonagem e hibridização com membranas, sendo um marcador eficiente no estudo de um grande número de fitopatógenos. Os microssatélites são abundantes em microrganismos, com a vantagem de terem característica codominante e são bastante utilizados em estudo de genética de populações de microrganismos paternidade, migração e filogeografia (WEISING et al., 1995).

Entretanto, o progresso do uso de marcadores baseados em microssatélites tem sido dificultado devido ao alto custo e tempo dispendidos no desenvolvimento de *primers* para cada espécie. A transferibilidade de microssatélites entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia da seqüência de DNA das regiões que flanqueiam os microssatélites, sendo inversamente relacionada com a distância evolucionária entre duas espécies. E tem sido demonstrada em vários estudos. HANTULA et al. (2002) estudaram a amplificação heteróloga de marcadores específicos, *Pp1* e *Pp2* usando PCR, em *Cronartium flaccidum* e *Peridermium pini*, dois fitopatógenos que provocam ferrugem em pinheiro. Estes autores mostraram que, embora um baixo nível de diferenciação genética ocorreu entre populações de ambos os fitopatógenos, diferença entre as espécies não foi detectada, indicando que estas se

assemelham a um único *taxon*. MOLINA et al. (2001) desenvolveram 48 pares de *primers* microssatélites com a finalidade de se obter informações sobre diversidade genética e composição de populações em *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira. Destes, 26 foram polimórficos e 4 foram transferíveis com sucesso para estudos com a mesma finalidade em *M. fijiensis*, outro importante patógeno da bananeira causador da Sigatoka-negra.

Em razão dos *primers* de microssatélites desenvolvidos para *C. pernicioso* (GRAMACHO et al., 2003) terem amplificado com eficiência (88,0%) *loci* de *M. roreri*, confirmou-se a pouca divergência evolutiva entre essas duas espécies, demonstrando que as seqüências que flanqueiam os *loci* SSR são conservadas. A proximidade taxonômica de *M. roreri* e *C. pernicioso* tem sido demonstrada em estudos prévios. Baseado em similaridades na biologia e sintomatologia, EVANS (1981) sugeriu que *M. roreri* está intimamente relacionado com o *C. pernicioso* e que estes compartilham de um ancestral comum. *M. roreri* evoluiu das montanhas ocidentais dos Andes e é endêmico das espécies *Theobroma* ou *Herrania*, enquanto *C. pernicioso* adaptou-se ao cacau (*T. cacao*) em seu centro de origem, no lado Amazônico da Cordilheira dos Andes. GRIFFITH et al. (2003) produziram híbridos entre *M. roreri* e *C. pernicioso*, demonstrando razoável afinidade entre as espécies. Em trabalhos posteriores, PHILLIPS-MORA (2003) utilizou pares de *primers* de locos específicos amplificando dois segmentos de genes de RNA nuclear ribossomal. Os resultados geraram confirmação que *M. roreri* é um Basidiomiceto e sugere fortemente que o mesmo pertence a ordem Agaricales e possivelmente à família Tricholomataceae. Comparações de seqüências também indicaram que o fungo está intimamente relacionado com o *C. pernicioso*. AIME & PHILLIPS-MORA (2005), com base em análises filogenéticas de seqüências de DNA de cinco diferentes regiões nucleares do gene (28S rDNA, 18s rDNA, ITS, RPB1 e EF1- α) confirmaram que *C. pernicioso* e *M. roreri* fazem parte do mesmo *taxa*, e propõem um novo nome, *Moniliophthora pernicioso* Aime & Phillips-Mora comb. nov., ambos fazendo parte da família Marasmiaceae. No presente caso, baseado na análise de variância molecular de fenótipos de microssatélites (Tabela 4), observou-se que apenas 0,03% ($\phi = 0,00$; $p > 0,447$) foi a

variação entre estas duas espécies, não sendo estatisticamente diferentes. Com isso, juntamente com outras evidências descritas anteriormente, tem-se a confiança da proximidade genética entre as espécies estudadas. A este respeito está a dedução lógica de que *M. roreri* e *C. pernicioso* pertencem provavelmente a um único *taxon*.

Neste estudo observou-se um nível moderado de multialelismo nos *loci* avaliados. Os *loci* de microssatélites utilizados foram suficientes para detectar uma média de 7,50 diferentes genótipos multilocus. Desta maneira, confirmou-se a eficiência da transferibilidade de *primers* de *C. pernicioso* para *M. roreri* e o poder de resolução dos marcadores microssatélites, principalmente quando adicionado dados RAPD, na determinação da estrutura genética populacional em *Moniliophthora* e nas conclusões em relação aos prováveis eventos evolucionários acontecidos em várias escalas regionais.

Os níveis de diferenciação genética das populações de *M. roreri* oriundas do Equador e Peru revelaram elevados índices de diferenciação entre as populações estudadas, bem como dentro de populações com presença de subpopulações. Na população do Peru foi encontrada a mais alta diversidade genética total ($H_T = 0,42$) (Tabela 5), o que indica boa adaptação do patógeno às condições ambientais e às do hospedeiro neste país. Atualmente, a podridão de *Moniliophthora* ocorre em todas as cinco regiões produtoras de cacau no Peru, ocasionando perdas de 19 a 100% na produção, somando-se a este fato, o controle da doença por meio de variedades resistentes, só recentemente despertou interesse neste país (RIOS-RUIZ, 2004).

Neste estudo, foi estimado a diferenciação genética interpopulacional através do índice de Wright (WRIGHT, 1951), expresso em valores de F_{ST} , que foi de 0,59 ($p \leq 0,001$). Em outros patossistemas de fungos, índice de diferenciação de populações acima de 0,25 tem sido interpretado como indicativo de alta diferenciação genética entre populações (HAMELIN et al., 1995; KUBISIAK et al., 2004; PARRENT et al., 2004). No caso de *M. roreri*, isto implica que o patógeno encontrou excelentes condições de clima e hospedeiro suscetível inerente em cada país, favorecendo uma ampla adaptação e disseminação da doença. Temperaturas entre 22 a 26 °C e umidade relativa acima de 85%, ótimas para germinação e infecção de *M. roreri*, são

prevalentes nas regiões produtoras de cacau destes países (PORRAS et al., 1988; HERNANDEZ, 1991). Assim, espera-se que nas áreas de introdução do patógeno a doença certamente progredirá em tempo e espaço.

