

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



VARIABILIDADE GENÉTICA DE *CERATOCYSTIS*
***CACAOFUNESTA* EM CACAUEIROS NO SUL DA BAHIA**

ELIZABETE NETA DOS SANTOS GUSMÃO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2018

ELIZABETE NETA DOS SANTOS GUSMÃO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *CERATOCYSTIS*
CACAOFUNESTA EM CACAUEIROS NO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2018

ELIZABETE NETA DOS SANTOS GUSMÃO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *CERATOCYSTIS*
CACAOFUNESTA EM CACAUEIROS NO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 07 de Março de 2018

Dr. Acelino Couto Alfenas
(UFV)

Dr. Marco Antônio Costa
(UESC)

Dra. Fabienne Micheli
(UESC)

Dra. Karina Peres Gramacho
(UESC-Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças ao longo dessa caminhada.

Ao meu irmão, Isac, por me apoiar sempre.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira por toda estrutura e suporte a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pela bolsa.

À minha orientadora, Dr. Karina Peres Gramacho pelo suporte e orientação.

À minha co-orientadora Dra. Fernanda Amato Gaiotto por todas as contribuições.

À pesquisadora Msc. Dilze Argôlo, pela contribuição e ensinamentos na obtenção dos isolados de *Ceratocystis Cacaofunesta* preservados na coleção de *Ceratocystis* do Cepec.

À toda equipe do laboratório de *Ceratocystis* na CEPLAC, nas pessoas da Ana Rosa e Vírínia. Obrigada por tudo, as contribuições de vocês foram fundamentais para que esse trabalho se realizasse.

A todos aqueles que contribuíram com a minha formação até aqui, sejam professores e amigos.

À Dra. Mariana Barreto por toda a ajuda nesses dois anos.

A todos os colegas e amigos do Fitomol por todo apoio, por todo o carinho e todas as contribuições, sem vocês essa caminhada seria mais árdua.

INDÍCE

RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
CAPITULO 1	10
VALIDAÇÃO DO MÉTODO <i>IN HOUSE</i> E EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>Ceratocystis</i> <i>cacaofunesta</i>	10
Resumo	10
1. Introdução	10
2. Material e Métodos.....	12
3. Resultados e Discussão	15
Referências	19
CAPÍTULO 2:.....	21
VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Ceratocystis cacaofunesta</i> EM CACAUEIROS NO SUL DA BAHIA.....	21
Resumo	21
1. Introdução	21
2. Material e Métodos.....	24
3. Resultados	29
4. Discussão	34
Referências	37
CONCLUSÕES GERAIS	41
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	42
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	46

RESUMO

GUSMÃO, Elizabete Neta dos Santos, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, março de 2018. **Variabilidade Genética de *Ceratocystis cacaofunesta* em cacaueiros no Sul da Bahia.** Orientadora: Karina Peres Gramacho. Co-orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

A Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) tem como agente causal o fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & Harrington. Esta doença letal ao cacaueiro foi identificada pela primeira vez no Sul da Bahia em 1997 e atualmente está estabelecida nas plantações de cacau do estado. O conhecimento sobre a diversidade genética de *C. cacaofunesta* é importante para o programa de melhoramento genético, principalmente na busca de fontes de resistência genética à doença. Sob a hipótese de que as populações de *C. cacaofunesta* apresentam pouca diversidade genética no Sul da Bahia, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética de populações de *C. cacaofunesta* em cacaueiros oriundos de vários plantios comerciais do Sul da Bahia. Inicialmente, foi validado um método *in house* para extração de DNA, que incluiu testar as condições de crescimento para obtenção de micélio (meios de cultivo malte e mineral) e extração de DNA (SDS, CTAB e MATAB). Aplicou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (5 isolados x 2 meios de cultivo x 3 repetições) e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). Diferença significativa foi observada entre os métodos testados para o crescimento e extração de DNA ($p < 0,05$), sendo o crescimento fúngico em meio malte, associado ao protocolo SDS, o que apresentou o melhor resultado em relação à concentração e pureza de DNA. No segundo capítulo foi realizado o estudo da variabilidade genética populacional, utilizando 106 isolados, agrupados em 4 supostas subpopulações da Bahia (Ilhéus-Itabuna, Extremo Sul, Vale do Jiquiriçá, Baixo Sul), e genotipados com 11 locos microssatélites. Estimou-se o nível de estruturação genética, a diversidade genética e genotípica, distribuição da riqueza gênica e genotípica e foi testada também a hipótese de acasalamento aleatório. A população total apresentou uma moderada estruturação genética ($\theta_{ST} = 0,07$), havendo uma maior diferenciação (91,41%) dentro das populações do que entre. A subpopulação Ilhéus-Itabuna apresentou diferenciação em relação às subpopulações Vale do Jequiriçá ($\theta_{ST} = 0,06$) e Baixo Sul ($\theta_{ST} = 0,08$). A população total apresentou alta diversidade genética ($H = 0,59$) e genotípica ($G_S = 5,0$). Houve compartilhamento de alelos entre as subpopulações, no entanto, não houve de genótipos. A hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada, sugerindo que a reprodução é predominantemente clonal. A alta variabilidade genética observada neste estudo é compatível com a diversidade de populações nativas, sugerindo que as populações de *C. cacaofunesta* analisadas sejam nativas do Sul da Bahia. Este estudo representa a primeira análise detalhada de genética de populações de *C. cacaofunesta* no estado da Bahia e pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro na região.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Fitopatógenos. Marcadores microssatélites. Populações nativas

ABSTRACT

GUSMÃO, Elizabete Neta dos Santos, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, março de 2018. **Genetic variability of *ceratocystis cacaofunesta* in cacao trees in southern Bahia.** Adviser: Karina Peres Gramacho. Co-Adviser: Fernanda Amato Gaiotto.

The *Ceratocystis* wilt of the cacao tree (*Theobroma cacao* L.) has as causal agent the fungus *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & Harrington. This lethal disease to cacao tree was first identified in southern Bahia in 1997 and is currently established in the cacao plantations of the state of Bahia. Knowledge about genetic diversity of populations of *C. cacaofunesta* is important for the genetic breeding program, especially in the search for sources of genetic resistance to this disease. Under the hypothesis that *C. cacaofunesta* populations in Southern of the Bahia show a low genetic diversity, this work aimed to analyze the genetic diversity of this pathogen in cacao trees from several commercial plantations in the South of Bahia. First of all, an in-house method for DNA extraction was validated, which included testing the growth conditions to obtain mycelium (malt and mineral culture media) and DNA extraction (SDS, CTAB and MATAB). The experimental design was completely randomized (5 isolates x 2 culture media x 3 replicates) and the data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test at 5% ($p < 0.05$). Statistical difference was observed between the methods tested for DNA growth and extraction ($p < 0.05$). The fungal growth in malt medium, associated with the SDS protocol, showed the best result in relation to the concentration and purity of DNA. Second, 11 microsatellite loci were used to investigate the genetic diversity of 106 isolates, grouped into four subpopulations of Bahia (Ilhéus-Itabuna, Extremo Sul, Vale do Jiquiriçá, Baixo Sul). The level of genetic structure, genetic and genotypic diversity, gene and genotypic richness distribution were estimated, and the hypothesis of random mating was also tested. The total population showed a moderate genetic structure ($\theta_{ST} = 0.07$), with a greater differentiation (91.41%) within the subpopulations than between. Ilhéus-Itabuna subpopulation showed differentiation in relation to the subpopulations of Vale do Jequiriçá ($\theta_{ST} = 0.06$) and Southern Low ($\theta_{ST} = 0.08$). The total population presented high genetic diversity ($H = 0.59$) and genotype ($G_5 = 5.0$). There was allele sharing among the subpopulations, however, there was no genotype sharing. The hypothesis of random mating was rejected, suggesting that reproduction is predominantly clonal. The high genetic variability observed in this study is compatible with the diversity of native populations, suggesting that the populations of *C. cacaofunesta* analyzed are native to the South of Bahia. This study represents the first detailed analysis of genetics of *C. cacaofunesta* populations in the state of Bahia and may contribute to the development of management strategies for the *Ceratocystis* wilt of the cacao tree disease in the region.

Key words: *Theobroma cacao*. Plant pathogen. Molecular markers. Native populations.

INTRODUÇÃO

Detentora de um lugar de destaque na produção nacional de cacau, a região cacaueira baiana passou a ter o cultivo do cacaueiro comprometido, principalmente pela ocorrência do fungo causador da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Moniliophthora perniciosa*) (COUTO, 2000) e da Murcha de Ceratocystis do Cacaueiro (*Theobroma cacao*), causado pelo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta*. A Murcha de Ceratocystis é uma doença que leva à murcha foliar, seca e morte da planta, especialmente, em plantios com material genético suscetível. (ENGELBRECHT et al., 2007; BAKER et al., 2003).

A doença foi identificada pela primeira vez no Equador em 1918, e posteriormente em países como Colômbia, Venezuela, Peru, Costa Rica, Equador e Trinidad (BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2007). No final dos anos de 1970 a Murcha de Ceratocystis foi relatada no Brasil, em Rondônia, e em 1997 foi identificada pela primeira vez na sul da Bahia, em mudas para enxertia em viveiros (BEZERRA 1997). Estima-se que 24% das plantações do cacaueiro, no sul baiano, tenham sido infectadas pela doença (CABRERA et al., 2016).

Devido à natureza sistêmica da infecção, a Murcha de Ceratocystis, nos dias atuais, é vista como uma das mais importantes doenças do cacaueiro (ENGELBRECHT et al., 2007; ENGELBRECHT et al., 2007b). Considerada emergente e de difícil controle, a doença está amplamente distribuída nos agrossistemas do sul da Bahia, sendo relevante o desenvolvimento de estratégias de mitigação da doença e fontes resistentes podem representar uma alternativa no controle da doença (DELGADO; SUÁREZ, 2003). Atualmente, o enfoque do programa de melhoramento genético do cacaueiro na CEPLAC é a obtenção de clones produtivos com resistência quantitativa às várias doenças que infectam o cacaueiro. Mas, são poucos os clones de cacau com resistência à Murcha de Ceratocystis. A variabilidade genética da população do patógeno é um fator que pode explicar este comportamento.

O conhecimento sobre a variabilidade genética e a estrutura genética populacional do patógeno pode auxiliar os programas de melhoramento genético, no estabelecimento de estratégias de manejo e na identificação de genes de resistência (FERREIRA et al., 2007; TSCHURTSCHENTHALER et al., 2012). Pois a estrutura genética populacional é um importante componente epidemiológico de um patossistema e a variabilidade genética do patógeno tem importante papel no potencial de adaptação de um organismo às diversas condições do ambiente (McDONALD; LINDE, 2002). Este conhecimento pode ser usado

para entender o desenvolvimento da doença e prever a evolução da Murcha de *Ceratocystis* e principalmente, prolongar a vida útil dos materiais resistentes selecionados.

Os estudos de variabilidade genética do gênero *Ceratocystis* teve como foco a espécie *Ceratocystis fimbriata*, patógeno de plantas como o eucalipto, mangueira e a batata doce. Estudos utilizando marcadores do tipo microssatélites realizados com populações de *C. fimbriata* de mangueira no Rio de Janeiro e São Paulo, de eucalipto em Minas Gerais e de kiwi no Rio Grande do Sul mostraram alta diversidade genética em alguns locais, o que suporta a hipótese de que o fitopatógeno estava presente na região antes de ocorrer o desmatamento florestal para a agricultura (FERREIRA et al., 2010, FERREIRA et al., 2011, Ferreira et al., 2017).

Dos poucos estudos sobre a variabilidade genética de *C. cacaofunesta*, Engelbrecht et al. (2007) analisaram a diversidade genética e possíveis origens de isolados coletados no Brasil, Costa Rica, Equador e Colômbia. Utilizando marcadores microssatélites e mDNA, os autores verificaram alta variabilidade genética entre populações coletadas em Rondônia e Equador, sugerindo que essas são naturais dessas regiões.

