UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANGELA SANCHE ARTERO FREITAS

**Avaliação da diversidade genética e associação com patogenicidade
de isolados de *Moniliophthora perniciosa* oriundos da Amazônia Brasileira**

Piracicaba

2012

ANGELA SANCHE ARTERO FREITAS

**Avaliação da diversidade genética e associação com patogenicidade
de isolados de *Moniliophthora perniciosa* oriundos da Amazônia Brasileira**
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira
Figueira**

Piracicaba

2012

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Freitas, Angela Sanche Artero

Avaliação da diversidade genética e associação com patogenicidade de isolados de *Moniliophthora perniciosa* oriundos da Amazônia brasileira / Angela Sanche Artero Freitas; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

153 p.: il.

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

1. Diversidade genética 2. Fungos Fitopatogênicos 3. Genética de populações 4. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDU 575.17 : 632.27

Ao Luciano, com todo meu amor.
OFEREÇO

Aos meus pais Leonildo e Fátima
e meu querido irmão João Marcos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira que me recebeu em seu laboratório pela segunda vez, por todos os seus ensinamentos e principalmente paciência durante todos esses anos de convivência.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela possibilidade de realização do doutorado.

Ao Dr. Gildemberg Leal Júnior por toda a atenção concedida e colaboração desde o início deste projeto.

Ao Dr. Paulo Albuquerque por todos os ensinamentos, por ceder os isolados Amazônicos e colocar a disposição o laboratório e área experimental da Estação de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH), pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelo auxílio nas análises estatísticas, discussões e ensinamentos fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Afrânio Vieira pelo auxílio nas análises estatísticas dos experimentos de avaliação de resistência.

Ao laboratorista de fitopatologia Paulo Edivaldo Emiliado Pimentel e a aluna do curso de agronomia Darly Caroline Silva que auxiliaram nos experimentos de avaliação de resistência.

A Dra. Karina Peres Gramacho da CEPLAC/CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau), pela contribuição com isolados do biótipo-C oriundos da Bahia.

Ao Dr. Alan Pomella do *Mars Center for Cocoa Studies*, Barro Preto, BA e Dr. Gareth W. Griffith, *Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University*, Reino Unido que gentilmente cederam isolados dos biótipos –C, –S e –L.

A bióloga Tais Tomazini pela dedicação e auxílio na manutenção dos estoques dos isolados.

A Dra. Maria Lorena Sereno pelo auxílio nas análises de expressão gênica.

A todos os colegas que passaram e aos que ainda estão no Laboratório de Melhoramento de Plantas, pela amizade, companheirismo e dicas de trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas Raquel Orsi e Wlamir Godoy pela cooperação.

Aos secretários da Pós-Graduação do CENA/USP: Sônia, Daiane e Fábio; e a bibliotecária Adriana Bueno Moretti.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudo e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

FREITAS, A. S. A. **Avaliação da diversidade genética e associação com patogenicidade de isolados de *Moniliophthora perniciosa* oriundos da Amazônia Brasileira**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

O fungo *Moniliophthora perniciosa* é o agente causal da vassoura de bruxa no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Três biótipos distintos (biótipos -C, -L e -S) são reconhecidos de acordo com a especificidade quanto ao hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo a análise da diversidade genética com o uso de marcadores microsatélites de 134 isolados dos biótipos -C, -L e -S de *M. perniciosa* coletados principalmente na Amazônia Brasileira e áreas de cultivo. A diversidade genética foi associada com virulência e/ou agressividade dos isolados a acessos diferenciais (suscetíveis ou resistentes) de *T. cacao*. Os biótipos -S e -L apresentaram uma diversidade gênica e genotípica superior em comparação com o biótipo-C. A população do biótipo-C com maior diversidade genotípica foi a do Acre, seguida pelo Oeste do Amazonas, ambas correspondendo a áreas em que se encontra cacauzeiro nativo no Brasil. A população com menor diversidade genotípica foi a da Bahia, que corresponde a uma área onde a presença de *M. perniciosa* foi registrada mais recentemente, no final da década de 1980. Dos 134 isolados, 83 correspondem a genótipos multilocos únicos, sendo encontrados apenas dois indivíduos com genótipos idênticos para o biótipo-S, e nenhum para o biótipo-L. No biótipo-C foram identificados 61 genótipos multilocos em 111 isolados coletados em áreas de ocorrência natural e cultivo de cacau. Os dados de similaridade genética corroboram que o biótipo-C e também o -S que são homotáticos evoluíram de um biótipo heterotático, possivelmente o biótipo-L. As populações do biótipo-C do estado do Pará e Leste do Amazonas compartilham ancestrais comuns em Ji-Paraná (RO) e Assis Brasil (AC), enquanto que a região sob a influência do rio Amazonas possui outra ascendência, que seria em Atalaia do Norte (Alto Solimões). Os genótipos multilocos da Bahia exibiram origens análogas as da população do Baixo Amazonas, com ascendência em Ji-Paraná (RO) e Alenquer (PA). Na avaliação de agressividade de *M. perniciosa*, a concentração do inóculo se mostrou determinante para a manifestação dos sintomas, com o aumento de plântulas com sintomas à medida que aumenta a concentração de basidiósporos. Dentre as progênies avaliadas, 'PA 195 x CAB 214' apresentou menor proporção de plântulas com sintomas. Na inoculação com

isolados de *M. perniciosa* oriundos do Acre e Amazonas, a proporção de plântulas com sintomas foi superior quando inoculadas com o isolado de Tabatinga (AM). O genótipo de cacaueiro que apresentou uma reação diferenciada foi o 'CAB 214', para o qual nenhuma plântula apresentou sintomas quando inoculada com o isolado de Marechal Thaumaturgo (AC). Com o uso de microssatélites os genótipos multilocos de Tabatinga (AM) e Marechal Thaumaturgo (AC) foram identificados em grupos distintos. Na análise de treze genes de patogenicidade induzidos pela limitada disponibilidade de N, o gene 88KD foi o que demonstrou o maior número de transcritos acumulados. Os isolados que apresentaram uma mesma tendência em seus genes mais expressos foram Tabatinga (AM) e Óbidos (PA) que apesar de possuírem origens geográficas distintas, foram identificados no mesmo grupo na análise com microssatélites.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, vassoura-de-bruxa, biótipos, microssatélites, estrutura genética de populações e patogenicidade.

ABSTRACT

FREITAS, A. S. A. **Evaluation of the genetic diversity and its association with pathogenicity of *Moniliophthora perniciosa* isolates from the Brazilian Amazon.** 2012. 153 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of witches' broom in cacao (*Theobroma cacao* L.). Three different biotypes (C-; S-; and L-biotypes) are recognized according to host specificity. The present study aimed to analyze the genetic diversity using microsatellite markers for 134 isolates of the C-, L- and S- biotypes of *M. perniciosa* collected mainly in the Brazilian Amazon and areas of cultivation. Genetic diversity was associated with virulence and/or aggressiveness of isolates in differential accesses (susceptible or resistant) of *T. cacao*. The L- and S- biotypes showed a higher genetic and genotype diversity compared with C-biotype. Of the 134 isolates, 83 corresponded to unique multilocus genotypes, and found only two individuals with identical genotypes for the S-biotype, and none for the L-biotype. In the C-biotype were identified 61 multilocus genotypes in 111 isolates collected in areas of natural occurrence and cultivation of cocoa. The genetic similarity data corroborate that the C- and S- biotypes that are apparently homothallic evolved from a heterothallic biotype, possibly L-biotype. The populations of C-biotype of the state of Para and Amazonas East share common ancestors, in Ji-Paraná (RO) and Assis Brazil (AC), while the region under the influence of the Amazon River has another descent that would be in the Atalaia do Norte (Upper Solimões). The multilocus genotypes from Bahia showed a similar origin of the population of the Lower Amazon, with ancestry in Ji-Paraná (RO) and Alenquer (PA). In the evaluation of aggressiveness of *M. perniciosa*, the inoculum concentration proved to be decisive for the manifestation of symptoms, with the increase of seedlings with symptoms as increases the concentration of basidiospores. Among the progenies, 'PA 195 x CAB 214' showed a lower proportion of seedlings with symptoms. In inoculation with *M. perniciosa* from Acre and Amazonas, the proportion of seedlings with symptoms was higher when inoculated with the isolate from Tabatinga (AM). The genotype of cocoa that had a differentiated reaction was the 'CAB 214', for which no plants showed symptoms when inoculated with the isolate Marechal Thaumaturgo (AC). With the use of microsatellite, the multilocus genotypes of Tabatinga (AM) and Marechal Thaumaturgo (AC)

were identified in different groups. In the analysis of thirteen genes of pathogenicity induced by the limited availability of N, *88KD* gene showed the highest number of transcripts. The isolates that showed a similar trend in their more expressed genes were Tabatinga (AM) and Óbidos (PA) that despite having different geographical origins were identified in the same group in the analysis with microsatellite.

Key-words: *Moniliophthora perniciosa*, witches' broom disease, biotypes, microsatellites, population structure and pathogenicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 <i>Moniliophthora perniciosa</i>	16
2.1.1 Classificação em biótipos	17
2.1.2 A disseminação da vassoura-de-bruxa.....	19
2.1.3 Diversidade genética em <i>M. perniciosa</i>	21
2.2 Microssatélites em fungos	23
2.3 Patogenicidade	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Coleta dos isolados de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	30
4.2 Cultivo dos isolados e extração do DNA.....	38
4.3 Amplificação do DNA ribossomal dos isolados de <i>M. perniciosa</i>	38
4.3.1 Digestão dos fragmentos amplificados na região ITS	39
4.4 Locos de microssatélites em <i>M. perniciosa</i>	39
4.4.1 Estrutura genética espacial e diversidade clonal de <i>M. perniciosa</i>	43
4.4.2 Análise da diversidade genética.....	43
4.5 Ensaio de inoculação	44
4.5.1 Avaliação da interação da concentração do inóculo X resistência	44
4.5.1.1 Produção de basidiósporos.....	44
4.5.1.2 Preparo das mudas e inoculação	45
4.5.1.3 Avaliação de resistência.....	45

4.5.2 Avaliação da interação da concentração do inóculo de diferentes isolados X resistência.....	46
4.5.2.1 Produção de basidiósporos.....	46
4.5.2.2 Preparo das mudas e inoculação	46
4.5.2.3 Avaliação de resistência.....	47
4.6 Análise da expressão de genes associados à patogenicidade em <i>M. pernicioso</i>	48
4.6.1 Cultivo de <i>M. pernicioso</i> <i>in vitro</i> em condições de carência de N em meio sólido	48
4.6.2 Cultivo <i>in vitro</i> em condições de estresse por carência de N em meio líquido para análise da expressão gênica	48
4.6.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	49
4.6.4 Amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	49
4.6.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR	50
4.7 Polimorfismo do gene que codifica a cerato-platanina em <i>M. pernicioso</i>	51
5 RESULTADOS	55
5.1 Confirmação da identidade dos isolados.....	55
5.2 Diversidade genética de <i>M. pernicioso</i> utilizando microsatélites	57
5.3 Análise da presença de genótipos multilocos e da estrutura genética espacial	60
5.4 Diversidade genética dentro e entre populações e biótipos	65
5.5 Estrutura genética dos genótipos dos biótipos -C, -L e -S.....	67
5.5.1 Estrutura genética dos genótipos do biótipo-C	70
5.6 Grau de parentesco e origem de genótipos de <i>M. pernicioso</i>	73
5.7 Avaliação de resistência.....	86
5.7.1 Avaliação da interação da concentração do inóculo X resistência	86
5.7.2 Avaliação da interação da concentração do inóculo de diferentes isolados X resistência.....	91
5.8 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) de isolados de <i>M. pernicioso</i> cultivados em carência de N	95
5.8.1 Cultivo de <i>M. pernicioso</i> <i>in vitro</i> em condições de estresse por carência de N	95
5.8.2 Polimorfismo do gene que codifica a cerato-platanina em <i>M. pernicioso</i>	114

6 DISCUSSÃO	115
6.1 Análise da diversidade genética de isolados de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	115
6.2 Avaliação de resistência de progênies e genótipos de <i>T. cacao</i>	120
6.3 Expressão de genes associados à virulência e patogenicidade em condições de estresse abiótico.....	125
7 CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS	134
APÊNDICES	147
APÊNDICE A.....	148
APÊNDICE B	152

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) [syn. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer; Marasmiaceae *sensu stricto* Tricholomataceae], consiste numa importante enfermidade do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), restrita a América do Sul e Caribe, que provoca má formação de ramos e almofadas florais e perda de frutos e sementes (PURDY; SCHMIDT, 1996). A vassoura-de-bruxa é a doença que mais afeta a lavoura cacaueira brasileira (ALBUQUERQUE et al., 2005), sendo responsável pela queda na produção nacional, principalmente nas duas últimas décadas, colocando o Brasil na posição de importador de cacau. Em 1989 houve o primeiro registro de sua ocorrência no sul da Bahia, estado que respondia por 85% da produção nacional de cacau na época (PEREIRA et al., 1989).

O primeiro registro científico da vassoura-de-bruxa foi realizado em 1895 no Suriname, apesar de relatos anteriores ainda no século XVIII (SILVA, 1987). *Moniliophthora perniciosa* pode ser classificado em biótipos de acordo com o hospedeiro de origem, aliado a diferenças morfológicas, bioquímicas e compatibilidade somática. Com relatos do fungo colonizando cipós (lianas) de floresta e solanáceas foi possível classificar os isolados nos biótipos –C, –S e –L, já que não ocorre infecção cruzada dos isolados de um grupo com os hospedeiros do outro (GRIFFITH et al., 2003). A distinção dos grupos é corroborada por estudos de compatibilidade somática (HEDGER et al., 1987; McGEARY; WHEELER, 1988; GRIFFITH; HEDGER, 1994a). O biótipo-C abrange isolados patogênicos ao cacaueiro, ou a outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (Sterculiaceae ou Malvaceae *sensu lato*). O biótipo-S infecta espécies do gênero *Solanum*, geralmente plantas invasoras de áreas com florestas degradadas, induzindo os sintomas característicos da doença (BASTOS; EVANS, 1985). O biótipo-L pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae, colonizando tecidos vivos sem induzir sintomas (GRIFFITH; HEDGER, 1994b).

Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro incluem o manejo e poda fitossanitária (remoção das partes infectadas); controle químico e biológico, e principalmente a resistência genética (PURDY; SCHMIDT, 1996). O manejo fitossanitário consiste na remoção de tecidos infectados para redução de inóculo e possui um custo elevado em mão-de-obra e baixa eficácia, enquanto que o controle químico é ineficiente e de alto custo, e o

controle biológico, utilizando principalmente *Trichoderma stromaticum*, ainda não apresenta eficácia no controle de partes afetadas.

A forma definitiva e mais eficiente de controle consiste no emprego de variedades resistentes. Os genótipos 'Scavina 6' e 'Scavina 12', originalmente coletados no Peru, consistem nas principais fontes de resistência largamente utilizadas no cultivo e no melhoramento, entretanto ambos tem demonstrado sintomas de infecção desde 1976 (BARTLEY, 1986). No Pará, 'Scavina 6' foi considerado inicialmente resistente (EVANS; BASTOS, 1980), entretanto, a sua resistência foi quebrada alguns anos após sua introdução no Equador e Colômbia (BARTLEY, 1986), e também mais recentemente no sul da Bahia. A variação na reação de resistência deriva possivelmente da diversidade do patógeno. Estudo recente demonstrou uma interação específica entre isolados e genótipos de cacaueteiro, com variação na resposta de resistência de 'Scavina 6' em relação a diversos isolados (SHAW; VANDENBON, 2007). Novas fontes de resistência têm sido identificadas na coleção de germoplasma de cacaueteiro localizada em Marituba, PA, resultante da coleta sistemática da diversidade conduzida na Amazônia Brasileira pela CEPLAC do Ministério da Agricultura e Pecuária a partir de 1986 (ALMEIDA et al., 1995). Após avaliações em campo e em condições controladas, alguns acessos resistentes foram identificados, destacando-se 'CAB 214' e 'CAB 208' (ALBUQUERQUE et al., 2010), geneticamente divergentes de 'Scavina 6' (ALBUQUERQUE, 2006).

Estabelecer relações genéticas entre os biótipos -C, -L e -S de *M. perniciosa* pode auxiliar no entendimento da capacidade adaptativa dos isolados, em função de seus biótipos e hospedeiros preferenciais. A definição da região na Amazônia Brasileira com a maior diversidade genética do fungo e a avaliação do grau da diversidade genética presente principalmente no biótipo-C, também se mostra fundamental para auxiliar em programas de melhoramento do cacaueteiro, visando à compreensão da interação dos isolados de diferentes origens e genótipos de *T. cacao*.

O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de uma amostra representativa de isolados dos biótipos -C, -L e -S de *Moniliophthora perniciosa* coletados na Amazônia Brasileira e áreas de cultivo empregando marcadores microssatélites, de forma a classificá-los e selecionar representantes na inoculação de genótipos diferenciais ao patógeno incluindo os materiais resistentes, suscetíveis e intermediários, para avaliar diferenças em agressividade entre os isolados. Isolados de diferentes grupos foram investigados quanto à expressão *in vitro* de genes candidatos presumíveis de virulência e patogenicidade identificados no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP, em condições

indutoras (estresse de N e fotoperíodo) de forma a buscar a associação entre diversidade e agressividade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Moniliophthora perniciosa*

Moniliophthora perniciosa (Marasmiaceae *sensu stricto*; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) [Syn. *C. perniciosa* (Stahel) Singer, Tricholomataceae] é o agente causal da doença vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). Este patógeno foi inicialmente identificado como *Marasmius pernicius* (STAHHEL, 1915), mas na revisão do gênero *Crinipellis* (SINGER, 1942) foi reclassificado como *C. perniciosa*. Mais recentemente, utilizando análises filogenéticas com base nas sequências de cinco genes nucleares, Aime; Phillips-Mora (2005) propuseram realocar a espécie no gênero *Moniliophthora*, juntamente com *M. roreri*, outro patógeno sul-americano de cacau que causa a monilíase, isso porque ambos formaram uma linhagem separada e distinta dos gêneros *Marasmius*, *Crinipellis* e *Chaetocalathus*.

Além destas duas espécies patogênicas que infectam plantas de cacau na América do Sul (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), putativas espécies simbióticas endofíticas de *Moniliophthora*, foram identificadas ocorrendo em raízes de gramíneas do semi-árido do Novo México (EUA) (KHIDIR et al., 2010); enquanto três novas espécies saprófitas de *Moniliophthora* foram descritas no Sudeste Asiático (KEREKES; DESJARDIN, 2009). Espécies de gêneros afins de *Crinipellis* e *Marasmius* são geralmente saprófitas, algumas associadas a espécies arbóreas, enquanto outras são saprófitas de serapilheira (GRIFFITH et al., 1994; 2003).

Moniliophthora perniciosa é um patógeno hemibiotrófico, com distinta morfologia de micélio e comportamento nas fases biotrófica/parasítica e necrotrófica/saprofítica (GRIFFITH et al., 1994). Quando se encontra em condições ambientais favoráveis, três a seis meses após a infecção da planta ocorre a formação dos basidiocarpos com a disseminação dos basidiósporos (GRIFFITH; HEDGER, 1994a). A liberação e dispersão dos basidiósporos ocorrem geralmente à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pelo vento e chuva. A penetração dos basidiósporos no hospedeiro se dá por meio de estômatos e ferimentos nas bases de tricomas lesados (PURDY; SCHIMIDT, 1996).

Basidiósporos são uninucleados e normalmente germinam por um único tubo germinativo, dando origem a um emaranhado e largo micélio primário de hifas monocarióticas (DELGADO; COOK, 1976). O emaranhado e largo micélio primário (5-20 μm) é considerado inerente à fase biotrófica do fungo, enquanto o micélio secundário mais estreito (1-3 μm) e regular, com grampos de conexão, é típico da fase necrotrófica ou do cultivo *in vitro* em meio artificial. Geralmente a fase biotrófica tem sido descrita como associada com o micélio monocariótico, mas existem descrições contraditórias sobre as condições nucleares das hifas durante essa fase (DELGADO; COOK, 1976; WHEELER, 1985). Ambas as fases dos micélios podem ocorrer ao mesmo tempo em tecidos colonizados vivos (PURDY; SCHMIDT, 1996), como descrito por Ceita et al. (2007).

Os estímulos envolvidos nas mudanças de fase do micélio ainda são desconhecidos, e micélios uninucleados e binucleados foram obtidos *in vitro* (MEINHARDT et al., 2006). O glicerol foi encontrado em altas concentrações durante a formação da vassoura-verde (fase biotrófica), e em concentrações reduzidas na vassoura-seca (fase necrotrófica) (SCARPARI et al., 2005). Estudos demonstraram que é possível manter o micélio *in vitro* na fase monocariótica (não infectiva), impedindo a dicarionização do micélio, e que as condições que impedem a mudança de fase seriam o baixo teor de nutrientes e a presença de glicerol como única fonte de carbono (MEINHARDT et al., 2006).

2.1.1 Classificação em biótipos

A doença vassoura-de-bruxa deriva da infecção por basidiósporos de tecidos meristemáticos do cacaueiro (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento), induzindo uma série de sintomas, dependendo do órgão infectado e estágio de desenvolvimento (PURDY; SCHMIDT, 1996). O crescimento hipertrófico e hiperplásico de gemas infectadas, denominadas "vassouras", são os sintomas mais característicos. Inicialmente, acreditava-se que *Moniliophthora perniciosa* infectasse apenas o cacaueiro e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (PURDY; SCHMIDT, 1996), todas da família Malvaceae *sensu lato* (anteriormente denominada Sterculiaceae; ALVERSON et al., 1999). No entanto, desde 1980, tem-se demonstrado que *M. perniciosa* pode infectar naturalmente outros hospedeiros não-relacionados. Griffith; Hedger (1994a) propuseram que *M. perniciosa* poderia ser classificado em pelo menos três biótipos distintos (biótipos -C, -S e

-L), com o fungo apresentando alguma especificidade quanto ao hospedeiro, e com o desenvolvimento limitado ou ocasional de sintomas moderados (inchaço dos tecidos) em inoculações cruzadas entre biótipos e hospedeiros.

Isolados que infectam o cacaueiro e outras espécies de *Theobroma* e *Herrania* são classificados como biótipo-C (GRIFFITH; HEDGER, 1994a). O biótipo-S inclui isolados que infectam naturalmente algumas espécies de solanáceas invasoras (ex. *Solanum rugosum*), mas com a inoculação artificial, pode ser patogênico também para espécies de solanáceas cultivadas, como tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimentão (*Capsicum annuum*) (BASTOS; EVANS, 1985; GRIFFITH et al., 2003; MARELLI et al., 2009). O biótipo-L é representado por uma infecção geralmente assintomática com a produção de basidiocarpos em cipós vivos ou mortos de florestas (lianas) ou em serapilheira e restos de tecidos da floresta Amazônica (GRIFFITH; HEDGER, 1994b). No Equador, o biótipo-L está associado principalmente com a espécie *Arrabidaea verrucosa* (Bignoniaceae) (GRIFFITH; HEDGER, 1994b). Já no Brasil foi encontrado associado à espécie *Mascagnia sepium* (Malpighiaceae) (BASTOS et al., 1998). Evans (2007) sugeriu que outros hospedeiros ainda precisam ser identificados na extensa variedade de famílias de plantas presentes na América do Sul.

Outros biótipos têm sido propostos como os biótipos -B e -H. O biótipo-H, foi identificado em tecidos de *Heteropterys acutifolia*, uma Malpighiaceae em Minas Gerais (GRIFFITH et al., 2003), mas mais tarde foi reclassificado como uma nova espécie, *Crinipellis brasiliense* (ARRUDA et al., 2005). O biótipo-B foi identificado em plantas de urucum (*Bixa orellana*), que cresceram próximas as plantações de cacau (BASTOS; ANDEBHRAN, 1986).

Os biótipos -C, -S e -L apresentam diferenças na história de vida e compatibilidade somática, com variação morfológica menor no biótipo-L. Os biótipos patogênicos que ocasionam a vassoura-de bruxa (-C e -S) são homotáticos primários, em que o micélio dicariótico surge por meio de um único micélio monocariótico que sofre plasmogamia entre suas próprias hifas (BAKER; CROWDY, 1943). O biótipo-L aparenta ser heterotático bifatorial, evidenciado pela observação de um mecanismo de cruzamento envolvendo hifas geneticamente distintas, como a maioria dos fungos basidiomicetos (GRIFFITH; HEDGER, 1994a; GRIFFITH et al., 1994; GRIFFITH et al., 2003).

Diversas análises genéticas e moleculares sugerem que os biótipos -C e -S são mais semelhantes entre si do que para o biótipo-L, com ambos exibindo um nível de diversidade menor em comparação ao biótipo-L (ARRUDA et al., 2003a; 2003b; GRIFFITH; HEDGER, 1994a; GRIFFITH et al., 2003). Determinar a história da evolução e adaptação dos biótipos

aos hospedeiros é fundamental para definir as áreas com a maior diversidade e o modo de desenvolvimento da infecção no hospedeiro, ajudando a elaborar uma estratégia para pesquisar a resistência na região Amazônica, supostamente considerada o centro de origem do *M. pernicioso* (BAKER; HOLLIDAY, 1957; GRIFFITH et al., 1994; PURDY; SCHMIDT, 1996) e *T. cacao* (MOTAMAYOR et al., 2002).

Acredita-se que *M. pernicioso* tenha co-evoluído com os hospedeiros *Theobroma* e *Herrania* na região do Alto Amazonas (PURDY; SCHMIDT, 1996). Por outro lado, Griffith et al. (1994) propõe que o biótipo-C possa ter evoluído somente após o estabelecimento do cultivo do cacau (intencional ou não) por seres humanos. Árvores de baixa densidade e restrita brotação, floração e frutificação em condições naturais poderiam ter levado a propagação da infecção e evolução da doença. Griffith et al. (1994) também sugere que os biótipos -C e -S evoluíram de forma independente, possivelmente a partir do biótipo-L, porém não pode ser descartada a existência de outros biótipos ainda desconhecidos (EVANS, 2007).

2.1.2 A disseminação da vassoura-de-bruxa

Acredita-se que o biótipo-C de *M. pernicioso* seja endêmico para a região Amazônica (PURDY; SCHMIDT, 1996), de onde foi levado para outras regiões produtoras de cacau na América do Sul e Caribe, devastando as lavouras locais. O primeiro relato da vassoura-de-bruxa infectando plantios comerciais de cacau ocorreu no Suriname em 1895 (RORER, 1913). Posteriormente, a introdução sequencial do patógeno foi relatada ocorrendo na Guiana Inglesa (1906), Equador (1921); Trinidad (1928); Tobago (1939) e Granada (1948) [BAKER; HOLLIDAY, 1957], atingindo a maior região produtora de cacau do Brasil, no sul da Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1996). As sementes de cacau originalmente introduzidas na Bahia entre os séculos XIX e início do século XX eram provavelmente saudáveis e, devido à distância geográfica de cerca de 2.000 Km das áreas de cultivo e de ocorrência natural do hospedeiro e patógeno na região norte do país, lá permaneceram não infectados até 1989 (PEREIRA et al., 1996).

A introdução da doença na América Central ocorreu em 1978, mas até onde se tem conhecimento, tem sido contida com sucesso no Panamá (PEREIRA et al., 1996). O fungo é atualmente encontrado em todos os países produtores de cacau na América do Sul e Caribe, com perdas estimadas pela doença vassoura-de-bruxa atingindo mais de 250 mil toneladas por

ano (BOWERS et al., 2001). Atualmente há uma grande preocupação sobre o risco potencial da introdução de *M. pernicioso* na África Ocidental, região responsável hoje por mais de 70% da produção de cacau no mundo, que seria potencialmente catastrófica e com graves consequências sociais.

A distribuição natural de *T. cacao* no Brasil é limitada à região do Alto Amazonas (SERENO et al., 2006; MOTAMAYOR et al., 2008), mas quando o cacau se tornou um produto comercialmente valioso durante o século XVII, o cultivo estendeu-se para o leste até próximo a foz do rio Amazonas, particularmente estimulado por missionários jesuítas (BARTLEY, 2005). A produção de cacau foi a base inicial da economia da Amazônia até ser superada pela extração de borracha no final do século XIX. As primeiras sementes de cacau da Amazônia Brasileira foram plantadas no Sul da Bahia a partir do final do século XVIII (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Mais recentemente, o cultivo do cacaueiro foi incentivado pelo governo Brasileiro no estado de Rondônia e na região central do Estado do Pará ao longo da rodovia Transamazônica, em projetos de colonização durante os anos 1970 e 1980. O estado de Rondônia, próximo ao suposto centro da diversidade, contém cacaueiro silvestre que permanece com incidência natural de *M. pernicioso* (BARTLEY, 2005).

Por outro lado, a região ao longo da rodovia Transamazônica (região central do Pará) não possui cacaueiro nativo (BARTLEY, 2005), mas é considerada o centro de diversidade da espécie *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu; ALVES et al., 2007), que também é altamente suscetível a *M. pernicioso*. Desde o início do estabelecimento do cultivo de cacaueiro na região Transamazônica, a vassoura-de-bruxa tem sido um fator limitante para essa cultura. Mas, a origem do *M. pernicioso* na região ao longo da rodovia Transamazônica não está bem estabelecida, podendo ter derivado tanto de plantações antigas ao longo do rio Amazonas (~400 Km de distância) ou Belém (~500 Km), como ser proveniente de plantios locais de cupuaçu, ou de outro local.

A introdução do fungo no sul da Bahia ocorreu em 1989, e parece ter acontecido em dois focos primários (ANDEBRAHN et al., 1999), possivelmente por intervenção humana acidental ou não (HOMEWOOD, 1991). A fonte original dos isolados permanece desconhecida, mas pelo menos duas linhagens distintas têm sido constantemente detectadas por vários meios moleculares (ANDEBRAHN et al., 1999; RINCONES et al., 2003; 2006). A investigação sobre a origem dos isolados presentes nessas regiões que são grandes produtoras de cacau é necessária para subsidiar programas de melhoramento com informações sobre a diversidade do patógeno.

2.1.3 Diversidade genética em *M. pernicioso*

A variabilidade genética de isolados de *M. pernicioso*, incluindo o biótipo-C, tem sido avaliada por meio de aspectos morfológicos (PEGLER, 1978), estudos de patogenicidade (HEDGER et al., 1987; WHEELER; MEPSTED, 1988), testes bioquímicos e compatibilidade somática (HEDGER et al., 1987; McGEARY; WHEELER, 1988; GRIFFITH; HEDGER, 1994a) e mais recentemente com o uso de marcadores moleculares.