Em relação à análise intrapopulacional, paralelamente ao F_{ST} , valores de G_{ST} têm sido usados em fitopatógenos para inferir variabilidade a este nível populacional (LEUNG & WILLIAMS, 1986; BOEGER et al., 1993; GOODWIN et al., 1993). Foi encontrado em populações de *M. royeri* altos níveis de variação genética dentro de populações do Equador ($G_{ST}= 0,56$; $\phi_{ST}= 0,49$; $p>0,020$) e do Peru ($G_{ST}= 0,74$; $\phi_{ST}= 0,38$; $p>0,009$), embora estas diferenças não tenham sido significativas entre estados e municípios, e sim dentro de municípios para ambas as populações. Talvez, uma provável explicação para este acontecimento possa estar no alto grau de patogenicidade do fungo e da ampla suscetibilidade do hospedeiro. Os propágulos infectivos de *M. royeri* são transportados pelo ar e principalmente têm grande facilidade de se dispersarem pelo vento (EVANS, 1981), embora a dispersão possa ocorrer também através da água, insetos e outros animais (NAUNDORF, 1954). Quando atinge uma localidade e, ou região, a erradicação do patógeno é dificultada pela alta adaptabilidade e patogenicidade do fungo. Ademais, o confundimento com a esporulação de fungos saprófitas na superfície externa dos frutos dificulta a diagnose precoce da doença (RIOS-RUIZ, 2004). Somando-se a estes fatos, os propágulos infectivos (esporos) do fitopatógeno são mais resistentes a luz e dissecação (EVANS, 1981) do que os de *C. pernicioso* (PURDY & SCHIMIDT, 1996), otimizando a eficiência de dispersão, influenciando no fluxo gênico.

Inicialmente a podridão de *Moniliophthora* foi identificada em 1988 no Peru (EVANS, 1981). Porém, como a doença foi constatada numa área muito ampla, foi sugerido que o patógeno estivesse presente na região desde 1986 aproximadamente (RIOS-RUIZ, 2004). Na Província de San Ignacio, fronteira com o Equador, no início dos anos 80, existia uma feira, nas quais produtores equatorianos e peruanos intercambiavam produtos, como sementes e frutos de cacau, para consumo e plantio no Peru. Desde que a doença surgiu na região norte do país, os órgãos do governo responsáveis pelo setor fitossanitário, não realizaram quaisquer medidas

quarentenárias para evitar a expansão da doença para outras áreas cacaeiras (RIOS-RUIZ, 2004). Com isso, acredita-se que em vista da facilidade de dispersão de *M. royeri*, a disseminação para outras regiões foi inevitável e previsível. Em vista do intenso comércio e do incremento do tráfego na região de fronteira com o Peru, há risco iminente de introdução da podridão de *Moniliophthora* no Brasil e Bolívia.

Durante anos, o mais ativo meio de dispersão do fitopatógeno observado foi atribuído ao homem, e principalmente ao aumento da sua atividade nestas regiões. Assim, na América do Sul, *M. royeri* se disseminou aproximadamente 1.100 km dentro do Peru em apenas 10 anos (PHILLIPS-MORA, 2003). O fitopatógeno tem se dispersado rapidamente ao longo das montanhas e depois nos declives orientais dos Andes até chegar ao norte do Peru em 1989, nos vales de Huallaga e nos rios Apurimac e Ene, chegando na região de Cuzco em 1996 (EVANS et al., 1998). O fitopatógeno se dispersando através da Sierra Madre de Dios, o mesmo se constituirá numa séria e direta ameaça para as plantações brasileiras de cacau em Rondônia, como também para o cacau da Bolívia (EVANS, 2002). Esta situação tem obviamente aumentado o medo da possibilidade de dispersão da podridão de *Moniliophthora* nestes países.

Foi encontrada maior diversidade alélica (H_S) nas populações de *M. royeri* do Equador em relação às populações do Peru (Tabela 2). Sugere-se, portanto, que neste país as populações do fitopatógeno são as mais diversas, havendo maior frequência de diferentes alelos, podendo estar atuando processos evolucionários como mutação, seleção ou barreiras genéticas (genetic drift) (McDONALD, 2004).

Em vista da importância da podridão de *Moniliophthora* para a cultura do cacau, das dificuldades encontradas no controle desta doença, da alta variabilidade genética detectada nas populações do Equador e Peru e no eminente perigo da sua entrada no Brasil e Bolívia, a adoção de métodos integrados pode contribuir para minimizar as perdas decorrentes da doença e evitar que esta chegue nas zonas cacaeiras dos países aonde não se constata a sua presença. A remoção de frutos doentes, a aplicação de fungicidas protetores, o uso de cultivares resistentes são importantes componentes para implementar o manejo integrado da podridão de *Moniliophthora*. A

identificação com maior precisão de isolados de fungos, o estudo do modo de reprodução, a caracterização de populações a nível temporal e espacial e a adaptação dos fitopatógenos ao ambiente, podem, no momento, serem fácil e rapidamente acompanhadas pelas tecnologias moleculares baseadas na amplificação do DNA usando PCR. Concomitantemente com estes enfoques moleculares, há uma necessidade premente de desenvolver estudos de patogenicidade com isolados (patótipos) de *Moniliophthora* em uma série diferenciadora do hospedeiro (cacaueiro), de forma a identificar tipos virulentos do fitopatógeno ou até mesmo raças. Aliado às tecnologias moleculares, poder-se-á obter marcas típicas para cada isolado ou grupos de isolados, no qual poderão ser facilmente identificados através de um gel. Com isso, permitirá a elaboração de mapas geográficos mostrando a distribuição dos patótipos de *M. roleri* como também o monitoramento do fitopatógeno, auxiliando os programas de melhoramento na seleção de genótipos de cacaueiro com diferentes níveis de resistência em função da distribuição do fitopatógeno em diferentes escalas espaciais nos países aonde a doença se faz presente.