Até o momento, não existem estudos sobre a genética molecular da população do patógeno na Bahia. Sob a hipótese de existir pouca diversidade genética da espécie e a ausência de estruturação genética de *C. cacaofunesta* na Bahia, este estudo teve como objetivos: otimizar e aplicar um método *in house* de extração de DNA total de isolados de *C. cacaofunesta*; e determinar a estrutura genética da população do patógeno na Bahia em escala local e regional. O estudo utilizou 11 marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie por STEIMEL (et al., 2004).

Esta dissertação representa a primeira análise detalhada da genética populacional de *C. cacaofunesta* no estado da Bahia, por incluir isolados de uma ampla área geográfica do estado e pode contribuir para trazer novos dados sobre a diversidade da espécie e consolidar as informações já expostas por estudos anteriores.

REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Ceratocystis*

O gênero *Ceratocystis* foi identificado pela primeira vez em 1890 como patógeno da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). No ano seguinte Halsted e Fairchild fizeram a descrição completa do fungo, o qual recebeu o nome de *Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted (HALSTED; FAIRCHILD, 1891). Ao longo do tempo a classificação taxonômica da espécie foi reavaliada de tal forma que gênero *Ceratocystis* chegou a ser incluído em gêneros tais como *Leptographium*, *Raffaelea* e *Ophiostoma* (CABRERA et al., 2016).

O primeiro equívoco em relação à classificação taxonômica das espécies do gênero *Ceratocystis* ocorreu em 1919 com a descrição do gênero *Ophiostoma*, devido principalmente à similaridade morfológica e ecológica entre as espécies desses gêneros. Em ambos os gêneros, as espécies apresentam como corpo de frutificação peritécios com bases globosas escuras e pescoços longos, os quais possuem em seu ápice uma matriz hidrofóbica e pegajosa que mantém os ascósporos unidos, o que favorece a sua dispersão por determinados insetos (De BEER, et al., 2014).

Com o advento das técnicas de sequenciamento de DNA em meados dos anos 80, as disponibilidade de sequências de biomoléculas, como de DNA ou de proteína, têm aumentado significativamente na última década. A disponibilidade de sequências de DNA tem tornado possível esclarecer as relações filogenéticas dos gêneros *Ophiostoma* e *Ceratocystis* (De BEER et al., 2014) e as primeiras árvores filogenéticas não demonstram relação de parentesco, sugerindo que as semelhanças morfológicas observadas e a associação com insetos sejam características de convergência adaptativa e não de divergência evolutiva (MALLOCH; BLACKWELL, 1993; SPATAFORA; BLACKWELL, 1994). Por conseguinte, *Ophiostoma* foi descrito como pertencente à família *Ophiostomataceae* e à ordem *Ophiostomatale*, enquanto *Ceratocystis* foi incluso na ordem *Microascales* e na família *Ceratocystidaceae* (SPATAFORA; BLACKWELL, 1994; KAMGAN et al., 2008).

Uma vez esclarecido a posição taxonômica de *Ceratocystis*, análises filogenéticas, morfológicas e recentes estudos baseados em sequências de genes β -tubulina e *mating type* sugeriram a existência de complexos de espécies dentro do gênero (JOHNSON et al., 2005; HARRINGTON, 2000). De acordo com Cabrera et. al (2016), o conceito tradicional de espécies biológicas não é sempre aplicável aos fungos, principalmente quando se refere a

complexos de espécies com alta taxa de reprodução assexuada e caracteres morfológicos muito semelhantes, aspectos comuns em *Ceratocystis*.

Harrington e Rizzo (1999) debatem sobre o conceito biológico de espécies que se baseia apenas na delimitação pré e pós zigóticas não é sempre aplicável ao reino Fungi, pois há de se considerar também as variações morfológicas e a especialização por hospedeiros. Portanto, uma espécie fúngica pode se referir também ao menor conjunto ou agregado de populações que apresentam uma linhagem comum e que compartilham entre si caracteres fenotípicos exclusivos e detectáveis. Com base nesses conceitos de espécie biológica e também em dados moleculares, o gênero *Ceratocystis* foi dividido nos complexos *Ceratocystis fimbriata sensu lato*, *Ceratocystis moniliformis*, *Ceratocystis paradoxa* e *Ceratocystis coerulescens* (JOHNSON et al., 2005; PAULIN-MAHADY et al., 2002). O complexo *C. fimbriata* abriga diversas espécies crípticas, as quais estão distribuídas em clados associados a regiões geográficas: o clado da América do Norte, o clado da América Latina, o clado da Ásia e as espécies africanas de *C. albifundus* (HARRINGTON, 2000; ROUX et al., 2001; JOHNSON; HARRINGTON; ENGELBRECHT, 2005).

O clado da América Latina é considerado um dos mais importantes, pois apresenta várias espécies com nível variado de agressividade tanto em plantas autóctones como também em hospedeiros não nativos (JOHNSON et al., 2005; ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). Muitos ascomicetos são heterotáticos e a reprodução sexual ocorre apenas se houver o cruzamento de isolados de *mating* opostos (MAT1 e AT2). Mas de acordo com Harrington e McNew (1997), os membros do clado da América Latina são homotáticos, através de um sistema *mating type* unidirecional. Ou seja, apresentam micélios autoférteis, capazes de completar o ciclo sexual de forma independente (POÈGGELER, 1999) e produzir tanto linhagens autoférteis como autoestéreis (WITTHUHN et al., 2000). Essa autofertilização promove uma interrupção do fluxo gênico e permite uma rápida especiação desse grupo (ENGELBRECHT et al., 2007; CABRERA et al., 2016). Também pode limitar a diversidade genética dentro das populações de *Ceratocystis* (HARRINGTON et al., 1998), de modo que, grande parte da variação genética dentro do complexo *C. fimbriata* ocorre entre os clados ou por especialização para o hospedeiro (FERREIRA et al., 2010).

Baker et al. (2003) estudaram as relações filogenéticas e a especialização por hospedeiros entre linhagens do clado da América Latina, em isolados obtidos em *Theobroma cacao*, *Xanthosoma* sp., *Ipoema batatas*, *Mango indica*, *Platanus* sp., *Annona* sp., *Eucalyptus* sp., *Coffea arabica*, *Colocasia esculenta* e *Herrania* spp. Por meio de filogenia baseada em

sequências rDNA-ITS e patogenicidade cruzada, verificaram que as linhagens patogênicas ao cacau, batata doce e *Platanus* demonstraram especificidade em relação ao hospedeiro. Com base em dados morfológicos, especialização por hospedeiros e testes de interesterilidade entre grupos de isolados, *C. cacaofunesta* e *C. plantani* foram descritas como espécies hospedeiras especializadas dentro do clado da América Latina, sendo *C. cacaofunesta* o agente causal da Murcha de Ceratocystis do Cacau (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

O patossistema cacau – *Ceratocystis cacaofunesta*

A doença Murcha de Ceratocystis do Cacau, também conhecida como mal do facão, foi relatada pela primeira vez no Equador em 1918, na época o agente causal foi identificado como *C. fimbriata* (RORER, 1918). A doença não recebeu atenção em razão da variedade de *T. cacao* predominante naquele país apresentar resistência a essa. Todavia, posteriormente foi identificada uma forma mais agressiva do fungo em variedades do cacau Criollo, e que aparentavam serem menos agressivas nas variedades Trinitário e Forasteiro (WOOD; LASS, 2001).

A doença se disseminou por países da América Central e América do Sul (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005) e entre os anos de 1940 e 1960 foram relatados prejuízos em lavouras cacaueiras na Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Equador, Guatemala, Peru e Trinidad (THOROLD, 1975; ENGELBRECHT; HARRINGTON; ALFENAS, 2007). Em 1978 foi relatada sua presença no Brasil, no estado de Rondônia e em 1997 surgiu o primeiro relato da doença no Sul da Bahia, em mudas para enxertia (BEZERRA, 1997) um ano mais tarde foi observada infectando plantas adultas no campo (BEZERRA et al., 1998).

Os sintomas da doença no cacau se expressam por meio de clorose e murcha foliar e as folhas secas permanecem aderidas aos galhos após a morte da planta durante semanas. Aparecem no caule da planta lesões de coloração marrom acastanhada (Figura1) (DELGADO; SUAREZ, 2003; SANTOS et al., 2013).

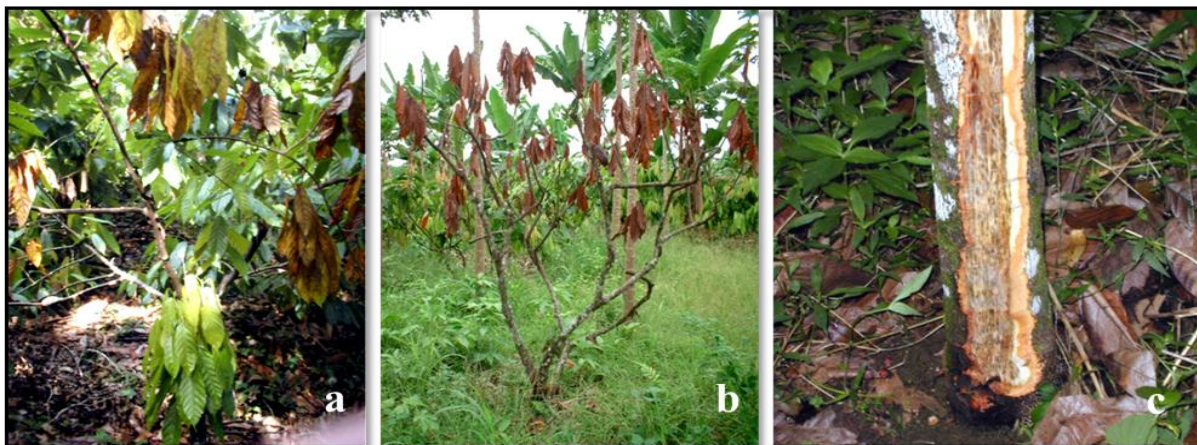


Figura 1: Sintomas da Murcha de *Ceratocystis* em cacaueiro. (a) Planta adulta com folhas apresentando clorose; (b) folhas secas ainda aderidas à planta morta; (c) necrose interna atingindo o lenho (Fotos: Acervo Karina Gramacho/ Ceplac-Cepec-Fitomol).

A infecção do cacaueiro pelo fungo *C. cacaofunesta* ocorre principalmente via lesões no caule do hospedeiro, causadas pela poda ou corte realizados com ferramentas contaminadas pelo patógeno. A infecção pode ocorrer também por vetores como insetos *Scolitidae* e *Platipodinae* (ENGELBRECHT et al., 2007). Como outras espécies do gênero, o fungo produz compostos voláteis com aromas frutais. Tais aromas são em virtude da presença de ácidos e ésteres graxos e, acredita-se que esse seja um mecanismo que atua na atração dos insetos vetores (ENGELBRECHT et al., 2004). Os insetos são atraídos aos locais infectados, pelo aroma exalado pelo fungo e as massas mucilaginosas de ascósporos do patógeno se ligam no exoesqueleto dos insetos. Dessa forma, a produção de voláteis e a morfologia são fatores importantes para o ciclo de vida desses fungos (MALLOCH; BLACKWELL, 1993; ENGELBRECHT et al., 2004).

Após a infecção do hospedeiro, o patógeno atinge células do parênquima da planta e vasos do xilema (SANTOS et al., 2013), se movendo por meio do xilema secundário (MALAGUTI, 1952). Com a liberação de esporos do fungo no xilema, ocorre a colonização de vasos importantes levando ao bloqueio do transporte hídrico e acarretando a murcha e morte do cacaueiro (DELGADO; SUAREZ, 2003). Há relato que em outros hospedeiros seja possível a infecção através do contato de raízes lesionadas com o patógeno (BAKER et al., 2003; HARRINGTON, 2009; FERREIRA et al., 2010).