A variabilidade morfológica pode ser analisada em relação ao tamanho do basidiósporo, cor do píleo e origem geográfica (PEGLER, 1978). Foram identificadas em basidiocarpos de *M. pernicioso* coletados na América do Sul, três variantes morfológicas para a característica cor do píleo, que seriam: *pernicioso* (píleo vermelho escuro), *ecuadorienses* (Stahel) Pegler (basidiocarpo grande e de coloração vermelho claro, sem áreas esbranquiçadas) e *citriniceps* Pegler (píleo amarelo), sendo os dois últimos coletados no Equador (PEGLER, 1978). Wheeler e Mepsted (1988) observaram que o biótipo-C poderia ser classificado em dois grupos principais de acordo com a capacidade de provocar sintomas em progênies de ‘Scavina 6’. Os isolados de cacaueiros coletados no Equador, Bolívia, e na maior parte da Colômbia causavam reações severas nas progênies de ‘Scavina 6’, enquanto que isolados de cacaueiros coletados na Amazônia Brasileira, Trinidad e Venezuela induziam reações restritas no mesmo tipo de inoculação. Já os isolados da região oriental do Equador, centro presumível de diversidade de *T. cacao*, apresentaram a maior diversidade para patogenicidade.

Estudos de compatibilidade somática usando os mesmos isolados apontaram a formação de seis grupos distintos, consistentes com a classificação de acordo com a reação do hospedeiro (McGEARY; WHEELER, 1988). A separação entre isolados do Equador e Colômbia, e do Brasil, Venezuela e Trinidad foi corroborada por análises empregando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (T. Andebrahm e D. Furtek, não publicado).

O emprego de marcadores moleculares como o RAPD já possibilitou a distinção de isolados de *M. pernicioso* provenientes de quatro países da região Amazônica, incluindo o Brasil, concluindo que quanto a similaridade genética do biótipo-C, a proximidade genética parece ser mais importante do que o hospedeiro (ANDEBRHAN; FURTEK, 1994). Num

estudo posterior, Andebrhan et al. (1999) utilizando também o marcador RAPD, na análise genética de isolados de *M. pernicioso* encontrados da Bahia, supôs ter ocorrido duas introduções independentes no sul deste estado em 1989, dados estes reforçados pelos resultados obtidos com análises de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (PLOETZ et al., 2005), cariotipagem por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo para comprimento de cromossomos e amplificação de sequências teloméricas (RINCONES et al., 2003; 2006).

Utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, Gramacho et al. (2002), identificaram em 25 isolados coletados em almofadas florais, flores, ovários, gemas apicais e frutos de uma mesma árvore, quatro populações de *M. pernicioso*. Gramacho et al. (2005) usando marcadores RAPD, determinaram a estrutura genética de populações de *M. pernicioso* provenientes da Bahia, coletadas de plantações de cacauzeiro naturalmente infectadas em três zonas agroecológicas num mesmo período, relatando que as populações do fitopatógeno das diferentes zonas diferiram entre si.

A análise de sequências repetidas do tipo ERIC por PCR de diversos isolados de *M. pernicioso* de três hospedeiros (*T. cacao*; *Solanum lycocarpum*; e *Heteropterys acutifolia*) e de diversos estados e localidades permitiu a clara separação entre isolados de acordo com hospedeiro (como biótipos -C ou -S), e uma correlação com origem geográfica (ARRUDA et al., 2003a). Os mesmos isolados não apresentaram polimorfismo para sequências de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA nuclear e para o gene da subunidade ribossomal pequena do rDNA mitocondrial (mtDNA SSU rDNA) por digestão de produtos amplificados (ARRUDA et al., 2003b). A região IGS (*Inter Genic Spacer*) do gene rDNA apresentou polimorfismo, e permitiu a separação de isolados de acordo com hospedeiro por PCR-RFLP, e ainda parcialmente por sequenciamento e análise filogenética, a separação por hospedeiro e origem geográfica (ARRUDA et al., 2003b).

O recente desenvolvimento de locos microssatélites para *M. pernicioso* (GRAMACHO et al., 2007; SILVA et al., 2008) oferece o potencial de análise e classificação de isolados de acordo com origem geográfica, hospedeiro, patogenicidade e agressividade. Por exemplo, entre os isolados do Brasil, os originários de Rondônia foram os mais agressivos ao 'Scavina 6', e marcadores RAPD claramente distinguiram estes isolados de outros coletados no Pará (ANDEBRHAN et al., 1999), sendo que os isolados de Rondônia possuem alelos de locos de microssatélites raros e específicos, demonstrando maior diversidade genética (SILVA, 2007). O estudo de locos de microssatélites também permitiu identificar

uma maior diversidade na região Amazônica em isolados de *M. pernicioso* coletados em Rondônia e Pará (SILVA, 2007).

2.2 Microssatélites em fungos

Marcadores moleculares oferecem excelentes ferramentas para o estudo da biologia de fitopatógenos em processos importantes, como dispersão, sistema de reprodução, adaptação a hospedeiros e especiação (GIRAUD et al., 2008). Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são marcadores codominantes e de natureza multialélica, que consistem de sequências de 1-5 pares de bases repetidas em série, em número variável nos genomas (JARNE; LAGODA, 1996). Para amplificar uma ilha de microssatélites utilizam-se um par de iniciadores, que são sequências únicas de oligonucleotídeos, homólogos as regiões flangeadoras dos microssatélites (LITT; LUTTY, 1989). Essas regiões geralmente são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies relacionadas (DUTECH et al., 2007). Cada segmento amplificado de tamanho distinto representa um alelo diferente para o mesmo loco dentro da população.

Embora representem importantes marcadores genéticos, os microssatélites têm sido isolados em poucas espécies de fungos (DUTECH et al., 2007). A obtenção desses marcadores com um nível aceitável de polimorfismo é geralmente mais difícil em fungos do que em outros organismos, e a possibilidade de transferência interespecífica de microssatélites em fungos também parece menor do que em outras taxas (DUTECH et al., 2007). Apesar das dificuldades é importante lembrar que os fungos são de interesse primordial, não só por serem os principais parasitas de plantas e animais, mas também por constituírem modelos adaptáveis e altamente úteis para a compreensão dos processos evolutivos (GIRAUD et al., 2008). Microssatélites vêm sendo utilizados em estudos envolvendo diversas espécies de fungos patogênicos a plantas cultivadas, com o intuito de estudar entre outras coisas, a estrutura genética das populações, a presença de genótipos multilocos, a origem de fungos introduzidos em áreas em que não há indícios da ocorrência natural da espécie e a ocorrência ou não de recombinação sexual.

Em *Ustilago scitaminea*, basidiomiceto que causa a doença conhecida como carvão na cana-de-açúcar, microssatélites foram utilizados para investigar o sistema de reprodução, a diversidade e estrutura genética de populações coletadas em quinze países da África, América

e Ásia (RABOIN et al., 2007). Neste estudo, todos os isolados de *U. scitaminea* analisados, foram homozigotos para todos os locos de microssatélites, indício de que não há recombinação sexual. A diversidade genética encontrada em populações de *U. scitaminea* americanas e africanas foi extremamente baixa, com todos os isolados pertencendo a uma mesma linhagem, sendo esta linhagem também encontrada em algumas populações da Ásia, onde foi detectada a maior diversidade genética para *U. scitaminea*, sugerindo que esta espécie é oriunda desta região (RABOIN et al., 2007).

Mycosphaerella fijiensis, é um ascomiceto que causa a doença conhecida como Sigatoka-negra na bananeira, e que tem uma ampla distribuição global. YANG; ZHONG (2008) encontraram um alto polimorfismo na avaliação de isolados de *M. fijiensis* coletados no Havaí, analisados com quatorze locos de microssatélites. Isolados desta espécie coletados na Costa Rica e Camarões foram analisados com marcadores microssatélites, visando identificar a dispersão do patógeno, detectando baixa para moderada diferenciação genética entre as populações dos dois países e isolamento por distância em Camarões (HALKETT et al., 2010).

No estudo da estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica*, fungo ascomiceto que ocasiona a ferrugem em espécies do gênero *Castanea* (castanheiras), utilizando dez locos de microssatélites, Dutech et al. (2010), verificaram a presença de três diferentes grupos ou linhagens clonais presentes na França, sugerindo a ocorrência de ao menos três introduções desta espécie originária da Ásia. Na genotipagem de isolados de *C. parasitica*, coletados no Principado de Astúrias (Espanha), com dezesseis locos de microssatélites foi observada uma baixa diversidade com uma estrutura populacional clonal, tendo um haplótipo multilocos representando 95% da população, e sem evidências de recombinação (GONZÁLEZ-VARELA et al., 2011).

Marcadores microssatélites foram utilizados para identificar a diversidade genética de isolados de *Phakopsora pachyrhizi*, basidiomiceto que ocasiona a ferrugem da soja, coletados em quatro zonas agroecológicas na Nigéria (TWIZEYIMANA et al., 2011). Neste estudo, a diversidade genética foi maior (>90%) dentro de cada campo de soja, do que entre os campos dentro de regiões geográficas (6%). A análise filogenética indicou uma estrutura estritamente clonal, concluindo que devido a reprodução assexuada de *P. pachyrhizi*, as diferenças genéticas dentro de cada grupo devem ser atribuídas a mutações em locos de SSR (TWIZEYIMANA et al., 2011).

No ascomiceto *Pyrenophora teres*, que causa a mancha reticular na cevada, os marcadores microssatélites foram utilizados para determinar o nível de diversidade genética e

diferenciação entre duas populações em áreas de cultivo, e avaliar a prevalência da reprodução sexual nestas populações (BOGACKI et al., 2010). Com o uso de microssatélites foi identificada uma maior diversidade genética nas populações do que relatada anteriormente com o uso de outros marcadores moleculares, e ainda que ambas as populações de *P. teres* analisadas apresentavam predominantemente recombinação sexual (BOGACKI et al., 2010). Marcadores microssatélites também foram utilizados para quantificar a diversidade genética entre outras espécies de fungos que infectam cereais, como *Puccinia graminis* f.sp. *avenae* e *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (basidiomicetos que causam a ferrugem do colmo da aveia e do trigo, respectivamente) (KEIPER et al., 2006; ADMASSU et al., 2010) e *Rhynchosporium secalis* (ascomiceto que causa a escaldadura da cevada) (BOUAJILA et al., 2007).

O sistema de reprodução de populações israelenses do ascomiceto de solo *Emericella nidulans* foi estudado utilizando locos de microssatélites (HOSID et al., 2010). O estudo foi realizado em três cânions: dois no norte de Israel e um ao sul do deserto de Negev, indicando a presença de recombinação sexual na população do norte e predominância de clonalidade na população do deserto. O caráter predominantemente clonal da população do deserto foi explicado pelo pressuposto de que apenas alguns haplótipos podem sobreviver nas condições extremamente estressantes do deserto. Além disso, a baixa densidade de populações de *E. nidulans* no solo do cânion do deserto, reduz a possibilidade do encontro de um parceiro sexual, favorecendo a clonalidade por autofecundação. A recombinação sexual em populações de *E. nidulans* do norte pode ser resultado do estresse biótico (pressão pela concorrência com diversas espécies de fungos), devido às condições ecológicas mais amenas encontradas nestes cânions (HOSID et al., 2010).

Plantas selvagens e cultivadas representam habitats muito diferentes de patógenos, especialmente quando as plantas cultivadas carregam genes de resistência qualitativa (XHAARD et al., 2011). *Melampsora larici-populina* é um basidiomiceto que causa a ferrugem nas folhas de álamo (*Populus*). O estudo do impacto da domesticação do hospedeiro na estrutura genética de populações de *M. larici-populina*, coletadas preferencialmente em áreas de ocorrência natural do hospedeiro com locos de microssatélites, identificou a presença de três grupos genéticos coexistindo em *M. larici-populina*, com alguns indivíduos coletados num mesmo local pertencendo a diferentes grupos genéticos (XHAARD et al., 2011).

A sarna da macieira é uma doença ocasionada pelo ascomiceto *Venturia inaequalis*. Estudos com locos de microssatélites foram realizados visando avaliar a evolução da estrutura de populações de *V. inaequalis* e o impacto associado com a domesticação de seu hospedeiro (GLADIEUX et al., 2010). Essas análises indicaram que a domesticação da maçã induziu uma

mudança significativa na diferenciação genética de populações de *V. inaequalis* em seu centro de origem, mas teve pouco impacto na dinâmica de populações e no sistema de acasalamento (GLADIEUX et al., 2010).

Isolados do ascomiceto *Alternaria brassicicola* que causa a mancha foliar preta em brássicas, coletados em sete países, foram analisados com locos de microsatélites, que se mostraram úteis para a análise da diversidade genética, porém não foi possível a transferibilidade desses locos para outras onze espécies de *Alternaria* (AVENOT et al., 2005). Sete locos de microsatélites foram utilizados para a caracterização genética de oitenta isolados de *Phytophthora ramorum*, oomiceto que causa mancha foliar em diversas plantas ornamentais, identificando trinta genótipos multilocos, sem evidências da ocorrência de recombinação sexual (VERCAUTEREN et al., 2010). Isolados da espécie *Phytophthora infestans* que causa a doença conhecida como requeima de batata, coletados em campos comerciais da França, foram analisados com locos de microsatélites, identificando dois grupos diferenciais de isolados, o que sugere a ocorrência de múltiplas introduções na França (MONTARRY et al., 2010). Ambos os grupos identificados tinham uma forte estrutura clonal e eram similares em relação à diversidade genética e mecanismo de reprodução. A manutenção da diferenciação entre os dois grupos genéticos deve resultar da contribuição fraca ou inexistente de reprodução sexual nas populações francesas de *P. infestans* (MONTARRY et al., 2010).

Em *M. perniciosa*, foram desenvolvidos dois estudos envolvendo marcadores microsatélites. Gramacho et al. (2007) identificou doze locos de microsatélites polimórficos apropriados para estudos de genética populacional, sendo que três destes foram capazes de distinguir isolados de diferentes biótipos e de diferentes países. Os locos de microsatélites também foram utilizados para verificar a diversidade e estrutura genética populacional de isolados de *M. perniciosa* coletados principalmente na região Amazônica, identificando maior variabilidade genética em isolados coletados em Rondônia e Pará, quando comparados com isolados do Amazonas e alguns representantes da Bahia (SILVA, 2007).

2.3 Patogenicidade

Um provável mecanismo de patogenicidade do *M. perniciosa* pode estar associado com a capacidade de induzir a suscetibilidade do cacaueiro pela produção do hormônio

vegetal ácido salicílico nos tecidos da planta infectada (CHAVES; GIANFAGNA, 2006; KILARU et al., 2007). Estudos detectaram que a fase necrotrófica do fungo *M. perniciosus* produz o hormônio ácido salicílico (CHAVES; GIANFAGNA, 2006; KILARU et al. 2007) que está ligado à regulação da resposta de defesa contra patógenos biotróficos, sendo esta via antagônica a resposta de defesa regulada por jasmonato e/ou etileno (LORENZO; SOLANO 2005; KUNKEL; BROOKS, 2002; THALER et al., 2004). Também foi verificado que a alta concentração de ácido salicílico induz os sintomas de necrose e morte do ramo colonizado no final do processo (CHAVES; GIANFAGNA, 2006).

Há especulações de que *M. perniciosus* tenha evoluído de um fungo endófitico para um patogênico, para tanto pode ter adquirido um mecanismo de produção de ácido salicílico para alterar o sistema de defesa na planta e, como consequência, modificando-se de um organismo biotrófico e endófitico a um patógeno hemibiotrófico (CHAVES; GIANFAGNA, 2006). Diversos grupos no Brasil e no exterior buscam no banco de dados do genoma de *M. perniciosus* por genes candidatos que regulem outros mecanismos, mas focando seus efeitos durante a fase sintomática da doença, quando ocorre a necrose dos tecidos, incluindo a ação da proteína de necrose e indutora de etileno (NEP) e genes relacionados à morte celular programada (GARCIA et al., 2007; CEITA et al., 2007).

Os genes de patogenicidade são aqueles necessários para o desenvolvimento da doença, e os tipos de genes envolvidos dependem do processo de infecção e da espécie do patógeno (IDNURM; HOWLETT, 2001). Estudos indicam que o ambiente colonizado inicialmente no hospedeiro deva ser deficiente em Nitrogênio (SNOEIJERS et al., 2000) ou em aminoácidos essenciais para a patogênese (SOLOMON et al., 2003), sendo um estímulo para a ativação dos genes de patogenicidade. Assim, os genes de patogenicidade são mais expressos sob carência de N, sendo esta tendência reforçada pela identificação na região promotora de genes de patogenicidade, de sequências específicas para o acoplamento de fatores de transcrição relacionados com metabolismo de N em fungos e bactérias (SNOEIJERS et al., 2000).

Na busca por candidatos a genes de virulência e patogenicidade de *M. perniciosus*, foi realizada a procura em biblioteca de genes induzidos em cultivo sob a carência de N e sob fotoperíodo (LEAL Jr. et al., 2010). Esta estratégia vem sendo utilizada na identificação destes tipos de genes candidatos de virulência e patogenicidade, principalmente no cultivo *in vitro* sob condições de estresse abiótico, tais como restrição de carbono ou nitrogênio, presença de luz ou alteração de pH (PIETERSE et al., 1994; TALBOT et al., 1997; TRAIL et al., 2003; ACKERVEKEN et al., 1994; PRUSKY; YAKOY, 2003). Os genes de *M.*

perniciosa identificados representam componentes de parede celular, enzimas do metabolismo primário e secundário relacionado com a síntese de toxinas e desintoxicação. A expressão de alguns desses genes do patógeno foi detectada em plantas suscetíveis inoculadas, no período assintomático de até 10 dias (LEAL Jr. et al., 2010). Alguns dos genes tiveram o padrão de expressão diferente do gene *housekeeping* do fungo, como o da fenilalanina amônio liase (PAL) que de acordo com o mecanismo especulado pode estar envolvido na síntese do ácido salicílico (VERBENE et al., 2000).

O sequenciamento do genoma de *M. perniciosa* permitiu a realização de busca através da bioinformática, identificando uma parcela significativa de genes envolvidos na adaptação ao estresse e necrose na planta, duas características necessárias para que um fungo hemibiotrófico possa cumprir seu ciclo de infecção (MONDEGO et al., 2008). Foram identificados ainda outros genes associados a biossíntese de fitormônios, que ocasionam uma desordem fisiológica na planta, possivelmente alterando seu balanço hormonal, favorecendo o processo de infecção (MONDEGO et al., 2008). Rincones et al. (2008) observou uma expressão diferencial de genes relacionados a patogenicidade durante o desenvolvimento de *M. perniciosa*. A categorização funcional dos genes diferencialmente expressos revelou uma alta atividade metabólica na fase monocariótica, representada por uma porcentagem maior de transcritos supostamente envolvidos na biossíntese e degradação de proteínas e lipídeos acoplada a uma menor porcentagem de transcrições supostamente envolvidas no crescimento celular (RINCONES et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a diversidade genética de isolados de *Moniliophthora perniciosa* da Amazônia Brasileira com o uso de marcadores moleculares e expressão de genes presumíveis de patogenicidade, de forma a associar a diversidade com patogênese e/ou agressividade dos isolados a acessos diferenciais (suscetíveis ou resistentes) de *Theobroma cacao* L..

3.2 Específicos

- Analisar e categorizar 134 isolados dos biótipos -C, -L e -S de *Moniliophthora perniciosa* coletados principalmente na Amazônia Brasileira e áreas de cultivo, quanto à variabilidade genética com o uso dos marcadores moleculares do tipo microsatélites;
- Avaliar a variabilidade na patogênese e/ou agressividade de isolados de *M. perniciosa* por meio da inoculação em acessos de *Theobroma cacao* L., que diferem quanto ao grau de resistência ao fitopatógeno;
- Avaliar a expressão *in vitro* de genes presumíveis de virulência e/ou patogenicidade em condição de estresse (carência de N) de uma amostra dos diversos isolados de *M. perniciosa* coletados na Amazônia Brasileira e áreas de cultivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP, e na Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH) pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Marituba, PA.

4.1 Coleta dos isolados de *Moniliophthora perniciosa*

A coleta sistemática de isolados do biótipo-C foi conduzida a partir de árvores infectadas de *T. cacao* na área de ocorrência natural do fungo na região Amazônica, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia no Brasil, e Equador (Figura 1). Tecidos de cacau infectados (vassouras) foram coletados de árvores em áreas de cultivo ou de ocorrência natural, ao longo de rodovias na Amazônia Brasileira, com uma distância mínima de 10 Km entre os locais de coleta, e com o posicionamento registrado por GPS (Tabela 1).

Os isolados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia foram coletados pela equipe do Ministério da Agricultura do Brasil da CEPLAC, Marituba, PA. Os tecidos infectados de cacau foram coletados de vassouras verdes com cerca de 50 cm de comprimento, e levados para a ERJOH (Marituba, PA), onde os micélios foram isolados após a desinfecção com solução de 5% hipoclorito de sódio. Os isolados foram então cultivados em meio seletivo BDA contendo 20% de batata, 2% de ágar, 2% de dextrose, 100 mg L⁻¹ de benlate-benzamidazol e 100 mg L⁻¹ de estreptomicina.

Micélios liofilizados de isolados do Equador foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gareth W. Griffith, *Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University*, Reino Unido. Foram incluídos ainda isolados do biótipo-C coletados no sul da Bahia, onde o patógeno foi introduzido em 1989 (PEREIRA et al., 1996), visando investigar sua origem. Os isolados da Bahia foram gentilmente cedidos pelo Prof. Gonçalo Pereira da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP (isolados 74, 75, 76 e 77); e pela Dra. Karina Peres Gramacho da CEPLAC/CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau), Itabuna, BA (os 14 isolados restantes).

No total, foram analisados 111 isolados do biótipo-C de *M. perniciosa* (Figura 1; Tabela 1). Além desses, foram incluídos quatorze isolados do biótipo-S e nove isolados do biótipo-L, provenientes do Brasil e Equador (Tabela 1; Figura 1), cedidos pelo Dr. Gareth W. Griffith como micélios liofilizados e pelo Dr. Alan Pomella do *Mars Center for Cocoa Studies*, Barro Preto, BA.

Figura 1 - Mapa ilustrando a localização aproximada dos pontos de coleta de isolados de *M. perniciosus* dos biótipos -L, -S e -C.

Tabela 1 - Descrição dos isolados de *Moniliophthora perniciosa* dos biótipos -C, -S e -L analisados nesse estudo, com informações sobre o código, hospedeiro de origem, biótipo, local de coleta, com estado e país; seguidos da coordenada geográfica do local.

(continua)

Código	Hospedeiro	Biótipo	Cidade	Estado/País	Latitude	Longitude
1	<i>T. cacao</i>	C	Anapu	PA, Brasil	S03°28'51.4"	W051°10'38.7"
2	<i>T. cacao</i>	C	Altamira	PA, Brasil	S03°13'17.2"	W052°16'30.8"
3	<i>T. cacao</i>	C	Altamira	PA, Brasil	S03°16'13.7"	W052°23'43.5"
4	<i>T. cacao</i>	C	Brasil Novo	PA, Brasil	S03°17'16.8"	W052°29'27.2"
5	<i>T. cacao</i>	C	Brasil Novo	PA, Brasil	S03°21'58.4"	W052°38'38.3"
6	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°23'29.5"	W052°42'39.4"
7	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°26'02.5"	W052°52'32.0"
8	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°27'29.4"	W052°55'35.4"
9	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°30'53.3"	W052°57'45.6"
10	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°30'01.2"	W053°02'51.1"
11	<i>T. cacao</i>	C	Medicilândia	PA, Brasil	S03°30'04.0"	W053°07'05.8"
12	<i>T. cacao</i>	C	Uruará	PA, Brasil	S03°39'23.4"	W053°30'14.9"
13	<i>T. cacao</i>	C	Uruará	PA, Brasil	S03°41'47.5"	W053°37'09.1"
14	<i>T. cacao</i>	C	Uruará	PA, Brasil	S03°44'16.4"	W053°48'33.5"
15	<i>T. cacao</i>	C	Alenquer	PA, Brasil	S01°55'48.0"	W054°42'57.0"
16	<i>T. cacao</i>	C	Alenquer	PA, Brasil	S01°50'10.6"	W054°41'15.8"
17	<i>T. cacao</i>	C	Santarém	PA, Brasil	S01°52'37.9"	W054°42'36.9"
18	<i>T. cacao</i>	C	Santarém	PA, Brasil	S02°33'37.7"	W054°39'58.5"
19	<i>T. cacao</i>	C	Cametá	PA, Brasil	S02°02'10.1"	W049°19'52.1"
20	<i>T. cacao</i>	C	Cametá	PA, Brasil	S02°11'01.6"	W049°21'20.9"
21	<i>T. cacao</i>	C	Cametá	PA, Brasil	S02°24'51.5"	W049°29'03.5"
22	<i>T. cacao</i>	C	Baião	PA, Brasil	S02°40'45.3"	W049°39'48.0"
23	<i>T. cacao</i>	C	Mocajuba	PA, Brasil	S02°33'14.0"	W049°31'24.0"
24	<i>T. cacao</i>	C	Mocajuba	PA, Brasil	S02°31'07.8"	W049°29'99.7"
25	<i>T. cacao</i>	C	Trairão	PA, Brasil	-	-
26	<i>T. cacao</i>	C	Trairão	PA, Brasil	S04°46'13.8"	W056°05'55.2"
27	<i>T. cacao</i>	C	Trairão	PA, Brasil	S04°46'13.8"	W056°00'30.2"

(continuação)						
Código	Hospedeiro	Biótipo	Cidade	Estado/País	Latitude	Longitude
28	<i>T. cacao</i>	C	Manaus	AM, Brasil	S03°06'23.8"	W060°00'87.7"
29	<i>T. cacao</i>	C	Manaus	AM, Brasil	S02°38'80.8"	W059°38'51.5"
30	<i>T. cacao</i>	C	Manaus	AM, Brasil	S03°05'06.8"	W058°17'01.5"
31	<i>T. cacao</i>	C	Manaus	AM, Brasil	S03°06'23.8"	W058°19'25.8"
32	<i>T. cacao</i>	C	Boa Vista	AM, Brasil	S02°38'80.8"	W059°38'51.5"
33	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°31'50.1"	W057°34'48.7"
34	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°31'50.1"	W057°34'48.7"
35	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°31'35.7"	W057°34'6.30"
36	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°33'22.0"	W057°35'16.2"
37	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°38'32.6"	W057°35'16.2"
38	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°38'54.1"	W057°39'16.8"
39	<i>T. cacao</i>	C	Augusto Montenegro	AM, Brasil	S02°45'47.5"	W057°45'24.2"
40	<i>T. cacao</i>	C	Uricurituba	AM, Brasil	S02°45'37.1"	W058°06'10.7"
41	<i>T. cacao</i>	C	Uricurituba	AM, Brasil	S03°02'26.8"	W058°09'16.6"
42	<i>T. cacao</i>	C	Uricurituba	AM, Brasil	S03°04'20.5"	W058°09'42.5"
43	<i>T. cacao</i>	C	Costa da Conceição	AM, Brasil	S03°18'38.4"	W058°46'28.8"
44	<i>T. cacao</i>	C	Costa da Conceição	AM, Brasil	S03°16'08.6"	W058°40'47.3"
45	<i>T. cacao</i>	C	Ceplac/ERNEG	AM, Brasil	S02°33'15.3"	W060°02'15.0"
46	<i>T. cacao</i>	C	Ceplac/ERNEG	AM, Brasil	S02°33'33.7"	W060°02'04.2"
47	<i>T. cacao</i>	C	Ariquemes	RO, Brasil	S09°57'15.2"	W062°57'11.8"
48	<i>T. cacao</i>	C	Ariquemes	RO, Brasil	S09°55'00.5"	W062°53'93.8"
49	<i>T. cacao</i>	C	Ariquemes	RO, Brasil	S09°55'91.3"	W062°51'87.6"
50	<i>T. cacao</i>	C	Ariquemes	RO, Brasil	S09°47'53.2"	W063°02'99.0"
51	<i>T. cacao</i>	C	Ariquemes	RO, Brasil	S10°04'21.9"	W062°56'79.0"
52	<i>T. cacao</i>	C	Cacaulândia	RO, Brasil	S10°20'49.9"	W062°52'68.1"
53	<i>T. cacao</i>	C	Cacaulândia	RO, Brasil	S10°20'57.3"	W062°50'43.5"
54	<i>T. cacao</i>	C	Cacaulândia	RO, Brasil	S10°20'67.2"	W062°48'19.2"
55	<i>T. cacao</i>	C	Jaru	RO, Brasil	S10°26'41.1"	W062°28'00.6"
56	<i>T. cacao</i>	C	Ouro Preto D'Oeste	RO, Brasil	S10°43'52.2"	W062°14'98.8"
57	<i>T. cacao</i>	C	Ouro Preto D'Oeste	RO, Brasil	S10°32'78.7"	W062°05'35.1"

(continuação)

Código	Hospedeiro	Biótipo	Cidade	Estado/País	Latitude	Longitude
58	<i>T. cacao</i>	C	Ouro Preto D'Oeste	RO, Brasil	S10°38'41.7"	W062°09'92.1"
59	<i>T. cacao</i>	C	Ouro Preto D'Oeste	RO, Brasil	S10°41'90.0"	W062°14'37.4"
60	<i>T. cacao</i>	C	Ji-Paraná	RO, Brasil	S10°46'52.2"	W062°04'72.7"
61	<i>T. cacao</i>	C	Cacoal	RO, Brasil	S11°28'07.7"	W061°22'24.7"
62	<i>T. cacao</i>	C	Ji-Paraná	RO, Brasil	S11°24'88.1"	W061°27'47.8"
63	<i>T. cacao</i>	C	Ji-Paraná	RO, Brasil	S10°55'23.2"	W061°58'54.1"
64	<i>T. cacao</i>	C	Mal. Thaumaturgo	AC, Brasil	-	-
65	<i>T. cacao</i>	C	Mal. Thaumaturgo	AC, Brasil	S09°05'02.8"	W072°54'10.1"
66	<i>T. cacao</i>	C	Mal. Thaumaturgo	AC, Brasil	S09°10'10.2"	W072°54'50.3"
67	<i>T. cacao</i>	C	Plácido de Castro	AC, Brasil	S08°59'43.9"	W072°41'55.0"
68	<i>T. cacao</i>	C	Assis Brasil	AC, Brasil	S10°20'08.7"	W067°11'15.8"
69	<i>T. cacao</i>	C	Assis Brasil	AC, Brasil	S10°53'34.9"	W069°30'52.3"
70	<i>T. cacao</i>	C	Brasiléia	AC, Brasil	S10°53'13.6"	W069°30'51.0"
71	<i>T. cacao</i>	C	Brasiléia – Bolívia	AC, Brasil	S10°59'28.2"	W068°47'25.1"
72	<i>T. cacao</i>	C	Assis Brasil	AC, Brasil	-	-
73	<i>T. cacao</i>	C	Assis Brasil	AC, Brasil	S10°53'34.9"	W069°30'52.3"
74	<i>T. cacao</i>	C	Itajuípe	BA, Brasil	-	-
75	<i>T. cacao</i>	C	Itabuna	BA, Brasil	-	-
76	<i>T. cacao</i>	C	Ilhéus	BA, Brasil	-	-
77	<i>T. cacao</i>	C	Itapebi	BA, Brasil	S14°40'41.0"	W039°22'30.0"
78	<i>T. cacao</i>	C	Canavieiras	BA, Brasil	S14°47'08.0"	W039°16'49.0"
79	<i>T. cacao</i>	C	Camacan	BA, Brasil	S14°47'20.0"	W039°02'58.0"
80	<i>T. cacao</i>	C	Una	BA, Brasil	S15°57'03.0"	W039°32'02.1"
81	<i>T. cacao</i>	C	Uruçuca	BA, Brasil	-	-
82	<i>T. cacao</i>	C	Uruçuca	BA, Brasil	-	-
83	<i>T. cacao</i>	C	Uruçuca	BA, Brasil	-	-
84	<i>T. cacao</i>	C	Gandu	BA, Brasil	-	-
85	<i>T. cacao</i>	C	Floresta Azul	BA, Brasil	-	-
86	<i>T. cacao</i>	C	Floresta Azul	BA, Brasil	-	-
87	<i>T. cacao</i>	C	Camacan	BA, Brasil	-	-