4 – CONCLUSÕES GERAIS

- Existem populações de *C. pernicioso* agrupadas de acordo com o país de origem.
- As populações de *C. pernicioso* do Brasil, Equador, Trinidad e Peru são geneticamente diferentes. Variabilidade genética foi também evidenciada dentro de populações, indicando a presença de subpopulações.
- A população de *C. pernicioso* do Brasil apresentou maior diversidade genotípica em comparação com as outras populações.
- A população de *C. pernicioso* do Equador apresentou menor nível de diferenciação genética intrapopulacional.
- Existe potencial de transferibilidade de pares de *primers* de microssatélites para o mesmo gênero e outros gêneros, como no caso de *C. pernicioso* para *M. royeri*.
- As populações de *M. royeri* do Equador e Peru possuem elevados índices de diferenciação genética interpopulacional.
- A população de *M. royeri* do Peru apresentou maior variabilidade do que a população do Equador.
- Existe congruência entre as metodologias de caracterização genética populacional de *C. pernicioso* e *M. royeri* por marcadores dominantes (RAPD) e por marcadores codominantes (microssatélites).

REFERÊNCIAS

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lawrence, v.97, n.5, p.1012-1022, 2005.
- ALDEN, D. O significado da produção de cacau na região amazônica. **Revista do Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro (Brasil)**, Belém, v. 28, p.163-265, 1974.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 1996. 868 p.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG, UFV, SIF, 1991. 242p.
- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core *Malvales*: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 10 , p.1474–1486, 1999.
- AMPUERO, E. Monilia pod rot of cocoa. **Cocoa Growers' Bulletin**, Birmingham, v.9, p.15-18, 1967.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.2, p. 167-175, 1999b.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.2 , p.167-175, 1999.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, n.6, p.1020-1027, 1994.

- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers to distinguish isolates of *Crinipellis perniciosa*, causative agent of witches' broom disease of *Theobroma* spp. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1993, Yamoussoukro. **Proceedings ...** Ivory Coast: Producers Alliance, 1993. p. 133-134.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.141, n.4, p.399-436, 2003.
- ARANZAZU, F.; BURITICÁ, P. Comparative epidemiology study: Colombia Caldas and Llanos Orientales. In: RUDGARD, S. A.; MADDISON, A. C.; ANDEBRHAN, T. (Ed.). **Disease management in cocoa**. London: Chapman & Hall, 1993. p.57-71.
- ARÉVALO, E.; GARCÍA, L.; KRAUSS, U.; RÍOS, R.; ZÚÑIGA, L.; ADRIAZOLA, J. Mejoramiento genético para el control de enfermedades del cacao en el Perú. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CONTRIBUTION OF DISEASE RESISTANCE TO COCOA VARIETY IMPROVEMENT, 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: INGENIC, 1996. p.127-133.
- ARGÜELLO, O. Manejo integrado de monília en cacao (*Theobroma cacao* L.). In: MEJÍA, L. A.; ARGÜELLO, C. O. (Eds.) **Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao**. Bucaramanga: CORPOICA, 2000a. p.74-84.
- ARRUDA, M. C. C. de.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequebce-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.2, p.236-244, 2003b..
- ARRUDA, M. C. C. de; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and host. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.1, p.25-37, 2003a.
- ATALLAH, Z. K.; LARGET, B.; CHEN, X.; JOHNSON, D. A. High Genetic Diversity, Phenotypic Uniformity, and Evidence of Outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the

- Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, n.7, p.737-742, 2004.
- BAKER, R. E. D.; COPE, F. W.; HOLLIDAY, P. C.; BARTLEY, B. G.; TAYLOR, D. J. The Anglo-Colombian cacao-collecting expedition. **Report of Cacao Research**, Trinidad, v.1953, p.8-29, 1954.
- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. **Witches' broom disease of cacao**. The Commonwealth Mycological Institute, 1957. 39p. (Phytopathological Paper, n. 2).
- BARROS, O. El control de la moniliasis en Cacaoteras del Dique. **Cacaotero Colombiano**, Medellín, v.15, p.31-44, 1980.
- BARTLEY, B. G. D. Cacao, *Theobroma cacao*. In: **Breeding for Durable Resistance in Perennial Crops**. Food and Agriculture Organization of the United States, Plant Prod. Pap. 70, 1986. p.25-42.
- BARTLEY, B.G.D. Progress in cacao breeding and genetics. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1., 1965, Abdijan. **Proceedings...** Abdijan, IOCC, 1967. p.228-233.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vasoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.4 , p.963-965, 1986.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Comparações morfológica e patológica de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.3, p.202-206, 1988.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches' broom disease) on solanaceous host. **Plant Pathology**, Oxford, v.34, n.2 , p.306-312, 1985.
- BAZÁN DE SEGURA, C. **Escoba de brujas del cacao em Bagua**. Lima: Centro Nacional de Investigacion y Experimentacion Agrícola "La Molina", 1952. 13p.
- BEKELE, F.; BEKELE, I. A sampling of the Phenetic diversity of cacao in the International Cocoa Gene of Trinidad. **Crop Science**, Madison, v.36, p.57-64, 1996.
- BELABID, L.; BAUM, M.; FORTAS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by

- RAPD and AFLP analysis. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v.3, n.1, p.25-31, 2004.
- BELKHIR, K.; BOESA, P.; GOUDET, J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. **GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, 1999.
- BERGEMANN, S. E.; MILLER, S. L. Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. **New Phytologist**, Cambridge, v.156, n.2, p.313-320, 2002.
- BERGMAN, J. F. The distribution of cacao cultivation in pré-colombian América. **Annals of the Association of America Geographers**, Canada, v.59, 1969.
- BOEGER, J. M.; CHEN, R. S.; McDONALD, B. A. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.1148-1154. 1993.
- BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. Interpretation of PCR methods for species definition. In: BRIDGE, P.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (Ed.). **Applications of PCR in mycology**. London: CAB International, 1998. p.63-84.
- BUSO, G. S. C. **Análise genética de espécies silvestres de arroz (*Oryza spp*) nativas do Brasil: estrutura de populações, diversidade genética e relações filogenéticas utilizando marcadores moleculares**. 1998. 324f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 1998.
- BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo, IME, USP, 1990. 105p.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio-technology**, New York, v.9, n.6, p.553-557, 1991.
- CAMARGO, L. E. A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.455-469.