A reprodução de *C. cacaofunesta*

A reprodução de *C. cacaofunesta* pode ocorrer por meio de propagação vegetativa, assexuadamente e também por reprodução sexual. Em sua forma vegetativa o fungo possui hifas septadas de paredes lisas que vão do marrom claro ao hialino. A propagação vegetativa ocorre quando uma porção não especializada do micélio é separada do micélio principal e forma uma nova colônia (CABRERA et al., 2016). Em sua forma anamorfa (assexuada), o fungo produz os esporos assexuais (conídios) em estruturas especializadas denominadas conidióforos, as quais se desenvolvem a partir de hifas especializadas (Figura 2) (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

Na forma sexuada, *C. cacaofunesta* apresenta peritécios (ascocarpo) com bases globosas com cores que variam do marrom escuro ao preto, e se estendem em um rostro longo também de cor escura, cilíndrico e fimbriado. Os ascósporos são hialinos, unicelulares, produzidos em ascos dispostos no ascocarpo, e quando atingem a maturidade as paredes dos ascos se desintegram expondo os ascósporos, os quais são envolvidos por uma massa mucilaginosa e por meio de pressão hidrostática essa massa é levada até o ostíolo, sendo depositada no topo do rostro do peritécio, (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005; CABRERA et al., 2016). O sistema de acasalamento de *C. cacaofunesta* é determinado por um mecanismo bipolar de *mating*, o qual apresenta as formas idiomorfas MAT1 e MAT2 no loco MAT1. A reprodução sexual de *C. cacaofunesta* ocorre por homotalismo via um mecanismo unidirecional de troca de *mating-type*, no qual linhagens MAT2 podem se converter em MAT1, se tornando autoestéreis, por meio da deleção do gene MAT2, sendo essa conversão irreversível (CABRERA et al., 2016; HARRINGTON; McNEW, 1997).

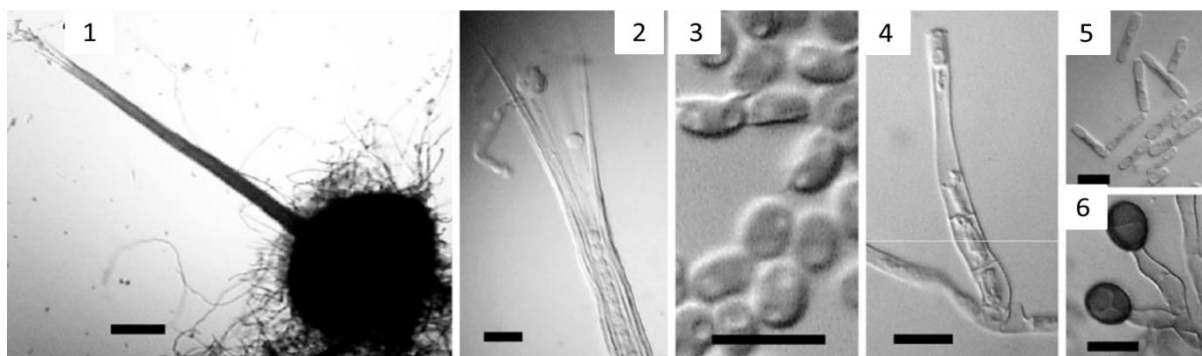


Figura 2: reprodução de *Ceratocystis cacaofunesta*. 1. Peritécio; 2. Hifa ostiolar; 3. Ascósporos; 4. Conidióforo; 5. Endoconidióforos de hifas vegetativas; 6. Aleurioconidióforos. Escala: 4 5 100 mm; 5–9 5 10 mm. (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005, p. 65).

Genética populacional e o controle da Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro

A genética populacional permite descrever como ocorre a distribuição genética e genotípica de populações no tempo e no espaço, considerando a ação das forças evolutivas: seleção, mutação, deriva genética e migração (HAMRICK, 1982). O estudo da genética populacional possibilita a quantificação da variabilidade genética existente no nível de espécie e de populações (TORGGLER et al., 1995). Em fitopatógenos essa variação pode ser estimada através da análise da frequência alélica, heterozigosidade observada e esperada, índice de fixação e porcentagem de locos que apresentam polimorfismo (MCDONALD, 2004).

A frequência alélica pode ser obtida por meio do número médio de alelos por loco, o qual representa a riqueza alélica (NEI, 1978). A heterozigosidade esperada é uma medida de genética intrapopulacional, a qual descreve toda a variação genética em uma população, por meio da mensuração da proporção de heterozigotos dentro da população (NEI, 1978). A porcentagem de locos polimórficos indica quantos apresentam polimorfismo. Essa medida se baseia na frequência de alelos existentes nos locos. A estrutura genética de uma população pode ser quantificada por meio de modelos estatísticos derivados do teorema de Hardy-Weinberg (MOURA, 2005). Esse teorema pressupõe que em uma população de tamanho infinito, com ausência das forças evolutivas e prevalência de panmixia, as frequências gênicas e genotípicas tendem a se manter constantes ao longo das gerações (FUTUYMA, 1992). Nessa situação não haverá estruturação genética da população, porém, eventos que levam à diminuição de heterozigotos e ao aumento de homozigose tendem a desviar a população desse equilíbrio e o índice de fixação possibilita estimar esse desvio (MOURA, 2005).

McDonald e Linde (2002) defendem que os princípios da genética populacional podem contribuir como guia para o desenvolvimento de estratégias de controle de fitopatógenos em agrossistemas. McDonald (2004) expõe que os princípios da genética populacional podem ser utilizados para compreender como populações de patógenos irão evoluir e a partir desse conhecimento traçar estratégias para o controle. McDonald (2015) argumenta que o conhecimento de aspectos da genética de população, como a origem do patógeno e filogeografia, por exemplo, podem auxiliar na busca de um germoplasma resistente para programas de melhoramento e também oferecer uma visão sobre o modo de disseminação do patógeno.

Em se tratando da genética populacional de *C. cacaofunesta*, um importante estudo foi o realizado por Engelbrecht et al. (2007), o qual comparou a diversidade genética de populações de *C. cacaofunesta* coletados em diversos países, incluindo isolados de 4 cidades da Bahia. Por meio de marcadores microssatélites e rDNA-ITS, os autores verificaram pouca variabilidade entre os grupos encontrados na Bahia, Colômbia, e Costa Rica, diante disto, propuseram que essas populações foram introduzidas. Novos estudos utilizando isolados de uma maior área geográficas da Bahia podem contribuir para trazer dados mais recentes sobre a diversidade da espécie nessa região, bem como servir para consolidar as informações já expostas por estudos anteriores, contribuindo para o delineamento de estratégias de manejo da Murcha de *Ceratocystis*.

Uma ferramenta apropriada para contribuir na elucidação da biologia populacional de *Ceratocystis cacaofunesta* são os marcadores moleculares microssatélites. De acordo com Vieira et al. (2016), os microssatélites são marcadores de grande utilidade em estudos de estrutura populacional, mapas genéticos e processos evolutivos. Os microssatélites ou Sequências Simples Repetitivas são repetições em tandem de herança co-dominante, compostas de 1 a 6 pares de bases que por seu alto polimorfismo e reprodutibilidade são úteis em estudos de diversidade genética (GEMAYEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2016). Muitos desses sítios irão apresentar variação polimórfica no número de cópias que estão em tandem, e a partir de iniciadores desenvolvidos para os sítios invariantes do DNA que flanqueiam a região microssatélite e da amplificação com esses iniciadores obtém-se produtos de DNA que apresentam variação quanto ao tamanho, em virtude do número de repetições (TEMPLETON, 2011). Os microssatélites estão presentes ao longo do genoma de eucariotos e procariotos, em regiões codificantes e não codificantes e devido à sua instabilidade (taxa de mutação entre 10^3 e 10^6), possuem um importante papel nos processos evolutivos, por meio da criação e manutenção da variabilidade genética quantitativa (GEMAYEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2016; TÓTH; GÁSPÁRI; JURCA, 2000). Portanto, esses marcadores são propícios para o estudo da genética populacional de *C. cacaofunesta*.

CAPITULO 1

VALIDAÇÃO DO MÉTODO *IN HOUSE* E EXTRAÇÃO DE DNA DE *Ceratocystis cacaofunesta*

Resumo

Ceratocystis cacaofunesta Engelbrecht & Harrington é o agente causal da Murcha de Ceratocystis do Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), uma doença letal à planta. O conhecimento sobre a variabilidade deste fitopatógeno é uma importante ferramenta para um manejo eficiente da doença. Nesse sentido, para a análise molecular de estudos de genética populacional, é importante que se obtenha DNA em quantidades adequadas e com boa qualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de massa micelial de *C. cacaofunesta* em dois meios de cultura e analisar a quantidade e a qualidade do DNA extraído a partir de massa micelial obtida em cada meio e analisar a pureza do DNA extraído, utilizando-se três métodos de extração de DNA (CTAB, SDS e MATB). O experimento indicou não haver diferença significativa entre os meios testados quanto à quantidade de micélio produzida. Em relação aos protocolos de extração, foi observado que o meio malte em interação com o protocolo de extração SDS apresentou melhores resultados em relação às razões de pureza do DNA como também a concentração de DNA obtida.

Palavras-chave: Microssatélites, DNA, *Theobroma cacao*, Fitopatógenos.

1. Introdução

Ceratocystis cacaofunesta Engelbrecht & Harrington é um ascomiceto, hospedeiro especializado do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e agente causal da Murcha de Ceratocystis do Cacaueiro, uma doença que pode levar à murcha foliar e morte da planta (ENGELBRECHT et al., 2007). Desde o seu primeiro relato no Equador em 1918 (RORER, 1918), a Murcha de Ceratocystis do Cacaueiro causou prejuízos econômicos em lavouras cacaueiras da Colômbia, Equador, Colômbia, Venezuela, Peru, Costa Rica, Equador e Trinidad (BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2007). E mais recentemente a doença foi identificada no Brasil (BEZERRA, 1997). De acordo com McDonald e Linde (2002) o manejo eficiente de doenças causadas por fitopatógenos depende também da compreensão da variabilidade e biologia do agente causal.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados para o estudo de genética populacional de fitopatógenos, entre esses, os marcadores microssatélites se caracterizam como um método bem reconhecido para análises moleculares de genética populacional, relações filogenéticas e aspectos evolutivos (CARDOSO; WILKINSON, 2008). As análises

de genética de patógenos requerem o uso de um elevado número de indivíduos, o qual possibilite a comparação entre e dentro de populações (ZELAYA-MOLINA et al., 2011). Assim como a obtenção de massa micelial suficiente para a extração de DNA em quantidade e qualidade adequada (FALEIRO et al., 2003).

O co-isolamento de polissacarídeos, nucleases, melaninas e compostos secundários presentes na parede celular fúngica dificultam a lise da célula e exposição dos ácidos nucléicos (FREDRICKS et al., 2005). Este é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA fúngico, podendo danificar o DNA e inibir a ação da enzima Taq polimerase.

De modo geral, o protocolo de extração de DNA mais utilizado para a extração de DNA de *C.cacaofunesta*, a partir de massa micelial para as diferentes espécies é o detergente aniônico SDS (sodium dodecyl sulfato) (DESCENZO; HARRINGTON 1994). Pequenas variações no método de extração de DNA são relatadas na literatura tais como a mudança de concentração de um ou outro componente do tampão de extração, tempos e força gravitacional das centrifugações e a utilização ou não de fenol no processo de retirada de proteínas.