(continuação)						
Código	Hospedeiro	Biótipo	Cidade	Estado/País	Latitude	Longitude
88	<i>T. cacao</i>	C	Wenceslau Guimarães	BA, Brasil	-	-
89	<i>T. cacao</i>	C	Teolândia	BA, Brasil	-	-
90	<i>T. cacao</i>	C	Camamu	BA, Brasil	-	-
91	<i>T. cacao</i>	C	Aurelino Leal	BA, Brasil	-	-
92	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	-	-
93	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	-	-
94	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	-	-
95	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°13'21.0"	W069°55'03.6"
96	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°13'19.0"	W069°55'21.6"
97	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°21'3.80"	W069°43'23.6"
98	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°21'05.0"	W069°43'32.7"
99	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°20'57.0"	W069°43'10.4"
100	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°20'46.0"	W069°42'28.5"
101	<i>T. cacao</i>	C	Tabatinga	AM, Brasil	S04°20'46.0"	W069°42'36.8"
102	<i>T. cacao</i>	C	São Paulo de Olivença	AM, Brasil	S04°20'36.0"	W069°42'08.3"
103	<i>T. cacao</i>	C	São Paulo de Olivença	AM, Brasil	S04°20'33.0"	W069°41'59.5"
104	<i>T. cacao</i>	C	Benjamim Constant	AM, Brasil	S04°20'14.0"	W069°41'29.2"
105	<i>T. cacao</i>	C	Atalaia do Norte	AM, Brasil	S04°12'27.0"	W069°24'57.0"
106	<i>T. cacao</i>	C	Óbidos	PA, Brasil	S04°12'46.0"	W069°24'54.3"
107	<i>T. cacao</i>	C	Alenquer	PA, Brasil	S04°19'47.0"	W069°57'31.6"
108	<i>T. cacao</i>	C	Alenquer	PA, Brasil	S04°17'14.0"	W070°17'01.1"
109	<i>T. cacao</i>	C	Duca Alenquer	PA, Brasil	S01°56'54.5"	W055°39'28.7"
110	<i>T. cacao</i>	C	Agua Blanca, Manabi	Equador	S01°24'29.8"	W054°58'01.0"
111	<i>T. cacao</i>	C	San Carlos, Napo	Equador	S01°37'55.8"	W054°49'20.1"
112	Liana	L	Pichilingue	Equador	S01°38'50.7"	W054°30'59.5"
113	Liana	L	Pichilingue	Equador	-	-
114	Liana	L	Pichilingue	Equador	-	-
115	Liana	L	Pichilingue	Equador	-	-
116	Liana	L	Jauneche	Equador	-	-
117	Liana	L	San Carlos, Napo	Equador	-	-

(conclusão)						
Código	Hospedeiro	Biótipo	Cidade	Estado/País	Latitude	Longitude
118	Liana	L	San Carlos, Napo	Equador	-	-
119	Liana	L	San Carlos	Equador	-	-
120	Liana	L	Pichilingue	Equador	-	-
121	<i>S. lycocarpum</i>	S	Viçosa	MG, Brasil	-	-
122	<i>S. rugosum</i>	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
123	<i>S. rugosum</i>	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
124	<i>Solanum</i> sp.	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
125	<i>S. cernum</i>	S	-	MG, Brasil	-	-
126	<i>S. lycocarpum</i>	S	Viçosa	MG, Brasil	-	-
127	Solanaceae	S	Viçosa	MG, Brasil	-	-
128	Solaneceae	S	Rio Pomba	MG, Brasil	-	-
129	Jurubeba	S	Gandu	BA, Brasil	-	-
130	<i>S. lycocarpum</i>	S	Viçosa	MG, Brasil	-	-
131	<i>S. rugosum</i>	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
132	<i>S. rugosum</i>	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
133	<i>S. rugosum</i>	S	Manaus	AM, Brasil	-	-
134	Solanaceae	S	Manaus	AM, Brasil	-	-

4.2 Cultivo dos isolados e extração do DNA

Os isolados foram transferidos para o meio MYEA+G (0,17% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 2% de Agar e 5% de glicerol) em placas de petri e também em tubos com a adição de óleo mineral esterilizado para preservação de médio prazo do micélio. Para extração de DNA, após duas semanas de crescimento em MYEA+G, hifas das bordas nas placas de petri, foram coletadas e crescidas em 50 mL de meio de líquido MYE+G. Esses frascos foram incubados a temperatura ambiente, no escuro e sob agitação (100 rpm) por duas semanas. O micélio foi recolhido por filtração e armazenado à -80°C. O DNA dos micélios foi extraído seguindo o protocolo utilizando CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1990). Cerca de 100 mg de micélio foram macerados na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um microtubo, contendo 650 µL do tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona MW 10,000; 0,2 % β -mercaptoethanol; e 0,1 mg.mL⁻¹ de proteinase K). Os tubos foram misturados por inversão, e colocados em banho-maria a 55°C por 60 min, agitando-se a cada 15 min. O extrato foi misturado com 650 µL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) para formar uma emulsão, e centrifugado por 5 min a 12.000 g. O DNA precipitado na fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionando-se um volume igual de isopropanol gelado. O DNA foi centrifugado, lavado com 1 mL de etanol 70% para remover sais, e seco ao ar. O precipitado de DNA foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA), contendo RNase (10 µg.mL⁻¹). A concentração do DNA foi estimada por fluorimetria usando o DyNA Quant 2000 (Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK).

4.3 Amplificação do DNA ribossomal dos isolados de *M. pernicios*

Para confirmar a identidade dos isolados de *M. pernicios*, a região ITS 1 e 2 (*Internal Transcribed Spacer*) do gene ribossomal 5.8S foi amplificada com os iniciadores *ITS1-18S* (CGTAACAAGGTTTCCGTAGG) e *ITS4* (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al., 1990). As reações de amplificação foram preparadas num volume final de 30 µL, contendo 25

ng do DNA; tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 25 mM de KCl); 1,5 mM de $MgCl_2$; 100 μM de cada nucleotídeo (dATP, TTP, dGTP e dCTP); 0,1 μM de cada *primer*; e 1 U de *Taq DNA polymerase*. As amplificações foram conduzidas no termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), programado com um ciclo de desnaturação à 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 7 min. Cerca de 10 μL de cada reação foi aplicada em gel de 1% agarose em tampão 1X SB a 5 volt cm^{-1} . Foi utilizado tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol 400-DL) contendo o corante *Sybr-Gold* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para visualização dos fragmentos por fluorescência em UV, e o tamanho dos fragmentos foram estimados usando marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas, Burlington, Canada).

4.3.1 Digestão dos fragmentos amplificados na região ITS

Os produtos das amplificações com os iniciadores *ITS1-18S* e *ITS4* foram digeridos separadamente com as enzimas *MspI* e *HinfI*, para revelar fragmentos de restrição (ARRUDA et al., 2003b; SILVA, 2007). Para a digestão com cada enzima foi utilizado um volume de 10 μL da reação de amplificação, 2 μL do tampão da enzima e 2 unidades da enzima *MspI* ou *HinfI* (Fermentas) num volume total de 20 μL , incubados por uma hora a 37°C. Os fragmentos resultantes das digestões foram separados em gel de 1,0% agarose em tampão 1X SB a 5 volt cm^{-1} . O tamanho dos fragmentos foi determinado usando o marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

4.4 Locos de microssatélites em *M. pernicioso*

Para a análise da diversidade genética dos 134 isolados de *M. pernicioso* dos biótipos -C, -L e -S (Tabela 1) foram utilizados 14 locos de microssatélites, incluindo nove locos (*mMpCena3*; *mMpCena4*; *mMpCena8*; *mMpCena11*; *mMpCena12*; *mMpCena16*; *mMpCena19*; *mMpCena22*; e *mMpCena26*) descritos por Silva et al. (2008), e cinco locos

adicionais (*MsCepec_Cp14*; *MsCepec_Cp15*; *MsCepec_Cp16*; *MsCepec_Cp19*; e *MsCepec_Cp45*) desenvolvidos por Gramacho et al. (2007) (Tabela 2).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 20 ng do DNA, tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 25 mM KCl), 2,0 mM de MgCl₂; 100 µM de dNTPs; 0,2 µM de cada iniciador; 1 U de *Taq DNA polymerase*, num volume final de 13 µL. As amplificações foram realizadas empregando-se um programa *touchdown*, com ciclo inicial de 94°C por 10 min, seguido de 40 s a 94°C; 40 s a 60°C, 60 s a 72°C, reduzindo um grau a cada ciclo, num total de 10 ciclos, seguido de 35 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 50°C, 60 s a 72°C e finalmente uma extensão a 72°C por 10 min. Os produtos das amplificações foram separados em gel de 7% poliacrilamida desnaturante e corados com nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001).

Tabela 2 - Descrição dos 14 locos de microssatélites para *M. pernicioso*, propostos por Silva et al. (2008) e Gramacho et al. (2007).

(continua)

Acesso	Código	Sequência (5' – 3')	Referência
AM850061	<i>mMpCena3</i>	F: CGACAGGAGAGAGAGAAAAA R: CGTTATGGATTGGGCTTAC	Silva et al. (2008)
AM850062	<i>mMpCena4</i>	F: ATTTGGCTTCGTTGCTGGT R: AATCAGAGGCGGGATAGGG	Silva et al. (2008)
AM850065	<i>mMpCena8</i>	F: TCGGAAACCAACCAAGAAG R: AGGAAGGAGTCAGAGAGCA	Silva et al. (2008)
AM850068	<i>mMpCena11</i>	F: ATGCTGATGAAGAGGAAGAG R: TGGAAGAGAAGAGATGATGG	Silva et al. (2008)
AM850069	<i>mMpCena12</i>	F: GGGACCACCACCATAGAGA R: AACAAACAGCCCTAACAACC	Silva et al. (2008)
AM850073	<i>mMpCena16</i>	F: CGGGTCTTTTCTATTTTCACC R: CCAGTGTCCGTCCATACTC	Silva et al. (2008)
AM850075	<i>mMpCena19</i>	F: AACAAAGGACAGGCACAAC R: GGTATCAATGTAGGGGAGGA	Silva et al. (2008)
AM850077	<i>mMpCena22</i>	F: GCTGTGTATCCTCCACTC R: ATAGCCAAGGGTCTGGTTC	Silva et al. (2008)
AM850079	<i>mMpCena26</i>	F: GGCAACTTCAGAGGCAAC R: CACCAAATCCGCCCATAC	Silva et al. (2008)

(conclusão)

Acesso	Código	Sequência (5' – 3')	Referência
AM183147	<i>MsCepec_Cp14</i>	F: CAGCTCGTACGGATCAACAA R: TACCGATGGTGTGAGGTCAA	Gramacho et al. (2007)
AM183148	<i>MsCepec_Cp15</i>	F: AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT R: TGTCGAGCACTAGCATGTGA	Gramacho et al. (2007)
AM183149	<i>MsCepec_Cp16</i>	F: CGCACTTTGGCTGATGTAAA R: GTCCCAGAGGAAAGAGGAT	Gramacho et al. (2007)
AM183150	<i>MsCepec_Cp19</i>	F: TCCCACAACCCCAAAGATAG R: CCCCTTCAAGGTCGTATCCT	Gramacho et al. (2007)
AM183157	<i>MsCepec_Cp45</i>	F: ATGACCAGACAAATGAAAC R: CAAAGAGAAATCACAGAGC	Gramacho et al. (2007)

4.4.1 Estrutura genética espacial e diversidade clonal de *M. pernicioso*

A estrutura genética espacial foi quantificada utilizando o coeficiente de coancestria (θ_{xy}) entre pares de isolados para dez classes de distância usando o *SPAGeDi* 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002). As classes de distância foram escolhidas por conter o mesmo número de pares de indivíduos. Para identificar a presença de genótipos multilocos entre os isolados, foi utilizada a análise de identidade genética do programa *CERVUS* 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007).

4.4.2 Análise da diversidade genética

A diversidade genética entre os biótipos e populações foi determinada através de parâmetros convencionais, como o número médio de alelos por locos (A), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O). Os índices de endogamia foram inferidos a partir do índice de fixação (F). Para verificar se os valores de F foram significativamente diferentes de zero, foram usadas permutações de alelos entre os isolados. Todos esses parâmetros e análises foram estimados utilizando o *FSTAT*, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Foi avaliada a ocorrência de recombinação sexual aleatória entre isolados de *M. pernicioso* para estimar o índice de desequilíbrio de ligação multilocos (r_d) implementado no programa *MultiLocus* versão 2.1 (AGAPOW; BURT, 2001). Este índice baseia-se no índice de associação (I_A) definido por Brown et al. (1980), modificado para remover a dependência do número de locos (AGAPOW; BURT, 2001). A hipótese nula, de que não há desequilíbrio de ligação ($r_d=0$), foi avaliada por permutações de alelos entre indivíduos de forma independente para cada loco (1.000 permutações), usando o *MultiLocus* versão 2.1 (AGAPOW; BURT, 2001). Foi utilizado o modelo *Bayesiano* do *GeneClass2*, versão 2.2 (PIRY et al., 2004), para determinar a possível origem da migração dos isolados presentes na Bahia e na região do Baixo Amazonas e região central do estado do Pará (rodovia Transamazônica).

Foram analisados 13 locos de microssatélites em isolados dos biótipos –L, –S e em uma amostra dos isolados do biótipo –C (total de $n=83$) e, posteriormente somente nos genótipos multilocos do biótipo –C ($n=61$), por meio de uma abordagem *Bayesiana* estabelecida no programa *Structure*, versão 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000). Para estimar o

provável número de subgrupos, foram testados valores de K entre 2 e 20, sem informações hierárquicas (*loc a priori*). Foi utilizado o modelo de não mistura (*no admixture model*) com frequências alélicas independentes com *burn-in* de 200.000 e *run-length* de 500.000, com número de 10 interações independentes. O número de grupos (ΔK) foi estimado com o método proposto por Evanno et al. (2005). A partir dos dados de microsatélites foi gerada uma matriz de similaridade com base no índice de distância *simple matching*, usando DARwin 5.0 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006), para a construção de dendrogramas empregando-se o método UPGMA (*Unweighted pair group mean average*), utilizando o MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A estabilidade dos agrupamentos dentro do dendrograma foi testada a partir de 1.000 reamostragens *bootstraps*.

4.5 Ensaios de inoculação

Os ensaios de avaliação dos níveis de agressividade e resistência foram realizados na Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH) pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Marituba, PA.

4.5.1 Avaliação da interação da concentração do inóculo X resistência

4.5.1.1 Produção de basidiósporos

Basidiocarpos de *M. pernicioso* foram obtidos de ramos de cacaueiros infectados (vassouras) a partir de um isolado de Belém, PA. As vassouras secas foram mantidas sob controle de umidade (irrigação alternada por 12 h) para indução da produção de basidiocarpos. Os basidiocarpos produzidos foram lavados com água destilada e imersos em suspensão de 0,5% cloranfenicol. O estipe dos basidiocarpos foi removido e seus píleos aderidos à tampa de uma placa de Petri com gel de silicone para a liberação de basidiósporos sob tampão de armazenamento (16% glicerol; 0,01M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20) e sob agitação por 12 h. A suspensão de esporos foi filtrada em membrana de 0,45 μm , e os

basidiósporos retidos na membrana foram ressuspensos novamente em 2 mL de tampão de armazenamento e mantidos em nitrogênio líquido. Os esporos do isolado foram diluídos para os ensaios de inoculação, nas concentrações de 10^4 esporos por mL^{-1} , 10^5 esporos por mL^{-1} e 10^6 esporos por mL^{-1} .

4.5.1.2 Preparo das mudas e inoculação

Foram utilizadas cerca de duzentas mudas para cada uma das progênes de ‘PA 195 x CAB 214’; ‘PA 195 x SCA 6’ e ‘PA 195 x ICS 39’. Essas mudas foram crescidas por 60 dias em casa de vegetação até a inoculação. Com auxílio de uma micropipeta foram depositados em cada plântula em momento de lançamento foliar 30 μL de uma suspensão de basidiósporos nas concentrações de 10^4 esporos por mL^{-1} , 10^5 esporos por mL^{-1} ou 10^6 esporos por mL^{-1} , sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 24 h. Para cada progênie, 50 plântulas foram inoculadas para cada uma das três concentrações da suspensão de basidiósporos testadas. Cinquenta plântulas de cada progênie foram utilizadas como controles sendo inoculadas com água. As avaliações de resistência foram conduzidas 40 dias após as inoculações.

4.5.1.3 Avaliação de resistência

Os níveis de resistência foram avaliados baseados na variável incidência de plântulas doentes. Foram considerados dois fatores: *Progênie* (com os níveis ‘PA 195 x CAB 214’; ‘PA 195 x SCA 6’ e ‘PA 195 x ICS 39’) e *Concentração* (com níveis 10^4 , 10^5 e 10^6), sob um delineamento experimental com estrutura de parcelas completamente aleatorizada e estrutura de tratamentos fatorial $2 \times 2 \times 2$. A variável resposta foi considerada quando uma planta apresentou sintomas (codificado como “1”) ou não apresentou sintomas (codificado como “0”), Para respostas binárias sujeitas à variação aleatória, foi assumida a distribuição probabilística Bernoulli. Para a análise dos dados foi adotado um modelo linear generalizado (McCULLAGH; NELDER, 1989) com distribuição Bernoulli e uma função de ligação *Logit* que liga a probabilidade de ocorrer sintoma ao preditor linear formado pelos dois fatores

(*Progenie* – “*P*” e *Concentração* - “*C*”) e a interação de segunda ordem *P* x *C*. Matematicamente este modelo tem a seguinte estrutura, considerando:

$$Prob(Y = 1) = \pi$$

$$y \sim Bern(\pi)$$

$$\log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \beta + P + C + PC$$

Para testar a significância dos termos no modelo acima, foi utilizado o teste da razão de verossimilhanças, conforme Albuquerque et al. (2010).

4.5.2 Avaliação da interação da concentração do inóculo de diferentes isolados X resistência

4.5.2.1 Produção de basidiósporos

Basidiocarpos de *M. pernicioso* foram obtidos de ramos de cacaueiros infectados (vassouras) a partir dos isolados de Tabatinga, AM (96) e Marechal Thaumaturgo, AC (65). Os esporos de ambos os isolados foram diluídos para os ensaios de inoculação, nas concentrações de 10^5 esporos por mL⁻¹ e 10^6 esporos por mL⁻¹.

4.5.2.2 Preparo das mudas e inoculação

Foram utilizadas cem mudas clonais para cada um dos genótipos resistentes ‘CAB 214’ e ‘CAB 270’, e também para o suscetível ‘PA 195’. Essas mudas foram crescidas por 60 dias após a enxertia em casa de vegetação até a inoculação. Com auxílio de uma micropipeta foram depositados em cada plântula em momento de lançamento foliar, 30 µL de uma suspensão de basidiósporos na concentração de 10^5 esporos por mL⁻¹ ou 10^6 esporos por mL⁻¹, sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 24 h. Para cada genótipo, 20 plântulas

foram inoculadas com a suspensão de basidiósporos na concentração de 10^5 mL^{-1} e outras 20 plântulas com a aplicação da suspensão de basidiósporos na concentração de 10^6 mL^{-1} nas regiões meristemáticas. Vinte plântulas de cada acesso foram utilizadas como controles sendo inoculadas com água. As avaliações de resistência foram conduzidas 40 dias após as inoculações.

4.5.2.3 Avaliação de resistência

Os níveis de resistência foram avaliados baseados na variável incidência de plântulas doentes. A variável resposta considerada foi a plântula apresentando sintomas (codificado como “1”) ou não apresentando sintomas (codificado como “0”). Para respostas binárias sujeitas à variação aleatória, foi assumida a distribuição probabilística Bernoulli. Considerando os três fatores *Genótipo* (com os níveis ‘CAB 214’, ‘CAB 270’ e ‘PA 195’), *Inóculo* (com os níveis Tabatinga, AM e Marechal Thaumaturgo, AC) e *Concentração* (com níveis 10^5 e 10^6), foi assumido um delineamento experimental com estrutura de parcelas completamente aleatorizada e estrutura de tratamentos fatorial $2 \times 2 \times 3$. Para a análise dos dados foi adotado um modelo linear generalizado (McCULLAGH; NELDER, 1989) com distribuição Bernoulli e uma função de ligação *Logit* que liga a probabilidade de ocorrer sintoma ao preditor linear formado pelos três fatores (*Genótipo* – “G”, *Inóculo* – “I” e *Concentração* – “C”) e as três interações de segunda ordem ($G \times I$, $G \times C$ e $I \times C$). Matematicamente este modelo tem a seguinte estrutura, considerando:

$$Prob(Y = 1) = \pi$$

$$y \sim \text{Bern}(\pi)$$

$$\log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \beta + G + I + C + GI + GC + IC$$

Para testar a significância dos termos no modelo acima, foi utilizado o teste da razão de verossimilhanças, conforme Albuquerque et al. (2010).

4.6 Análise da expressão de genes associados à patogenicidade em *M. perniciosa*

Para os ensaios de cultivo de *M. perniciosa in vitro* em condições de carência de N, foram selecionados dez isolados oriundos de diversas localidades, incluindo Cacaulândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itajuípe, BA (74); Itapebi, BA (77); Uruçuca, BA (82); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106).

4.6.1 Cultivo de *M. perniciosa in vitro* em condições de carência de N em meio sólido

Os isolados selecionados foram cultivados em placas de Petri em meio sólido sintético (*Yeast Carbon Base*, Bencto Dickinson Microbiology Systems, MD, EUA) contendo 1,5 % de glicose com 2 mM de Tartarato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6]$, 4 mM de nitrogênio ou 10 mM de nitrato de potássio (KNO_3) por 30 d a 27°C e fotoperíodo de 12 h. Para acompanhar o crescimento do fungo e sua atividade biológica foi feita a medição na placa de Petri do diâmetro referente ao halo formado pelo crescimento do fungo e a produção de pigmento aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do meio.

4.6.2 Cultivo *in vitro* em condições de estresse por carência de N em meio líquido para análise da expressão gênica

Os dez isolados de *M. perniciosa* selecionados para o experimento anterior, foram utilizados para investigar a expressão de genes presumíveis ou associados a patogênese. Discos de ágar de cada isolado foram cultivados em meio sólido MYEA+G (0,17% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 2% de Agar; 5% de glicerol) e transferidos para 30 mL de meio líquido sintético (*Yeast Carbon Base*) contendo 1,5% de glicose e 2 mM de Tartarato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6]$, 4 mM de nitrogênio], cultivados a 27°C por 15 e 30 dias, sob fotoperíodo de 12 h. Como controle negativo, os mesmos isolados foram cultivados em 30 mL de meio líquido sintético (*Yeast Carbon Base*) contendo 1,5 % de glicose e 10 mM de

nitrito de potássio (KNO_3), sob as mesmas condições. Após o cultivo, a fase líquida foi separada e o micélio lavado três vezes com água destilada e armazenado -80°C . Foram realizadas duas repetições biológicas deste experimento.

4.6.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos micélios de *M. perniciosus* cultivados *in vitro* em condições contrastantes para concentração e forma de N suplementado foram extraídos de acordo com o protocolo proposto por Verica et al. (2004). O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de micélio macerado na presença de nitrogênio líquido, transferido para tubos de centrífuga (2 mL), onde foi adicionado 1 mL de tampão de extração (2% CTAB; 2% PVP; 100 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β -mercaptoetanol). Após a homogeneização do macerado com o tampão, 1 mL de clorofórmio foi adicionado, novamente homogeneizado e centrifugado a 8000 g por 20 min a 4°C . O sobrenadante, aproximadamente 600 μL , foi transferido para um novo tubo de 2 mL, e o RNA total foi precipitado com 500 μL de uma solução 8 M de cloreto de lítio e incubado a 4°C por 16 h. O RNA total precipitado foi coletado no fundo do tubo após centrifugação a 8000 g por 30 min e descarte do sobrenadante. O RNA precipitado foi ressuspensionado em água livre de RNase. A integridade e concentração do RNA foram visualizadas em gel de 1,2% agarose. A quantificação das amostras de RNA foi realizada com espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). O cDNA foi sintetizado via transcrição reversa a partir de 1 μg de RNA previamente tratado com DNase I e a reação foi conduzida utilizando o Kit *RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis* (Fermentas).

4.6.4 Amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Foi avaliada a expressão de sete genes presumíveis de patogenicidade e outras seis sequências selecionadas (LEAL Jr., 2006; LEAL Jr. et al., 2010) como possíveis genes associados a virulência e/ou patogenicidade nas condições de cultivo *in vitro* contrastantes para concentração e forma de N suplementado (Tabela 3). Os genes da Actina e Tubulina de

M. perniciosus foram empregados como controle interno de expressão (Tabela 3), conforme Leal Jr. (2006).

As amplificações quantitativas de transcritos reversos das amostras (RT-qPCR) foram conduzidas para reações com volume de 10 μ L contendo 1 μ L cDNA (diluição 1:10 v/v); 0,5 μ M para cada iniciador específico para os genes presumíveis de patogenicidade e/ou virulência (Tabela 3): A expressão dos genes *Aspf13*, *88KD*, *AS*, *AK*, *P450*, *PAL*, *AAO*, *Perox* (LEAL Jr. et al., 2010), *VersSint*, *Ich*, *PenicSynt*, *Oxireduc*, *GAL4*, *Act-Mp* (actina) e *Tub-Mp* (tubulina) (LEAL Jr., 2006); e 5 μ L *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X* (Invitrogen). As amplificações foram realizadas no termociclador *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Hilden, Alemanha). A amplificação foi conduzida com incubação inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão (2 *steps*); ou por 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62°C por 15 s e 72°C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão (3 *steps*). Com o término da reação, a curva de dissociação da fita dupla de DNA (*melting curve*) para cada produto amplificado foi determinada entre as temperaturas de 72°C e 95°C. Todos os ensaios de RT-qPCR incluíram amostras em duplicatas (10^{-1}), controle negativo (água ultrapura estéril como cDNA). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão composta de triplicatas das diluições seriais de um *pool* de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) utilizados e pelo coeficiente R^2 resultante.

4.6.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A aquisição dos dados foi feita através do programa *Rotor-Gene Q Real-Time Analysis 6.0* (Qiagen), que disponibiliza os valores de *cycle threshold* (C_T) e eficiência de PCR (E). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão com três diluições seriais de um *pool* dos cDNAs utilizados e pelo coeficiente R^2 resultante. A análise da curva padrão da diluição serial do *pool* de cDNAs das amostras serviu como referencial para calcular a concentração de transcritos com base em um modelo de regressão linear, valores logarítmicos das concentrações e com o ciclo *threshold*, ou seja, o limite de detecção estabelecido em 10% de fluorescência. O coeficiente R^2 resultante foi considerado

como ideal com valores acima de 0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de 3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto foram considerados valores satisfatórios entre 88% e 100%.

A média dos C_T das duplicatas foi aplicada para determinar as diferenças na expressão utilizando a referência interna (média geométrica entre os genes da Actina e Tubulina) para determinar a diferença da expressão entre o tratamento e o controle com o uso do programa *Relative Expression Software Tool* 2008 (REST 2008) (PFAFFL et al., 2002).

4.7 Polimorfismo do gene que codifica a cerato-platanina em *M. pernicios*

Os isolados de *M. pernicios* foram avaliados para polimorfismo em reações de amplificação do gene cerato-platanina (ZAPAROLI et al., 2009; LEAL Jr. et al., 2010). Nessas reações, foram utilizados 20 ng de DNA; tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 25 mM KCl); 2,5 mM de $MgCl_2$; 100 μ M de cada nucleotídeo (dATP, TTP, dAGP e dACP); 0,15 mM de cada iniciador (*Aspf13*; Tabela 3); 1 U de *Taq DNA polymerase*, num volume final de 25 μ L. Nas reações de amplificação foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação à 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min. Foi aplicado 20 μ L de cada reação corada com *Sybr-gold* em gel de 1,0% agarose em tampão 1X SB a 5 volt.cm⁻¹.

Os fragmentos amplificados de dois isolados dos biótipos -C e -S foram recortados do gel, purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and gel Band Purification kit* (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK), clonados em *pGEM-T Easy PCR Product Cloning* (Promega; Madison, WI, USA) e sequenciados usando os iniciadores *T7* e *SP6*, com protocolo padrão do *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing and kit* (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido). As sequências foram alinhadas por BLASTN para confirmar a identidade e analisadas com base no banco de dados do *REBASE* (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) que permite aferir sobre sítios de restrição com diversas enzimas. Foi identificada que a enzima *MseI* digeriria o fragmento amplificado pelo *Aspf13*.

As reações de amplificação foram repetidas e seus produtos utilizados nas digestões com *MseI*. As digestões com *MseI* foram realizadas num volume de 20 μL , contendo tampão da enzima, 10 μL da reação e 2 unidades da *MseI* (Fermentas). A digestão foi incubada por 16 h a 37°C e os produtos da digestão foram separados no gel de agarose 1,5% em tampão 1X SB a 5 volt.cm^{-1} .

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores selecionadas por Leal Jr. et al. (2010) e Leal Jr. (2006) como possíveis genes associados a virulência e patogenicidade e dos genes da Actina e Tubulina de *M. pernicioso*, empregados como controle interno de expressão.