- CAMPUZANO, H. Fluctuaciones de población de esporas de *Monília royeri* y su viabilidad durante un ciclo completo de afección. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8., 1981, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena: Cocoa Producers' Alliance. 1981.
- CASELA, C. R.; GUIMARÃES, F. B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.75-93, 1996.
- CASTAÑO, J. J. Moniliasis del cacao en una región del Departamento de Caldas. **Agricultura Tropical**, Bogotá, v.8, p.21-25, 1952.
- CHANG, S. B.; CHEN, W. H.; CHEN, H. W.; FU, Y. M.; LIN, Y. S. RFLP and inheritance patterns of chloroplast DNA in intergeneric hybrids of *Phalaenopsis* and *Doritis*. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, Taipei, v.41, p.219-223, 2000.
- CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Tropical Agriculture**, Guildford, v.21, p.143-159, 1944.
- CHEN, W.; SHI, X.; CHEN, YUNG-CHUN. Microsatellite markers and clonal genetic structure of the fungal pathogen *Phialophora gregata*. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, p.194-202, 2002.
- CIFERRI, R.; PARODI, E. Descrizione Del fungo Che causa la "moniliase" Del cacao. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.6, p.539-542, 1933.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lawrence, v.23, p.72-84, 1969.
- COPE, F. W. Cacao. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p. 285-289.
- CORTESI, P.; OTTAVIANI, M-P.; MILGROOM, M. G. Spatial and genetic analysis of a flag shoot subpopulation of *Erysiphe necator* in Italy. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, n.6, p.544-550, 2004.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, F. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, 299-306, 2001.

- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG, UFV, 1994. 390p.
- DALE, W. T. Witches' broom disease investigations. XII: further studies on the infection of cacao pods. **Tropical Agriculture**, Guildford, v.23, n.12, p.217-221, 1946.
- DALE, W. T. Witches' broom disease of cacao in Grenada. **Tropical Agriculture**, Guildford, v. 26, n.1, p. 23, 1949.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD JR., W. B. **Microbiologia**. São Paulo: EDART. 1973.
- DAVIS, J. E.; KUBISIAK, T. L.; MILGROOM, M. G. Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, n.2, p.195–197, 2005.
- DESROSIERS, R.; DÍAZ, J. The world distribution of diseases of cacao. In: MEETING OF THE INTER-AMERICAN TECHNICAL COMMITTEE OF CACAO, 6. 1957, Salvador. **Proceedings...** Salvador, 1957. p.331-344.
- DESROSIERS, R.; VON BUCHWALD, A.; BOLAÑOS, C. W. Selección en masa de plántulas de cacao con base a su resistencia a la escoba de bruja. **Turrialba**, Coronado, v.5, n.4, p.134-138, 1955.
- DIAS, L. A. S. Análises Multidimensionais. **Introdução à Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. ALFENAS, A. C. (Ed.). Viçosa: Editora UFV, 1998. p.405-476.
- ENRÍQUEZ, G. A.; BRENES, O.; DELGADO, J. C. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1981, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena: Cocoa Producers' Alliance, 1981.
- ENRIQUEZ, G. A.; SORIA, V. J. La moniliasis irrumpe em lãs zonas cacaoterias em Costa Rica. **Actividades em Turrialba**, Turrialba, v.9, p.8-9, 1981.
- ENRÍQUEZ, G.; SUÁREZ, C. Monília disease of cacao in Costa Rica. **Turrialba**, San José, v.28, n.5, p.339-340, 1978.
- ESSER, K.; BLAICH, R. Heterogenic incompatibility in fungi. In: WESSELS, J. G. H.; MEINHARDT, F. (Ed.) **The Mycota. I. Growth, differentiation and sexuality**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.211-232.

- ET-TOUIL, K.; BERNIER, L.; BEAULIEN, J.; BÉMBÉ, J. A.; HOPKIN, A.; HAMELIN, R. C. Genetic structure of *Cronartium ribicola* populations in eastern Canada. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.915-919, 1999.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease in cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.74, p.515-523, 1980.
- EVANS, H. C. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. London, UK: Commonwealth Mycological Institute. **Phytopathological papers**, n.24, p.44, 1981.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.89, n.2, p.185-192, 1978.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease: a case study. **Cocoa Growers' Bulletin**, Birmingham, n.32, p.5-19, 1981b.
- EVANS, H. C.; KRAUSS, U.; RÍOS-RUIZ, R.; ZECEVICH-ACOSTA, T.; AREVALO-GARDINI, E. Cocoa in Peru. **Cocoa Growers' Bulletin**, Birmingham, n.51, p.7-22, 1998.
- EVANS, H. C.; STALPERS, J. A.; SAMSON, R. A.; BENNY, G. L. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.56, p.2528-2532, 1978.
- EVANS, H.C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, p.476-485, 2003.
- EVERITT, B. S. **Cluster analysis**. Cambridge, Edward Arnold, University Press, 1993. 170p.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Maryland, v.131, p.479-491, 1992.
- FAOSTAT "acesso em Novembro 2005".
- FERREIRA, L. F. R. **Diversidade genética de isolados polispóricos de Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer**. 2005. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Biotecnologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proc. R. Soc. Lond.**, London, v.263, p.209-215, 1996.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUG, H. P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **J. Amer. Soc. Hot. Sci.**, Alexandria, v.117, p.673-677, 1992.
- FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Minnesota, v.32, p.653-668, 1942.
- FLORIS, E.; ALVAREZ, J. M. Nature of resistance of seven melon lines to *Sphaerotheca fuliginea*. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, p.155-160, 1996.
- GARCES, D. C. La escoba de bruja del cacao. **Revista Facultad de Agronomía**, v.24, p.329-369, 1947.
- GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.34, p.165-186, 2000.
- GOLDSTEIN, D. B, SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press. 1999. 352p.
- GOMES, L. M. C.; MELO, G. R. P.; FALEIRO, F. G.; SILVA, S. D. V. M.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C.; MORAES, M. G.; AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 377, 2000. Suplemento.
- GOODWIN, S. B.; SAGHAI-MAROOF, M. A.; ALLARD, R. W.; WEBSTER, R. K. Isozyme variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe, Australia and the United States. **Mycol. Res.**, Cambridge, v.97, p.49-58, 1993.
- GOODWIN, S. B.; SPIELMAN, L. J.; MATUSZAK, J. M.; BERGERON, S. N.; FRY, W. E. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans*: Populations in northern and central Mexico. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.955-961, 1992.
- GOWER, J. C.; LEGENDRE, P. Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. **Journal Classification**, New York, v.3, p.5-48, 1986.
- GRAMACHO, I. C. P.; MANDARINO, E. P.; MATOS, S. A. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Itabuna: CEPLAC, 1992. 125 p.