Portanto, o método utilizado deve ser capaz de gerar DNA de qualidade e de concentração adequados para estudos moleculares e livres de inibidores de PCR (TEDERSOO et al., 2010). A diferença básica entre esses protocolos está na composição do tampão de extração que normalmente utilizam um detergente catiônico CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), ou um aniônico SDS (Dodecil sulfato de sódio) ou MATAB para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas. O Tampão de extração ainda integra um sal para dissociar as proteínas do DNA e um inibidor de DNAses para proteger o DNA

Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de massa micelial de *C. cacaofunesta* em dois meios de cultura e analisar a quantidade e a qualidade do DNA extraído a partir de massa micelial obtida em cada meio e analisar a pureza do DNA extraído, utilizando-se três métodos de extração de DNA (CTAB, SDS e MATB).

2. Material e Métodos

Seleção e ativação dos isolados

As atividades foram realizadas nos laboratórios de *Ceratocystis* e de Fitopatologia Molecular da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau - CEPEC (CEGEN Nº 133/2015/SECEX/CGEN), situado na sede da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em Ilhéus, BA.

Foram utilizados cinco isolados de *C. cacaofunesta* (CC20, CC14, CC82, CC86, CC87) que estavam preservados na coleção de *Ceratocystis* (CEGEN Nº 133/2015/SECEX/CGEN) do Centro de Pesquisas do Cacau- CEPEC (CEPLAC, Ilhéus-Ba). Os isolados foram removidos da coleção, onde estavam preservados água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e cultivados em meio seletivo (batata, dextrose, ágar - BDA e ácido tartárico a 1%), em placas de Petri e mantidos à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias no escuro. Este procedimento foi realizado para ativação das colônias dos isolados e confirmação através de identificações morfológica das estruturas. Após o crescimento em meio seletivo, foi feita nova repicagem e as bordas das colônias foram retiradas e transferidas para placas de Petri contendo apenas meio BDA. As placas foram mantidas sob iluminação constante à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias.

Crescimento de *C. cacaofunesta* em diferentes meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura líquidos: Extrato de malte e levedura (extrato de malte 2% e levedura 0,2% - MYE) e meio mineral (glicose 1%, cloreto de potássio 0,02%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,02 e extrato de levedura 0,5%). Não foi feito ajuste de pH nos respectivos meios. O crescimento do micélio em cada meio de cultura foi iniciado a partir de um único disco de 5mm de cultura axênica *C. cacaofunesta*, o qual foi colocado no centro de cada erlenmeyer de 250mL contendo 30 mL de meio líquido, sendo estas armazenadas a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em incubadora B.O.D. por 5 dias.

Decorrido o período de incubação, a massa micelial foi lavada com água destilada estéril e filtrada com o uso auxílio de bomba de vácuo (Quimis®). O micélio após drenagem foi secado em papel filtro, pesado e acondicionado em microtubos de 2 mL e estocada a -20°C para uso posterior.

Extração de DNA

O DNA de *C. cacaofunesta* foi obtido utilizando-se três métodos de extração: SDS de DeScenzo e Harrington (1994) com modificações (GUSMÃO et al. 2018, dados não publicados); CTAB de Doyle e Doyle (1987) e o protocolo MATAB de Risterucci et al. (2000).

Protocolo CTAB: o micélio foi macerado em nitrogênio líquido e acrescentados 800 μ L de tampão de extração (2% de CTAB; 100 mM de Tris-HCl pH8; 20 mM de EDTA pH 8; 1.4 M de NaCl; 0.2% de β -Mercaptoetanol), homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 65°C por 1h e posteriormente centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e adicionado a este uma proporção de 1:1 de clorofórmio-álcool isoamílico – CIA (24:1), seguido por homogeneização por inversão de tubos durante 5 minutos e depois centrifugação a 14000 rpm, por 10 minutos, sendo esta etapa repetida por 2 vezes. Seguiu-se então com a adição de isopropanol na proporção 1:1, sendo as amostras incubadas em freezer -20°C durante 30 minutos e depois centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado em 200 μ L de etanol a 95%, depois etanol a 70% e após a completa evaporação do etanol, o sobrenadante foi ressuscitado em 150 μ L de RNase e incubado em banho-maria a 37°C por 2 horas.

Protocolo SDS: as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionadas 800 μ L de tampão de extração (1.25% de SDS; 100 mM de Tris-HCl pH8; 500 mM de EDTA pH 8; 0.1 M de NaCl; 0.2% de β -Mercaptoetanol), sendo em seguida homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 65°C por 1h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi recuperado e adicionado CIA na proporção 1:1, seguido de homogeneização por inversão de tubos por 7 minutos e centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante recuperado foram adicionados 70 μ L de SDS 10% e a mistura incubada em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo repetida então a etapa do CIA. Ao sobrenadante resultante após a centrifugação foi adicionado isopropanol na proporção 1:1, e as amostras foram homogeneizadas gentilmente, incubadas em freezer -20°C durante 30 minutos e depois centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante gerado foi descartado e o precipitado lavado em 200 μ L de etanol 95% e depois etanol a 70%, após a evaporação do etanol o precipitado foi ressuscitado em 150 μ L de RNase, sendo as amostras incubados em banho-maria a 37°C por 2 horas.

Protocolo MATAB: as amostras foram também maceradas em nitrogênio líquido, seguido por adição de 800 μ L de tampão de extração (2% de MATAB; 150 mM de Tris-HCl pH8; 40 mM de EDTA pH 8; 0.7 M de NaCl; 1% de PEG 600; 10 mM de sulfato de sódio). As amostras foram homogeneizadas, incubadas em banho-maria 65°C por 1h e após adição de CIA na proporção de 1:1, essas foram homogeneizadas por 5 minutos e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, sendo essa etapa repetida por 2 vezes. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado isopropanol na proporção 1:1 e as amostras foram incubadas em freezer -20°C durante 30 minutos e centrifugadas mais uma vez a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi lavado em 200 μ L de etanol 95% e 70% e depois ressuspensionado em 150 μ L RNase e levado a banho-maria 37°C por 2 horas.

O experimento foi realizado em arranjo fatorial (5 isolados x 2 meios de cultura x 3 protocolos de extração) com 3 repetições, totalizando 90 amostras.

Verificação da integridade e qualidade do DNA

A integridade e a quantidade do DNA foram verificadas usando eletroforese em gel de agarose 1% coradas com GelRed® e visualizadas em transiluminador L-Pix/Loccus. A quantidade e a qualidade do DNA foi estimada em espectrofotometria no NanoDrop ND-1000/*ThermoFisher*, observando as razões de absorbância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando verificada diferença significativa aplicou-se o teste Tukey a 5% de significância. As análises foram feitas utilizando o *software RStudio* versão 1.0.153.

A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de amplificação em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o loco de microssatélite CfCAA80 *forward* (5' ACCCGTCTCGTATTGGCTAT 3') e *reverse* (5' AATCGTTCGCATTCAGGTGG 3') (FERREIRA et al., 2010). As reações de PCR foram preparadas em volume final de 20 μ L contendo 10x de tampão (Fermentas), 25mM de BSA, 2,5mM de dNTPs, 25mM de MgCl₂ (Fermentas), 2pmol de primer *forward*, 2pmol de primer *reverse* 5U/ μ L de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia) e 20ng de DNA. Os ciclos de amplificações foram realizados no *Applied Biosystems Veriti (ThermoFisher Scientific)* seguindo as condições descritas por Ferreira et al. (2010): desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 94°C por 30 segundos, 35 ciclos de 57°C por 60 segundos, 72°C por 72 segundos e extensão

final de 72°C por 30 minutos. O produto das amplificações foi analisado em gel de agarose 2% com 5µL de produto de PCR e corado com *GelRed*®.

3. Resultados e Discussão

Em ambos os meios de cultura testados o diâmetro das colônias e a formação de estruturas reprodutivas foi similar. Abundantes peritécios foram observados em meio de cultura cerca de 5 a 7 dias da repicagem. Observou-se que aos 12 dias após a repicagem as colônias apresentaram 6 cm de diâmetro atingindo todo o diâmetro da placa de petri. Mas, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na quantidade de micélio produzido de acordo com o meio de cultivo utilizado ($p > 0,05$) (Tabela 1). Estes resultados são relevantes, tendo em vista a necessidade de se obter ascósporos e outras estruturas reprodutivas em menor tempo para o preparo de suspensões assim como uma massa micelial com quantidade suficiente para obtenção de DNA genômico visando a realização de estudos moleculares.

Tabela 1: Produção média de massa micelial de *Ceratocystis cacaofunesta* por frasco após sete dias de crescimento em dois meios de meios de cultivo

Meio de cultivo	Quantidade de amostras	Média da quantidade de micélio (mg)
Malte	90	436,37*
Mineral	90	414,93*

*Resultados não obtiveram diferenças estatísticas significativas ao nível de 5%

Foi possível a obtenção de DNA integro e de qualidade em todos os tratamentos testados (Figura 1). No geral, todos os isolados apresentaram DNA de qualidade e boa pureza (relação A260/A28 maior ou igual 1,56, (Figura 1).

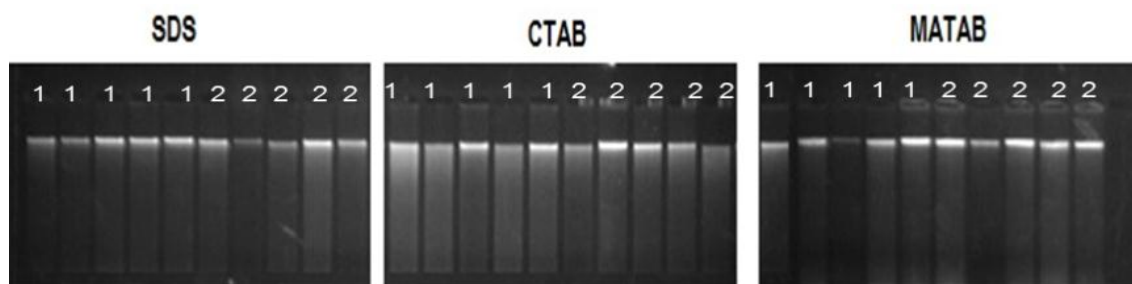


Figura 1: comparação de métodos de extração de DNA genômico de *C. cacaofunesta*. Da esquerda para a direita estão os resultados referentes aos protocolos SDS, CTAB e MATAB. Os números 1 e 2 que aparecem na figura referem-se respectivamente ao meio de cultivo malte e ao meio mineral.

Não houve diferença significativa entre a quantidade de DNA obtida e o peso de micélio produzido nos dois meios de cultura (Material Suplementar).

Com base na ANOVA, houve interação significativa entre o meio de cultura e a quantidade de DNA obtida a partir do peso de micélio de 250 mg de micélio produzido nos dois meios de cultura (Material Suplementar) (Figura 2). O meio malte + levedura (ML) em interação com o protocolo SDS foi o que apresentou DNA íntegro de alto peso molecular permitindo inferir que o protocolo ML+ SDS possibilitou a melhor eliminação de impurezas, e amostras de DNA mais puro, o que foi observado pela espectrofotometria, com base na relação de absorbância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) que alcançaram valores $\cong 1,8$. Valores inferiores a esse padrão provavelmente indicam a presença de contaminantes que absorvem luz no comprimento de onda de 280nm, como, por exemplo, proteínas (Thermo Fisher Scientific (2008)).