(continua)

Gene	Fragmento (pb)	Descrição do gene	NCBI ou MIPS	Sequência (5' – 3')
<i>Act-Mp</i>	273	Actina	- ^z	R: CCACAATGGAGGACGAAGTCG F: CCCGACATAGGAGTCCTTCTG
<i>Tub-Mp</i>	377	Tubulina	- ^z	R: CGTGGAGCAAGTAACGATGA F: TTGAGGGACCATGTGGATTT
<i>Aspf13</i>	286	Proteína alergênica Aspf13	AAQ87930.1	R: TTCACAACGATTCCCAACCT F: TTACAAGCCGCAGACAGAAC
<i>88KD</i>	104	Manoproteína imunoreativa 88 kDa	AAW41285.1	R: TGCCATCAGGAATGATACGA F: TCTCTTTGCTCCCCCTCAA
<i>AS</i>	205	Aril-sulfatase	AAW42619.1	R: GTTGTTGGAGGCGAGATTG F: GTATTGGAACGGTGGTTTGG
<i>AK</i>	100	Aldo-ceto redutase	XP_749025.1	R: CACGGTCGGATTCATTAGGT F: GACGGCGGGAACTTGACT
<i>P450</i>	121	Citocromo P450	XP383013.1	R: GGAGCAAGAGAAGGCGATTA F: CTTCTGGGCTTCTGGGTACA
<i>PAL</i>	107	Fenilalanina amônio-liase	CAA09013.1	R: CGATTTGAGGACCAATGAAC F: GCCACCTTACACGAAGAGGA

(conclusão)

Gene	Fragmento (pb)	Gene	NCBI ou MIPS	Sequência (5' – 3')
<i>AAO</i>	310	Aril-Álcool Oxidase	AAC72747.1	R: AGGTTGAAGGTATGCGGTTG F: TGGGCTTGGGAATCTGTCT
<i>Perox</i>	269	Peroxidase	AAN31510	R: GACCAATCGAAACCCCATC F: TCTGGGATACGCTCCTCAAC
<i>VersSint</i>	101	Versicolorin B sintase	um11112	R: TGGTAGACGCGTCAGTGTTT F: GGGCAGGTACCGTATCAAAT
<i>Ich</i>	111	Ich1	BAA32788.1	R: CGGCGTCACGTAATTGAGAT F: TTTTACC GAACAACCTCAAAA
<i>PenicSynt</i>	166	Proteína hipotética UM06042.1	XP762189.1	R: AACCCCTCCCGAGAGAAGTTG F: GGCTAAAAGGCCACACAGAC
<i>Oxireduc</i>	111	O-metilesterigmatocistina oxidoreductase	fg12003	R: GCTTCTGGGTACATGCCATT F: GGAGCAAGAGAAGGCGATTA
<i>GAL4</i>	274	Proteína hipotética CNL05700	AAW46587.1	R: GCTAGAAGGGTTGCGCTATG F: TGGCAAGTGTTTATGGTGGA

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação da identidade dos isolados

Como a maioria dos isolados do biótipo-C analisados foram coletados de tecidos infectados de cacaueiro, foi necessária a confirmação da identidade desses isolados como sendo da espécie *M. perniciosa*. Para isso, foi realizada a amplificação das regiões *ITS1*-5.8S-*ITS2* do gene ribossomal, produzindo um fragmento monomórfico com cerca de 750 pb em todos os isolados do biótipo-C analisados (Figuras 2A e 2B). Isolados oriundos de basidiósporos foram usados como controle positivo. O fragmento amplificado foi digerido separadamente com as enzimas de restrição *MspI* ou *HinfI* (SILVA, 2007), para verificar a existência de qualquer padrão de banda discrepante entre os isolados. A restrição com a *MspI* gerou dois fragmentos com cerca de 450 e 300 pb (Figuras 2C e 2D) e com *HinfI* produziu três fragmentos com 290, 190 e possivelmente dois fragmentos menores de 135 pb (Figuras 2E e 2F). De acordo com os resultados, pode-se concluir que todos os isolados analisados pertencem a espécie *M. perniciosa*, já que apresentaram perfis de bandas idênticos e de tamanhos esperados para a espécie (SILVA, 2007). Na figura 2 constam 61 isolados, já que os cinquenta isolados restantes já haviam tido suas identidades confirmadas por Silva (2007).

Figura 2 – **A e B.** Amplificação das regiões *ITS1-5.8S-ITS2* do gene ribossomal, em 61 isolados do biótipo-C de *M. perniciosus*. **C e D.** Digestão com a enzima *MspI*. **E e F.** Digestão com a enzima *HinfI*.

5.2 Diversidade genética de *M. perniciosa* utilizando microsatélites

Os 134 isolados foram analisados por 14 locos de microsatélites, e destes 13 foram polimórficos, revelando um total de 66 alelos com média de 5,1 alelos por loco. O loco *MsCepec_Cp45* foi monomórfico para todos os isolados analisados. Os locos com maior número de alelos foram o *mMPCena19* com 10 alelos; o *mMpCena11* e o *MsCepec_Cp16* com 8 alelos. O loco com menor número de alelos foi o *MsCepec_Cp15* com apenas dois alelos.

A maioria dos isolados foi homozigota para quase todos os locos, mas heterozigose foi detectada para os locos *mMpCena3*, *mMPCena4*, *mMpCena8*, *mMPCena11*, *mMPCena19*, *mMpCena22*, *mMpCena26*, *MsCepec_14*, *MsCepec_16* e *MsCepec_19* para alguns isolados. Foram observados isolados heterozigotos nos três biótipos para os locos *mMPCena3*, *mMPCena26* e *MsCepec_14*. Para o *mMPCena11* foram encontrados isolados heterozigotos para os biótipos -L e -S, enquanto que para *mMPCena8* e *mMPCena22*, foram observados isolados heterozigotos apenas no biótipo-C dos estados do Pará e Acre, e também em Boa Vista, Ceplac/ERNEG e Costa Conceição (Leste do Amazonas). Para os outros quatro locos (*mMPCena4*, *mMPCena19*, *MsCepec_16* e *MsCepec_19*), foram identificados isolados heterozigotos somente no biótipo-L. O isolado 113 (Pichilingue, Equador), do biótipo-L foi o único a apresentar dois alelos para os locos *mMPCena4*, *mMPCena19* e *MsCepec_19*. No loco *MsCepec_Cp16* o único indivíduo heterozigoto foi o 114 (Pichilingue, Equador) do biótipo-L (Figura 3A). Na figura 3 é possível observar a comparação do perfil de géis de microsatélites utilizando o loco *MsCepec_Cp16* em isolados de *M. perniciosa* dos biótipos -L, -S (Figura 3A) e -C (Figura 3B).

O biótipo-L apresentou nos treze locos polimórficos, um total de 52 alelos com uma média de 4,0 alelos por loco, tendo 10 alelos exclusivos, isto é, que não estão presentes nos outros dois biótipos. Cinco desses alelos foram identificados no loco *mMPCena19*, 4 alelos para o loco *MsCepec_Cp16* e 1 alelo no loco *MsCepec_Cp14* (Tabela 4; Apêndice A). Para o biótipo-S foram identificados 45 alelos, com média de 3,36 alelos por loco. Dos treze locos polimórficos identificados, quatro foram monomórficos para os isolados do biótipo-S, incluindo *mMPCena8*, *mMPCena26*, *MsCepec_Cp14* e *MsCepec_Cp15*. Foram encontrados 6 alelos exclusivos para o biótipo-S, com 2 alelos específicos para os locos *mMPCena16* e *MsCepec_Cp16*, e um alelo para os locos *mMPCena12* e *mMPCena19* (Tabela 4; Apêndice A). No biótipo-C foram encontrados 37 alelos com 2,85 alelos por loco. Apenas 2 alelos

foram exclusivos para os isolados do biótipo-C, presentes nos locos *mMPCena8* e *mMPCena16* (275 e 151 pb, respectivamente) (Tabela 4; Apêndice A).

Figura 3 – Comparação do perfil de géis de microssatélites utilizando o loco *MsCepec_Cp16* em isolados de *M. perniciosus* dos biótipos –L, –S (A) e –C (B). Em destaque na figura 3A, o isolado 114 (Pichilingue, Equador) do biótipo-L, o único representante heterozigoto identificado com o loco *MsCepec_Cp16*.

Tabela 4 - Alelos exclusivos identificados por locos de microsatélites para os biótipos -C, -L e -S de *M. pernicioso*.

Loco	Alelo	Frequência	Biótipo	Código do isolado
<i>mMpCena8</i>	275	0,008	C	65
<i>mMpCena12</i>	304	0,231	S	125, 130, e 131
<i>mMpCena16</i>	151	0,279	C	1, 2, 4, 10, 12, 14, 19, 32, 33, 45, 68, 72, 77, 91, 93, 101, 106 e 110
<i>mMpCena16</i>	160	0,154	S	121
	162	0,462	S	122, 128, 129, 131, 132 e 133
<i>mMpCena19</i>	256	0,056	L	113
	271	0,056	L	113
	274	0,333	L	114 e 118
	285	0,111	L	116
	305	0,333	L	117, 119 e 120
<i>mMpCena19</i>	252	0,231	S	134
<i>MsCepec_16</i>	224	0,056	L	114
	226	0,444	L	116, 117, 119 e 120
	232	0,333	L	112, 113 e 115
	239	0,167	L	118
<i>MsCepec_16</i>	216	0,538	S	126, 127, 130, 131, 132, 133 e 134
	220	0,308	S	121, 125, 128 e 129
<i>MsCepec_14</i>	228	0,167	L	113, 114 e 116

5.3 Análise da presença de genótipos multilocos e da estrutura genética espacial

Foi observado durante a análise dos locos de microsatélites que em geral, havia pouca variabilidade entre isolados do biótipo-C de um mesmo local de coleta, e que estes muitas vezes compartilhavam os mesmos alelos para todos os locos estudados. Assim, foi utilizado o programa *CERVUS* 3.0 para identificar isolados que apresentavam exatamente (*exact match*) os mesmos alelos para os 13 locos de microsatélites. Essa análise indicou que dos 134 isolados de *M. pernicioso*, apenas 83 correspondem a genótipos multilocos únicos, os 51 restantes compartilham com um ou mais isolados, os mesmos alelos para todos os locos (Tabela 5). Os isolados selecionados para representar cada genótipo multilocos constam no Apêndice B.

Os 83 genótipos únicos foram então utilizados para a análise da estrutura genética espacial com base nos dados de posicionamento geográfico (Figura 4). Foram excluídos dessa análise, os sete genótipos multilocos da Bahia, por ser uma área de introdução recente provavelmente por interferência antrópica, em um local que não corresponde à área de ocorrência natural do cacaueteiro. A coancestria (θ_{xy}) é a probabilidade de que dois alelos homólogos, retirados aleatoriamente de dois indivíduos, x e y , sejam idênticos por descendência a um alelo de um antecessor recente. O coeficiente de coancestria de um grupo de indivíduos indica a probabilidade de que dois alelos homólogos, retirados aleatoriamente do conjunto gênico do grupo, sejam idênticos por descendência (SEBBENN; SEOANE, 2005). O coeficiente de coancestria indicou o valor mais alto e significativo ($\theta_{xy} = 0,275$) em 118 Km, sendo os demais valores, para a maioria das distâncias de classes, próximos a zero ou negativos. Esta análise revelou uma estrutura genética espacial significativa a 95% de probabilidade para os isolados do biótipo-C situados a uma distância até 118 Km (Figura 4). Assim, isolados coletados até cerca de 118 Km compartilham uma significativa coancestralidade, que tende a zero ou valores negativos significativos para distâncias acima desta.

Com base na estrutura genética espacial, os isolados do biótipo-C foram divididos em sete populações. A distribuição das amostras coletadas não foi geograficamente uniforme, com a presença de maior número de isolados em algumas áreas, e alguns isolados foram agrupados com populações mais distantes (>118 Km) para evitar a formação de grupos com número limitado de membros (Tabela 6). Isto ocorreu com as populações resultantes do agrupamento de isolados de Alenquer, Santarém e Cametá na população Pará (Baixo

Amazonas), ou a inclusão de isolados do Equador na população do Oeste do Amazonas (Alto Solimões). Assim, foram definidas as sete populações geográficas de isolados do biótipo-C de *M. pernicioso*: Pará Central (região Transamazônica); Pará ou Baixo Amazonas (em torno do rio Amazonas; Figura 1); Leste do Amazonas (tríplice fronteira do Brasil com a Colômbia e o Peru); Oeste do Amazonas (Alto Solimões); Rondônia; Acre e Bahia (Tabela 6).

Essas sete populações foram então investigadas para a frequência de genótipos multilocos idênticos. As populações com o maior número de genótipos multilocos idênticos foram a Bahia, Rondônia e Pará Central (Tabela 5), regiões com a maior concentração de cultivo de cacaueteiro comercial e com alta incidência da doença vassoura-de-bruxa. Dos 50 genótipos idênticos identificados para o biótipo-C, apenas dois pertencem a uma população diferente daquela de origem do seu respectivo genótipo multilocos, incluindo o isolado 25 de Trairão, PA (Pará Central ou região Transamazônica), que possui os mesmos alelos que o genótipo 64 de Marechal Thaumaturgo, AC; e do isolado 27 de Trairão, PA (Pará Central ou região Transamazônica), que tem os mesmos alelos que o genótipo 46 da Ceplac/ERNEG, AM (Baixo Amazonas) (Tabela 5). Para o biótipo-S, apenas um genótipo idêntico foi identificado (isolados 123 e 124, ambos de Manaus), e nenhum foi detectado entre os nove isolados do biótipo-L (Tabela 5).

Tabela 5 - Número total de isolados encontrados nas populações; número de genótipos multilocos; genótipos idênticos, isto é, que compartilham os mesmos alelos com um dos genótipos multilocos, usando o programa *CERVUS* 3.0 com base em 13 locos de microssatélites.

População	Número total de isolados	Genótipos multilocos	Número de genótipos idênticos
Pará Central (Transamazônica)	20	11	9
Pará (Baixo Amazonas)	11	8	3
Leste do Amazonas	19	10	9
Oeste do Amazonas (Alto Solimões)	16	11	5
Rondônia	17	7	10
Acre	10	7	3
Bahia	18	7	11
Biótipo-C	111	61	50
Biótipo-S	14	13	1
Biótipo-L	9	9	0
Total	134	83	51

Figura 4 - Análise de correlação espacial com o coeficiente de coancestria (θ_{xy}) dentro das populações da região Amazônica (LOISELLE et al., 1995) entre os isolados para cada classe de distância, usando o programa *SPAGeDi* 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002).

Tabela 6 – Descrição das sete populações geográficas de isolados do biótipo-C de *Moniliophthora perniciosa* baseada no SPAGeDI 1.2, considerando isolados a uma distância menor que 118 Km, como pertencentes a uma mesma população.

Populações	Locais (municípios)
Pará Central (Transamazônica)	Anapú; Altamira; Baião; Brasil Novo; Medicilândia; Mocajuba; Trairão; Uruará
Pará (Baixo Amazonas)	Alenquer; Cametá; Óbidos; Santarém
Leste do Amazonas	Augusto Montenegro; Boa Vista; Ceplac/ERNEG; Costa da Conceição; Manaus; Uricurituba
Oeste do Amazonas (Alto Solimões)	Atalaia do Norte; Benjamim Constant; São Paulo de Olivença; Tabatinga; Agua Blanca (Equador); San Carlos (Equador)
Rondônia	Ariquemes; Cacaulândia; Cacoal; Jaru; Ji-Paraná; Ouro Preto D'Oeste
Acre	Assis Brasil; Brasiléia; Marechal Thaumaturgo; Plácido de Castro
Bahia	Aurelino Leal; Camacan; Camamú; Canavieiras; Floresta Azul; Gandú; Ilhéus; Itabuna; Itajuípe; Itapebi; Teolândia; Una; Uruçuca; Wenceslau Guimarães

5.4 Diversidade genética dentro e entre populações e biótipos

Entre as sete populações do biótipo-C, foi observada uma variação de 1,77 alelos por loco para Oeste do Amazonas (Alto Solimões) a 2,31 alelos por loco para a Bahia (Tabela 7). A população Oeste do Amazonas foi a que apresentou a menor proporção de locos polimórficos, totalizando 57%. As populações Rondônia, Acre e Bahia apresentaram apenas três locos monomórficos (21%). A população com H_O mais elevada foi o Acre (0,13) e com menor H_O foram Oeste do Amazonas e Bahia (0,08). A heterozigosidade observada (H_O) foi maior para os genótipos do biótipo-L (0,14) e menor para os genótipos do biótipo-S (0,09) (Tabela 7). Todas as populações apresentaram valores de F significativamente altos, variando de 0,60 para Leste do Amazonas a 0,82 para a Bahia (Tabela 7).

Apesar das amostras de DNA genômico terem sido extraídas do micélio dicariótico (saprofítico), na maioria dos casos, um único alelo foi amplificado em cada isolado. A presença de um único alelo reflete na baixa heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) e pelo alto índice de fixação (F) para todos os locos.

Tabela 7 – Diversidade genética e índice de fixação para os genótipos multilocos de cada biótipo (-L, -S e -C) e população. N é o tamanho de amostra, A é o número médio de alelos por loco, H_E é a heterozigosidade média esperada, H_O é a heterozigosidade média observada, F é o índice médio de fixação.

População	N	A	H_E	H_O	F
Biótipo-L	9	4,00	0,67	0,14	0,57*
Biótipo-S	13	3,46	0,56	0,09	0,49*
Biótipo-C	61	2,85	0,41	0,13	0,75*
Pará Central (Transamazônica)	11	1,85	0,27	0,10	0,65*
Pará (Baixo Amazonas)	8	2,00	0,40	0,11	0,73*
Leste do Amazonas	10	1,92	0,31	0,12	0,60*
Oeste do Amazonas (Alto Solimões)	11	1,77	0,25	0,08	0,69*
Rondônia	7	1,92	0,37	0,10	0,73*
Acre	7	2,15	0,36	0,13	0,63*
Bahia	7	2,31	0,43	0,08	0,82*

Como as populações estabelecidas para os genótipos multilocos do biótipo-C apresentavam um número distinto de membros, de 10 (Acre) a 20 (Pará Central), a riqueza alélica foi normalizada para um tamanho de amostra de $n=10$ (Tabela 8). Nesta condição, a riqueza alélica nas populações do biótipo-C teve uma variação de 1,8 (Oeste do Amazonas) a 2,3 (Bahia), enquanto que os biótipos -S e -L exibiram uma maior riqueza alélica (3,3 e 4,0, respectivamente; Tabela 8). Os genótipos dos biótipos -S e -L apresentaram uma diversidade gênica e genotípica muito superior em comparação com os genótipos do biótipo-C (Tabela 8). No biótipo-C, a maior diversidade gênica foi observada na população Pará – Baixo Amazonas (0,42), seguida por Acre e Bahia (0,36). Por outro lado, a população do Acre apresentou a maior diversidade genotípica (0,96), seguida pelo Oeste do Amazonas (0,95), enquanto que a Bahia apresentou a menor D_g (0,78). O índice de desequilíbrio de ligação multilocos (r_d) foi baixo (variando de 0,09 a 0,35), mas significativamente diferente de zero em todas as populações, exceto para o Acre, sugerindo o desvio de acasalamento ao acaso.

Tabela 8 - Informações sobre o tamanho da amostra (n), estimativa da riqueza alélica para uma amostra de 10 genótipos para cada população (R_{10}), diversidade gênica (H_e), diversidade genotípica (D_g), e índice de desequilíbrio de ligação multilocos (r_d).

População	n	R_{10}	H_e	D_g	r_d
Pará Central (Transamazônica)	20	1,9±0,17	0,30±0,06	0,94	0,09*
Pará (Baixo Amazonas)	11	2,1±0,24	0,42±0,07	0,93	0,35*
Leste do Amazonas	19	1,9±0,20	0,31±0,07	0,87	0,14*
Oeste do Amazonas (Alto Solimões)	16	1,8±0,20	0,28±0,07	0,95	0,15*
Rondônia	17	2,0±0,16	0,31±0,06	0,81	0,15*
Acre	10	2,2±0,23	0,36±0,06	0,96	0,17
Bahia	18	2,3±0,25	0,36±0,07	0,78	0,34*
Biótipo-L	9	4,0±0,48	0,67±0,04	0,99	0,11*
Biótipo-S	14	3,3±0,46	0,55±0,07	1,00	0,12*

5.5 Estrutura genética dos genótipos dos biótipos -C, -L e -S

Para estabelecer a estrutura genética dos biótipos e populações de *M. pernicioso*, as frequências alélicas dos 13 locos microssatélites para os nove genótipos multilocos do biótipo-L, 13 do biótipo-S e 61 do biótipo-C foram analisados utilizando a abordagem *Bayesiana* implementada no *Structure*. Para definir o número de subgrupos K, os indivíduos foram probabilisticamente avaliados em subgrupos K de acordo com suas frequências alélicas. A escolha do número mais provável de subgrupos foi realizada com base na maior probabilidade logarítmica dos dados alélicos ($\ln(X/K)$). De acordo com o método descrito por Evanno et al. (2005) para estimar o K ideal maximizando o valor de ΔK , os 83 genótipos dos biótipos -C, -L e -S, formaram dois grupos (Figura 5A).

Com base no valor de K, a análise com o *Structure* separa claramente os biótipos em dois grupos, contendo no primeiro todos os genótipos do biótipo-C (vermelho) e no segundo os genótipos dos biótipos -L e -S (verde) (Figura 5B), sugerindo uma maior semelhança entre os biótipos -L e -S, em relação ao biótipo-C. Esta separação foi confirmada pelo agrupamento UPGMA derivado de uma matriz de similaridade, em que são visualizados dois grupos (Figura 6), com maior semelhança entre os genótipos dos biótipos -L e -S.

Quando considerado K = 3, os genótipos foram claramente divididos nos três biótipos (Figura 5C). Alguns indivíduos do biótipo-C (65 Marechal Thaumaturgo, AC; 70 Brasiléia, AC e 77 Itapebi, BA) compartilham uma fração de seu genoma com o grupo onde se encontra os genótipos dos biótipos -L e -S para K = 2 (Figura 5B) ou apenas do biótipo-L para K = 3 (Figura 5C). O oposto foi observado para genótipos do biótipo-L, principalmente o 114 de Pichilingue, Equador, que parece compartilhar regiões genômicas com o biótipo-C. Para K = 3 e K = 4 (Figuras 5C e 5D, respectivamente), uma porção do genoma do biótipo-L foi detectada no genótipo 127 de Viçosa, MG; e em pequena porção no 128 de Rio Pomba, MG e 129 de Gandu, BA; todos representantes do biótipo-S; pequenas frações do biótipo-C também pode ser detectada nos genótipos do biótipo-S, especialmente no 127 de Viçosa, MG.

Para K = 4 (Figura 5D), os genótipos do biótipo-C são divididos em dois grupos contendo num dos grupos (em azul), todos os representantes da população Oeste do Amazonas (Alto Solimões), três da população Pará, Baixo Amazonas (106 Óbidos, 107 e 108 de Alenquer) e três genótipos compartilhando uma fração de seu genoma com representantes da Bahia (76 Ilhéus; BA, 84; Gandu, BA e 91 Aurelino Leal, BA). Outros compartilham com este grupo uma fração muito reduzida do genoma, como o 77 Itapebi, BA e 29 Manaus, AM.

Figura 5 – **A**. Valor estimado do ΔK calculado de acordo com Evanno et al. (2005). Eixo X indica a população (K) em teste. Eixo Y indica o valor de ΔK atribuído a cada população. O maior valor para o ΔK corresponde ao K ótimo para os 83 genótipos multilocos dos biótipos -C, -L e -S. **B**, **C**, e **D**. Agrupamento de genótipos dos biótipos -C, -L e -S, de acordo com a análise realizada pelo *Structure* versão 2.3.3 para K = 2 (**B**), K = 3 (**C**) e K = 4 (**D**). A mesma cor em cada genótipo indica que eles pertencem a um grupo ou população. Cores diferentes no mesmo genótipo mostram a porcentagem do genoma que é compartilhado com outros.

Figura 6 - Agrupamento dos genótipos multilocus de *M. pernicioso* dos biótipos -C, -L e -S por UPGMA com base em uma matriz de similaridade derivada do índice de distância *simple matching*.

5.5.1 Estrutura genética dos genótipos do biótipo-C

Foram testados valores de K variando de 1 a 20 para o provável número de subgrupos, envolvendo os 61 genótipos multilocos do biótipo-C, encontrando como valor ótimo $K = 2$ (Figura 7A). O primeiro subgrupo foi composto de 44 genótipos multilocos das populações do Acre, Pará Central (região Transamazônica); Leste do Amazonas; Pará (Baixo Amazonas) e Rondônia; e genótipos de Bahia (77 Itapebi, BA; 81 Uruçuca, BA; 87 Camacan, BA e 90 Camamu, BA). O segundo subgrupo contém os genótipos 76 (Ilhéus, BA); 84 (Gandu, BA); 91 (Aurelino Leal, BA); 92-101 (Tabatinga, AM); 102-103 (São Paulo de Olivença, AM); 104 (Benjamim Constant, AM); 105 (Atalaia do Norte, AM); 106 (Óbidos, PA); 107-108 (Alenquer, PA); 110 (Agua Blanca, Equador). As populações do Pará (Baixo Amazonas) e Bahia foram às únicas com representantes em ambos os grupos. O genótipo 77 de Itapebi, BA exibiu alelos compartilhados entre os dois subgrupos (Figura 7B). Foi observada uma separação semelhante em dois grupos quando os dados foram analisados por UPGMA (Figura 8).

Foram avaliados também os valores de $K = 3$ e $K = 4$. Tanto para $K = 3$ como para $K = 4$, observa-se que o segundo subgrupo relatado anteriormente permanece inalterado, isto é, contendo os mesmos genótipos da população do Oeste do Amazonas (Alto Solimões), 106 (Óbidos, PA), 107-108 (Alenquer, PA), 110 (Agua Blanca, Equador), 76 (Ilhéus, BA), 84 (Gandu, BA) e 91 (Aurelino Leal, BA). Para $K = 3$ encontram-se nos dois subgrupos genótipos multilocos das duas populações do Pará, do Leste do Amazonas, de Rondônia e Acre. Os genótipos da Bahia (77 Itapebi, BA; 81 Uruçuca, BA, 87 Camacan, BA e 90 Camamu, BA) se concentram todos no grupo identificado pela coloração azul (Figura 7C). Assim, estes novos dois subgrupos, identificados para $K = 3$, não indicam qualquer origem clara ou explicável.

Na estrutura para $K = 4$ (Figura 7D), os genótipos da Bahia (81 Uruçuca, 87 Camacan e 90 Camamu), encontram-se no mesmo grupo de quatro genótipos de Rondônia (48 Ariquemes, 54 Cacaúlândia, 60 e 63 Ji-Paraná); três do Acre (65 Marechal Thaumaturgo, 69 Assis Brasil e 70 Brasília); dois do Pará Central (3 Altamira e 11 Medicilândia) e três do Pará no Baixo Amazonas (15-16 Alenquer e 17 Santarém). O genótipo 77 Itapebi, BA, situa-se num grupo contendo indivíduos do Acre (68 e 71 de Assis Brasil); Pará Central (1 Anapú, 2 Altamira, 4 Brasil Novo, 12 e 14 Uruará); Pará - Baixo Amazonas (19 Cametá) e Leste do Amazonas (32 Boa Vista e 33 Augusto Montenegro).

Figura 7 – **A**. Estimativa do valor de ΔK calculado de acordo com Evanno et al. (2005). Eixo X indica a população (K) em teste. Eixo Y o valor de ΔK atribuído a cada população. O maior valor de ΔK corresponde ao K ideal para os 61 genótipos multilocos do biótipo-C. **B**, **C** e **D**. Agrupamento dos 61 genótipos multilocos de biótipo-C para K = 2 (**B**), K = 3 (**C**) e K = 4 (**D**).

Figura 8 - Agrupamento dos genótipos de *M. perniciosus* dos 61 genótipos multilocus do biótipo-C por UPGMA com base em uma matriz de similaridade derivada do índice de distância *simple matching*.

5.6 Grau de parentesco e origem de genótipos de *M. perniciosa*

A abordagem *Bayesiana* implementada no *GeneClass2*, versão 2.2, foi usada para atribuir a origem mais provável dos genótipos a partir dos diversos biótipos, definir as potenciais relações genéticas, e para estabelecer a origem dos genótipos do biótipo-C em áreas onde o *M. perniciosa* não estava originalmente presente, como nos estados do Pará e Bahia (Figura 1). O objetivo foi inferir sobre a potencial origem dos genótipos presentes na Bahia (introduzidos em 1989) e Pará Central na região da Transamazônica, bem como elucidar a possível rota da região com maior diversidade (potencialmente a região do Alto Amazonas) para o Leste do Amazonas vinculado a região do Baixo Amazonas.

Quando os nove genótipos multilocos do biótipo-L do Equador (Pichilingue, Janauche e San Carlos) foram analisados para similaridade com todos os genótipos restantes, sete apresentaram uma alta pontuação de similaridade (>96,5%) com o genótipo 134 (Manaus, AM) do biótipo-S (Tabela 9), já o genótipo 113 de Pichilingue exibiu uma menor similaridade (48,5%) com o mesmo genótipo 134. A única exceção foi o genótipo de Pichilingue (114) que mostrou uma alta similaridade (90,1%) com o genótipo 91 do biótipo-C de Aurelino Leal, BA. Na avaliação enquanto grupo, os genótipos do biótipo-L foram 100% similares ao genótipo 134 de Manaus, AM.

Dos 13 genótipos multilocos do biótipo-S, 12 apresentaram alta similaridade (>95,8%) com o genótipo 120 Pichilingue, Equador do biótipo-L (Tabela 10). A exceção foi o genótipo 127 de Viçosa, MG, que mostrou uma similaridade de 51,4% para um genótipo multilocos do biótipo-C representado pelo genótipo 73 de Assis Brasil, AC. Enquanto grupo, os genótipos do biótipo-S apresentaram uma similaridade de 100% para o genótipo 120 de Pichilingue, Equador do biótipo-L.

Quando os 61 genótipos multilocos do biótipo-C foram contrastados com os genótipos dos biótipos -L e -S, 50 destes apresentaram maior similaridade com o genótipo 120 de Pichilingue, Equador, (biótipo-L) com pontuação acima de 93,1%, exceto para os genótipos 56 e 57 de Ouro Preto d'Oeste, Rondônia, que apresentaram pontuação de 75,8% (Tabela 11). Os 11 genótipos restantes foram mais similares ao genótipo 134 de Manaus, AM, pertencente ao biótipo-S. Nesses onze genótipos encontram-se seis representantes da população do Oeste do Amazonas (Alto Solimões): 93 (96,4%), 94 (96,4%), 96 (60,9%) e 101 (60,9%) de Tabatinga, 102 e 103 (ambos com pontuação de 58,6%) de São Paulo de Olivença. Os outros cinco genótipos foram o 73 Assis Brasil, AC (59,6%), 108 Alenquer, PA (93,1%), 33 Augusto

Montenegro, AM (59,6%), 91 Aurelino Leal, BA (86,8%), 110 Agua Blanca, Equador (93,1%). Os genótipos com pontuação de similaridade abaixo de 90% apresentaram como segunda posição na pontuação, o genótipo 120 de Pichilingue, Equador (Tabela 11).

Tabela 9 – Análise individual dos genótipos multilocos para determinar o grau de parentesco dos genótipos do biótipo-L de *M. pernicioso* oriundos do Equador, em comparação com genótipos dos outros biótipos, utilizando 13 locos de microssatélites analisados pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
112 Pichilingue, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0
113 Pichilingue, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	48,5*
114 Pichilingue, Equador (L)	91 Aurelino Leal, BA, Brasil (C)	<u>90,1</u>
115 Pichilingue, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0
116 Jauneche, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0
117 San Carlos, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	96,5
118 San Carlos, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	99,1
119 San Carlos, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0
120 Pichilingue, Equador (L)	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0
Genótipos do biótipo-L	134 Manaus, AM, Brasil (S)	100,0

*2ª Posição = 46,5% para 73 Assis Brasil, AC, Brasil (C).