- GRAMACHO, K. P.; BAHIA, C.; LOPES, U. V.; ZAIDAN, H.; GESTEIRA, A. S.; ARAUJO, M. R. (2003) Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 14., 2003, Gana. **Proceedings...** Gana: Cambery, 2003.
- GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L.; BAHIA, R. C.; MAHE, L.; SENA, K. Caracterização molecular (RAPD, rDNA) e patogênica de isolados de *Crinipellis pernicioso* em cacauero e outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 290, 2002a. Suplemento.
- GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; OLIVEIRA, M. L. de.; PIRES, J. L.; NIELLA, G. R.; FALEIRO, F. G. Estrutura genética de isolados de *Crinipellis pernicioso* em diferentes órgãos de um cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.289, 2002b. Suplemento.
- GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA, C.; ZAIDAN, H. Phylogeography of the Witches' broom pathogen in Bahia. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 14., 2003, Accra. **Proceedings ...** Accra: Chambery, 2003. p.1325-1332.
- GREGORY, P. H. Cocoa protection by quarantine. **Cocoa Growers' Bulletin**, Bournville, v.27, p.20-26, 1978.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the Witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, Harlow, v.72, n.3, p.278-289, 1994.
- GRIFFITH, G. W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R. N.; HEDGER, J. N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.41, n.3, p.423-435, 2003.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A. A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes. **Proceedings National Academy Science United States America**, Washington, v.79, p.6465-6469, 1982.

- HAMELIN, R, C., BEAULIEU, J.; PLOURDE, A. Genetic diversity in populations of *Cronartium ribicola* in plantations and natural stands of *Pinus strobes*. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v.91, p.1214-1221, 1995.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Ohio, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.
- HANTULA, J.; KASANEN, R.; KAITERA, J.; MORICCA, S. Análisis of genetic variation suggest that pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* belong to the same species. **Mycol. Res.**, Cambridge, v.2, p.203-209, 2002.
- HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J.; WORKNEH, F.; YANG, X. B. Characterization and distribution of two races of *Phialophora gregata* in the North-Central United States. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.7, p.901-912, 2003.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, v.88, n.4, p.533-546, 1987.
- HENSEN, I.; OBERPRIELER, C.; WESCHE, K. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. **Flora**, Jena, v.200, n.1, p.3-14, 2005.
- HERNÁNDEZ, T. A.; ARANZAZU, H. F.; ARÉVALO, E.; RÍOS, R. R. La moniliasis del cacao en el Perú. **Agrotrópica**, Itabuna, v.2, p.56-58, 1990.
- HERNÁNDEZ, T.; ARANZAZU, F.; ARÉVALO, E. **Reporte sobre la presencia de la Moniliasis del cacao en el Perú y políticas recomendables para su manejo integral**. Informe Proyecto AD/PER/86/459OSP/PNUD. San Martín, Perú: Instituto de Cultivos Tropicales. 1988.
- HOLLIDAY, P. *Crinipellis pernicioso*. **C. M. I. descripcion of pathogenic fungi and bacteria**. London: Commonw. Mycol. Inst., 1970. 2p.
- HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1980. p.115-117.
- HOLLIDAY, P. Spread of pod rot of cocoa. **Commonwealth Phytopathological News**, v.3, n.1, p.12, 1957.

- HOLLIDAY, P. **Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel)**. London: H. M. Stationery Office, 1952. 8p. (Colonial, 286).
- HWANG, S. Y.; LIN, H. W.; KUO, Y. S.; LIN, T. P. RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. **Bot. Bull. Acad. Sin**, Taipei, v.42, p.173-179, 2001.
- IGNACCHITI, M. D. C.; PEREIRA, J. J.; ARAÚJO, E. F.; CASCARDO, J.; FORMIGHERI, E.; PEREIRA, G. A. G.; QUEIROZ, M. V. Detecção de elementos transponíveis da classe II putativos em *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBE, 2003. p. 1142.
- JAMES, T. Y.; LIOU, S.-R.; VILGALYS, R. The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.41, n.8, p.813–825, 2004.
- JOHANSSON, M.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. Cloning and characterization of highly Polymorphic porcine microsatellites. **J Hered**, Washington, v.83, p.196-198, 1992.
- KALTZ, O.; SHYKOFF, J. A. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity*, Oxford, v.81, p.361-370, 1998.
- KNAPOVA, G.; GISI, U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.5, p.641-653, 2002.
- KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, Orlando, v.24, p.82-89, 2002.
- KUBISIAK, T. L.; ROBERDS, J. H.; SPAINE, P. C.; DOUDRICK, R. L. Microsatellite DNA suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f. sp *fusiforme*. **Heredity**, Oxford, v.91, p.41-50, 2004.
- LAKER, H. A. Variation in the cultural characteristics of isolates of *Crinipellis pernicioso* in Trinidad. **Turrialba**, Coronado, v.39, n.4, p.501-505, 1989.
- LANA, T. G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. 2004. 91f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