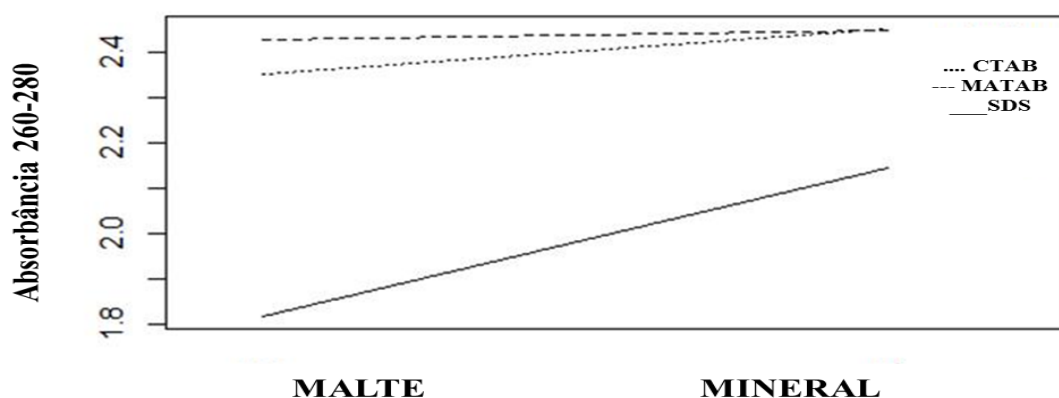


Figura 2: Razão de absorbância (A_{260}/A_{280}) estimada em NanoDrop ND1000/ThermoFisher de DNA de *Ceratocystis cacaofunesta* obtidos de micélios crescidos em dois meios de cultura e três protocolos de DNA.

A pureza do DNA extraído pelos diferentes protocolos foi avaliada pela razão A_{260}/A_{230} (Figura 3). O DNA obtido com o protocolo SDS em interação com o meio malte e mineral exibiu absorbância média de A_{260}/A_{230} próximas de 2,0. Resultados similares foram observados com o protocolo MATAB tanto em associação com o meio malte, como também com meio mineral (média de 1,99). Por outro lado, o DNA obtido com o protocolo CTAB apresentou médias inferiores a $\leq 1,8$ tanto em interação com o meio malte como com o mineral (Tabela 2). De acordo com o boletim técnico *Thermo Fisher Scientific* (2008), uma amostra de DNA é considerada pura quando os valores para essa razão variam de 2,0 a 2,2, sendo que índices inferiores a esses podem sinalizar a presença de contaminantes que absorvem luz no comprimento de 230nm. Valores significativamente inferiores a 2,0, para a razão A_{260}/A_{230} ,

refletem a não remoção completa de alguns contaminantes durante a extração (Zelaya-Molina et al. (2011). E, segundo Hansen et al. (2007) pode também indicar a presença de impurezas como fenóis, resíduos de sais de tampão ou outros compostos aromáticos.

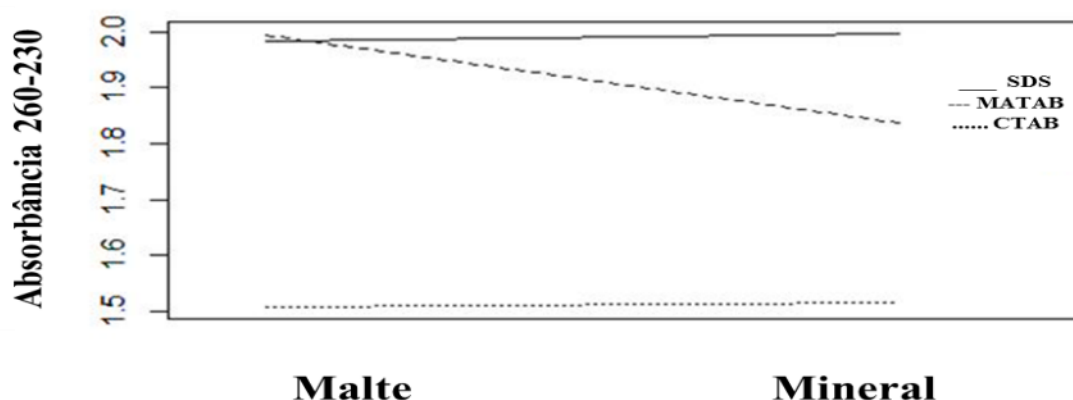


Figura 3: Razão de absorbância $A_{260/230}$ estimada em *NanoDrop ND1000/ThermoFisher*

Tabela 2: Média total das razões de absorbância $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ e concentração de DNA por ng.

Protocolo-Meio de cultivo	$A_{260/280}$	$A_{230/260}$	Média da concentração de DNA (ng)
CTAB			
Malte	2,39	1,5	199,71
Mineral	2,45	1,51	186,48
SDS			
Malte	1,81	1,98	506,93
Mineral	2,14	1,99	374,76
MATAB			
Malte	2,43	1,83	170,91
Mineral	2,44	1,99	229,88

Em um estudo sobre métodos de extração de DNA para comunidades microbianas, Ning et al. (2009), discorrem sobre o papel das relações de absorbância ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$) em estudos moleculares, e defendem que em resultados de PCR a qualidade das bandas de DNA é mais influenciada pela razão $A_{260/280}$ do que $A_{260/230}$.

O DNA obtido com o auxílio dos 3 protocolos de extração testados em interação com os 2 meios de cultivo, foi bem sucedido em relação à amplificação por PCR. Com a amplificação dos primer microsatélite CfCAA80, as amostras geraram produtos de PCR com

bandas de aproximadamente 300pb, as quais foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 4).

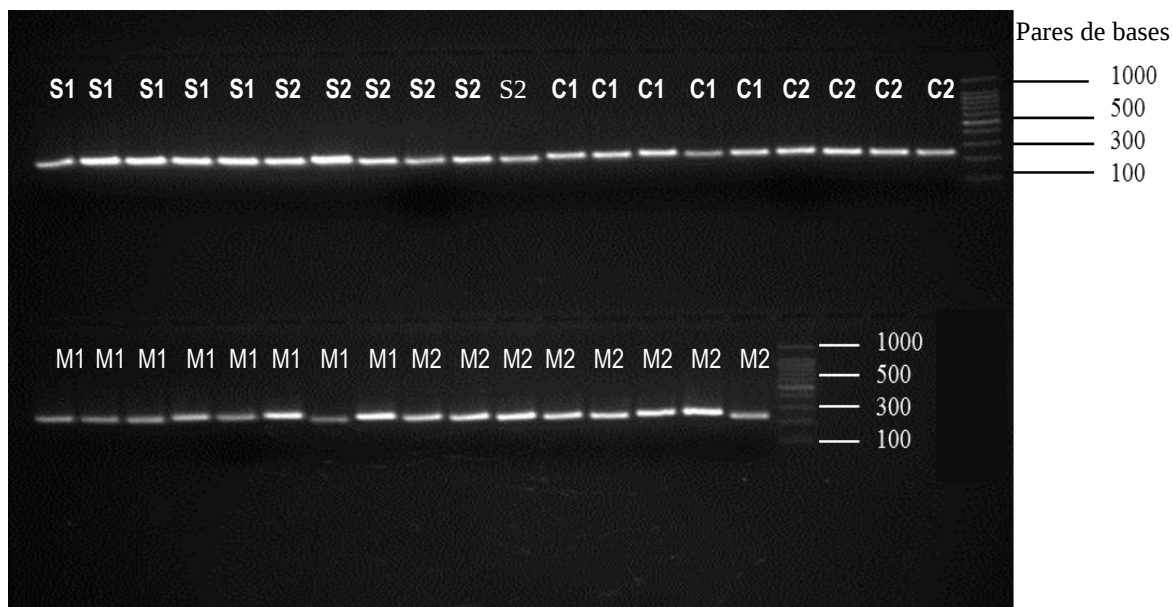


Figura 4: Produtos de PCR em gel de agarose a 2% (loco microsatélite CfCAA80 com bandas de aproximadamente 300pb) comparando os 3 protocolos de extração testados. S=SDS; C=CTAB; M=MATAB. Os números 1 e 2 referem-se aos meios mineral e malte, respectivamente. DNA ladder 100pb.

Assim, com base nos resultados obtidos, e nas condições em que se realizou o presente estudo, conclui-se que os 3 métodos foram eficientes para a obtenção de DNA de qualidade e em concentrações suficientes para a realização da técnica PCR-SSR. De forma análoga, os dois meios de cultivo forneceram massa micelial em quantidade similar. Sugere-se, portanto, a preferência pelo meio malte também pela facilidade e praticidade de preparo do meio de cultivo malte, quando comparado ao meio mineral, sendo inclusive um meio utilizado em trabalhos anteriores com o gênero *Ceratocystis* (FERREIRA et al., 2010; ENGELBRECHT et al., 2007). No que diz respeito aos protocolos de extração testados, foi observada uma diferença significativa entre esses, e apesar dos 3 protocolos terem sido bem sucedidos no teste de amplificação de PCR, o protocolo SDS em interação com o meio de cultivo malte foi o que apresentou melhores resultados em relação à concentração de DNA obtida e qualidade da amostra de acordo com as razões de absorbância A260/280 mineral.

Referências

- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS A. C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology** 93, p. 1274-1284, 2003.
- BEZERRA, J.L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, n1, v 6, 1997.
- CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 55-57, 2008.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water, **Journal of Tropical Medicine and hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939
- DeSCENZO, R. A.; HARRINGTON, T. C. Use of (CAT)₅ as a DNA fingerprinting probe for fungi, **Phytopathology**, v. 84, p. 534-540, 1994.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p.11–15, 1987.
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T.C.; ALFENAS, A.C.; SUAREZ, C. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. **Plant Pathology**, v 56, p. 923-933, 2007.
- FALEIRO, F. G.; NIELLA, G. R.; CERQUEIRA, A. R. R. N; DAMACENO, V.O; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, F. A. S. G. Produção de micélio de *Crinipellis perniciosa* em quatro meios de cultura, visando extração de DNA, **Fitopatologia Brasileira**, n. 29, v. 3, p. 312-315, 2004.
- FERREIRA, E. M; HARRINGTON, T.C; THORPE, D. J.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, v 59, p.721–735, 2010.
- FREDRICKS, D.N.; SMITH, C.; MEIER, A. Comparison of Six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5122–5128, 2005.
- HANSEN, T. V. O.; SIMONSEN, M. K.; NIELSEN, F. C.; HUNDRUP, Y. A. Collection of blood, saliva and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA, **Cancer Epidemiology Biomark and Prevention**, v. 16, p. 2072-2076, 2007.
- MCDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v 124, n. 2, 2002, p. 163-180, 2002.
- NING, J.; LIEBICH, J.; KÄSTNER, M.; ZHOU, J.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P (2009) Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional

gene microarray in soil microbial community study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 983-993, 2009.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L., **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 948–955, 2000.

RORER, J.B. **Enfermedades y plagas de cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo de cacao**. Asociación de Agricultores del Ecuador, 1918.

TEDERSOO, L.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; JAIRUS, T.; SADAM, A.; SAAR, I.; BAHRAM, M.; BECHEM, E.; CHUYONG, G.; KÖLJALG, U. 454 pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytologist** 188, p. 291–301, 2010.

ZELAYA-MOLINA, L. X.; ORTEGA, M. A.; DORRANCE, A. E. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis, **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 715-720, 2011.

CAPÍTULO 2:

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ceratocystis cacaofunesta* EM CACAUEIROS NO SUL DA BAHIA

Resumo

A Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro (*Theobroma cacao*), causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta*, foi identificada pela primeira vez no Sul da Bahia em 1997 e atualmente está disseminada no estado. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética de populações de *C. cacaofunesta* em cacaueiros oriundos de vários plantios comerciais do Sul da Bahia. Cento e vinte e seis isolados de 4 macro regiões (Ilhéus-Itabuna, Extremo Sul, Vale do Jiquiriçá, Baixo Sul) foram genotipados com 11 locos microssatélites. Avaliou-se o nível de estruturação genética, a diversidade genética e genotípica e testada a hipótese de acasalamento aleatório. A população total apresentou uma moderada estruturação ($\theta_{ST} = 0,07$), havendo uma maior diferenciação (91,41%) dentro das subpopulações. A subpopulação Ilhéus-Itabuna apresentou diferenciação genética em relação às subpopulações Vale do Jiquiriçá ($\theta_{ST} = 0,06$) e Baixo Sul ($\theta_{ST} = 0,08$). A população total apresentou alta diversidade genética ($H = 0,59$) e genotípica ($G_5 = 5,7$). A hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada, sugerindo que a reprodução ocorra via autofecundação. Os índices de diversidade genéticas encontrados nas subpopulações *C. cacaofunesta* foram similares ao esperado para populações. Assim, as linhagens de *C. cacaofunesta*, isoladas de cacaueiro parecem ser nativas do Sul da Bahia.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Microssatélites. Estrutura genética. Fitopatógenos.