Tabela 10 – Análise individual dos genótipos multilocos para determinar o grau de parentesco dos genótipos do biótipo-S de *M. pernicioso* em comparação com genótipos dos outros biótipos, utilizando 13 locos de microssatélites analisados pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
121 Viçosa, MG, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
122 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	99,4
123 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
125 Itajuípe, BA, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
126 Viçosa, MG, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
127 Viçosa, MG, Brasil (S)	73 Assis Brasil, AC, Brasil (C)	51,4*
128 Rio Pomba, MG, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
129 Gandu, BA, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
130 Viçosa, MG, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
131 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	99,4
132 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	95,8
133 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
134 Manaus, AM, Brasil (S)	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
Genótipos do biótipo-S	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0

*2ª Posição = 42,4% para 63 Ji-Paraná, RO, Brasil (C).

Tabela 11 – Análise individual dos genótipos multilocos para determinar a ancestralidade dos genótipos do biótipo-C de *M. pernicioso* com genótipos de outros biótipos, através da similaridade genética observada para os 13 locos microssatélites, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

(continua)

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
2 Altamira, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
3 Altamira, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
4 Brasil Novo, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
6 Medicilândia, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
7 Medicilândia, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
10 Medicilândia, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	97,1
11 Medicilândia, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
12 Uruará, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
14 Uruará, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
15 Alenquer, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	99,5
16 Alenquer, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
17 Santarém, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
18 Santarém, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
19 Cametá, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
23 Mocajuba, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	99,9
26 Trairão, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	99,8
106 Óbidos, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	97,4
107 Alenquer, PA	134 Manaus, AM, Brasil (S)	93,1
108 Alenquer, PA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
47 Ariquemes, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	99,9
48 Ariquemes, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
54 Cacaúlândia, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
56 Ouro Preto d'Oeste, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	75,8*
57 Ouro Preto d'Oeste, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	75,8*
60 Ji-Paraná, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
63 Ji-Paraná, RO	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
64 Marechal Thaumaturgo, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	99,7

(continuação)

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
65 Marechal Thaumaturgo, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	99,7
68 Assis Brasil, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	99,7
69 Assis Brasil, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	93,1
70 Brasiléia, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	99,9
71 Assis Brasil, AC	134 Manaus, AM, Brasil (S)	59,6**
73 Assis Brasil, AC	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
28 Manaus, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,8
29 Manaus, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
30 Manaus, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,9
31 Manaus, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
32 Boa Vista, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	97,1
33 A. Montenegro, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	59,6**
40 Uricurituba, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,7
43 C. da Conceição, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
45 Ceplac/ERNEG, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
46 Ceplac/ERNEG, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
92 Tabatinga, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	97,4
93 Tabatinga, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	96,1
94 Tabatinga, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	96,4
96 Tabatinga, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	60,9**
100 Tabatinga, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,0
101 Tabatinga, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	60,9**
102 São Paulo de Olivença, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	58,6**
103 São Paulo de Olivença, AM	134 Manaus, AM, Brasil (S)	58,6**
104 Benjamim Constant, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,8
105 Atalaia do Norte, AM	120 Pichilingue, Equador (L)	99,8
110 Agua Blanca, Equador	134 Manaus, AM, Brasil (S)	93,1
76 Ilhéus, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
77 Itapebi, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
81 Uruçuca, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0
84 Gandú, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	99,0

(conclusão)		
Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
87 Camacan, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	97,3
90 Camamu, BA	120 Pichilingue, Equador (L)	97,3
91 Aurelino Leal, BA	134 Manaus, AM, Brasil (S)	86,9***
Genótipos do biótipo-C	120 Pichilingue, Equador (L)	100,0

*2ª Posição = 24,2% para 134 Manaus, AM, Brasil (S).

**2ª Posição = > 39,1% para 120 Pichilingue, Equador (L).

***2ª Posição = 13,1% para 120 Pichilingue, Equador (L).

Foi realizada a análise dos genótipos multilocos do biótipo-C de cada uma das principais regiões geográficas definidas na Tabela 6, nas áreas onde nem *M. pernicioso* aparentemente estava presente (Bahia; Pará Central, Pará - Baixo Amazonas e Leste do Amazonas) e nem seu hospedeiro *T. cacao* era endêmico, em comparação com ao restante dos genótipos visando determinar a origem putativa dos isolados. Dos sete genótipos multilocos da Bahia analisados usando o *GeneClass2* (Tabela 12), três (76, 77 e 91) foram muito semelhantes (>94,4%) ao genótipo 108 de Alenquer, PA; enquanto outros três (81; 88 e 90) foram mais semelhantes (>98,8%) ao genótipo multilocos 63 de Ji-Paraná, RO. O genótipo 84 de Gandu, BA foi mais semelhante numa pontuação menor (76,8%) com o genótipo 105 de Atalaia do Norte, região do Alto Solimões no estado do Amazonas, mas numa segunda posição foi mais semelhante ao genótipo 108 de Alenquer, PA (Tabela 12). Como grupo, os genótipos da Bahia foram mais similares ao mesmo genótipo de Alenquer, PA (108).

Os 19 genótipos multilocos das duas populações do Pará (Pará Central e Pará - Baixo Amazonas; Tabela 6) foram analisados pelo mesmo método. Os 11 genótipos da população Pará Central exibiram maior similaridade com os isolados representantes dos genótipos multilocos 63 de Ji-Paraná, RO (n=5) ou 73 de Assis Brasil, AC (n=6) em pontuações acima de 99%, exceto para os genótipos 6 (85,1%), 10 (91,1%), 14 (94,5%) e 26 (85,1%) (Tabela 13). Para os oito genótipos multilocos da população Pará - Baixo Amazonas, dois foram mais semelhantes aos isolados representados pelo genótipo multilocos 63 de Ji-Paraná, RO; três foram mais similares ao genótipo 73 de Assis Brasil, AC, e os outros três compartilharam maior semelhança com o genótipo 105 da Atalaia do Norte, AM (Tabela 13). O genótipo 108 de Alenquer teve uma pontuação de 100% de similaridade com o genótipo 105 de Atalaia do

Norte. Os 10 genótipos multilocos da população Leste do Amazonas compartilharam similaridade elevada (acima de 97%) com isolados representantes dos genótipos 63 de Ji-Paraná, RO (n = 6) ou 73 de Assis Brasil, AC (n = 4) (Tabela 14), com exceção dos genótipos multilocos 40 (87,9%) e 45 (79,3%). Como um grupo, as populações Pará Central, Pará - Baixo Amazonas e Leste do Amazonas compartilham maior similaridade com o mesmo genótipo (>96,7%), indicando que estas seriam derivadas do genótipo 63 de Ji-Paraná, RO.

Ambas as populações do estado do Pará e a população do Leste do Amazonas compartilham ancestrais comuns com base nas análises do *GeneClass2*, que seriam o genótipo multilocos 63 de Ji-Paraná (Rondônia) ou o genótipo 73 de Assis Brasil (Acre), enquanto que a região sob a influência do rio Amazonas (Baixo Amazonas) possui outra ascendência que seria o genótipo 105 da Atalaia do Norte (Oeste do Amazonas - Alto Solimões). Da mesma forma, os genótipos multilocos da Bahia exibiram origens análogas a da população do Baixo Amazonas, com ascendência nos genótipos 63 de Ji-Paraná (Rondônia) e 105 de Atalaia do Norte (Amazonas), e ainda a partir do genótipo 108 de Alenquer (Baixo Amazonas), que por sua vez, deriva do genótipo 105 de Atalaia do Norte (Oeste do Amazonas – Alto Solimões).

Quando a mesma análise foi realizada nas populações do Acre, Rondônia e Oeste do Amazonas (Alto Solimões), estes indicaram ter maior similaridade as outras regiões, como Bahia, populações do Pará e Leste do Amazonas, esses fatos corroboram com as análises descritas anteriormente. Os genótipos do Acre apresentaram alta similaridade com genótipos de Leste do Amazonas, Pará Central (Região Tranzamazônica) e também para um genótipo de Rondônia (Tabela 15). Os genótipos de Rondônia apresentam maior similaridade principalmente com genótipos do Pará (Baixo Amazonas), Leste do Amazonas e Bahia (Tabela 16). Os genótipos da população Oeste do Amazonas (Alto Solimões) região da tríplice fronteira do Brasil com o Peru e a Colômbia apresentam alta similaridade com o genótipo 108 de Alenquer, PA, que por sua vez apresentam alta similaridade com genótipos de Atalaia do Norte (Oeste do Amazonas), confirmando os resultados descritos anteriormente (Tabela 17). A população do Oeste do Amazonas apresenta ainda semelhanças com o genótipo 91 de Aurelino Leal na Bahia, porém, esse genótipo possui pontuação de 99,9% de similaridade com o genótipo 108 de Alenquer, PA.

Tabela 12 – Análise individual dos genótipos multilocos para determinar a origem dos genótipos de *M. pernicioso* encontrados na Bahia, por meio das semelhanças genéticas observadas para os 13 locos microssatélites, quando contrastados com os outros genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
76 Ilhéus, BA	108 Alenquer, PA	94,4
77 Itapebi, BA	108 Alenquer, PA	100,0
81 Uruçuca, BA	63 Ji-Paraná, RO	99,8
84 Gandú, BA	105 A. do Norte, AM	76,8*
87 Camacan, BA	63 Ji-Paraná, RO	99,2
90 Camamu, BA	63 Ji-Paraná, RO	98,8
91 Aurelino Leal, BA	108 Alenquer, PA	99,9
Genótipos da Bahia	108 Alenquer, PA	100,0

*2ª Posição = 21,4% para 108 Alenquer, PA (C).

Tabela 13 - Análise individual dos genótipos multilocos para determinar a origem de genótipos de *M. pernicioso* das populações Pará Central (região Transamazônica) e Pará (Baixo Amazonas), através das semelhanças genéticas observadas para os 13 locos de microssatélites, quando contrastados com os outros genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
2 Altamira, PA	73 Assis Brasil, AC	99,9
3 Altamira, PA	63 Ji-Paraná, RO	100,0
4 Brasil Novo, PA	73 Assis Brasil, AC	99,8
6 Medicilândia, PA	63 Ji-Paraná, RO	85,1*
7 Medicilândia, PA	63 Ji-Paraná, RO	100,0
10 Medicilândia, PA	73 Assis Brasil, AC	91,1
11 Medicilândia, PA	63 Ji-Paraná, RO	100,0
12 Uruará, PA	73 Assis Brasil, AC	99,4
14 Uruará, PA	73 Assis Brasil, AC	94,5
15 Alenquer, PA	73 Assis Brasil, AC	87,6**
16 Alenquer, PA	73 Assis Brasil, AC	80,8**
17 Santarém, PA	63 Ji-Paraná, RO	100,0
18 Santarém, PA	63 Ji-Paraná, RO	100,0
19 Cametá, PA	73 Assis Brasil, AC	99,6
23 Mocajuba, PA	73 Assis Brasil, AC	99,9
26 Trairão, PA	63 Ji-Paraná, RO	85,2*
106 Óbidos, PA	105 A. do Norte, AM	100,0
107 Alenquer, PA	105 A. do Norte, AM	100,0
108 Alenquer, PA	105 A. do Norte, AM	100,0
Genótipos do Pará	63 Ji-Paraná, RO	100,0

*2ª Posição = Assis-Brasil, AC.

**2ª Posição = Ji-Paraná, RO.

Tabela 14 – Análise individual dos genótipos multilocos para determinar a origem de genótipos de *M. pernicioso* da população Leste do Amazonas, através das semelhanças genéticas observadas para os 13 locos de microsatélites, quando contrastados com os outros genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
28 Manaus, AM	63 Ji-Paraná, RO	99,9
29 Manaus, AM	63 Ji-Paraná, RO	99,9
30 Manaus, AM	63 Ji-Paraná, RO	100,0
31 Manaus, AM	63 Ji-Paraná, RO	100,0
32 Boa Vista, AM	63 Ji-Paraná, RO	97,1
33 A. Montenegro, AM	73 Assis Brasil, AC	100,0
40 Uricurituba, AM	73 Assis Brasil, AC	87,9*
43 C. da Conceição, AM	73 Assis Brasil, AC	99,2
45 Ceplac/ERNEG, AM	63 Ji-Paraná, RO	79,3**
46 Ceplac/ERNEG, AM	73 Assis Brasil, AC	99,2
Genótipos do Leste do Amazonas	63 Ji-Paraná, RO	96,7

*2ª Posição = 12,1% para 63 Ji-Paraná, RO.

**2ª Posição = 20,7% para 73 Assis Brasil, AC.

Tabela 15 – Análise individual dos genótipos multilocos para verificar a similaridade de genótipos de *M. perniciosus* da população proveniente do Acre, quando contrastada com os demais genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
64 Marechal Thaumaturgo, AC	46 Ceplac/ERNEG, AM	68,4*
65 Marechal Thaumaturgo, AC	63 Ji-Paraná, RO	99,9
68 Assis Brasil, AC	12 Uruará, PA	64,4**
69 Assis Brasil, AC	12 Uruará, PA	41,5**
70 Brasiléia, AC	63 Ji-Paraná, RO	99,5
71 Assis Brasil, AC	12 Uruará, PA	63,8**
73 Assis Brasil, AC	46 Ceplac/ERNEG, AM	99,1
Genótipos do Acre	46 Ceplac/ERNEG, AM	99,2

*2ª Posição = 16,3% para 12 Uruará, PA.

**2ª Posição = 46 Ceplac/ERNEG, AM.

Tabela 16 – Análise individual dos genótipos multilocos para verificar a similaridade de genótipos de *M. perniciosus* da população proveniente de Rondônia, quando contrastada com os demais genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
47 Ariquemes, RO	18 Santarém, PA	56,1*
48 Ariquemes, RO	18 Santarém, PA	99,2
54 Cacaupê, RO	18 Santarém, PA	72,0**
56 Ouro Preto d'Oeste, RO	45 Ceplac/ERNEG, AM	99,9
57 Ouro Preto d'Oeste, RO	45 Ceplac/ERNEG, AM	99,9
60 Ji-Paraná, RO	90 Camamu, BA	76,1***
63 Ji-Paraná, RO	18 Santarém, PA	88,8**
Genótipos de Rondônia	18 Santarém, PA	100,0

*2ª Posição = 42,5% para 45 Ceplac/ERNEG, AM.

**2ª Posição = 90 Camamu, BA.

***2ª Posição = 18 Santarém, PA.

Tabela 17 – Análise individual dos genótipos multilocos para verificar a similaridade de genótipos de *M. pernicioso* da população proveniente do Oeste do Amazonas (Alto Solimões), quando contrastada com os demais genótipos, pela abordagem *Bayesiana* estabelecida pelo programa *GeneClass2*.

Genótipos e sua localização	1ª Posição	Pontuação (%)
92 Tabatinga, AM	108 Alenquer, PA	99,8
93 Tabatinga, AM	108 Alenquer, PA	97,4
94 Tabatinga, AM	108 Alenquer, PA	89,5*
96 Tabatinga, AM	108 Alenquer, PA	89,5*
100 Tabatinga, AM	108 Alenquer, PA	99,9
101 Tabatinga, AM	91 Aurelino Leal, BA	51,5**
102 São Paulo de Olivença, AM	108 Alenquer, PA	99,9
103 São Paulo de Olivença, AM	108 Alenquer, PA	99,7
104 Benjamim Constant, AM	108 Alenquer, PA	98,4
105 Atalaia do Norte - AM	108 Alenquer, PA	99,9
110 Agua Blanca, Equador	91 Aurelino Leal, BA	83,9**
Genótipos do Oeste do Amazonas	108 Alenquer, PA	100,0

*2ª Posição = 91 Aurelino Leal, BA.

**2ª Posição = 108 Alenquer, PA.

5.7 Avaliação de resistência

5.7.1 Avaliação da interação da concentração do inóculo X resistência

Nesse experimento, foram avaliadas progênies dos cruzamentos ‘PA 195 x CAB 214’; ‘PA 195 x SCA 6’ e ‘PA 195 x ICS 39’. Plântulas de cada progênie foram inoculadas com uma suspensão de basidiósporos de um isolado de *M. perniciosus* de Belém, PA com concentrações crescentes de inóculo, 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos por mL^{-1} . Os genótipos ‘PA 195’ e ‘ICS 39’ são considerados suscetíveis a vassoura-de-bruxa, enquanto que ‘SCA 6’ apresenta uma reação intermediária e ‘CAB 214’ seria resistente ao patógeno.

A proporção de plântulas exibindo sintomas (incidência da doença) variou entre 7,9% para a progênie do cruzamento entre ‘PA 195 x CAB 214’ na concentração do inóculo de 10^4 esporos por mL^{-1} , e de 100% para ‘PA 195 x ICS 39’ na concentração do inóculo de 10^6 esporos por mL^{-1} . Em todas as progênies avaliadas, o aumento na concentração do inóculo resultou no aumento da proporção de plântulas que apresentaram sintomas. O cruzamento envolvendo os genótipos suscetíveis ‘PA 195 x ICS 39’ resultou na maior proporção de plântulas com sintomas para as três concentrações do inóculo com uma variação de 64% (10^4 esporos por mL^{-1}) a 100% (10^6 esporos por mL^{-1}). A progênie ‘PA 195 x SCA 6’ apresentou uma proporção de plântulas com sintomas variando de 33,3% (10^4 esporos por mL^{-1}) a 84,3% (10^6 esporos por mL^{-1}). Das progênies avaliadas, ‘PA 195 x CAB 214’ foi a que apresentou a menor proporção de plântulas com sintomas para as três concentrações do inóculo analisadas com variação entre 7,9% (10^4 esporos por mL^{-1}) e 67,3% (10^6 esporos por mL^{-1}) (Tabela 18 e Figura 9).

Tabela 18 – Proporção média de plântulas com sintomas. Cada tratamento envolve uma das progênies dos cruzamentos de ‘PA 195’ com ‘CAB 214’, ‘SCA 6’ e ‘ICS 39’; inoculadas com o isolado de *M. perniciosa* de Belém, PA nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos por mL⁻¹.

Progênie	Concentração do inóculo	Proporção média de plântulas com sintomas
PA 195 x CAB 214	10^4	7,9
PA 195 x CAB 214	10^5	20,5
PA 195 x CAB 214	10^6	67,3
PA 195 x SCA 6	10^4	33,3
PA 195 x SCA 6	10^5	63,8
PA 195 x SCA 6	10^6	84,3
PA 195 x ICS 39	10^4	64,0
PA 195 x ICS 39	10^5	88,0
PA 195 x ICS 39	10^6	100,0

Figura 9 - Proporção média de plântulas com sintomas na combinação das progênes dos cruzamentos de 'PA 195' com 'CAB 214', 'SCA 6' e 'ICS 39'; inoculadas com o isolado de *M. perniciosa* de Belém, PA nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos por mL^{-1} .

Nas análises estatísticas, a interação entre *Progênie* e *Concentração* não foi significativa ($P = 0,6769$). Entretanto os efeitos atribuídos as *Progênies* ($P < 0,0001$) e *Concentrações* ($P = 0,0007$) quando analisados separadamente foram significativos (Tabela 19). Comparando o efeito médio entre as três progênies e as três concentrações na probabilidade de gerar sintomas, todas foram significativas ($P < 0,0001$) (Tabelas 20 e 21).

Tabela 19 – Estimativa da probabilidade de diferenças significativas na avaliação dos efeitos atribuídos a análise dos fatores *Progênies*, *Concentrações* e interação entre eles (*Progênie* x *Concentração*).

Efeito	Valores de P
<i>Progênies</i>	$< 0,0001^*$
<i>Concentrações</i>	$0,0007^{**}$
<i>Progênie</i> x <i>Concentração</i>	$0,6769$
Nível de significância: $*P < 0,0001$; $**P < 0,001$	

Utilizando o conceito de razão das probabilidades ou *Odds-Ratio* (*OR*) para as diferenças significativas, foi realizada uma comparação entre as progênies e ainda concentrações do inóculo, quanto à probabilidade de produzirem sintomas. A razão das probabilidades (*Odds-Ratio*) é definida como a razão entre a probabilidade de um evento ocorrer em um grupo e a probabilidade de ocorrer em outro grupo. Uma razão de probabilidade de 1 indica que a condição ou evento sob estudo é igualmente provável de ocorrer nos dois grupos. Uma razão de probabilidade maior do que 1 indica que a condição ou evento tem maior probabilidade de ocorrer no primeiro grupo. Uma razão de probabilidade menor do que 1 indica que a probabilidade é menor no primeiro grupo do que no segundo (COLLET, 2003).

Quando a *OR* está entre 0 e 1, a interpretação pode ser feita calculando o recíproco do valor da *OR*. Assim, na comparação entre ‘PA 195 x CAB 214’ contra ‘PA 195 x ICS 39’, a *OR* é igual a 0,044. Calculando o recíproco do valor da *OR* tem-se $1/0,044 = 22,72$; ou aproximadamente 23. No cálculo do valor recíproco, é necessário inverter a comparação, sendo assim ‘PA 195 x ICS 39’ tem 23 vezes mais chance de gerar sintomas do que ‘PA 195 x CAB 214’. A progênie ‘PA 195 x SCA 6’, apresenta aproximadamente 5 vezes ($1/0,203 = 4,93$) mais chances de gerar sintomas quando comparada com ‘PA 195 x CAB 214’ ($OR = 0,203$). Por outro lado, quando a *OR* é um valor maior que 1, ele representa em quantas vezes

um tratamento tem a chance de ocorrer sintomas quando comparado com o outro tratamento. Deste modo, para ‘PA 195 x ICS 39’ versus ‘PA 195 x SCA 6’ a *OR* foi igual a 4,56; indicando que a progênie ‘PA 195 x ICS 39’ tem aproximadamente 4,6 vezes mais chance de produzir sintomas quando comparada com a ‘PA 195 x SCA 6’ (Tabela 20).

Tabela 20 – Comparação do efeito médio entre as progênies quanto à probabilidade de produzirem sintomas.

Progênie 1	Progênie 2	Valores de <i>P</i>	Valores de <i>OR</i>
PA 195 x CAB 214	PA 195 x ICS 39	< 0,0001*	0,044
PA 195 x CAB 214	PA 195 x SCA 6	< 0,0001*	0,203
PA 195 x ICS 39	PA 195 x SCA 6	< 0,0001*	4,560

Nível de significância: **P* < 0,0001

Na comparação do efeito médio das concentrações do inóculo na probabilidade de produzir sintomas nas plantas, a concentração 10^5 apresenta 3,6 vezes ($1/0,277 = 3,6$) mais chances de gerar sintomas que a concentração 10^4 (*OR* = 0,277). Já a concentração 10^6 apresenta 5,6 vezes ($1/0,178 = 5,6$) mais chances de gerar sintomas que a concentração 10^5 (*OR* = 0,178). Quando se compara os extremos das concentrações de inóculos avaliadas, a concentração de 10^6 apresenta 20,4 vezes (*OR* = 0,049; $1/0,049 = 20,4$) mais chances de produção de sintomas quando comparada com a concentração de 10^4 (Tabela 21).

Tabela 21 – Comparação do efeito médio das concentrações do inóculo quanto à probabilidade de produzirem sintomas.

Concentração 1	Concentração 2	Valores de <i>P</i>	Valores de <i>OR</i>
10^4	10^5	< 0,0001*	0,277
10^4	10^6	< 0,0001*	0,049
10^5	10^6	< 0,0001*	0,178

Nível de significância: **P* < 0,0001

5.7.2 Avaliação da interação da concentração do inóculo de diferentes isolados X resistência

Mudas clonais dos genótipos descritos como resistentes ‘CAB 214’ e ‘CAB 270’ (ALBUQUERQUE et al., 2010), e também para o suscetível ‘PA 195’ foram inoculadas com uma suspensão de basidiósporos nas concentrações de 10^5 e 10^6 esporos por mL^{-1} . Os isolados de *M. perniciosa* avaliados foram Tabatinga, AM (96) e Marechal Thaumaturgo, AC (65). Nos três genótipos analisados, a proporção de plântulas com sintomas foi superior quando inoculadas com o isolado de Tabatinga, AM. A proporção de plântulas com sintomas apresentou uma variação de 0 a 81,2% quando inoculadas com o isolado de Marechal Thaumaturgo, AC, enquanto que com o isolado Tabatinga, AM a proporção de plântulas com sintomas ficou entre 46,2 e 85,0% (Tabela 22).

Para o genótipo ‘CAB 214’ nenhuma plântula apresentou sintomas quando inoculadas com o isolado de Marechal Thaumaturgo, AC em ambas as concentrações. Entre os genótipos descritos como resistentes, o ‘CAB 214’ foi também o que apresentou menor proporção de plântulas com sintomas em ambas as concentrações de inóculo testadas. Nesse experimento, o genótipo ‘CAB 270’ apresentou resultados próximos aos encontrados para o genótipo suscetível ‘PA 195’.

Tabela 22 – Proporção média de plântulas com sintomas dentro dos tratamentos envolvendo três genótipos de *T. cacao* inoculados com os isolados Tabatinga, AM (96) e Marechal Thaumaturgo, AC (65) de *M. pernicioso*, nas concentrações de 10^5 ou 10^6 esporos por mL⁻¹.

Genótipo	Inóculo	Concentração do inóculo	Proporção média de plântulas com sintomas
CAB 214	Mal. Thaumaturgo, AC	10^5	0
CAB 214	Mal. Thaumaturgo, AC	10^6	0
CAB 214	Tabatinga, AM	10^5	57,1
CAB 214	Tabatinga, AM	10^6	46,2
PA 195	Mal. Thaumaturgo, AC	10^5	65,0
PA 195	Mal. Thaumaturgo, AC	10^6	65,0
PA 195	Tabatinga, AM	10^5	70,0
PA 195	Tabatinga, AM	10^6	84,2
CAB 270	Mal. Thaumaturgo, AC	10^5	62,5
CAB 270	Mal. Thaumaturgo, AC	10^6	81,2
CAB 270	Tabatinga, AM	10^5	85,0
CAB 270	Tabatinga, AM	10^6	80,0

Conduzindo um processo parcimonioso de teste e exclusão de termos não significativos, verifica-se que nenhuma interação de segunda ordem ($G \times I$, $G \times C$ e $I \times C$) se mostrou significativa ($P > 0,05$) (Tabela 23). A partir da Tabela 23, concluí-se que todas as interações não foram significativas. Em seguida, o modelo foi ajustado contendo apenas *Genótipos*, *Inóculos* e *Concentrações* (dados não apresentados), confirmando que o fator *Concentração* não foi significativo. Nas análises seguintes o modelo foi reajustado sem levar em conta o fator *Concentrações*. Entretanto os efeitos atribuídos a *Genótipo* ($P < 0,0001$) e *Inóculo* ($P = 0,0003$) se apresentaram fortemente significativos (Tabela 24). Comparando o efeito médio entre os três genótipos na probabilidade de gerar sintomas, foram identificadas diferenças significativas entre ‘CAB 214’ e ‘CAB 270’ ($P < 0,0001$) e entre ‘CAB 214’ e ‘PA 195’ ($P < 0,0001$). Os genótipos ‘CAB 270’ e ‘PA 195’ não apresentaram diferença significativa ($P = 0,4290$) (Tabela 25).

Tabela 23 – Estimativa da probabilidade de diferenças significativas na avaliação dos efeitos atribuídos a análise dos fatores *Genótipos*, *Inóculos* e *Concentrações* e interação entre eles ($G \times I$, $G \times C$ e $I \times C$).

Efeito	Valores de <i>P</i>
<i>Genótipos</i>	0,6874
<i>Inóculos</i>	0,9689
<i>Concentrações</i>	0,8302
<i>Genótipo x Inóculo</i>	0,9990
<i>Genótipo x Concentração</i>	0,7501
<i>Inóculo x Concentração</i>	0,8890

Tabela 24 – Estimativa da probabilidade de diferenças significativas na avaliação dos efeitos atribuídos a análise dos fatores *Genótipos* e *Inóculos*.

Efeito	Valores de <i>P</i>
<i>Genótipos</i>	< 0,0001*
<i>Inóculos</i>	0,0003**

Nível de significância: * $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$

Utilizando o conceito de razão das probabilidades ou *Odds-Ratio* (*OR*) (COLLET, 2003), para as diferenças significativas, observa-se que o genótipo ‘CAB 270’ tem aproximadamente 11 vezes ($1/0,090 = 11,11$) mais chance de produzir sintomas quando comparado com o genótipo ‘CAB 214’ ($OR = 0,090$). O genótipo ‘PA 195’ tem 8 vezes ($1/0,123 = 8,13$) mais chance de produzir sintomas que o genótipo ‘CAB 214’ ($OR = 0,123$) (Tabela 25). A comparação entre os genótipos ‘CAB 270’ e ‘PA 195’ não foi significativa ($P = 0,4290$), logo concluí-se que esta *OR* não difere significativamente do valor 1. A $OR = 1$ indica que não há diferença entre os tratamentos, isto é, os dois genótipos não diferem na geração de sintomas. Na comparação entre os dois inóculos, a chance de produzir sintomas pelo inóculo de Tabatinga, AM é 3,5 vezes ($1/0,282 = 3,54$) maior quando comparado com o inóculo de Mal. Thaumaturgo, AC ($OR = 0,282$) (Tabela 26).

Tabela 25 – Comparação do efeito médio entre os genótipos quanto a probabilidade de produzirem sintomas.

Genótipo 1	Genótipo 2	Valores de <i>P</i>	Valores de <i>OR</i>
CAB 214	CAB 270	< 0,0001*	0,090
CAB 214	PA 195	< 0,0001*	0,123
CAB 270	PA 195	0,4290	1,362

Nível de significância: * $P < 0,0001$

Tabela 26 – Comparação do efeito médio dos inóculos Mal. Thaumaturgo, AC e Tabatinga, AM quanto a probabilidade de produzirem sintomas.

Inóculo 1	Inóculo 2	Valores de <i>P</i>	Valores de <i>OR</i>
Mal. Thaumaturgo, AC	Tabatinga, AM	0,0003*	0,282

Nível de significância: * $P < 0,001$

5.8 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) de isolados de *M. pernicioso* cultivados em carência de N

5.8.1 Cultivo de *M. pernicioso* *in vitro* em condições de estresse por carência de N

Para a análise da expressão gênica por RT-qPCR de sequências selecionadas como possíveis genes associados à virulência e patogenicidade expressos em condições de estresse abiótico, foi realizado um experimento para observar o comportamento de cada isolado sob condição de estresse de N esperando haver diferença na adequação ao estresse induzido entre os isolados. Foi feito o acompanhamento do crescimento do fungo num período de 30 d. Foram cultivados dez isolados em meio com carência de N e controle. Nos isolados crescidos sob carência de N, foi observada a produção de um pigmento vermelho na borda dos *plugs* de ágar utilizados para inocular o meio sólido, e posteriormente também no meio líquido, em que as hifas e meios foram completamente corados com o pigmento vermelho (Figura 10). A liberação do pigmento iniciou-se entre o 5º e 10º dia de cultivo, intensificando-se até o 30º dia. A produção de pigmento foi observada em todos os isolados crescidos em carência de N, porém os isolados que se destacaram com uma acentuada liberação de pigmento desde o início de seu crescimento, foram Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Marechal Thaumaturgo, AC (65) e Assis Brasil, AC (69).