- LEACERTEAN, E. et al. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, Berlin, v.95, p.10-19, 1997.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. de M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.197-230, 1998.
- LEUNG, H.; WILLIAMS, P. H. Enzyme polymorphism and genetic differentiation among geographic isolates of the rice blast fungus. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.778-783, 1986.
- LEWONTIN, R. The apportionment of human diversity. In: DOBZHANSKY, T.; HECHT, M. K.; STEERE, W. C. (Ed.). **Evolutionary Biology**. New York: Appleton-Century-Crofts. 1972. p.381-398.
- LINDE, C. C.; ZHAN, J.; McDONALD, B. A. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to Continents. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.946-955, 2002.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v.44, p.397-401, 1989.
- LOPES, J. R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. Suscetibilidade do cupuçuazeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis pernicioso* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3 , p.601-605, 2001.
- LÓPEZ, G. M. A.; ENRÍQUEZ, V. O. **Presencia de *Monília royeri* Cif. Et Par. Em el cacao, *Theobroma cacao* L. em la frontera de Costa Rica, Nicarágua**. Manágua, Nicarágua: Ministério de Desarrollo Agropecuario, Laboratorio de Fitopatologia, 1980. p.150.
- LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V.; BEZERRA, J. L.; SANTOS FILHO, L. P. Evaluation of F1 cacao progênies for resistance to witches' broom disease. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch. Proceedings... Christchurch, 2003, p.8.

- MA, Z.; BOEHM, E. W. A.; LUO, W.; MICHAILIDES, T. J. Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and other hosts in California. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.7, p.665-672, 2001.
- MA, ZHONGHUA; BOEHM, W. A.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio and other hosts in California. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, p.665-672, 2001.
- MARITA, J. M. **Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD-marker based estimates of genetic distance and recommendations for a core collection to maximize genetic diversity**. 1998. 150p. M.S. Thesis-University of Wisconsin, 1998.
- MARITA, J. M. et al. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches'broom disease resistance. **Crop Science**, Madison, v.41, n.4, p.1305-1316, 2001.
- MAYR, E. Populações, espécie e evolução. São Paulo: EDUSP, 1977. 485p.
- McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, Wallingford, v.31, p.353-373, 1993.
- McDONALD, B. A. **Populations genetics of plant pathogens**. APSnet Educations Center Advanced Topics. 2004. 1 CD ROM.
- McDONALD, B. A.; McDERMOTT, J. M.; GOODWIN, S. B.; ALLARD, R. W. The population biology of host-pathogen interactions. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.77-94, 1989.
- McDONALD, B. A.; ZHAN, J.; YARDEN, O.; HOGAN, K.; GARTON, J.; PETTWAY, R. E. The populations gentics of *Mycosphaerella graminicola* and *Stagnospora nodorum*. In: LUCAS, J. A.; BOWYER, P.; ANDERSON, H. M. (Ed.) **Septoria on Cereals: a study of pathosystems**. Wallingford: CABI Publishers, 1999. p.44-69.
- McGEARY, F. M.; WHEELER, B. E. J. Growth rates of and mycelial interactions between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v.37, n.4, p.489-498, 1988.
- McLAUGHLIN, H. Observation on cacao in Peru. **Cacao Information Bulletin**, Costa Rica, v.2, p.3-4, 1950.

- MELO, G. R. P. **Caracterização da diversidade genética de isolados de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, causador da doença vassoura de bruxa do cacau, no sul da Bahia, por meio de marcadores moleculares.** 2000. 30f. Monografia (Especialização em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2000.
- METTLER, L. E.; GREGG, T. G. **Genética de populações e evolução.** São Paulo: Polígono/EDUSP, 1973. 262p.
- MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. **Adv. Bot. Res.**, London, v.24, p.1-30, 1997.
- MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n.6, p.608-617, 2003.
- MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; MUTHUMEENAKSHI, S. In: BRIDGE, P.; COUNTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). **Molecular variability of fungal pathogens.** Local: CAB International, 1998. p.105-120.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DE NICARAGUA **Diagnóstico Nacional de monília (*Moniliophthora roreri*) y escoba de bruja *Crinipellis perniciosa*) em el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*).** Manágua, Nicaragua: PROCACAO, 1992. 34p.
- MOLINA, C. M.; KAHL, G. Genomics of two banana pathogens: genetic diversity, diagnostics, and phylogeny of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*. In: JAIN, S. M. (Ed.) **Banana Improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations.** Vienna: FAO/IAEA, 2004. 392p.
- MOLINA, C.; KAEMMER, D.; APONTE, S.; WEISING, K.; KAHL, G. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.1, n.3, p.137, 2001.
- MORA, J. Notas sobre el possible origen y la variabilidad del cacao cultivado en la América tropical. **Cacao**, Costa Rica, v.8, n.1, p.34-42, 1958.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **Plant J.**, Oxford, v.3, p.175-182, 1993.

- MOTAMAYOR, J. C. Et al. Domestication du cacaoyer. I. Preuve d'une origine sud américaine des cacaoyers cultivés par les Mayas. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 13., 2000, Kota Kinabalu. **Proceedings...** Kota Kinabalu, 2000.
- MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends Ecology Evolution**, Amsterdam, v.14, p.389-394, 1999.
- MULLER, A. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas de Venezuela. **Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales**, Caracas, v.8, p.99-113, 1941.
- N'GORAN, J. C. et al. Domestication du cacaoyer. I. Preuve d'une origine sud américaine des cacaoyers cultivés par les Mayas. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 13., 2000, Kota Kinabalu. **Proceedings...** Kota Kinabalu, 2000.
- NAUNDORF, G. Contribuciones al problema de la moniliasis em cacao. **Cacao en Colombia**, Bogotá, v.3, p.35-61, 1954.
- 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.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Maryland, v.89, p.583-590, 1978.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, v.41, p.225-233, 1977.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.
- NEWHOUSE JR., MACDONALD, W. L. The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v.69, p.602-614, 1991.
- NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L.; CASTRO, H. A.; FIGUEIRA, A. R.; SILVA, I. S.; ARAÚJO, L. M.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, F. G. Diversidade genética de isolados monospóricos de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes estados do Brasil

utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.400, 2000.

NOLLA, J. A. B. **Reconocimiento Agropecuario de Valle del Cauca**. San Juan de Puerto Rico. P.318-319. 1930.

ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin during the development of witches' broom on cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, n.1, p.65-72, 1994.

ORELLANA, R. G. La moniliosis y otras enfermedades Del cacao em el este de panamá. **Boletín Fitosanitario de la FAO**, v.4, p.168-169, 1956.