1. Introdução

A Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro (*Theobroma cacao*), causada pelo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & Harrington, causa clorose foliar, lesões no caule do cacaueiro que vão da coloração marrom acastanhada ao marrom escuro, murcha total das folhas que permanecem aderidas aos galhos e por fim, morte da planta, (DELGADO; SUAREZ, 2003; SANTOS et al., 2013). A infecção ocorre principalmente via lesões no caule do hospedeiro, por meio da poda utilizando ferramentas contaminadas com o patógeno (BAKER et al., 2003). A disseminação também pode ocorrer por meio de espécies de insetos Scolitidae e Platipodinae, ao carregar esporos sexuais do fungo de uma planta doente para uma saudável (ENGELBRECHT et al., 2007).

A Murcha de *Ceratocystis* foi relatada pela primeira vez em cacaueiros no Equador em 1918 (RORER, 1918). E depois atingiu os diversos países das Américas do Sul, América Central e nas ilhas de Haiti e Trinidad, a doença causou prejuízos no cultivo do cacaueiro

(BAKER; HARRINGTON, 2003). Em 1978 a Murcha de *Ceratocystis* do Cacaueiro foi constatada pela primeira vez no Brasil, no estado de Rondônia (BASTOS; EVANS, 1978), e em 1997 foi oficialmente relatada no Sul da Bahia, em viveiros voltados para a produção de mudas para enxertia (BEZERRA, 1997), em 1998 foi observada em plantas adultas no campo (BEZERRA, 1998).

Após sua introdução na Bahia a Murcha de *Ceratocystis* causou grandes prejuízos a cacauicultura da Bahia sendo considerada como uma das mais severas enfermidades do cacaueiro. Em um levantamento realizado no sul baiano, entre 2000 e 2005, pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira-CEPLAC, foi confirmada a disseminação da doença pelos cacauais da região, sendo na época detectada em 42 fazendas ao longo de 22 municípios (ALMEIDA et al., 2005). Maior incidência (30 %) foi encontrada no município de Uruçuca, mas os demais municípios apresentaram uma incidência média inferior a 1 %. A alta incidência deve-se, provavelmente, pela prevalência da variedade THEOBAHIA altamente suscetível a Vassoura de Bruxa do Cacaueiro.

Ceratocystis cacaofunesta pertence ao complexo *C. fimbriata*, o qual abriga uma série de espécies crípticas fitopatógenas de inúmeras culturas de importância econômica. Esse complexo é formado pelos clados da América Latina, América do Norte, Ásia e das espécies africanas de *C. albifundus* (HARRINGTON, 2000; FERREIRA et al., 2010). De acordo com Engelbrecht e Harrington (2005), as espécies pertencentes ao complexo *C. fimbriata* são homotáticas e devido a autofecundação as populações geradas podem ser essencialmente clonais. *C. cacaofunesta* faz parte do clado latino americano, considerado um dos importantes grupos geográficos, por englobar espécies agressivas para diversas culturas (JOHNSON; et al., 2005).

Baker et al. (2003) estudaram diferentes isolados do gênero *Ceratocystis* em diversos hospedeiros e verificaram, por meio de testes de inoculação cruzada, que as linhagens encontradas no cacaueiro (*Teobroma cacao*), batata doce (*Ipomoea batatas*) e *Platanus* apresentavam características de especialização para o hospedeiro. Posteriormente, Engelbrecht e Harrington (2005) analisaram diferenças morfológicas, moleculares e testes de interesterilidade entre isolados de *C. cacaofunesta* encontrados em *Platanus*, batata-doce e do cacaueiro, e verificaram que esses isolados eram interestéreis ao serem cruzados entre si, assim, mantiveram o patógeno da batata-doce como *C. fimbriata* e reclassificaram os patógenos do *Platanus* e do cacaueiro como *C. plantani* e *C. cacaofunesta*, respectivamente.

O agente causal da murcha de *Ceratocystis*, *C. cacaofunesta*, é hospedeiro especializado, tido como originário da região do Alto da Amazônia (HARRINGTON et al., 2011). Apesar do conhecimento que se tem sobre *C. cacaofunesta* são poucos os estudos referentes à variabilidade genética. Supõe-se que a doença tenha sido introduzida na Bahia juntamente com o plantio de variedades resistentes à Vassoura de Bruxa do Cacaueiro em materiais de propagação vegetativa (Engelbrecht & Harrington, 2005; Engelbrecht et al., 2007b). De fato o patógeno pode facilmente ser introduzido para novas áreas em material de embalagem de madeira sólida, ferramentas contaminadas e material propagativo infectado (Harrington, 2000; Baker et al., 2003; Engelbrecht et al., 2007a).

McDonald (2015) discorre que o conhecimento sobre a biologia da população de um fitopatógeno, o qual inclui a genética populacional, pode oferecer informações que servem de base para a implementação de estratégias de manejo de doenças. McDonald e Linde (2002) argumentam que a estrutura genética de populações de fitopatógenos tem implicação direta nos mecanismos de disseminação de doenças e nos padrões de desenvolvimento de epidemias.

Atualmente, o enfoque do programa de melhoramento genético do cacaueiro na CEPLAC é a obtenção de clones produtivos com resistência quantitativa as várias doenças que infectam o cacaueiro. Mas, são poucos os clones de cacau com resistência ao mal do facão. A variabilidade genética da população do patógeno é um fator que pode explicar este comportamento.

Esta pesquisa apresenta uma análise detalhada sobre a variabilidade genética de *C. cacaofunesta* no estado da Bahia e incluiu 126 isolados de toda a região cacaueira do estado utilizando 11 marcadores microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir do DNA genômico de *C. cacaofunesta* (STEIMEL et al., 2004), previamente utilizados em diversos estudos com o gênero *Ceratocystis* (Engelbrecht et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; Ferreira et al. 2011; Oliveira et al., 2015).

Sob a hipótese de que as populações de *C. cacaofunesta* do Sul da Bahia apresentam pouca variabilidade, o que é compatível com populações introduzidas. De acordo com McDonald (1997) populações introduzidas em comparação as populações nativas apresentam substancialmente baixos níveis de diversidade genética com poucos genótipos na população.

O objetivo geral deste estudo foi analisar a diversidade genética de *C. cacaofunesta* em cacaueiros oriundos de vários plantios comerciais do Sul da Bahia. O trabalho teve como objetivos específicos: investigar a existência de populações de *C. cacaofunesta* na Bahia; analisar os níveis de diversidade dentro e entre as populações; e avaliar como essas

populações estão interagindo entre si, de modo a obter informações que possam subsidiar a seleção de materiais resistentes para plantio comercial, o que constitui a melhor alternativa de controle da doença

2. Material e Métodos

Obtenção de isolados

Foram obtidos 126 isolados de *C. cacaofunesta* que estavam preservados na coleção de *Ceratocystis* (CEGEN Nº 133/2015/SECEX/CGEN) do Centro de Pesquisas do Cacau-CEPEC (CEPLAC, Ilhéus-Ba), os quais foram coletados de plantas com sintomas da Murcha de *Ceratocystis* ao longo de 22 municípios do estado da Bahia-Brasil (Tabela 1) pela pesquisadora Dilze Argolo. Vinte isolados foram excluídos das análises por apresentarem incongruências. Assim, foi utilizado para este estudo um total 106 isolados. O registro dos isolados foi preservado da Coleção de *Ceratocystis*, que é patrimônio genético do país.

Tabela 1: Registro e origem de isolados de *Ceratocystis cacaofunesta* utilizados para estudo de genética populacional no estado da Bahia, Brasil.

Subpopulações	Agrossistema	Nº de isolados	Registro do Isolado
Ilhéus-Itabuna	Almada, Canavieiras, Camacan, Ipiaú	66	Cc01-Cc17; Cc19-Cc25; Cc28-Cc34; Cc37-Cc41; Cc46-Cc47; Cc58-Cc59; Cc72-Cc73; Cc75; Cc77; Cc79; Cc83-Cc89; Cc90-Cc95; Cc120-Cc126; Cc159; Cc171; Cc175; Cc181; Cc183; Cc188; Cc194-Cc196; Cc200; Cc211; Cc229-Cc239
Extremo Sul	Porto Seguro, Caravelas, Itamarajú	05	Cc48-Cc49; Cc55-Cc57; Cc228
Vale do Jiquiriçá	Jiquiriçá	18	Cc61-Cc68; Cc71; Cc78; Cc103; Cc105; Cc109-Cc110; Cc163-Cc164; Cc167; Cc184-Cc186
Baixo Sul	Recôncavo, Valença	17	Cc26; Cc36; Cc51; Cc53-Cc54; Cc97; Cc99-Cc100; Cc162; Cc172; Cc102; Cc115; Cc130; Cc135; Cc143; Cc145; Cc147-Cc150; Cc197; Cc207-Cc226

*O código mais o número dos isolados referem-se ao registro dos isolados na coleção de *Ceratocystis cacaofunesta* (Cc) (CEGEN Nº 133/2015/SECEX/CGEN) do Centro de Pesquisas do Cacau-CEPEC (CEPLAC, Ilhéus-Ba).

Os isolados foram removidos da coleção onde estavam preservados em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e cultivados em meio seletivo (batata, dextrose, ágar - BDA e ácido tartárico a 1%), contido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais foram mantidas à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias no escuro. Este procedimento foi realizado para ativação das colônias dos isolados e confirmação através de identificações morfológica das estruturas. Após o crescimento em meio seletivo, foi feita nova repicagem, para a obtenção de culturas monoaspóricas (CHOI; HYDE; HO, 1999).

A massa de ascósporo de um único peritécio, por isolado, foi homogeneizada em 20 μl de água destilada estéril. A suspensão obtida foi espalhada de forma homogênea na superfície do meio utilizando sementeira por espalhamento, em formato de um 7 com o auxílio de uma alça de vidro estéril, em placa de Petri contendo apenas meio BDA. As placas foram mantidas sob iluminação constante à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias. As colônias desenvolvidas individualmente foram recuperadas e inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA.

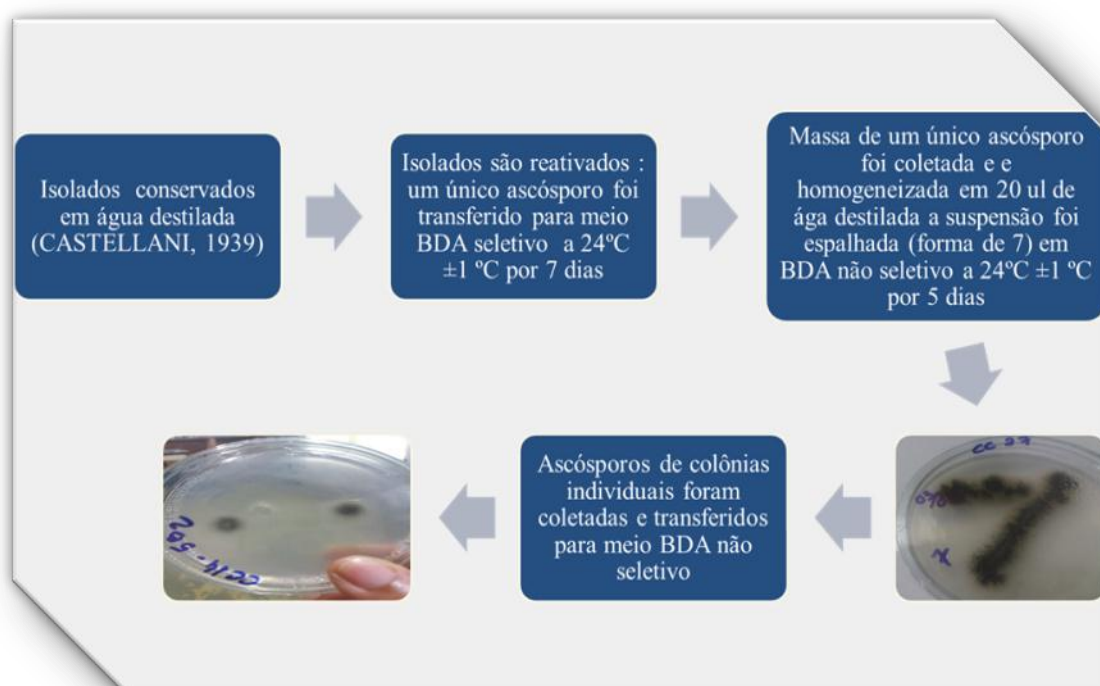


Figura 1: Fluxograma do processo de obtenção de culturas monoaspóricas.