A partir do diâmetro do halo formado pelo crescimento do fungo na placa de Petri nos tratamentos de carência de N e controle, foi possível notar que na condição de carência de nitrogênio, houve uma redução no crescimento do fungo quando comparado ao controle nos isolados Ji-Paraná, RO (63); Itajuípe, BA (74); Itapebi, BA (77); Uruçuca, BA (82); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106) (Figuras 11, 12 e 13). A diferença do crescimento nas duas condições ficou mais evidente após 10 e 15 d de cultivo. Nos isolados Cacaúlândia, RO (52) e Mocajuba, PA (24) não foi observada uma diferença significativa no crescimento entre as duas condições em nenhum dos tempos analisados (Figuras 11 e 13).

Figura 10 - Isolado de *M. pernicioso* de Marechal Thaumaturgo, AC (65) crescido em meio sólido na condição controle (A) e em carência de N (B).

Figura 11 – Análise do crescimento em carência de N por 30 d, de isolados de *M. perniciosa* coletados em Cacaulândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77) e Uruçuca, BA (82). Eixo X: indica o tempo analisado em dias. Eixo Y: indica o diâmetro em cm do halo formado pelo crescimento do fungo na placa de Petri.

Figura 12 – Análise do crescimento em carência de N por 30 d, de isolados de *M. pernicioso* coletados em Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69) e Tabatinga, AM (96). Eixo X: indica o tempo analisado em dias. Eixo Y: indica o diâmetro em cm do halo formado pelo crescimento do fungo na placa de Petri.

Figura 13 – Análise do crescimento em carência de N por 30 d, de isolados de *M. pernicioso* coletados em Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). Eixo X: indica o tempo analisado em dias. Eixo Y: indica o diâmetro em cm do halo formado pelo crescimento do fungo na placa de Petri.

Após esse ensaio, os dez isolados de *M. pernicioso* representando a diversidade da espécie foram crescidos por 15 e 30 d em meio líquido sob condições de estresse por carência de N (4 mM de N como tartarato de amônio) e meio convencional rico em N (10 mM de N como nitrato de potássio) sob fotoperíodo de 12 h, para avaliar a expressão de genes potencialmente associados a patogenicidade. O tempo de 15 d foi o menor possível para que o micélio atingisse um tamanho mínimo que permitisse sua coleta e extração do RNA.

Na avaliação da expressão relativa dos treze genes presumíveis associados à virulência e/ou patogenicidade nas condições de cultivo *in vitro*, foram utilizados os genes Actina e Tubulina de *M. pernicioso* como referência. A estabilidade dos genes de referência entre os tratamentos também foi avaliada, não se verificando a expressão diferencial entre Actina e Tubulina nas condições testadas para todos os isolados analisados. Como exemplo, utilizando o isolado Mocajuba, PA (24), não houve diferenças contrastantes quando se utilizou o gene da Actina ou da Tubulina como referência, demonstrando não haver regulação diferencial nessas condições para esses dois genes normalizadores (Figura 14).

No cálculo do valor de expressão dos genes são necessários os valores de eficiência da reação (E) e o C_T (*cycle threshold*) das amostras na amplificação. O C_T não indica exatamente a mensuração da sua transcrição, pois esta depende ainda da eficiência da amplificação obtida para este gene com os iniciadores específicos (PFAFFL, 2001). O valor da eficiência é dado antes do processo de quantificação da expressão gênica, quando é estabelecida uma curva de diluição utilizando diferentes concentrações de cDNA como molde inicial da quantificação. A análise é considerada relativa, já que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim em quantidade relativa de transcritos em relação a outro gene expresso e constante, denominado gene de referência. A quantificação consiste em obter a razão de expressão entre um gene-alvo numa amostra de cDNA, em relação ao gene de referência para a mesma amostra de cDNA (PFAFFL, 2001). O cálculo da expressão relativa é adequado para a investigação de mudanças fisiológicas em termos de expressão gênica (PFAFFL, 2001). Se o valor da expressão relativa for igual 1,0; indica que a expressão do gene estudado não foi alterada com o tratamento. Os valores maiores que 1,0 indicam o aumento ou indução na expressão do gene em relação ao tratamento, já valores menores que 1,0 indicam a redução ou repressão na expressão do gene em relação ao tratamento.

Os treze genes presumíveis associados à virulência foram então empregados para análise de expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). A verificação da significativa indução ou repressão transcricional de genes foi realizada com

programa REST 2008 (PFAFFL et al., 2002). Utilizando-se um *pool* de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) de isolados de *M. pernicioso* coletados em ambos os tempos e também tratamentos, foi estabelecida uma curva de eficiência para cada par de iniciadores. Os valores de eficiência obtidos variaram de 0,88 (*PenicSynt*) a 0,98 (*AK*), e os valores de R^2 foram superiores a 0,98 (Tabela 27). A expressão dos genes *Aspf13*, *88KD*, *AS*, *AK*, *P450*, *PAL*, *AAO*, *Perox* (LEAL Jr. et al., 2010), *VersSint*, *Ich*, *PenicSynt*, *Oxireduc*, *GAL4* (LEAL Jr., 2006), foi analisada nos tempos de 15 e 30 d.

Figura 14 – Genes de *Moniliophthora perniciosa* diferencialmente expressos no genótipo Mocajuba, PA (24), cultivado em carência de N por 30 d. Foram utilizados como referência os genes da actina e tubulina de *M. perniciosa*. Não houve alteração na expressão na utilização do gene da actina ou da tubulina como referência. O eixo y representa o número de vezes da expressão relativa em relação a referência. As últimas colunas indicam o gene actina sendo utilizado como referência na avaliação da expressão da tubulina (cinza escuro) e a tubulina sendo utilizado como referência na avaliação da expressão da actina (cinza claro).

Tabela 27 – Valores de eficiência e R^2 dos genes associados à virulência e/ou patogenicidade de *M. perniciosus* obtidos através de curva de eficiência por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).

Gene	Eficiência	R^2
<i>Act-Mp</i>	0,97	0,99
<i>Tub-Mp</i>	0,90	0,99
<i>Aspf13</i>	0,93	0,99
<i>88KD</i>	0,90	0,99
<i>AS</i>	0,96	0,98
<i>AK</i>	0,98	0,98
<i>P450</i>	0,90	0,99
<i>PAL</i>	0,92	0,99
<i>AAO</i>	0,93	0,98
<i>Perox</i>	0,96	0,99
<i>VersSint</i>	0,97	0,99
<i>Ich</i>	0,91	0,98
<i>PenicSynt</i>	0,88	0,99
<i>Oxireduc</i>	0,96	0,99
<i>GAL4</i>	0,95	0,99

O acúmulo relativo dos transcritos dos genes *Aspf13*, *88KD*, *AS*, *AK*, *P450*, *PAL*, *AAO*, *Perox* (LEAL Jr. et al., 2010), *VersSint*, *Ich*, *PenicSynt*, *Oxireduc*, *GAL4* (LEAL Jr., 2006), nos tempos de 15 e 30 d pode ser visualizado nas figuras 15, 16, 17 e 18, em que genes com funções similares foram organizados na mesma figura. Dos genes analisados, o *88KD* foi o que apresentou os maiores valores de expressão, com destaque para os isolados provenientes de Cacaulândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77) e Mocajuba, PA (24) (Figura 15). Os únicos isolados que apresentaram valores de expressão inferiores a 3,0 com o gene *88KD*, em ambos os tempos de coleta do micélio foram Marechal Thaumaturgo, AC (65), Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106). Para o gene *Aspf13*, o isolado com maior valor de expressão foi o de Itajuípe, BA (74), porém os isolados Ji-Paraná, RO (63); Uruçuca, BA (82); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106) também apresentaram valores de expressão superiores a 1,0 no tempo de 15 d, indicando a indução na expressão do gene. Na análise do gene *Aspf13* no tempo de 30 d, foi observada a repressão desse gene em quase todos os isolados, exceto Itapebi, BA (77) e Itajuípe, BA (74) (Figura 15). Para os dez isolados analisados, parece haver uma tendência de expressão superior no tempo de 15 d para os genes *Aspf13* e *88KD* (Figura 15).

Para o gene *P450*, todos os isolados apresentaram expressão superior em 15 d, sendo menos expressos aos 30 d. O isolado de Mocajuba, PA (24) foi o que apresentou maior valor de expressão. Todos os isolados tiveram valores de expressão inferiores a 0,72 para o gene *P450* no tempo de 30 d, indicando a ocorrência de repressão (Figura 15).

VersSint foi mais expresso aos 30 d com maiores valores de expressão para o isolado de Tabatinga, AM (96) e também para os isolados de Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106) (Figura 16). O gene *AK* foi mais expresso aos 30 d. Os isolados com maiores valores de expressão para o gene *AK* foram Itapebi, BA (77); Itajuípe, BA (74); Assis Brasil, AC (69); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106) (Figura 16). Nos genes *PenicSynt* e *Oxireduc* na comparação dos dez isolados, não foi possível verificar uma tendência de expressão superior ocorrendo aos 15 ou 30 d (Figura 16). Os isolados de Itajuípe, BA (74), Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106) apresentaram os maiores valores de expressão para o gene *PenicSynt*. Já para o gene *Oxireduc* os maiores valores de expressão foram encontrados principalmente no isolado Mocajuba, PA (24) (Figura 16).

Para os genes *AS*, *Ich* e *GAL4* não foi identificada uma tendência de acúmulo de transcritos superior ocorrendo aos 15 ou 30 d. No entanto, para os genes *AS* e *GAL4* os maiores números de transcritos foram identificados no tempo de 30 d. Para o gene *AS*, os isolados com maior expressão foram Ji-Paraná, RO (63); Marechal Thaumaturgo, AC (65);

Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106). Na maioria dos isolados a expressão do gene *Ich* foi inferior a 3,0; excetuando-se os isolados Itapebi, BA (77); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106). O gene *GAL4* também apresentou baixos valores de expressão para a maioria dos isolados com exceção de Mocajuba (24) e Óbidos (106), ambos do Pará. Os isolados Itapebi, BA (77) e Marechal Thaumaturgo, AC (65) também apresentaram valores de expressão acima de 3,0 para o gene *GAL4* (Figura 17).

O gene *Perox* foi mais expresso aos 30 d, já no gene *AAO* foram observados maiores números de transcritos em 15 d. O gene *AAO* apresentou valores de expressão superiores para os isolados de Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA. Os isolados de Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106) apresentaram valores de expressão para o gene *Perox* superiores a 5,0 em 30 d. Para o gene *Perox* observa-se repressão para oito isolados no tempo de 15 d. Na análise da expressão do gene *PAL* quase todos os isolados apresentaram repressão do gene, as exceções foram Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Uruçuca, BA (82) e Assis Brasil, AC (69) (Figura 18).

Desconsiderando as diferenças dos tempos de coleta do micélio, os isolados oriundos do Pará apresentaram maior expressão quando comparados aos demais isolados, para cinco dos treze genes avaliados (Figuras 19, 20 e 21). Já os isolados da Bahia apresentaram maiores valores para três desses genes (Figuras 19, 20 e 21). O isolado de Mocajuba, PA (24) apresentou maiores valores de expressão para os genes *P450*, *PenicSynt*, *Oxireduc* e *GAL4*; e o de Óbidos, PA (106) teve maior expressão para o gene *AS* (Figura 21). O isolado de Itapebi, BA (77) teve maior expressão na comparação com os demais isolados para os genes *88KD* e *Ich* (Figura 19); e o de Itajuípe, BA (74) apresentou maiores valores para o *Aspf13* (Figura 20). Para o gene *PAL*, o isolado com maior expressão foi o coletado em Ji-Paraná, RO (63) (Figura 19); o isolado de Tabatinga, AM (96) teve maior expressão para os genes *VersSint* e *AAO* (Figura 20). Os isolados do Acre de Marechal Thaumaturgo, AM (65) e Assis Brasil, AC (69), apresentaram maiores valores de expressão para *Perox* e *AK*, respectivamente (Figura 20).

Os isolados Cacaúlândia (52) e Ji-Paraná (63), ambos de Rondônia, apresentaram valores próximos de expressão para o gene *88KD* nos dois tempos analisados (Figura 19). Observando os isolados de Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106) foi possível notar que estes apresentam uma mesma tendência em seus genes mais expressos, que incluem *AAO* em 15 d, *VersSint* e *Perox* aos 30 d, e *AS* em ambos os tempos analisados (Figuras 20 e 21). Esses isolados coincidentemente também apresentam repressão para cinco condições (gene e tempo de coleta do micélio) testadas. Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106) apresentam repressão

para o gene *PAL* em 15 e 30 d, *Perox* em 15 d, e para os genes *Aspf13* e *P450* em 30 d. O isolado de Tabatinga, AM (96) apresentou repressão ainda para *GAL4* e *Ich*, no tempo de coleta de 15 d. Já em Óbidos, PA (106) foi observada a repressão no gene *Oxireduc* no tempo de 30 d. Alguns isolados apresentaram repressão para alguns genes nas condições analisadas, como o isolado de Uruçuca, BA (82) que apresentou repressão para nove dos treze genes avaliados no tempo de coleta de 30 d (Figura 19).

Figura 15 – Expressão relativa dos genes presumíveis de patogenicidade *Aspf13*, *88KD* e *P450* em dez isolados de *M. pernicioso* crescidos em meio com carência de N. A barra cinza escuro indica a expressão em 15 d e cinza claro em 30 d. Eixo X: isolados de *M. pernicioso* coletados em Cacaúlândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Urucuça, BA (82); Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). Eixo Y: os valores de expressão dos genes quando contrastados com os mesmos isolados cultivados em meio rico em N, utilizando como referências os genes Actina e Tubulina. O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 16 – Expressão relativa dos genes presumíveis de patogenicidade *VersSint*, *AK*, *PenicSynt* e *Oxireduc* em dez isolados de *M. perniciosa* crescidos em meio com carência de N. A barra cinza escuro indica a expressão em 15 d e cinza claro em 30 d. Eixo X: isolados de *M. perniciosa* coletados em Cacaulândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Uruçuca, BA (82); Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). Eixo Y: os valores de expressão dos genes quando contrastados com os mesmos isolados cultivados em meio rico em N, utilizando como referências os genes Actina e Tubulina. O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 17 – Expressão relativa dos genes presumíveis de patogenicidade *AS*, *Ich* e *GAL4* em dez isolados de *M. pernicioso* crescidos em meio com carência de N. A barra cinza escuro indica a expressão em 15 d e cinza claro em 30 d. Eixo X: isolados de *M. pernicioso* coletados em Cacaulândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Urucuca, BA (82); Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). Eixo Y: os valores de expressão dos genes quando contrastados com os mesmos isolados cultivados em meio rico em N, utilizando como referências os genes Actina e Tubulina. O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 18 – Expressão relativa dos genes presumíveis de patogenicidade *AAO*, *Perox* e *PAL* em dez isolados de *M. pernicioso* crescidos em meio com carência de N. A barra cinza escuro indica a expressão em 15 d e cinza claro em 30 d. Eixo X: isolados de *M. pernicioso* coletados em Cacaúlândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77); Urucuça, BA (82); Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69); Tabatinga, AM (96); Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). Eixo Y: os valores de expressão dos genes quando contrastados com os mesmos isolados cultivados em meio rico em N, utilizando como referências os genes Actina e Tubulina. O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 19 - Análise da expressão relativa de genes presumíveis de patogenicidade em 15 d e 30 d, de isolados de *M. perniciosus* coletados em Cacaúlândia, RO (52); Ji-Paraná, RO (63); Itapebi, BA (77) e Uruçuca, BA (82). O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 20 – Análise da expressão relativa de genes presumíveis de patogenicidade em 15 d e 30 d, de isolados de *M. perniciosus* coletados em Itajuípe, BA (74); Marechal Thaumaturgo, AC (65); Assis Brasil, AC (69) e Tabatinga, AM (96). O * indica a ocorrência de repressão do gene.

Figura 21 – Análise da expressão relativa de genes presumíveis de patogenicidade em 15 d e 30 d, de isolados de *M. pernicioso* coletados em Mocajuba, PA (24) e Óbidos, PA (106). O * indica a ocorrência de repressão do gene.

5.8.2 Polimorfismo do gene que codifica a cerato-platanina em *M. pernicioso*

Na amplificação do gene completo da cerato-platanina (*Aspf13*) foram produzidos fragmentos para dois isolados dos biótipos –C e –S (isolados 65 e 125, respectivamente; Tabela 1), que foram clonados e sequenciados, revelando cinco polimorfismos de bases únicas (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) e uma região com uma inserção de cinco bases no isolado 65 de Marechal Thaumaturgo, AC do biótipo-C de (dados não mostrados). Na análise das sequências no banco de dados de sítios de restrição *REBASE*, foi identificado um local de reconhecimento para a enzima *MseI* com potencial de expor polimorfismo para o tamanho de fragmento entre as sequências avaliadas.

Foi produzido um único fragmento de tamanho idêntico (~500 pb) em todos os isolados (Figura 22A). Os produtos da amplificação foram digeridos com a enzima *MseI*, resultando na maioria dos isolados em dois fragmentos com tamanhos de aproximadamente 107 e 368 pb (475 pb) e outros três isolados (65 e 66 de Marechal Thaumaturgo, AC; e 70 de Brasília, AC) exibiram quatro fragmentos com cerca de 277, 99, 78 e 29 pb (total de 483 pb). Dois isolados de *T. grandiflorum* (cupuaçu) utilizados como controle também exibiram quatro fragmentos na digestão com a enzima *MseI* (Figura 22B).

Figura 22 - **A.** Fragmentos amplificados para o gene da cerato-platanina em diversos isolados de *M. pernicioso*, apresentando um único fragmento monomórfico com cerca de 500 pb. **B.** Resultados da digestão com a enzima *MseI*, dos fragmentos obtidos para o gene da cerato-platanina de diversos isolados de *M. pernicioso*, revelando cinco isolados com polimorfismo para a sequência.

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise da diversidade genética de isolados de *Moniliophthora perniciosa*

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* vem sendo classificado em biótipos de acordo com seu hospedeiro de origem, aliado a diferenças morfológicas, bioquímicas e compatibilidade somática. O biótipo-C inclui os isolados patogênicos para espécies de *Theobroma* e *Herrania* (Sterculiaceae ou Malvaceae *sensu lato*), e ocasiona a vassoura-de-bruxa no cacaueiro. É denominado biótipo-S o que infecta espécies do gênero *Solanum*, geralmente plantas invasoras de áreas com florestas degradadas, induzindo os sintomas característicos da doença (BASTOS; EVANS, 1985). Já o biótipo-L coloniza tecidos vivos sem induzir sintomas e pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae (GRIFFITH; HEDGER, 1994a).

No presente estudo, apesar das avaliações de diversidade genética com o uso de marcadores microssatélites terem sido realizadas em um maior número de isolados para o biótipo-C, os isolados do biótipo-L, seguidos do biótipo-S, apresentaram maior número de alelos e polimorfismo entre os isolados. Os isolados dos biótipos -S e -L apresentaram uma diversidade gênica e genotípica superior aos isolados do biótipo-C. Esse fato também foi evidenciado na identificação dos genótipos multilocos presentes entre os isolados representantes dos três biótipos. Para o biótipo-S foram encontrados apenas dois indivíduos com genótipos idênticos, isto é, com os mesmos alelos para todos os locos avaliados; e nenhum foi encontrado no biótipo-L. Entre os isolados do biótipo-C foram identificados 61 genótipos multilocos numa amostra de 111 isolados coletados em áreas de ocorrência natural e cultivo de cacau. No estudo da estrutura genética do fungo *Melampsora larici-populina* também foram encontrados exemplares clonais amostrados de diferentes locais, e assim como nesse estudo foram consideradas apenas uma única cópia de cada genótipo multilocos nas análises subsequentes (XHAARD et al., 2011).

No fungo *M. perniciosa* os biótipos patogênicos -C e -S são descritos como homotáticos primários (auto-férteis) e não realizam fecundação cruzada, enquanto que o biótipo-L é heterotático bifatorial e apresenta fecundação cruzada, como a maioria dos fungos basidiomicetos (GRIFFITH; HEDGER, 1994a; GRIFFITH et al., 1994; GRIFFITH et al., 2003). O predomínio do heterotalismo (auto-estéreis) entre os basidiomicetos é considerado

uma indicação de que o heterotalismo seja uma condição ancestral ao homotalismo neste grupo (GRIFFITH; HEDGER, 1994a). Como os micélios dos biótipos -C e -S são autoférteis, a disseminação é realizada sem a necessidade do cruzamento de micélios compatíveis, para a formação do basidiocarpo, levando a ocorrência de clones geograficamente disseminados (GRIFFITH; HEDGER, 1994a).

A presença de uma fase sexual em fungos descritos como homotáticos não significa necessariamente a ocorrência de recombinação ao nível da sua estrutura de população, devido à capacidade de autofecundação, por exemplo, *Eupenicillium* sp. apesar de ter um estágio sexual reconhecido no seu ciclo de vida foi encontrado sendo predominantemente clonal com o uso de marcadores ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeats*) (TUTHILL, 2004). Os resultados deste estudo indicaram que a presença de um ciclo meiótico não garante necessariamente maior diversidade genética (TUTHILL, 2004). O ascomiceto *Emericella nidulans* também descrito como homotático apresentou num estudo com microsatélites, a predominância de clonalidade na população do deserto de Negev, indicando que a baixa densidade de populações de *E. nidulans* no solo do cânion do deserto, reduz a possibilidade do encontro de um parceiro sexual, favorecendo a clonalidade por autofecundação (HOSID et al., 2010).

Os microsatélites constituem uma ferramenta eficaz na avaliação da diversidade genética em plantas, tendo sido utilizados em diversas espécies para este fim, incluindo os hospedeiros de *M. pernicioso* do biótipo-C, *Theobroma cacao* (SERENO et al., 2006) e *Theobroma grandiflorum* (ALVES et al., 2007). No entanto, em várias espécies de fungos já foi relatado um baixo polimorfismo em análises por microsatélites quando comparados com a utilização do mesmo marcador na avaliação de outros organismos (DUTECH et al., 2007). Gramacho et al. (2007) encontrou um polimorfismo restrito por meio da análise de locos de microsatélites em isolados do biótipo-C. Uma menor variabilidade genética encontrada em isolados do biótipo-C já foi evidenciada por outras metodologias. Neste estudo, embora as amostras de DNA terem sido extraídas de micélio dicariótico, na maioria dos casos, um único alelo foi amplificado em cada isolado. Este fato foi verificado em isolados de outros fungos como o *Ustilago scitaminea*, patógeno de cana-de-açúcar (RABOIN et al., 2007).

Compatibilidade somática e análises moleculares [isoenzimas; *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR); polimorfismo em sequências de DNA mitocondrial e de espaçadores intergênicos do rDNA 5S (*intergenic spacer* - IGS); ITS e IGS em sequência de nucleotídeos] sugeriram que os biótipos -C e -S são mais próximos entre si do que do biótipo-L, e exibem uma diversidade genética reduzida (ARRUDA et al., 2003a;

2003b; GRIFFITH; HEDGER, 1994a; GRIFFITH et al., 2003). Marcadores do tipo microssatélites demonstraram uma baixa diversidade genética em isolados do biótipo-C da região Amazônica (SILVA et al., 2008). Análises de sequências ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (ARRUDA et al., 2005), cariótipo e amplificação de sequências teloméricas sugerem que o biótipo-S apresenta maior polimorfismo que o biótipo-C (RINCONES et al., 2006). Por outro lado, o biótipo-L mantém um alto nível de diversidade genética avaliada pela morfologia, compatibilidade somática e várias análises moleculares (GRIFFITH et al., 2003; RINCONES et al., 2007). Essa discrepância na diversidade genética pode derivar diretamente do sistema de reprodução do biótipo e estrutura da população, que por não ocorrer fecundação cruzada, acaba favorecendo a ocorrência de clones adaptados a extensas áreas geográficas (GRIFFITH et al., 1994).

Na avaliação dos biótipos -C, -L e -S utilizando uma abordagem *Bayesiana* com o *Structure* e *GeneClass2*, ou fenética por análise de agrupamento, os genótipos multilocos dos biótipos -L e -S apresentaram maior similaridade genética, sendo alocados num mesmo grupo, indicando haver maior proximidade entre estes, do que entre estes e o biótipo-C. Para determinar a ancestralidade dos genótipos multilocos do biótipo-C de *M. perniciosa*, estes foram contrastados com genótipos dos biótipos -L e -S. Na análise com o *GeneClass2*, dos 61 genótipos multilocos do biótipo-C que foram contrastados com os isolados dos biótipos -L e -S, 50 apresentaram maior similaridade com um genótipo do biótipo-L. Assim, o biótipo-C apresentou nesta análise com o *GeneClass2*, ter maior similaridade com o biótipo-L do que com o biótipo-S. Como nos basidiomicetos o heterotalismo é predominante, indicando esta como uma condição ancestral ao homotalismo neste grupo (GRIFFITH; HEDGER, 1994a), os dados de similaridade genética sugerem que o biótipo-C e também o -S que são aparentemente homotáticos, evoluíram de um biótipo heterotático, possivelmente o biótipo-L.

M. perniciosa é um patógeno hemibiotrófico, com micélios distintos em cada fase de seu ciclo de vida. Griffith et al. (1994) levantou a hipótese de que o *M. perniciosa* tenha desenvolvido uma estratégia para colonizar oportunisticamente o tecido hospedeiro vivo, na ausência de concorrência com outros saprofíticos, eventualmente causando a morte do tecido para maximizar os seus recursos de exploração. O biótipo-L é saprófito e infecta liana sem induzir sintomas, como um endófito ou como uma infecção latente, esperando a morte do tecido (GRIFFITH; HEDGER, 1994b). Sua colonização saprofiticamente da massa anexada contígua de restos de tecidos da copa da floresta (queda de cipós ou lianas ou contato físico direto entre eles) pode ser um mecanismo relevante de dispersão a curta distância (GRIFFITH et al., 1994; 2003). Há indicações que *M. perniciosa* seja mais competitivo em condições de

menor umidade (copa das árvores) do que no solo (GRIFFITH et al., 1994). Tem-se proposto que o *M. pernicioso* possa ser mais eficientemente adaptado na colonização de parte aérea (copa das árvores) com detritos, vulneráveis a grande variação de umidade nas florestas tropicais, mas sendo menos competitivo sob a elevada atividade de água encontrada no solo (GRIFFITH et al., 1994). Em áreas de floresta desmatada, o biótipo-L poderia suportar a ausência do hospedeiro, e produzir basidiocarpos a partir da remanescente colonização saprofítica de resíduos florestais (GRIFFITH; HEDGER, 1994b). Os biótipos -S e -C podem ter evoluído para infectar hospedeiros alternativos que ocorrem em áreas florestais perturbadas, considerados como invasores (ex. espécies de Solanáceas) ou em um hospedeiro susceptível com brotações meristemáticas induzidas pela condição perturbada (*Theobroma* e *Herrania*). Convencionalmente, considerou-se que *M. pernicioso* co-evoluiu com os hospedeiros *Theobroma* e *Herrania* na região do Alto Amazonas, onde ambos podem compartilhar um centro comum de diversidade (PURDY; SCHMIDT, 1996). Por outro lado, Griffith et al. (1994) propôs que o biótipo-C pode ter evoluído somente após o estabelecimento do cultivo de cacaueteiro (intencional ou não) por humanos. Densidade de árvores baixas e brotações restritas, floração e frutificação em condições naturais poderiam ter levado a propagação da infecção e a evolução da doença. Assim, corroborando com a hipótese descrita neste estudo, Griffith et al. (1994) também propõe que os biótipos -C e -S evoluíram de forma independente, possivelmente a partir de biótipo-L, a menos que existam outros biótipos não identificados, como apontado por Evans (2007). Uma das evidências da sequência de especiação é a redução do polimorfismo entre biótipos à medida que acontece a troca de hospedeiro e, neste estudo observou-se que o biótipo-L apresentou maior diversidade quando comparado aos demais biótipos, principalmente ao biótipo-C, indicando mais uma vez, que o biótipo-L pode ter dado origem aos biótipos -C e -S. A evolução dos biótipos de *M. pernicioso* pode ocorrer por especiação no sentido de que ao colonizar um novo hospedeiro, o isolado se especializa neste e precisa ser homotálico para ali se manter, isto é, a especiação causa uma restrição genética. O biótipo-C apresenta menor variabilidade genética que o biótipo-S, pois pode ter se especializado para um determinado hospedeiro mais recentemente e ainda não teve tempo para acumular diferentes alelos para um mesmo loco, como verificado no biótipo-S.

Devido à grande extensão da área de coleta dos isolados do biótipo-C analisados neste estudo, foi realizada uma divisão destes em sete populações. A divisão em populações foi feita a partir de informações da estrutura genética espacial utilizando o coeficiente de coancestria, visando facilitar a interpretação da dispersão, no entanto, essas populações não

refletem exatamente áreas isoladas geograficamente ou sem ação antrópica, já que não se pode prever ou se ter um histórico de todos os movimentos migratórios e de dispersão do cacau e consequentemente do *M. pernicioso* nessas regiões. As populações que apresentaram maior número de indivíduos com genótipos idênticos, com percentuais acima de 50% do número total de genótipos foram as populações de Rondônia e Bahia; que correspondem a regiões produtoras de cacau. As populações de Pará Central (Região Transamazônica) e Leste do Amazonas também apresentaram percentuais altos de genótipos idênticos e correspondem a áreas de introdução do cacau, e consequentemente do fitopatógeno.

Entre as populações do biótipo-C, a que apresentou a maior diversidade genotípica foi a do Acre, seguida pelo Oeste do Amazonas, ambas correspondem a áreas em que se encontra cacaueiro nativo no Brasil. Essas regiões provavelmente abrigam o centro de diversidade de *T. cacao* (MOTAMAYOR et al., 2008; SERENO et al., 2006). A maior diversidade gênica foi observada na população Pará – Baixo Amazonas, seguida por Acre e Bahia. No entanto, a população da Bahia apresentou a menor diversidade genotípica. A Bahia corresponde a uma área onde a presença de *M. pernicioso* foi registrada mais recentemente, no final da década de 1980 (PEREIRA et al., 1996). A estrutura genética de populações de isolados do biótipo-C de *M. pernicioso* pode resultar da combinação de fatores como a baixa diversidade genética nas áreas de cultivo de seu hospedeiro, reduzido nível de recombinação e fluxo gênico muito limitado com uma dispersão recente do patógeno por movimentos ocasionais de material vegetal infectado.

Com os resultados obtidos a partir das análises com o *GeneClass2*, é possível inferir sobre a origem dos isolados de *M. pernicioso*, presentes em áreas de introdução do cacaueiro. Os genótipos multilocos do biótipo-C das populações do Pará (Região Transamazônica e Baixo Amazonas), apresenta maior similaridade genética e, portanto, parecem ter maior similaridade e parentesco com isolados das regiões do Acre e Rondônia e também do Oeste do Amazonas (Alto Solimões). Os genótipos multilocos da população Leste do Amazonas têm maior similaridade e parecem derivar de populações do Acre e de Rondônia. Esses dados sugerem que os isolados do biótipo-C presentes nas regiões de cultivo e introdução do cacaueiro na região norte do Brasil tiveram origem nas regiões do Acre e Rondônia e também no Oeste do Amazonas (Alto Solimões). Os estados do Acre, Rondônia e a região Oeste do Amazonas situam-se na região que contém o centro de diversidade de *T. cacao* (MOTAMAYOR et al., 2008; SERENO et al., 2006) e, correspondem ainda a locais onde o cacaueiro é encontrado naturalmente no Brasil. Rondônia, Pará e Bahia correspondem aos locais de maior produção de cacau no Brasil, não devendo ser rara ao longo do tempo a troca

de material vegetal. Quando realizada a análise com o *GeneClass2* nas populações do Acre, Rondônia e Oeste do Amazonas (Alto Solimões), estes indicaram ter maior similaridade as outras regiões, como Leste do Amazonas, populações do Pará e Bahia, esses fatos corroboram as análises descritas anteriormente.