PARRENT, J. L.; GARBELOTTO, M.; GILBERT, G. S. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. **Mycol. Res.**, Cambridge, v.4, p.403-410, abril 2004.

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B. et al. Mecanismos de patogenicidade em fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.1-47, 1998.

PEEVER, T. L.; MILGROOM, M. G. Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified Polymorphic DNA markers. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v.72, p.915-923, 1994.

PEGLER, D. N. *Crinipellis pernicioso* (Agaricales). **Kew Bulletin**, London, v.32, n.4, p.731-736, 1978.

PEREIRA, J. F.; IGNACCHITI, M. D. C.; ARAÚJO, E. F.; CASCARDO, J.; CARAZZOLE, M.; PEREIRA, G. A. G.; QUEIROZ, M. V. Análise de seqüências putativas de transcriptase reversa em *Crinipellis pernicioso*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49. 2003, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2003. p. 1156.

PEREIRA, J. L. M. **Manegement of witches' broom disease of cocoa: a contemporary retrospective**. Lagos: Cocoa Producers' alliance, 2000. 36p.

PEREIRA, J. L. Prospects for effective control of cocoa diseases. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador, 1996b.

- PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996. **Proceedings...** Salvador, 1996a.
- PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: Cocoa Producers' Alliance, 1996. p.87-89.
- PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, L. C. C. de; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, Guildford, v.15, n.8, p.743-752, 1996.
- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J. M. de; ALMEIDA, L. C. C. de. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, Itabuna, v.1, n.1, p.79-81, 1989.
- PERES FILHO, A. S. A. Agronegócio Brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade. In: ARAÚJO, C. (Ed.) **Cadeia produtiva do cacau**. Brasília: CNPQ, 1998. p.275.
- PEREZ, J. O.; RESENDE, M. L. V.; CAVALCANTI, L. S.; VILAS BOAS, C. H. Expressão de incompatibilidade entre isolados miceliais de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.454-455, 1999.
- PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT, F. Data analysis methods. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.; GLASMANN, J. C. (Ed.). **Genetic diversity of cultivated tropical plants**. Montpellier: Enfield Science Publishers, 2003. p.43-76.
- PHILLIPS-MORA, W. **Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomy affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence**. 2003. 349p. Thesis PhD. University of Reading, London, 2003.
- PHILLIPS-MORA, W. Studies at CATIE on Moniliasis resistance (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans et al.). In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CONTRIBUTION OF DISEASE RESISTANCE TO COCOA VARIETY IMPROVEMENT, 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: INGENIC, 1996. p.111-117.

- PHILLIPS-MORA, W.; CASTILLO, J.; KRAUSS, U.; RODRÍGUEZ, E.; WILKINSON, M. J. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. **Plant Pathology**, Oxford, v.54, p.483-490, 2005.
- PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R. J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C. T.; MOTAMAYOR, J. C.; JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis perniciosa* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.111, n.4, p.317-326, 2005.
- PORRAS, V. H.; CRUZ, C.; GUEVARA, C.; GALINDO, J. J. Efectos de la remoción de frutos, la aplicación de funguicidas y la polinización manual sobre la incidencia de la moniliasis y la producción de cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 10. 1988, **Proceedings...** Cocoa Producer Alliance, 1988. p.461-465.
- PORRAS, V. H.; ENRÍQUEZ, G. **Spread of monilia pod rot of cocoa through Central América**. San José, Costa Rica: IICA, 1998. p.20.
- PORRAS, V.; CRUZ, C. A.; GALINDO, J. J. Manejo integrado de la mazorca negra y la moniliasis del cacao en el Trópico Húmedo Bajo de Costa Rica. **Turrialba**, San José, v.40, p.238-245, 1990.
- POUND, F. J. **Cacao and witches' broom disease of South America**: report on a visit to Ecuador, the Amazon Valley and Colombia. Department of Agriculture, Trinidad and Tobago, 1938. 58 p.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.1, n.7, p.215-222, 1996.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Phytopathology**, St. Paul, v.34, p.573-594, 1996.
- QUEIROZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; ANHERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R. T. M.; PEREIRA, G.; MIRANDA, V. R. M.; LOGUERCIO, L. L.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, England, v.122, p.268-272, 2003.

- RAM, A. **Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao**. 1989. 286p. Thesis PhD. University of London, London, 1989.
- RAM, A.; VALLE, R. R.; GARDINI, E. A. **Monília do cacauero**. São Paulo: Fundação Cargill, 2004. 36p.
- RESENDE, M. L. V.; GUTEMBERG, B. A. N.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro *Heteropterys acutifolia* é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.10, p.88-91, 2000.
- RINCONES, J.; MEINHARDT, L. W.; VIDAL, B. C.; PEREIRA, G. A. G. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.452-458, 2003.
- RIOS-RUIZ, R. A. **Epidemiologia e manejo da monilíase do cacauero no Peru**. 80f. 2004. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ROBINSON, R. **Plant pathosystem**. Berlin: Springer-Verlag, 1976.
- ROCHA, H. M.; MIRANDA, R. C.; SGRILLO, R. B.; SETUBAL, R. A. Witches' broom in Bahia Brazil. In: RUDGARD, S. A.; MADDISON, A. C.; ANDEBRHAN, T. (Ed.). **Disease Management in cocoa: comparative epidemiology of witches' broom**. London: Chapman and Hall, 1993. p.189-200.
- ROMÁN, B.; SATOVIC, Z.; RUBIALES, D.; TORRES, A. M.; CUBERO, J. I.; KATZIR, N.; JOEL, D. M. Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.12, p.1262-1266, 2002.
- ROMESBURG, H. C. **Cluster analysis for researchers**. California, Lifetime Learning, 1984. 334p.
- RONNING, C. M.; SCHNELL, R. J. Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao* L. *Journal of Heredity*, v.85, n.4, p.291-295, 1994.
- RORER, J. B. **Enfermedades y plagas del cacao em el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao**. Guayaquil: Asociación de Agricultores, 1918. p.17-40.