Os isolados obtidos foram agrupados em 4 macrorregiões com os aspectos edafoclimáticos e agrícolas dos locais de coleta. De acordo com a classificação utilizada neste

estudo, as macrorregiões foram: Ilhéus-Itabuna, Extremo Sul, Vale do Jiquiriçá e Baixo Sul (Figura 2).

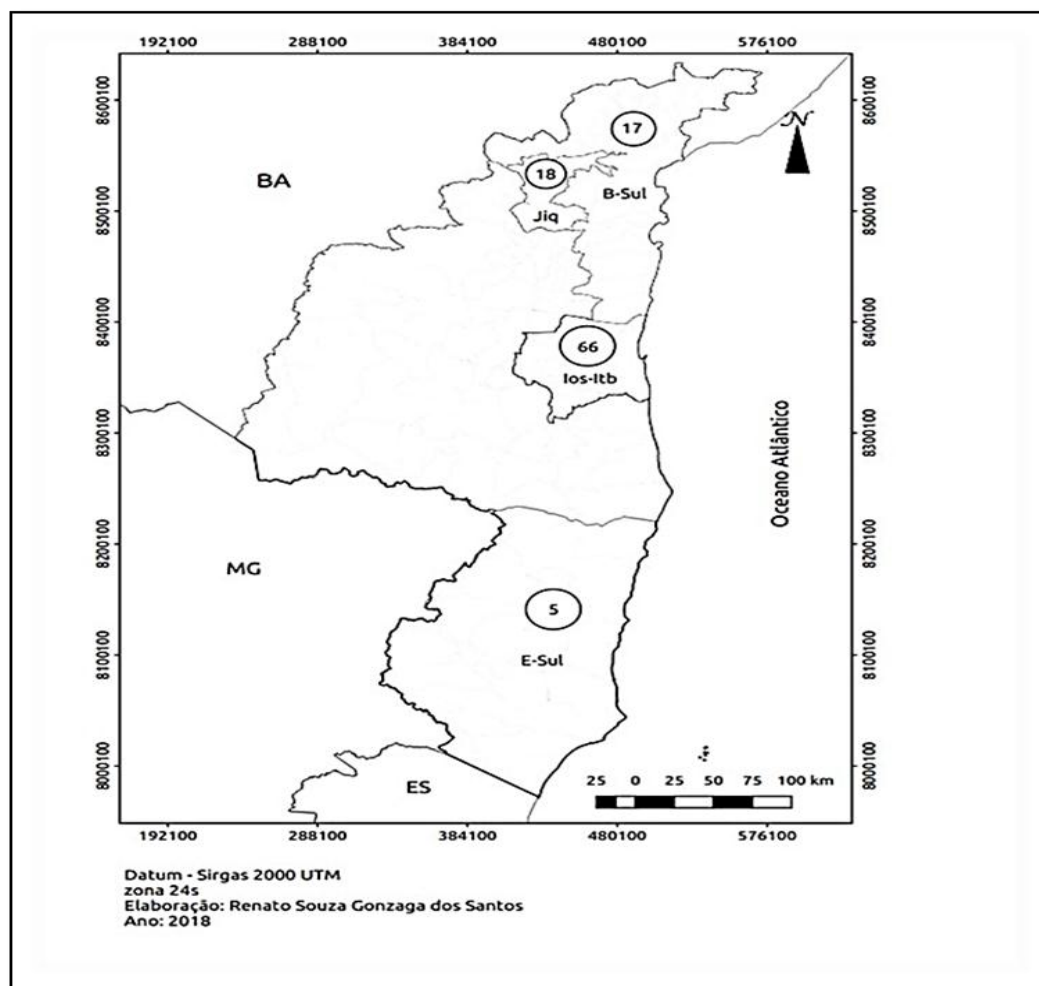


Figura 2: Distribuição geográfica por macro região dos isolados de *Ceratocystis cacaofunesta* na Bahia que foram utilizados neste estudo. As siglas no mapa significam B-Sul= Baixo Sul; Jiq= Vale do Jiquiriçá; Ios-Itb= Ilhéus-Itabuna; E-Sul= Extremo Sul.

Extração de DNA

Um disco de 5mm de cultura monoaspórica foi transferidas para 30 mL meio malte líquido - ML (2% malte e 0.2% extrato de levedura) e incubadas por 5 dias a 25°C. Os micélios crescidos foram filtrados com o uso de bomba a vácuo (*Quimis®*). A extração do DNA foi realizada utilizando o método SDS- *Cacaofunesta* de acordo com Gusmão et al. (2018) (Capítulo 1, dados não publicados). A quantificação de DNA foi avaliada em

eletroforese em gel de agarose a 1%, coradas com *GelRed*® e visualizadas em transluminador *L-Pix/Locus*. A quantidade e a qualidade do DNA foram estimadas em espectrofotometria em *NanoDrop ND-1000/Thermo Fisher Scientific*.

Marcadores microssatélites

Um total de 11 locos microssatélites foi utilizado para genotipar os 106 isolados de *C. cacaofunesta*; sendo 5 *primers* (CfCAA9, CfCAA38, CfCAA15, CfCAA80, CfCAG15, CfGACA60) marcados com HEX (*hexachloro-6-carboxyfluorescein*), NED (*N(1-naphetyl) ethylenediamine*) e FAM (*6-carboxyfluorescein*). Seis *primers* (CfCAA10, CfCAT1, CfCAT3K, CfCAT9X, CfCAT1200, e CfGACA650) acrescidos de cauda M13 e sua sequência complementar marcados com uma das fluorescências 6-FAM, NED e VIC (STEIMEL et al., 2004)

As amplificações de PCR dos locos microssatélites marcados com fluorescência foram realizadas em tríplex, usando termociclador de 96 poços *Applied Biosystems Veriti* (*ThermoFisher Scientific*), seguindo as condições descritas por Ferreira et al. (2010): desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 94°C por 30 segundos, 35 ciclos de 57°C por 60 segundos, 72°C por 72 segundos e extensão final de 72°C por 30 minutos. As reações de volume final 20 µL continham 10x de tampão (Fermentas), 25 mM de BSA, 2,5 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂ (Fermentas), 2 pmol de *primer forward*, 2 pmol de *primer reverse* 5U/µL de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia) e 5µL de DNA.

Para a amplificação dos locos microssatélites com cauda M-13, a termociclagem usada foi: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 58°C por 60 segundos, 72°C por 72 segundos, mais 8 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 60 segundos, 72°C por 72 segundos e extensão final de 72°C por 72 segundos. Cada reação conteve um volume final 20 µL continha 10X de tampão (Fermentas), 25 mM de BSA, 2,5 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂ (Fermentas), 2 pmol de *primer reverse*, 2 pmol de *primer forward* acrescido da cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGA) e 2 pmol de primer com sequência complementar a cauda M13 e marcado com o fluorocromo (6-FAM, VIC, ou NED), 5U/µL de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia) e 5µL de DNA (SCHUELKE, 2000; FERREIRA et al., 2010).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, corados com *GelRed*® e visualizados em transiluminador *L-Pix/Loccus* para se confirmar a amplificação, após confirmação, os *amplicons* foram genotipados em sequenciador automático *ABI 3500* (*Applied Biosystems*). A identificação e os tamanhos de bandas foram determinados usando o *software GeneMarker 3.7*. Cada comprimento de produto dentro de 3 pb foi considerado como um alelo diferente, com exceção dos locos microssatélites CfGACA6 e CfGACA650, os quais as diferenças de alelo foram consideradas dentro do comprimento de 4 pb. A reprodutibilidade das amplificações de PCR e análise de fragmentos foi confirmada por repetição de 20% das amostras

Teste de *mating*- type

A presença de MAT2 idiomorfos foi determinado por *amplicons* produzidos após PCR usando o primer CfMAT2-2 (5'-TAGTGGGGATATGTCAACATG-3') seguindo as condições de amplificação estabelecidas no protocolo de Ferreira et al. (2010). A presença de *amplicons* significaram a presença do gene MAT2 e ausência sugeriu a presença do gene MAT1. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 3%, corados com *GelRed*® e visualizados em transiluminador *L-Pix/Loccus*. Foram realizadas 3 repetições de cada etapa e os resultados foram descritos em uma matriz em que a presença de banda foi representada com 1 e a ausência com 0.

Análise de dados

Para a obtenção da distribuição de variações entre os isolados analisados, por meio da observação da variação alélica, foi realizada análise fatorial de correspondência (AFC), com o auxílio do *software Genetix 4.0* (Belkhir et al., 1999) A AFC equivale à análise de componentes principais (PCA) e por meio de uma análise exploratória, busca a melhor combinação linear entre as variáveis avaliadas, locos e alelos, descrevendo a variação existente entre os isolados. A diferenciação genética entre as subpopulações foi calculada por meio do θ de Weir e Cokerham (1984) e F_{st} de Wright com o auxílio dos *softwares Genetix 4.03* e *Fstat 2.9.3*. As estimativas de distribuição de variação genética entre e dentro

das subpopulações foram obtidas por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com o *software* Arlequin 3.5.1 com 1000 randomizações (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

As estimativas de frequência alélica e diversidade genética de Nei (h) (NEI, 1978) entre subpopulações, bem como entre e dentro peritécios foram calculadas com o *Genetix* 4.0. Para se verificar a homogeneidade das frequências alélicas foi realizado o teste da razão de verossimilhança (teste G^2) por meio do *software* Genepop 4.1 (ROUSSET, 2008). O índice de associação (IA) e sua medida alternativa r_d foram calculados para se verificar a hipótese de equilíbrio gamético (H_0 = população em equilíbrio) ou completa panmixia com o auxílio do programa *Multilocus* 1.3. com 1000 randomizações. Os índices de H' (SHANNON; WIENER, 1949) G (STODDART E TAYLOR, 1988) foram utilizados para estimativa de diversidade genotípica e suas mensurações foram obtidas por meio do *software* R versão 3.3.1 (R Development Core Team, 2016), com 1000 randomizações. Em razão das diferenças amostrais das subpopulações, foi utilizado o método de rarefação para estimar a riqueza genotípica (GRÜNWALD et al., 2003). A equitabilidade das subpopulações foi obtida por meio da fórmula $E_5 = G - 1/N_1 - 1$. E a fração clonal de cada subpopulação foi calculada como descrito em $1 - (\text{número de diferentes genótipos} / \text{número total de isolados})$.

3. Resultados

Todos os 11 locos microssatélites utilizados para a análise de diversidade genética populacional de *C.cacaofunesta* foram polimórficos, apresentando uma variação de 3 (CfCAA38) a 12 (CfCAA15 e CfCAG15) alelos por loco, com média de 6,8 alelos por loco e amplitude alélica de 104 pb (CfGACA650) a 429 pb (CfCAT1200). Os locos CfCAG15 e CfCAA15 apresentaram o maior polimorfismo, com 12 alelos cada (Tabela 2). As subpopulações apresentaram uma alta diversidade genética com um H_e total de 0,59, com a subpopulação Baixo Sul apresentando maior diversidade ($H_e=0,66$) e o Extremo Sul com a menor ($H_e=0,41$).