O cacauzeiro é uma espécie nativa da floresta Amazônica, que foi levado para cultivo na Bahia no século XVIII. Em 1989, surgiram os primeiros relatos da ocorrência do fungo *M. pernicioso* em plantas de cacauzeiro na Bahia (PEREIRA et al., 1996). Os primeiros surtos de vassoura-de-bruxa na Bahia foram relatados no mesmo ano (1989), com dois focos distintos da doença, nos municípios de Uruçuca e Camacan, separados por uma distância de 100 Km; indicando que houve a introdução de duas ou mais fontes da doença (PEREIRA et al., 1996). A avaliação da variabilidade genética com marcadores microssatélites e análises com o *GeneClass2* e *Structure* foram coincidentes e identificaram duas possíveis origens para os sete genótipos multilocos de municípios produtores de cacau no sul da Bahia. De acordo com esses dados, os genótipos de *M. pernicioso* presentes na Bahia, seriam provenientes de Ji-Paraná (Rondônia) e Alenquer (Pará). Esses dados corroboram outros estudos que também sugeriram a presença de duas fontes distintas ou de origens diferentes de inóculo de *M. pernicioso* na Bahia. A possibilidade de ter acontecido duas introduções independentes no sul da Bahia foi corroborada com o uso de marcadores RAPD (ANDEBRHAN et al., 1999), por cariotipagem em gel eletroforese em campo pulsado (PFGE), com polimorfismo para comprimento de cromossomos, e correlacionado com dados de amplificação de sequências teloméricas (RINCONES et al., 2003) e análise por AFLP (PLOETZ et al., 2005).

6.2 Avaliação de resistência de progênies e genótipos de *T. cacao*

Os acessos de *T. cacao* descritos como ‘Scavina 6’ (‘SCA 6’) e ‘Scavina 12’ (‘SCA 12’), foram originalmente coletados no Peru (BARTLEY, 2005) e caracterizados como fonte de resistência ao *M. pernicioso* em Trinidad na década de 1950. ‘SCA 6’ foi por muito tempo considerada a única fonte de resistência e amplamente utilizada em programas de melhoramento do cacau, no entanto, esta resistência foi superada no Equador, Peru e na Amazônia Brasileira após alguns anos de sua introdução (BARTLEY, 1986). De 1976 a 1991 foi realizada uma coleta sistemática pelo governo brasileiro para se obter uma representação da diversidade genética de cacau de toda a Amazônia Brasileira (ALMEIDA et al., 1995;.

SERENO et al., 2006). Assim, uma coleção de germoplasma foi estabelecida pela CEPLAC na Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH), em Marituba, PA com acessos registrados como ‘Cacau da Amazônia Brasileira’ ou ‘CAB’. Esses acessos incluem representantes de 36 bacias hidrográficas das 186 bacias da Amazônia Brasileira, levando a partir da avaliação de acessos CAB, a identificação de novas fontes de resistência a vassoura-de-bruxa como ‘CAB 214’, ‘CAB 208’ e ‘CAB 270’ (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Na avaliação de progênies dos cruzamentos ‘PA 195 x CAB 214’; ‘PA 195 x SCA 6’ e ‘PA 195 x ICS 39’, mudas de cada progênie foram inoculadas com uma suspensão de basidiósporos de um isolado de *M. pernicioso* de Belém, PA nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos por mL^{-1} . Os genótipos ‘PA 195’ e ‘ICS 39’ são considerados suscetíveis a vassoura-de-bruxa, enquanto que ‘SCA 6’ apresenta uma reação intermediária e ‘CAB 214’ seria resistente ao patógeno. Neste ensaio, verificou-se que a concentração de inóculo teve uma relação direta com o número de plântulas com sintomas. Foi observado um aumento no número de plântulas com sintomas combinado com o aumento na concentração do inóculo, ocorrendo em todas as progênies avaliadas. Foi possível observar ainda que quando realizada a calibração correta da concentração do inóculo era possível distinguir os diferentes níveis de resistência de cacauzeiro a *M. pernicioso*, ficando nítida a distinção entre os níveis de resistência nas progênies de ‘PA 195 x CAB 214’ (resistente), ‘PA 195 x SCA 6’ (intermediária) e ‘PA 195 x ICS 39’ (suscetível). Assim, pode-se sugerir que a combinação do isolado de *M. pernicioso* de Belém, PA com progênies de ‘CAB 214’, ‘SCA 6’ e ‘ICS 39’ refere-se a uma resistência quantitativa ou horizontal, em que a concentração de inóculo interage diretamente com o nível de resistência das progênies de cacauzeiro.

A concentração do inóculo teve um efeito direto sobre os níveis de resistência, demonstrando que um mesmo isolado pode provocar diferentes respostas em uma determinada variedade (clone) de cacauzeiro quanto à resistência, bastando para isso alterar a concentração do inóculo. Neste ensaio, a progênie resistente ‘PA 195 x CAB 214’ apresentou alto nível de resistência para as concentrações do inóculo de 10^4 e 10^5 , no entanto para 10^6 esta resistência começa a ser superada. A concentração do inóculo parece ser determinante para a manifestação dos sintomas, já que é notável o aumento de plântulas com sintomas à medida que aumenta a concentração de basidiósporos. Num estudo anterior, o genótipo ‘CAB 214’ também foi capaz de transmitir altos níveis de resistência à *M. pernicioso* para a progênie, mesmo quando cruzado com genótipos altamente suscetíveis, como ‘ICS 39’ ou ‘PA 195’, sugerindo dominância (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Na progênie ‘PA 195 x SCA 6’, cuja resistência tem características de nível intermediário, essa resistência só se manifestou na concentração mais baixa de inóculo, isto é, em 10^4 . Para as concentrações do inóculo de 10^5 e 10^6 a resistência foi superada. Relacionado esses dados obtidos em casa de vegetação com aqueles descritos em campo, observa-se que os descendentes de ‘SCA 6’ podem ter sua resistência superada quando a doença atinge níveis epidêmicos (altas concentrações do inóculo) como ocorreu no Equador, Peru, Amazônia Brasileira (BARTLEY, 1986) e mais recentemente no Sul da Bahia (PEREIRA et al., 1996), corroborando com a hipótese deste ensaio que indica que a concentração do inóculo interfere no nível de resistência. Na progênie formada pelos dois genótipos suscetíveis, ‘PA 195 x ICS 39’, verificou-se que a resistência não se manifesta em nenhuma das concentrações de inóculo testadas. Desta forma, a quebra de resistência observada em áreas de cultivo como no Sul da Bahia, atribuída geralmente a variabilidade genética do *M. pernicioso* pode não estar correta, o que pode estar ocorrendo é que o nível de inóculo da região Sul da Bahia seja tão alto que as variedades logo perdem a resistência, por se basearem em fontes intermediárias de resistência como o ‘SCA 6’.

Foram conduzidos ensaios de inoculação artificial a partir de alguns isolados avaliados com o uso de marcadores microssatélites e genes associados à virulência e patogenicidade, que neste ensaio demonstraram claramente um comportamento diferenciado para agressividade a três genótipos de cacaueteiro distintos quanto a resistência a *M. pernicioso*. Os isolados avaliados foram Tabatinga, AM e Marechal Thaumaturgo, AC. Clones para os genótipos descritos como resistentes ‘CAB 214’ e ‘CAB 270’ (ALBUQUERQUE et al., 2010), e também para o suscetível ‘PA 195’ foram inoculados com uma suspensão de basidiósporos nas concentrações de 10^5 e 10^6 esporos por mL⁻¹. O genótipo de *T. cacao* ‘CAB 214’ é proveniente do Amazonas da bacia do rio Purus, já o genótipo ‘CAB 270’ é de Tefé, AM e foi coletado na bacia do rio Solimões (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Nos três genótipos de *T. cacao* analisados, a proporção de plântulas com sintomas foi superior quando inoculadas com o isolado de Tabatinga, AM, enquanto que nenhuma plântula do genótipo ‘CAB 214’ apresentou sintomas quando inoculada com o isolado de Marechal Thaumaturgo, AC. O genótipo ‘CAB 214’ apresentou ainda a menor proporção de plântulas com sintomas em ambas as concentrações de inóculo. ‘CAB 270’ apresentou resultados parecidos aos identificados para o genótipo suscetível ‘PA 195’, o que foi demonstrado na análise estatística com o valor da *OR* próximo a 1, indicando que não há diferença entre os tratamentos, isto é, os dois genótipos não diferem na geração de sintomas. A concentração do

inóculo não foi considerada nas análises seguintes já que o fator *Concentração* não foi significativo neste experimento.

‘CAB 270’ demonstrou 11 vezes mais chance de produzir sintomas quando comparado com o genótipo ‘CAB 214’. O genótipo ‘PA 195’ apresentou 8 vezes mais chance de produzir sintomas que o genótipo ‘CAB 214’ para os dois inóculos. O desempenho superior de ‘CAB 214’ em termos de infecção reduzida e desenvolvimento de sintomas foram confirmados durante nove anos de avaliação em condições de campo na Bahia (ALBUQUERQUE et al., 2010). O genótipo ‘CAB 270’ não apresentou resistência para os isolados testados, embora tivesse sido descrito como resistente em experimentos em casa de vegetação no Pará e condições de campo na Bahia (ALBUQUERQUE et al., 2010). No entanto, é necessário considerar que todos os dados deste estudo foram obtidos em casa de vegetação e refletem a agressividade de isolados resultando na incidência de plântulas doentes e não necessariamente a severidade desses no campo, além disso, os isolados testados neste ensaio podem não refletir exatamente a agressividade daqueles utilizados nos experimentos anteriores.

Na comparação entre os dois inóculos, a chance de produzir sintomas pelo inóculo de Tabatinga, AM foi 3,5 vezes maior quando comparado com o inóculo de Marechal Thaumaturgo, AC. Foi identificado um comportamento diferenciado para os isolados de Tabatinga, AM e Marechal Thaumaturgo, AC em outras análises. Com o uso de microsatélites, Tabatinga, AM e Marechal Thaumaturgo, AC foram identificados em grupos distintos com o *Structure*, e com o *GeneClass2*. O isolado de Marechal Thaumaturgo, AC demonstrou ter maior similaridade com um de Ji-Paraná, RO; enquanto que Tabatinga, AM apresentou maior similaridade com um isolado de Alenquer, PA. De acordo com o *GeneClass2*, esses isolados de Ji-Paraná, RO e Alenquer, PA seriam as duas fontes dos inóculos de *M. perniciosus* presentes nos municípios produtores de cacau no sul da Bahia, indicando a presença na Bahia de isolados com comportamento diferenciado para agressividade.

Foi observada uma interação específica entre isolados e genótipos de cacaueiro, com variação na resposta de resistência. Dos materiais de cacaueiro testados o que apresentou uma reação diferenciada para os isolados de *M. perniciosus* foi o ‘CAB 214’, para o qual nenhuma plântula apresentou sintomas quando inoculada com o isolado de Marechal Thaumaturgo, AC. É possível que os isolados de Marechal Thaumaturgo, AC e Tabatinga, AM pertençam a raças fisiológicas diferentes do patógeno, isto é, apresentem diferentes níveis de agressividade. Isso indica a ocorrência de resistência vertical ou completa, já que mesmo na concentração de 10^6

esporos por mL⁻¹ o isolado do Acre não foi capaz de causar infecções no genótipo ‘CAB 214’. A agressividade do isolado de *M. perniciosa* de Tabatinga, AM em relação ao de Marechal Thaumaturgo, AC parece ser maior, já que na concentração de 10⁵ o isolado de Tabatinga, AM causou mais infecções que o de Marechal Thaumaturgo, AC na concentração de 10⁶, tanto no clone ‘CAB 270’ quanto no ‘PA 195’, o que indica neste caso a ocorrência de resistência horizontal.

Nesse experimento foi testada a agressividade dos isolados em genótipos de cacaueiros com diferentes níveis de resistência, verificando claramente que a procedência dos inóculos, que demonstraram nas análises moleculares serem geneticamente distintos, interferiu significativamente na manifestação do nível de resistência dos clones testados. O isolado de Tabatinga, AM foi muito mais agressivo que o de Marechal Thaumaturgo, AC, sendo capaz de gerar maior incidência de plântulas doentes que o primeiro em todos os genótipos testados, indicando que a diferença genética dos isolados avaliados, detectada por marcadores microssatélites, também está acompanhada de uma diferença de agressividade. Diferenças entre isolados de *M. perniciosa* quanto à capacidade de provocar sintomas foram detectadas em outros estudos. Wheeler e Mepsted (1988) concluíram que o biótipo-C poderia ser classificado em dois grupos principais de acordo com a capacidade de provocar sintomas em progênies de ‘SCA 6’. Isolados de cacaueiros cultivados no Equador, Bolívia, e na maior parte da Colômbia causavam reações severas nas progênies de ‘SCA 6’, enquanto que isolados de cacaueiros cultivados no Brasil, Trinidad e Venezuela induziam reações restritas no mesmo tipo de inoculação. Isolados do Equador, principalmente da região oriental, apresentavam a maior diversidade para patogenicidade (WHEELER; MEPSTED, 1988). Estudos de compatibilidade somática usando os mesmos isolados distinguiram seis grupos, consistentes com a classificação de acordo com a reação do hospedeiro (McGEARY; WHEELER, 1988). A separação entre isolados do Equador e Colômbia, e do Brasil, Venezuela e Trinidad foi corroborada por análises empregando marcadores RAPD (T. Andebrahn e D. Furtek, não publicado). Num estudo recente, ‘SCA 6’ demonstrou uma interação específica, com variação na resposta de resistência em relação a diversos isolados (SHAW; VANDENBON, 2007).

6.3 Expressão de genes associados à virulência e patogenicidade em condições de estresse abiótico

Foi analisada a diversidade genética por microssatélites de uma amostra representativa de isolados de *M. pernicioso* da Amazônia Brasileira, de forma a classificá-los e empregar representantes de grupos distintos na expressão *in vitro* de genes candidatos presumíveis de virulência e patogenicidade identificados no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP (LEAL Jr., 2006; LEAL Jr. et al., 2010), expressos em condições indutoras (estresse de N e fotoperíodo) e na inoculação de genótipos de *T.cacao* diferenciais ao patógeno, de forma a buscar a associação entre diversidade e agressividade. A expressão *in vitro* desses genes candidatos também poderá ser utilizada no futuro como marca para relação com a característica de agressividade manifestada em ensaios de avaliação de resistência em casa de vegetação ou no campo.

Os genes de patogenicidade podem ser induzidos pela limitada disponibilidade de N, enquanto que a produção de fitotoxinas pode ser estimulada pela limitação de nutrientes e/ou luz (EHRENSHAFT; UPCHURCH, 1991; ACKERVEKEN et al., 1994; BOLTON; THOMMA, 2008). Em diversas espécies de fungos, os genes de patogenicidade foram descritos sendo mais expressos quando o micélio foi cultivado *in vitro* sob limitação de N (BOLTON; THOMMA, 2008). Esse fato corrobora com a hipótese de que o ambiente do hospedeiro inicialmente colonizado por patógenos pode ser privado de N (BOLTON; THOMMA, 2008), ou de alguns aminoácidos essenciais (SOLOMON et al., 2003), funcionando como um estímulo para a indução de genes de patogenicidade *in planta*. Esse método já foi utilizado na identificação de genes candidatos de patogenicidade em vários fitopatógenos, incluindo *Gibberella zeae* (TRAIL et al., 2003), *Magnaporthe grisea* (DONOFRIO et al., 2006) e *Moniliophthora pernicioso* (LEAL Jr. et al., 2010).

Foi observado um crescimento mais lento na maioria dos isolados cultivados em carência de N. Em isolados crescidos no meio com carência de N, as hifas e meios foram completamente corados com um pigmento vermelho. A liberação do pigmento iniciou-se entre o 5º e 10º dia de cultivo, intensificando-se até o 30º dia. A produção desse pigmento foi descrita anteriormente como indicativo de uma condição mais estressante para o *M. pernicioso*, ocorrendo apenas na condição de carência de N (LEAL Jr. et al., 2010). Este fato foi confirmado no presente experimento, tendo todos os isolados liberado uma pigmentação vermelha sob carência de N, com destaque para os isolados Ji-Paraná, RO; Itapebi, BA; e

também para ambos os isolados do Acre, Marechal Thaumaturgo e Assis Brasil. Essa liberação de pigmentos no cultivo em carência de N indica a ativação do metabolismo secundário do fitopatógeno (YU; KELLER, 2005). Leal Jr. (2006) descreveu que as sequências obtidas na biblioteca de genes induzidos em cultivo sob a carência de N em *M. pernicioso*, sugerem a ativação do metabolismo secundário pela via do ácido chiquímico, associado à síntese de alguns pigmentos e/ou toxinas em basidiomicetos (GILL, 2001). O pigmento liberado pelo fungo foi hipotetizado como sendo uma toxina secretada pelo micélio (LEAL Jr., 2006) que poderia estar envolvida na morte do tecido vegetal para transformação do micélio em saprotrófico. A mudança de fase em *M. pernicioso* possivelmente ocorre ainda no período anterior a morte dos tecidos. Assim, há a intensificação do metabolismo secundário pelo fungo, que o protege do ataque da planta e favorece a colonização do hospedeiro com provável participação na indução de sintomas (LEAL Jr., 2006).

Os genes *88KD* e *Aspf13* são homólogos presumíveis a dois genes codificadores de proteínas alergênicas, um no ascomiceto *Cochliobolus lunatus* e outro no basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* (HUANG et al., 2002). O gene putativo *88KD* compartilha similaridade com uma proteína alergênica de *C. neoformans*, uma mano-proteína da parede celular de fungos, caracterizada por induzir resposta de defesa em seres humanos (HUANG et al., 2002). Dos treze genes avaliados, o gene *88KD* foi o que demonstrou o maior número de transcritos para a maioria dos isolados analisados sendo interessante sua utilização em futuros estudos. No momento, estão sendo conduzidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP, estudos envolvendo a clonagem do gene *88KD* de *M. pernicioso*, para expressão heteróloga em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* para ensaios de atividade biológica em cacaueiro e tomateiro.

Os isolados de Cacaupônia, RO; Ji-Paraná, RO; Itapebi, BA e Mocajuba, PA apresentaram os maiores números de transcritos para o gene *88KD*, por outro lado, Marechal Thaumaturgo, AC; Tabatinga, AM e Óbidos, PA apresentaram os menores números. Os isolados de Tabatinga, AM e Óbidos, PA foram identificados num grupo diferente dos demais isolados citados acima, na análise com locos de microssatélites. Na mesma análise, os isolados ou seus representantes (genótipos multilocos) de Cacaupônia, RO; Ji-Paraná, RO; Itapebi, BA; Mocajuba, PA e Marechal Thaumaturgo, AC encontram-se no mesmo grupo, o que demonstra haver similaridade entre estes. No entanto, na análise com os biótipos -L e -S é possível verificar que o isolado de Marechal Thaumaturgo, AC compartilha parte de seus alelos para os locos de microssatélites com isolados do biótipo-L, característica que o diferencia dos demais isolados do biótipo-C.

O gene *Aspf13* compartilha similaridades com outras proteínas descritas em ascomicetos patogênicos de plantas, com um tamanho médio de 120 aminoácidos, contendo quatro cisteínas, e altamente produzidas *in vitro* (HALL et al., 1999). A função geral desta classe de proteínas durante a patogênese ainda não foi estabelecida, mas há evidências de seu papel na resposta de defesa em *Platanus acerifolia* (PAZZAGLI et al., 1999), contribuindo para a adesão de fungos em superfícies ou contato com a célula hospedeira (HALL et al., 1999). O *Aspf13* é uma proteína alergênica similar a SnodProt que corresponde a uma proteína extracelular secretada pelo fungo *Stagonospora nodorum*, patógeno de trigo (HALL et al., 1999), e ambas são consideradas como membros da “família cerato-platanina” devido a alta similaridade de suas sequências (ZAPAROLI et al., 2009). Em *M. pernicioso* já foram identificadas cinco sequências em seu genoma que codificam proteínas putativas semelhantes à cerato-platanina, sendo ao menos três desses genes expressos (ZAPAROLI et al., 2009). Dois desses genes foram mais expressos em micélios na fase biotrófico, servindo como elicitores do sistema de defesa em plantas, e um destes foi capaz de induzir necrose *in vitro* em folhas de tabaco e cacau (ZAPAROLI et al., 2009). Na análise da expressão do gene *Aspf13*, a maioria dos isolados apresentou indução da expressão em 15 d, tendo uma redução no número de transcritos, isto é, repressão desse gene em 30 d.

A cerato-platanina é uma proteína isolada inicialmente por PAZZAGLI et al. (1999) a partir do ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, o agente causal do cancro em espécies de *Platanus*; e indicada como a fundadora da “família cerato-platanina” que inclui outras várias proteínas secretadas por fungos ascomicetos e os basidiomicetos. *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* infecta ainda uma grande variedade de plantas incluindo *Theobroma cacao*, *Coffea arabica*, *Hevea brasiliensis*, entre outras (HARRINGTON, 2000; BAKER et al., 2003). A cerato-platanina induz reações estruturais e fisiológicas relacionadas com respostas de defesa em plantas hospedeiras e não hospedeiras do fungo, provocando plasmólise celular, morte celular programada, a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e compostos fenólicos, resistência localizada e superexpressão de genes relacionados com a defesa (PAZZAGLI et al., 1999; SCALA et al., 2004; BENNICI et al., 2005; FONTANA et al., 2008; LOMBARDI et al., 2010).

O gene da cerato-platanina de *M. pernicioso* foi identificado em projetos de sequenciamento (ZAPAROLI et al., 2009) e como um gene putativo de patogenicidade (LEAL Jr. et al., 2010). Iniciadores específicos para amplificar o gene completo da cerato-platanina foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP, para produzir um fragmento de aproximadamente 500 pb (G. A. Leal Jr., dados não publicados).

Na amplificação do gene, todos os isolados aparentemente apresentavam um fragmento de igual tamanho (~500 pb), no entanto, no sequenciamento de isolados dos biótipos –C e –S foi possível verificar cinco polimorfismos de bases únicas (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) e uma região com uma inserção de cinco bases no isolado 65 de Marechal Thaumaturgo, AC do biótipo-C. Assim, parecia que o polimorfismo seria entre biótipos. No entanto, na digestão desse fragmento verificou-se que esse polimorfismo só acontecia em três isolados do Acre e outros dois de cupuaçu, não sendo identificado nenhum outro polimorfismo entre biótipos.

P450, *VersSint*, *AK*, *PenicSynt* e *Oxireduc* são genes potenciais para produção de toxinas ou pigmentos. Genes do citocromo *P450* estão presentes em fungos necrotróficos (ELLWOOD et al., 2010; LÉVESQUE et al., 2010) e participam do metabolismo secundário, essencial para a produção de toxinas em fungos, bem como a desintoxicação de fitoalexinas produzidas pelo hospedeiro (SIEWERS et al., 2006). A Versicolorin B sintase (*VersSint*) é uma enzima que catalisa a reação de biossíntese de aflotoxinas em *Aspergillus parasiticus* (CHIOU et al., 2004). No fungo filamentoso *Alternaria alternata*, um gene da família Aldoceto Redutase (*AK*) foi associado com a produção de toxinas (ITO et al., 2004). A Isopenicilina N sintase (*PenicSynt*) atua como enzima catalizadora na produção da penicilina (GIDIJALA et al., 2008). A enzima O-metilesterigmatocistina oxidoreductase (*Oxireduc*) atua na formação de aflatoxinas e faz parte da família do citocromo *P450* (PRIETO; WOLOSHUK, 1997). Na análise desses genes o isolado de Mocajuba, PA (24) se destacou entre os demais com um número de transcritos relativamente alto para esses cinco genes, quando comparado aos demais isolados. Os genes *VersSint* e *AK* foram mais expressos em 30 d, o que coincide com a intensificação na liberação do pigmento vermelho no meio e hifas no cultivo em carência de N, indicando a ativação do metabolismo secundário do fitopatógeno (YU; KELLER, 2005) possivelmente pela via do ácido chiquímico, que é associado a produção de alguns pigmentos e/ou toxinas em basidiomicetos (GILL, 2001).

Os genes *AS*, *Ich* e *GAL4* estão relacionados com mudança de fase durante o ciclo de vida em fungos. A Aril-sulfatase (*AS*) de *Colletotrichum gloeosporioides* foi induzida durante a fase biotrófica na interação com *Malva pusilla*, enquanto diminui a expressão durante a fase necrotrófica (GOODWIN et al., 2000). *Ich* é um gene essencial para a formação de basidiocarpos (MURAGUCHI; KAMADA, 1998). Uma proteína homóloga a família de proteínas *GAL4*, foi identificada na alternância das fases biotrófica e necrotrófica no processo de infecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (DUFRESNE et al., 2000). Nos genes *AS* e *GAL4* os maiores números de transcritos foram identificados no tempo de 30 d,

quando a liberação de pigmento no meio é mais intensa. Esse pigmento liberado pelo fungo foi hipotetizado como sendo uma toxina secretada pelo micélio (LEAL Jr., 2006) que poderia estar envolvida na morte do tecido vegetal para transformação do micélio de biotrófico em necrotrófico.

Os genes *AAO*, *Perox* e *PAL* não têm uma função claramente definida, no entanto, possuem algumas informações pertinentes. Aril-Álcool Oxidase (*AAO*) foi identificado como um putativo fator da patogenicidade em *Cladosporium fulvum*, já que mutantes desse fungo deficientes em *AAO* tiveram sua patogenicidade muito reduzida (SEGERS et al., 2001). Atualmente, o papel da *AAO* na patogenicidade ainda não está claro. Em geral, esta enzima catalisa a conversão de etanol ou metanol em peróxido de hidrogênio e acetaldeído ou formaldeído, respectivamente. A contribuição para a patogenicidade pode ser devido à sua contribuição para o metabolismo de carbono, a remoção de (m)etanol presente nas folhas de tomate, ou a produção de peróxido de hidrogênio (SEGERS et al., 2001). A função da Fenilalanina amônio-liase (*PAL*) em fungos é ainda desconhecida, mas sua expressão foi detectada no micélio na rede de Hartig da interação micorriza *Amanita muscaris* x *Picea abis* (NEHLS et al., 1999). Emiliani et al. (2009) encontraram evidências de que os ancestrais de plantas terrestres adquiriram uma enzima *PAL* via transferência horizontal de genes por simbiose com bactérias do solo e fungos, visando possivelmente defesa contra uma comunidade microbiana já desenvolvida e/ou proteção contra os raios UV; sendo interessante descobrir que os fungos também usam a enzima *PAL* para esses fins. Para o gene *AAO* foram observados maiores números de transcritos em 15 d, já o gene *Perox* foi mais expresso aos 30 d. Nas condições avaliadas, quase todos os isolados apresentaram repressão do gene *PAL*.

Desconsiderando as diferenças dos tempos de coleta do micélio, isolados oriundos do Pará e Bahia apresentaram maior expressão quando comparados aos demais isolados, para cinco e três, respectivamente; dos treze genes avaliados. Pará e Bahia correspondem aos principais locais de cultivo de cacau no Brasil. Entre os dez isolados analisados os que apresentaram uma mesma tendência em seus genes mais expressos foram os isolados de Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106), incluindo os genes *AAO* em 15 d, *VersSint* e *Perox* aos 30 d, e *AS* em ambos os tempos analisados. Esses isolados coincidentemente também apresentam repressão para as mesmas cinco condições (gene e tempo de coleta do micélio) testadas. Tabatinga, AM (96) e Óbidos, PA (106) apresentam repressão para o gene *PAL* em 15 e 30 d, *Perox* em 15 d, e para os genes *Aspf13* e *P450* em 30 d. Para o gene *88KD*, Tabatinga, AM; Óbidos, PA e também Marechal Thaumaturgo, AC apresentaram os menores números de transcritos. Apesar de possuírem origens geográficas distintas, esses isolados

foram identificados no mesmo grupo na análise com locos de microssatélites. Baseado na análise conduzida no *GeneClass2*, o isolado de Óbidos, PA (106), apresentou alta similaridade com o isolado de Atalaia do Norte, AM (105), que assim como o isolado de Tabatinga, AM (96), pertencem a população do Oeste do Amazonas (Alto Solimões).

É necessário considerar que a disponibilidade desigual de luz também pode ser um fator de estresse que contribui para a expressão dos genes potencialmente associados à patogenicidade (EHRENSHAFT; UPCHURCH, 1991), e é um fator de difícil controle na condução do experimento, já que os isolados foram cultivados em uma câmara incubadora com controle de temperatura e disponibilidade de luz, cuja fonte de luz se encontra na porta, não assegurando a distribuição igual para todas as placas do experimento que se encontram nas prateleiras, apesar de realizado um rodízio das placas rotineiramente.

Os genes *Aspf13* e *88KD*, presumíveis de patogenicidade, foram mais expressos em 15 d. O gene *88KD* foi o que se destacou demonstrando maior número de transcritos para isolados cultivados em carência de N, sendo dos genes estudados o candidato mais promissor a gene de patogenicidade em *M. pernicioso*. Assim, isolados de Cacaúlândia, RO; Ji-Paraná, RO; Itapebi, BA e Mocajuba, PA; que apresentaram maior expressão para o *88KD*, poderiam ser considerados os mais agressivos ou virulentos. A expressão dos genes *VersSint*, *AK*, *AS* e *GAL4* foi superior em 30 d, coincidindo com a intensificação na liberação do pigmento vermelho no meio em carência de N, fortalecendo a possibilidade desse pigmento liberado pelo fungo ser uma toxina secretada pelo micélio que pode estar envolvida na morte do tecido vegetal para transformação do micélio de biotrófico em necrotrófico. Os genes que possivelmente devem estar envolvidos na produção de pigmentos ou toxinas que levariam a morte do tecido vegetal seriam *VersSint* e *AK*, enquanto que os genes *AS* e *GAL4* estariam relacionados com a mudança de fase de biotrófica para necrotrófica.

A análise da diversidade genética de isolados do biótipo-C de *M. pernicioso* com locos de microssatélites permitiu a separação destes, com análises distintas, em dois grupos. Os ensaios demonstraram claramente diferenças entre isolados no que se refere à expressão dos genes analisados sob carência de N. Essas diferenças sugerem que pode haver distinções na agressividade entre esses isolados. Diferenças entre isolados de *M. pernicioso* quanto à capacidade de provocar sintomas também foram detectados no experimento de avaliação de resistência, com a inoculação em acessos de *Theobroma cacao*, que diferem quanto ao grau de resistência ao fitopatógeno. Neste ensaio, os dois isolados utilizados demonstraram claramente um comportamento diferenciado para agressividade a três genótipos de cacaueiro distintos quanto à resistência a *M. pernicioso*, demonstrando que a diferença genética dos

isolados avaliados, detectada por marcadores microssatélites, também está acompanhada de uma diferença de agressividade.