- RUDGARD, S. A. **Detailed description of symptoms of witches' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis pernicioso***. Cocoa Growers' Bulletin, Birmingham, 1989. 32 p.
- RUDGARD, S. A. Witches' broom disease on cacao in Rondonia, Brazil. Basidiocarp production on detached brooms in the field. **Plant Pathology**, Oxford, v.35, p.434-442, 1986.
- RUSSEL, J. R. et al. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.2, p.89-97, 1993.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFELL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; TORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic application of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, n.4.839, p.487-491, 1988.
- SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C. *Trichoderma stromaticum* sp nov., a parasite of the cacao Witches' broom pathogen. **Mycological Research**, Cambridge, v.104, n.6, p.760-764, 2000.
- SAS Institute. **The SAS System for Windows**, V7.0. Cary: SAS Institute Inc., 1999.
- SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, Eynsham, v.20, p.211-215, 1992.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C. de; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescrção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotropica**, Itabuna, v.14, n.1, p.1-28, 2002. Edição especial.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Cação resistance to *Crinipellis pernicioso*: diallelic crosses increase genes for resistance. In: **8th International Congress of Plant Pathology**, 2003, Christchurch Addendum to Abstracts of Offered Papers, Christchurch – New Zealand 8th ICPP, 2003, p.8.
- SINGER, R. A monographic study of the genera "*Crinipellis*" and "*Chaetocalathus*". **Lilloa**, Tucuman, v.8, p. 441-514, 1942.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco, W. R. Freeman, 1973. 573p.

- SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **Principles of numerical taxonomy**. San Francisco, W. R. Freeman, 1963. 359p.
- SOLIS, K. **Determinación de la diversidad genética de *Crinipellis perniciosa*, causante de la Escoba de bruja del cacao usando marcadores moleculares de RAPD**. 2005. 62f. Tese (Maestría en Biotecnología Biología Molecular e Ingeniería Genética) – Universidad de Guayaquil, 2005.
- SORIA, J. Principales variedades de cacao cultivadas en América tropical. **Cacao**, Costa Rica, v.16, n.3, p.261-267, 1966.
- STAHEL, G. Contribution to the knowledge of witch broom disease. (Translated by B. G. Montserim from Bulletin 39, Departement van den Landbouw.). **Tropical Agriculture**, Guildford, v.9, p.167-176, 1919.
- STELL, F. Witches' broom disease of cacao and its control. **Bulletin Department Agriculture**. Trinidad Tobago, v.21, p.3-14, 1928.
- STEPHAN, W.; CHO, S. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics**, Baltimore, v.136, n.1, p.333-341, 1994.
- SUÁREZ, C. C. Enfermedades del cacao y su control. In SUÁREZ, C. (Ed.). **Manual del cultivo de cacao**. 2. ed. Quevedo: Estación Experimental Tropical Pichilingue, 1993. p.90-106. (Manual técnico, n. 25).
- SUÁREZ, C. C. Las enfermedades del cacao en Latinoamérica. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN CACAO, 7., 1979, Douala. **Actas...** Douala. 1979. p.251-254.
- SUÁREZ, C. C.; DELGADO, A. J. C. **La escoba de bruja del cacao**. FUNDAGRO – INIAP, 1993. 21 p. (Boletín técnico, n. 11).
- SUÁREZ-CAPELLO, C. Monília pod rot resistance in Ecuador. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CONTRIBUTION OF DISEASE RESISTANCE TO COCOA VARIETY IMPROVEMENT, 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: INGENIC, 1996. p.119-121.
- TARAMINO, G.; TINGEY, S. V. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v.39, p.277-287, 1996.
- THOROLD, C. A. **Disease of cocoa**. Oxford, UK: Clarendon, 1975. p.27-31.

- TORO, R. A. Colombia (Republic of); crop diseases and pests. **Internat. Bull. of Plant Protect.**, v.4, n.1, p.3-4, 1930.
- TOVAR, G. Contribución al estudio de la variabilidad de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causante de la Escoba del Bruja del cacao. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v.8, n.1, p.83-93, 1991.
- TUSKAN, G. A.; WALLA, J. A.; LUNDQUIST, J. E. Genetic-geographic variation in *Peridermium harknessii* in the North-Central United States. **Phytopathology**, St. Paul, v.80, p.857-861, 1990.
- URQUHART, D. H. **Cacao**. London: Longmans, 1961. 293 p.
- VECONVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.15, p.53-60, 1992.
- VIANA-JÚNIOR, C. A. C.; RESENDE, M. L. V.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G. Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis* sp. Provenientes de diferentes regiões e hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.389, 2001a. Suplemento.
- VIANA-JÚNIOR, C. A. C.; RESENDE, M. L. V.; PEREZ, J. O.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, R. A. Patogenicidade de isolados de *Crinipellis* sp. em diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.389, 2001b. Suplemento.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. abundant class of human DNA polymorphism wich can be typed using the polymerase chain reaction. **Americam Journal Human Genetics**, Chicago, v.44, p.388-396, 1989.
- WEEDS, P. L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. D'A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; KELEMU, S. Genetic Diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at Centers of Origin and Utilization. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.2, p.176-185, 2003.
- WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II: methods for discrete populations genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, Lawrence, v.38, p.1358-1370, 1984.

- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA Fingerprinting in Plants and Fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322p.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24 , p.7213-7218, 1990.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. 1988. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Oxford, v.37, p.475-488, 1988.
- WHITLOCK, B. A.; BAUM, D. A. Phylogenetic relationships of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene vivilin. **Systematic Botany**, Kent, v.24, p.128-138, 1999.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. V.; RAFALSKI, J. A. TINGEY, S. V. DNA Polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4th edition. Cornwall, UK:Blackwell Science, 620p. 1985.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, Quartely, v.15, p.395-420, 1951.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Lawrence, v.19, p.395-420, 1965.
- YAMADA, M. M.; ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, Itabuna, v.10, n.2, p.123-126, 1998.
- YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belg. J. Bot.**, Brussels, v.129, p.157, 1997.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.1-16, 2002.
- ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J. (1986) A rapid, high yield mini-prep meted for isolation of total genomic DNA. **Mol. Cell. Biol.**, Bethesda, v.6, p.195-200, 1986.