7 CONCLUSÕES

- A análise dos locos de microssatélites indica que os biótipos -C e -S apresentam maior similaridade genética com o biótipo-L do que entre si. O biótipo-C e também o -S que são aparentemente homotáticos evoluíram de um biótipo heterotático, como o biótipo-L. Uma das evidências da sequência de especiação é a redução do polimorfismo entre biótipos à medida que acontece a troca de hospedeiro e, neste estudo observou-se que os biótipos -C e -S exibem um nível de diversidade menor em comparação ao biótipo-L. Deste modo, sugere-se que a evolução dos biótipos -C e -S ocorreu de forma independente, possivelmente a partir do biótipo-L.

- A evolução dos biótipos de *M. pernicioso* pode ocorrer por especiação no sentido de que ao colonizar um novo hospedeiro, o isolado se especializa neste e precisa ser homotático para ali se manter, isto é, a especiação causa uma restrição genética. Esse fato justifica a menor diversidade gênica e genotípica encontrada principalmente nos genótipos do biótipo-C.

- A estrutura genética das populações do biótipo-C de *M. pernicioso* pode resultar da combinação de fatores como a baixa diversidade genética nas áreas de cultivo de seu hospedeiro, reduzido nível de recombinação e fluxo gênico muito limitado com uma dispersão recente do patógeno por movimentos ocasionais de material vegetal infectado.

- As populações do biótipo-C de *M. pernicioso* do estado do Pará e a população do Leste do Amazonas compartilham ancestrais comuns, que seriam provenientes de Ji-Paraná (Rondônia) ou Assis Brasil (Acre), enquanto que a região sob a influência do rio Amazonas (Baixo Amazonas) possui outra ascendência que seria em Atalaia do Norte (Oeste do Amazonas - Alto Solimões).

- A avaliação dos genótipos multilocos para determinar a origem dos genótipos de *M. pernicioso* encontrados na Bahia, por meio das semelhanças genéticas observadas para locos de microssatélites, identificou duas possíveis origens ou introdução de ao menos duas fontes de *M. pernicioso* possivelmente por intervenção humana acidental ou não na Bahia, que seriam provenientes de Ji-Paraná (Rondônia) e Alenquer (Pará).

- Na avaliação de agressividade de *M. pernicioso*, a concentração do inóculo foi determinante para a manifestação dos sintomas. Assim, a quebra de resistência observada em áreas de cultivo pode estar ocorrendo devido ao alto nível do inóculo, fazendo com que as variedades de cacau logo percam a resistência, por se basearem em fontes intermediárias de resistência como o 'SCA 6'.

- Na inoculação com isolados de *M. pernicioso* oriundos do Acre e Amazonas, a proporção de plântulas com sintomas foi superior quando inoculadas com o isolado de Tabatinga (Amazonas). Os isolados de Marechal Thaumaturgo (Acre) e Tabatinga (Amazonas) devem pertencer a raças fisiológicas diferentes do patógeno.

- Foi observada uma interação específica entre isolados e genótipos de cacaueiro, com variação na resposta de resistência. O genótipo de cacaueiro 'CAB 214' apresentou um desempenho superior em termos de infecção reduzida e desenvolvimento de sintomas.

- Na análise de treze genes de virulência e/ou patogenicidade induzidos pela limitada disponibilidade de N, o gene *88KD* foi o que se destacou demonstrando maior número de transcritos, sendo dos genes estudados o candidato mais promissor a gene de patogenicidade em *M. pernicioso*.

- Os genes que demonstraram expressão superior em 30 d, coincidindo com a intensificação na liberação do pigmento vermelho pelo micélio, e que possivelmente devem estar envolvidos na produção de pigmentos ou toxinas que levariam a morte do tecido vegetal seriam *VersSint* e *AK*, enquanto que os genes *AS* e *GAL4* estariam relacionados com a mudança de fase de biotrófica para necrotrófica.

- A diversidade genética de isolados do biótipo-C de *M. pernicioso* demonstrada por microsatélites também foi detectada com outras metodologias. Os ensaios demonstraram diferenças entre isolados no que se refere à expressão dos genes analisados sob carência de N, sugerindo haver distinções na agressividade entre os isolados. Isolados de *M. pernicioso* demonstraram um comportamento diferenciado para agressividade a três genótipos de cacaueiro distintos quanto à resistência a *M. pernicioso*, evidenciando que a diferença genética dos isolados avaliados, detectada por marcadores microsatélites, também está acompanhada de uma diferença de agressividade.

REFERÊNCIAS

- ACKERVEKEN, G. F. J. M.; DUNN, R. M.; COZIJNSEN, A. J.; VOSSEN, J. P. M. J.; BROEK, H. W. J.; WIT, P. J. G. M. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *Avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular Genomics and Genetics**, Berlin, v. 243, p. 277–285, 1994.
- ADMASSU, B.; FRIEDT, W.; ORDON, F. Genetic characterization of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* populations from Ethiopia by SSRs. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 158, p. 806-812, 2010.
- AGAPOW, P. M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, p. 101-102, 2001.
- 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**, Lancaster, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associadas à resistência a *Crinipellis pernicios* em acessos de cacau (Theobroma cacao) originários da Amazônia Brasileira**. 2006. 133 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ALBUQUERQUE, P. S. B.; BASTOS, C. N.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Doenças do cacau. **Doenças do cacau**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds). Manual de Fitopatologia. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. v. 2, cap. 18, p. 151-164.
- ALBUQUERQUE, P. S. B.; SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; VIEIRA, A. M. C.; DEMÉTRIO, C. G. B.; PASCHOLATTI, S. F.; FIGUEIRA, A. Novel sources of witches broom resistance (causal agent *Moniliophthora pernicios*) from natural populations of *Theobroma cacao* from the Brazilian Amazon. **Euphytica**, Wageningen, v. 172, p. 125-138, 2010.
- ALMEIDA, C. M. V. C.; MACHADO, P. F. R.; BARRIGA, J. P.; SILVA, F. C. O. **Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia Brasileira: uma abordagem histórica e analítica**. Porto Velho: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária/Ceplac, 1995. 92 p.
- 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**, St. Louis, v. 86, n. 10, p. 1474–1486. 1999.
- ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics and Genomics**, New York, v. 3, p. 289-298, 2007.

ANDERBRHAN 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, p. 167-175, 1999.

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

ARRUDA, M. C. C.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brasil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 236-244, 2003a.

ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 25-37, 2003b.

ARRUDA, M. C. C.; SEPULVEDA, C. G. F.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTIAGO, D. V. R.; RESENDE, M. L. V.; DIANESE, J. C.; FELIPE, M. S. S. *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1348-1361, 2005.

AVENOT, H.; DONGO, A.; BATAILLE-SIMONEAU, N.; IACOMI-VASILESCU, B.; HAMON, B.; PELTIER, D.; SIMONEAU, P. Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 948-950, 2005.

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1274-1284, 2003.

BAKER, R. E. D.; CROWDY, H. Studies in the witches' broom disease of cacao caused by *Marasmius perniciosus* Stahel. Part 1: Introduction, symptoms and etiology. **Imperial College of Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 7, p. 18-20. 1943.

BAKER, R. E. D.; HOLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius pernicioso* Stahel). **Phytopathological Paper**, London, v. 2, p. 42, 1957.

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

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

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

- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicios*a (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, London, v. 34, p. 306-312, 1985.
- BASTOS, C. N.; FONSECA, S. E. A.; MELO, W. F. *Mascagnia cf. sepium*, native liana of the Brazilian Amazon, as host of *Crinipellis pernicios*a. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 504, 1998.
- BENNICI, A.; CALAMASSI, R.; PAZZAGLI, L.; COMPARINI, C.; SCHIFF, S.; BOVELLI, R.; MORI, B.; TANI, C.; SCALA, A. Cytological and ultrastructural responses of *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. leaves to cerato-platanin, a protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 44, p. 153–161, 2005.
- BOGACKI, P.; KEIPER, F. J.; OLDACH, K. H. Genetic structure of South Australian *Pyrenophora teres* populations as revealed by microsatellite analyses. **Fungal Biology**, Orlando, v. 114, p. 834-841, 2010.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J. The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 104-110, 2008.
- BOUAJILA, A.; ABANG, M. M.; HAOUAS, S.; UDUPA, S.; REZGUI, S.; BAUM, M.; YAHYAOU, A. Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analyses. **Mycopathologia**, Amsterdam, v. 163, p. 281-294, 2007.
- BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R. D. The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, Saint Paul, doi: 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV, 2001.
- BROWN, A. H. D.; FELDMAN, M. W.; NEVO, E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. **Genetics**, Austin, v. 96, p. 523–536, 1980.
- CEITA, G. O.; MACEDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANN, L.; GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; MARIANO, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHANDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. G. A.; CASCARDO, J. C. M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicios*a. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, p. 106-117, 2007.
- CHAVES, F. C.; GIANFAGNA T. J. Necrotrophic phase of *Moniliophthora pernicios*a causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, p. 104-108, 2006.
- CHIOU, C. H.; LEE, L. W.; OWENS, S. A.; WHALLON, J. H.; KLOMPARENS, K. L.; TOWNSEND, C. A.; LINZ, J. E. Distribution and sub-cellular localization of the aflatoxin enzyme versicolorin B synthase in time-fractionated colonies of *Aspergillus parasiticus*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 182, p. 67-89, 2004.
- COLLET, D. **Modelling binary data**. 2. ed. New York: Chapman & Hall, 2003. 387 p.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

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

DONOFRIO, N. M.; OH, Y.; LUNDY, R.; PAN, H.; BROWN, D. E.; JEONG, J. S.; COUGHLAN, S.; MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 605-617, 2006.

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

DUFRESNE, M.; PERFECT, S.; PELLIER, A. L.; BAILEY, J. A.; LANGIN, T. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1579-1589, 2000.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; BARRE'S, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 933-949, 2007.

DUTECH, C.; FABREGUETTES, O.; CAPDEVIELLE, X.; ROBIN, C. Multiple introductions of divergent genetic lineages in an invasive fungal pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in France. **Heredity**, London, v.105, p. 220-228, 2010.

EHRENSHAFT, M.; UPCHURCH, R. G. Isolation of light-enhanced cDNAs of *Cercospora kikuchii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2671-2676, 1991.

ELLWOOD, S. R.; LIU, Z.; SYME, R. A.; LAI, Z.; HANE, J. K.; KEIPER, F.; MOFFAT, C. S.; OLIVER, R. P.; FRIESEN, T. L. A first genome assembly of the barley fungal pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres*. **Genome Biology**, London, v. 11, R109, 2010.

EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R.; GRIBALDO, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, London, v. 4, n. 7, p. 1-12, 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EVANS, H. C. Cacao diseases: the trilogy revisited. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 1640-1643, 2007.

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

FONTANA, F.; SANTINI, A.; SALVINI, M.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; SCALA, A.; DURANTE, M.; BERNARDI, R. Cerato-platanin treated plane leaves restrict *Ceratocystis platani* growth and overexpress defence-related genes. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 90, p. 293–304, 2008.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A.; CASCARDO, J. C. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 443–455, 2007.

GIDIJALA, L.; BOVENBERG, R. A.; KLAASSEN, P.; VAN DER KLEI, I. J.; VEENHUIS, M.; KIEL, J. A. K. W. Production of functionally active *Penicillium chrysogenum* isopenicillin N synthase in the yeast *Hansenula polymorpha*. **BMC Biotechnology**, London, v. 8, n. 29, p. 1–8, 2008.

GILL, M. The biosynthesis of pigments in Basidiomycetes. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 54, n. 12, p. 721–734, 2001.

GIRAUD, T.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; DUTECH, C. Population genetics of fungal diseases of plants. **Parasite**, Paris, v. 15, p. 449–454, 2008.

GLADIEUX, P.; ZHANG, X. G.; ROLDAN-RUIZ, I.; CAFFIER, V.; LEROY, T.; DEVAUX, M.; VAN GLABEKE, S.; COART, E.; LE CAM, B. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. **Molecular Ecology**, Oxford, v.19, p. 658–674, 2010.

GONZÁLEZ-VARELA, G.; GONZÁLEZ, A. J.; MILGROON, M. G. Clonal population structure and introductions of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in Asturias, northern Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, p. 67–79, 2011.

GOODWIN, P. H.; LI, J.; JIN, S. Evidence for sulfate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 169–176, 2000.

GOUDET, J. FSTAT version 1.2: a computer program to calculate *F*-statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p. 485–486, 1995.

GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L.; BAHIA, R. C.; MAHE, L.; SENA, K. Caracterização molecular (RAPD, rDNA) e patogênica de isolados de *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro e outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 290, 2002.

GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA, C.; MAHE, L. Phylogeography of the Witches' broom pathogen in Bahia. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 17, p. 65–72, 2005.

GRAMACHO, K. P.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C.; LIMA, L. S.; LOPES, U. V. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, p. 153-155, 2007.

GRIFFITH, G. W.; BRAVO, E.; WILSON, F. J.; LEWIS, D. M.; HEDGER, J. N. Autoecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: Blakeman J. P.; Williamson, B. (Eds.). **The ecology of plant pathogens**. Wallingford: CABI, 1994. p. 245-267.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, London, v. 72, p. 278-289, 1994a.

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

GRIFFITH, G. W.; NICHOLSON, J. N.; NENNINGER, A.; BIRCH, R. N.; HEDGER, J. N. Witches' broom and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 42, p. 423-435, 2003.

HALL, N.; KEON, J. P. R.; HARGREAVES, J. A. A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, p. 69-73, 1999.

HALKETT, F.; COSTE, D.; PLATERO, G. G.; ZAPATER, M. F.; ABADIE, C.; CARLIER, J. Genetic discontinuities and disequilibria in recently established populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 3909-3923, 2010.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi 1.2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.

HARRINGTON, T. C. Host specialization and speciation in the american wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 262-263, 2000.

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

HOMEWOOD, B. Fungus threat to Brazil's 300 million cocoa trees. **New Scientist**, Chesterfield, n. 1778, p.16, 1991.

HOSID, E.; GRISHKAN, I.; YUSIM, E.; FRENKEL, Z.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; KOROL, A. The mode of reproduction in natural populations of ascomycetous fungus, *Emericella nidulans*, from Israel. **Genetics Research**, Cambridge, v. 92, p. 83-90, 2010.

HUANG, C.; NONG, S. H.; MANSOUR, M. K.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from

Cryptococcus neoformans that stimulates T-Cell responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 5485-5493, 2002.

IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 241-255, 2001.

ITO, K.; TANAKA, T.; HATTA, R.; YAMAMOTO, M.; AKIMITSU, K.; TSUGE, T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 52, p. 399-411, 2004.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 11, p. 424-429, 1996.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1006, 2007.

KEIPER, F. J.; HAQUE, M. S.; HAYDEN, M. J.; PARK, R. F. Genetic diversity in Australian populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 96-104, 2006.

KEREKES, J. F.; DESJARDIN, D. E. A monograph of the genera *Crinipellis* and *Moniliophthora* from Southeast Asia including a molecular phylogeny of the nrITS region. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 37, p. 101-152, 2009.

KHIDIR, H. H.; EUDY, D. M.; PORRAS-ALFARO, A.; HERRERA, J.; NATVIG, D. O.; SINSABAUGH, R. L. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, p. 35-42, 2010.

KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 274, p. 238-244. 2007.

KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 325-331, 2002.

LEAL JR., G. A. **Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença “Vassoura de bruxa”**. 2006. 125 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LEAL JR., G. A.; GOMES, L. H.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; TAVARES, F. C. A.; FIGUEIRA, A. Searching for *Moniliophthora perniciosa* pathogenicity genes. **Fungal Biology**, Orlando, v. 114, p. 842-854, 2010.

LÉVESQUE, C. A. et al. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. **Genome Biology**, London, v. 11, R73, 2010.

- LITT, M.; LUTTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.
- LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 82, p. 1420-1425, 1995.
- LOMBARDI, L.; BACCELLI, I.; BERNARDI, R.; CAPPUGI, G.; PAZZAGLI, L.; PICCIARELLI, P.; SCALA, A. Cerato-platanin and ceratopopulin induce differential resistance responses in plane leaves. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 92, S4.87, 2010.
- LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 532-540. 2005.
- MARELLI, J. P.; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 2, p. 149-160, 2009.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.
- McCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized linear models**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1989. 511 p.
- McGEARY, F. M.; WHEELER, B. E. J. Growth rates of and mycelial interaction between isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. **Plant Pathology**, London, v. 37, p. 489-498, 1988.
- MEINHARDT, L. W.; BELATTO, C. M.; RICONES, J.; AZEVEDO, J. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. *In vitro* production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 191-196, 2006.
- MONDEGO, J. M. C. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 549, p. 2-25, 2008.
- MONTARRY, J.; ANDRIVON, D.; GLAIS, I.; CORBIERE, R.; MIALDEA, G.; DELMOTTE, F. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 1965-1977, 2010.
- MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I. The origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, London, v. 89, p. 380-386, 2002.
- MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. S.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J. Geographic and genetic population differentiation of the

amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 10, e3311, 2008.

MURAGUCHI, H.; KAMADA, T. The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 16, p. 3133-3141, 1998.

NEHLS, U.; ECKE, M.; HAMPP, R. Sugar-and nitrogen-dependent regulation of an *Amanita muscaria* Phenylalanine ammonium lyase gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1931-1933, 1999.

PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; MANAO, G.; CAMICI, G.; SANTINI, A.; SCALA, A. Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p. 24959-24964, 1999.

PEGLER, D. N. *Crinipellis pernicios*a (Agaricales). **Kew Bulletin**, Nowick, v. 32, p. 731-73, 1978.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau. **Agrotópica**, Ilhéus, v. 1, p. 79-89, 1989.

PEREIRA, J. L.; DE ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 15, p. 743-752, 1996.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. **DARwin software**. Montpellier, 2006. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 10 out. 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PIETERSE, C. M. J.; DERKSEN, A. M. C. E.; FOLDERS, J.; GOVERS, F. Expression of the *Phytophthora infestans* *ipiB* and *ipiO* genes of in planta and in vitro. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 244, p. 269-277, 1994.

PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.; BAUDOUIN L.; ESTOUP, A. GENECLASS 2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**, Washington, v. 95, p. 536-539, 2004.

PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R. J.; YING, Z. T.; ZHENG, Q.; OLANO, C. T.; MOTAMAYOR, J. C.; JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicios*a with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 111, p. 317-332, 2005.

PRIETO, R.; WOLOSHUK, C. P. *ord1*, an Oxidoreductase Gene responsible for conversion of *O*-Methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1661-1666, 1997.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRUSKY, D.; YAKOBY, N. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 509-516, 2003.

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

RABOIN, L. M.; SELVI, A.; OLIVEIRA, K. M. PAULET, F.; CALATAYUD, C.; ZAPATER, M. F.; BROTTIER, P.; LUZARAN, R.; GARSMEUR, O.; CARLIER, J.; D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 64-76, 2007.

RINCONES, J.; MEINHARDT, L. W.; VIDAL, B. C.; PEREIRA, G. A. G. Eletrophoretic kariotype analysis of *Crinipellis pernicioso* the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 452-458, 2003.

RINCONES, J.; MAZOTTI, G. D.; GRIFFITH, G. W.; POMELA, A.; FIGUEIRA, A.; LEAL, Jr. G. A.; QUEIROZ, M. V.; PEREIRA, J. F.; AZEVEDO, R. A.; PEREIRA, G. A. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 821-832, 2006.

RINCONES, J.; SCARPARI, L. M.; CARAZZOLLE, M. F.; MONDEGO, J. M.; FORMIGHIERI, E. F.; BARAU, J. G.; COSTA, G. G.; CARRARO, D. M.; BRENATANI, H. P.; VILAS-BOAS, L. A.; DE OLIVEIRA, B. V.; SABHA, M.; DIAS, R.; CASCARDO, J. M.; AZEVEDO, R. A.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 2, n. 7, p. 891-908, 2008.

RORER, J. B. **The Surinam witches' broom disease of cacao**. Port of Spain: Board of Agriculture, 1913. 13 p. (Circular, 10).

SCALA, A.; PAZZAGLI, L.; COMPARINI, C.; SANTINI, A.; TEGLI, S.; CAPPUGI, G. Cerato-platanin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 86, p. 23-29, 2004.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELA, A. W. V.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cacao in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental of Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 865-877, 2005.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n.1, p. 1-8, 2005.

SEGRS, G.; BRADSHAW, N.; ARCHER, D.; BLISSET, K.; OLIVER, R. P. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 367-377, 2001.

SERENO, M. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; VENCovsky, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, New York, v. 7, p. 13-24, 2006.

SHAW, M. W.; VANDENBON, A. E. A qualitative host-pathogen interaction in the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* pathosystem. **Plant Pathology**, London, v. 56, p. 277-285, 2007.

SIEWERS, V.; VIAUD, M. JIMENEZ-TEJA, D.; COLLADO, I. G.; GRONOVER, C. S.; PRADIER, J. M.; TUDZYNSKY, B.; TUDZYNSKY, P. Functional analysis of the Cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 602-612, 2006.

SILVA, J. R. Q. **Caracterização da diversidade genética de isolados Amazônicos *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecidos infectados de *Theobroma cacao***. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVA, J. R. Q.; FIGUEIRA, A.; PEREIRA, G. A. G.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 783-785, 2008.

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

SINGER, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. **Lilloa**, Tucuman, v. 8, p. 441-534, 1942.

SNOEIJERS, S. S.; PEREZ-GARCIA, A.; JOOSTEN, M. H. A. J.; WIT, P. J. G. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 6, p. 493-506, 2000.

SOLOMON, P. S.; TAN, K. C.; OLIVER, R. P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 203-210, 2003.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec. the cause of the Krulloten-disease of cacao in Suriname. **Bulletin. Departement van den Landbouw in Surinan**, Paramaribo, v. 33, p. 5-49, 1915.

TALBOT, N. J.; McCAFFERTY, H. R. K.; MA, M.; MORE, K.; HAMER, J. E. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p.179-195, 1997.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Phoenix, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

THALER J. S.; OWEN, B.; HIGGINS, V. J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 530-538, 2004.

TRAIL, F.; XU, J. R.; MIGUEL, P. S.; HALGREN, R. G.; KISTLER, H. C. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 187-197, 2003.

TUTHILL, D. E. Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and *Eupenicillium* species. **Mycological Progress**, München, v. 3, p. 3-12, 2004

TWIZEYIMANA, M.; OJAMBO, P. S.; HAUDENSHIELD, J. S.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; PEDLEY, K. F.; BANDYOPADHYAY, R.; HARTMAN, G. L. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soyabean. **Plant Pathology**, London, v. 60, p. 719-729, 2011.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, V.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

VERCAUTEREN, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE DOBBELAERE, I.; HEUNGENS, K.; MAES, M.; GRUNWALD, N. J.; BONANTS, P. Clonal expansion of the Belgian *Phytophthora ramorum* populations based on new microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 92-107, 2010.

VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; STREM, M. D.; CARLSON, J. E.; BAILEY, B. A.; GUILTINAN, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 404-413, 2004.

WHEELER, B. J. E. The growth of *Crinipellis perniciosus* in living and dead cocoa tissue. In: In: MOORE, D.; CASSELTON, L. A.; WOOD, D. A.; FRANKLAND, J. C. (Eds.). **Developmental biology of higher fungi**. London: Cambridge University Press, 1985. p. 103-116.

- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, London, v. 37, p. 475-488, 1988.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.
- XHAARD, C.; FABRE, B.; ANDRIEUX, A.; GLADIEUX, P.; BARRÈS, B.; FREY, P.; HALKETT, F. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 2739-2755, 2011.
- YANG, B. J.; ZHONG, S. B. Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 910-912, 2008.
- YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 437-458, 2005.
- ZAPAROLI, G.; CABRERA, O. G.; MEDRANO, F. J.; TIBÚRCIO, R.; BARAU, J. G.; LACERDA, G.; PEREIRA, G. A. G. Identification of a second family of genes in *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 61-72, 2009.

APÊNDICES

(continuação)

Loco	No. alelos	Tamanho do alelo (pb)	Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6	Pop 7	Biótipos		
										C	L	S
<i>mMPCena12</i>	5	278	-	-	-	-	0.143	0.143	-	0.033	0.111	0.077
		281	1.000	0.625	1.000	-	0.857	0.857	0.429	0.672	0.556	0.077
		284	-	0.375	-	1.000	-	-	0.571	0.295	0.222	0.308
		292	-	-	-	-	-	-	-	-	0.111	0.308
		304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.231
<i>mMPCena16</i>	6	151	0.545	0.250	0.300	0.273	-	0.286	0.286	0.279	-	-
		154	0.455	0.750	0.600	0.727	1.000	0.571	0.571	0.672	0.222	-
		157	-	-	0.100	-	-	0.143	0.143	0.049	0.333	0.231
		160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.154
		162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.462
		169	-	-	-	-	-	-	-	-	0.444	0.154
<i>mMPCena19</i>	10	244	0.636	0.250	0.400	0.273	0.571	0.714	0.286	0.475	-	0.077
		247	0.364	0.500	0.600	0.364	0.429	0.286	0.429	0.393	-	0.077
		250	-	0.250	-	0.364	-	-	0.286	0.131	-	0.385
		252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.231
		256	-	-	-	-	-	-	-	-	0.056	-
		265	-	-	-	-	-	-	-	-	0.111	0.231
		271	-	-	-	-	-	-	-	-	0.056	-
		274	-	-	-	-	-	-	-	-	0.333	-
		285	-	-	-	-	-	-	-	-	0.111	-
		305	-	-	-	-	-	-	-	-	0.333	-
<i>mMPCena22</i>	3	133	0.773	0.688	0.750	0.909	0.571	0.429	0.286	0.656	0.333	0.231
		139	0.227	0.313	0.250	0.091	0.429	0.571	0.714	0.344	-	0.538
		145	-	-	-	-	-	-	-	-	0.667	0.231

(conclusão)												
Loco	No. alelos	Tamanho do alelo (pb)	Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6	Pop 7	Biótipos		
										C	L	S
										0.213	0.111	-
		228	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.357	0.500	0.484	0.111	-
		232	-	0.125	-	-	0.286	0.143	0.071	0.074	0.278	-
		235	-	0.188	0.200	0.500	-	0.357	0.143	0.213	0.167	0.5
		238	-	-	-	-	-	0.143	-	0.016	0.222	-
		245	-	-	-	-	-	-	-	-	0.111	0.5
<i>MsCepec_Cp14</i>	3	228	-	-	-	-	-	-	-	-	0.167	-
		235	0.909	0.625	0.200	0.182	0.714	0.857	0.857	0.951	0.5	0.5
		239	0.091	0.375	0.800	0.818	0.286	0.143	0.143	0.049	0.333	0.5
<i>MsCepec_Cp15</i>	2	190	0.800	0.636	0.632	0.188	0.824	0.900	0.944	0.658	0.667	1.000
		196	0.200	0.364	0.368	0.812	0.176	0.100	0.056	0.342	0.333	-
<i>MsCepec_Cp16</i>	8	203	1.000	1.000	1.000	0.727	1.000	0.714	0.857	0.59	-	0.077
		212	-	-	-	0.273	-	0.286	0.143	0.41	-	0.077
		216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.538
		220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.308
		224	-	-	-	-	-	-	-	-	0.056	-
		226	-	-	-	-	-	-	-	-	0.444	-
		232	-	-	-	-	-	-	-	-	0.333	-
		239	-	-	-	-	-	-	-	-	0.167	-
<i>MsCepec_Cp19</i>	4	197	0.818	1.000	1.000	1.000	0.857	1.000	1.000	0.902	0.056	-
		200	0.182	-	-	-	0.143	-	-	0.098	0.389	0.077
		205	-	-	-	-	-	-	-	-	0.222	0.462
		208	-	-	-	-	-	-	-	-	0.333	0.462

Pop 1 - Pará Central

Pop 2 - Pará – Baixo Amazonas

Pop 3 - Leste do Amazonas

Pop 4 - Oeste do Amazonas - Alto Solimões

Pop 5 – Rondônia

Pop 6 – Acre

Pop 7 - Bahia

APÊNDICE B – Isolados selecionados para representar cada genótipo multilocos e o(s) indivíduo(s) idêntico(s) a esse, com o local de origem da coleção.

(continua)

<u>Genótipos multilocos</u>		<u>Indivíduos idênticos</u>	
Número do isolado	Município, Estado	Número do isolado	Município, Estado
4	Brasil Novo, PA	5	Brasil Novo, PA
7	Medicilândia, PA	8	Medicilândia, PA
		9	Medicilândia, PA
10	Medicilândia, PA	13	Uruará, PA
19	Cametá, PA	20	Cametá, PA
		21	Cametá, PA
23	Mocajuba, PA	1	Anapú, PA
		22	Baião, PA
		24	Mocajuba, PA
33	Augusto Montenegro, AM	34	Augusto Montenegro, AM
		35	Augusto Montenegro, AM
		36	Augusto Montenegro, AM
		37	Augusto Montenegro, AM
		38	Augusto Montenegro, AM
40	Uricurituba, AM	39	Augusto Montenegro, AM
		41	Uricurituba, AM
		42	Uricurituba, AM
46	CeplacERNEG, AM	44	Costa da Conceição, AM
		27	Trairão, PA
47	Ariquemes, RO	49	Ariquemes, RO
		50	Ariquemes, RO
		51	Ariquemes, RO
		55	Jarú, RO
		62	Ji-Paraná, RO
		59	Ouro Preto D'Oeste, RO
52	Cacaulândia, RO	48	Ariquemes, RO
		53	Cacaulândia, RO

(conclusão)

<u>Genótipos multilocos</u>		<u>Indivíduos idênticos</u>	
Número do isolado	Município, Estado	Número do isolado	Município, Estado
56	Ouro Preto D'Oeste, RO	58	Ouro Preto D'Oeste, RO
61	Cacoal, RO	54	Cacaulândia, RO
64	Marechal Thaumaturgo, AC	25	Trairão, PA
65	Marechal Thaumaturgo, AC	66	Marechal Thaumaturgo, AC
68	Assis Brasil, AC	67	Plácido de Castro, AC
71	Brasiléia, AC	72	Assis Brasil, AC
76	Ilhéus, BA	75	Itabuna, BA
		74	Itajuípe, BA
87	Camacan, BA	79	Camacan, BA
		78	Canavieiras, BA
		85	Floresta Azul, BA
		86	Floresta Azul, BA
		80	Una, BA
		82	Uruçuca, BA
		83	Uruçuca, BA
91	Aurelino Leal, BA	89	Teolândia, BA
		88	Wenceslau Guimarães, BA
96	Tabatinga, AM	97	Tabatinga, AM
		99	Tabatinga, AM
102	São Paulo de Olivença, AM	95	Tabatinga, AM
103	São Paulo de Olivença, AM	98	Tabatinga, AM
107	Alenquer, PA	109	Duca Alenquer, PA
110	Agua Blanca, Manabi, Equador	111	San Carlos, Napo, Equador
123	Manaus, AM	124	Manaus, AM