Tabela 2: Análise descritiva do polimorfismos dos 11 locos microssatélites e diversidade genética das subpopulações de *Ceratocystis cacaofunesta*

Loco	Amplitude alélica	Amostra total (106)	Subpopulações								
			Ilhéus-Itabuna (66)		Extremo Sul (5)		Vale do Jiquiriçá (18)		Baixo Sul (17)		
			Na	He	Na	He	Na	He	Na	He	
CfCAA9	212-304	8	0,31	7	0,33	1	0,00	2	0,22	5	0,63
CfCAA38	153-270	3	0,16	3	0,19	1	0,00	1	0,00	2	0,43
CfCAA15	226-366	12	0,74	11	0,63	2	0,53	6	0,80	8	0,85
CfCAA80	230-329	4	0,58	4	0,48	2	0,53	3	0,55	3	0,64
CfCAG15	191-296	12	0,65	6	0,48	2	0,53	4	0,71	3	0,62
CfGACA60	134-321	4	0,35	4	0,18	2	0,53	2	0,20	2	0,43
CfCAA10	108-129	3	0,38	3	0,46	1	0,00	2	0,44	2	0,51
CfCAT1	176-275	5	0,67	5	0,78	2	0,35	4	0,70	4	0,71
CfCAT3K	240-366	7	0,86	7	0,81	6	0,89	7	0,85	7	0,84
CfCAT1200	266-429	9	0,70	9	0,73	2	0,57	5	0,64	5	0,73
CfGACA650	104-272	8	0,74	6	0,72	2	0,57	5	0,65	7	0,82
Total			0,59		0,53		0,41		0,52		0,66

Na= número de alelos; He=heterozigosidade esperada. Em negrito os locos que apresentaram maior diversidade e maior polimorfismo.

A maioria dos locos (92%) apresentou resultado significativo para o teste de homogeneidade alélica, indicando frequências alélicas distintas. De acordo com as frequências alélicas, a subpopulação Ilhéus-Itabuna apresentou diferenciação em relação às subpopulações Vale do Jiquiriçá em 50% dos locos e Baixo Sul em 83% dos locos. Para exemplificar esses resultados as tabelas 3 e 4 mostram 4 dos locos que contribuíram para essa diferenciação.

Tabela 3: Frequência alélica dos locos CfCAA15 e CfCAA80. Resultado estatísticos sobre a homogeneidade alélica entre os locos nas 4 subpopulações.

	Ilhéus -Itabuna	Extremo Sul	Vale do Jiquiriçá	Baixo Sul
Ilhéus-Itabuna	—	0,72	0,00**	0,00**
Extremo Sul	0,24	—	0,01*	0,07
Vale do Jiquiriçá	0,00**	0,42	—	0,00**
Baixo Sul	0,00**	0,16	0,35	—

Na diagonal superior o loco CfCAA15 e na inferior o loco CfCAA80.

** Significativo a 1%. *Significativo a 5%.

Tabela 4: Frequência alélica dos locos CfGACA60 e CfCAG15. Resultado estatísticos sobre a homogeneidade alélica entre os locos nas 4 subpopulações.

	Ilhéus -Itabuna	Extremo Sul	Vale do Jiquiriçá	Baixo Sul
Ilhéus-Itabuna		0,63	0,00**	0,00**
Extremo Sul	0,00**		0,15	0,08
Vale do Jiquiriçá	0,01*	0,16		0,01*
Baixo Sul	0,01*	0,00**	0,00*	

Na diagonal superior o loco CfCAG15 e na inferior o loco CfGACA60.

** Significativo a 1%. *Significativo a 5%.

Dos 106 isolados analisados, foram encontrados 105 haplótipos na população analisada. A análise fatorial de correspondência mostrou existir indícios de estruturação e isolados coletados na subpopulação Ilhéus-Itabuna demonstraram uma tendência de separação com a subpopulação do vale do Jiquiriçá e isolados do Baixo Sul (Figura 3).

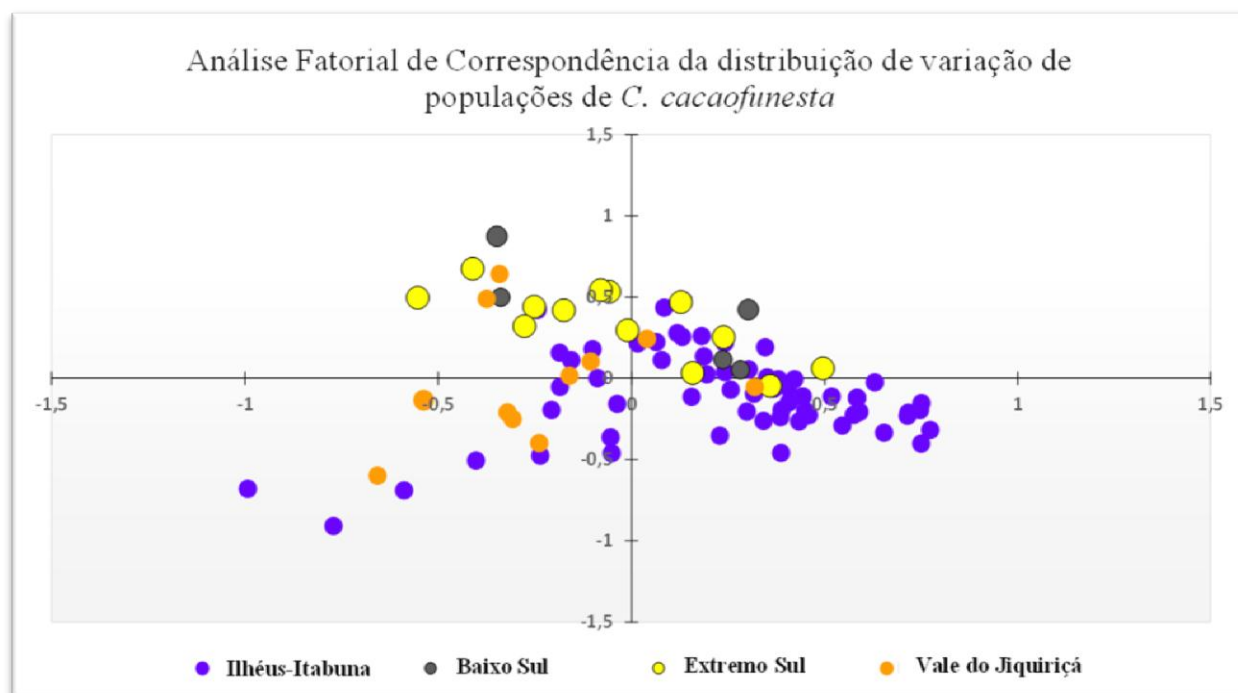


Figura 3: Gráfico apresentando resultados da Análise Fatorial de Correspondência da distribuição de variação de populações de *Ceratocystis cacaofunesta*. (FONTE: GENETIX 4.0).

De fato, a estimativa theta θ_{ST} de Weir e Cokerham (1984) suporta esta observação ($\theta_{ST} \cong 0,07$ com $p < 0,001$), indicando uma moderada estruturação (Tabela 2). A variação total

entre e dentro das subpopulações foi estimada pela AMOVA, a qual revelou uma maior variação (91,41% com $p < 0,001$) dentro das subpopulações do que entre (8,59 com $p < 0,001$). Na comparação entre os pares de subpopulações observou-se diferença significativa apenas entre a subpopulação Ilhéus-Itabuna com o Vale do Jiquiriçá ($\theta_{ST}=0,06$ com $p < 0,001$) e a subpopulação Ilhéus-Itabuna com a subpopulação Baixo Sul ($\theta_{ST}=0,08$ com $p < 0,05$). O fluxo gênico entre as subpopulações foi estimado e seus valores variaram de 2,73 (Ilhéus-Itabuna com Extremo Sul) a 6,13 (Vale do Jiquiriçá com Baixo Sul).

Tabela 5: Medidas de diferenciação genética entre as subpopulações de *Ceratocystis cacaofunesta* e número de migrantes

Subpopulações	Ilhéus -Itabuna	Extremo Sul	Vale do Jiquiriçá	Baixo Sul
Ilhéus-Itabuna	-	0,09	0,06***	0,07**
Extremo Sul	2,73	-	0,05	0,07
Vale do Jiquiriçá	3,99	4,93	-	0,04
Baixo Sul	3,08	3,22	6,13	-

*** Significativo a 1%. **Significativo a 5%. Na diagonal superior estão as medidas de diferenciação genética entre as subpopulações e na diagonal inferior estão os valores de fluxo gênico.

A caracterização da diversidade das subpopulações está descrita na tabela 7. A riqueza alélica com base no índice H' (Shannon-Wiener) foi maior na subpopulação de Ilhéus-Itabuna (4,17). A riqueza genotípica calculada a partir da curva de rarefação para G_5 foi 5,0 para todas as subpopulações. A análise descritiva no que se refere à fração clonal corrobora com os resultados obtidos acerca da riqueza genotípica, variando de 0,00 (Extremo Sul, Vale do Jiquiriçá e Baixo Sul) a 0,02 (Ilhéus-Itabuna), sem haplótipos compartilhados entre as subpopulações. As 4 subpopulações apresentaram altos índices de equitabilidade sugerindo existir uma uniformidade na distribuição dos genótipos. Alelos privativos foram encontrados apenas nas subpopulações Ilhéus-Itabuna e Baixo Sul.

A hipótese nula de recombinação foi rejeitada para todas as subpopulações pelo índice de associação (I) e desequilíbrio de ligação multilocus (r_d), com exceção da Região Extremo Sul onde as medidas de associação multilocus não foram significativas ($P > 0,01$), com valor de I_A de 0,52 (Tabela 6).

Tabela 6: Índices de diversidade, equitabilidade, e número de alelos privativos para as subpopulações de *Ceratocystis cacaofunesta*.

Subpopulações	N	g	Ma	Fração clonal	He	H'	E5	G5	Alelos privativos	I _A	r _d
Ilhéus-Itabuna	66	65	6,2	0,02	0,55	4,17	1,0	5,0	20	0,95***	0,09***
Extremo Sul	5	5	2,6	0	0,45	1,60	1,0	5,0	0	0,52	0,07
Vale do Jiquiriçá	18	18	1,7	0	0,55	2,89	1,0	5,0	0	0,46***	0,05***
Baixo Sul	17	17	2,1	0	0,67	2,83	1,0	5,0	6	1,13***	0,10***
Total	106	105	7,3	0,01	0,59	4,65	1,0	5,7	26	0,95***	0,09***

N= número de isolados por subpopulação. g= número de genótipos por subpopulação. Ma=média de alelos por população. Fração clonal= fração clonal calculada pela fórmula $1-(g/N)$. He=Diversidade genética de Nei (ou heterozigosidade), calculado pelo Genetix 4.0. H'=índice de Shannon calculado pela fórmula $H_{\max}=\ln(1/S)$, em que S é o número total de genótipos. E5= Índice de equitabilidade baseado na razão entre $(G-1/N_1-1)$. G₅= Índice de diversidade genotípica para o menor n amostral escalonado para o máximo de 5 amostras. I_A= Índice de associação.

r_d= Índice de associação multilocus

*** Significativo a 1% de probabilidade.

O teste de *mating-type* mostrou que 95% dos isolados analisados apresentaram o gene MAT2 e apenas os isolados Cc48, Cc58, Cc163 e Cc164 (5%) não amplificaram nos testes realizados. Os resultados sugerem que as maiorias dos isolados apresentam o gene MAT2 (figura 4), o que significa que esses isolados sejam autoférteis (WITTHUHN et al., 2000).

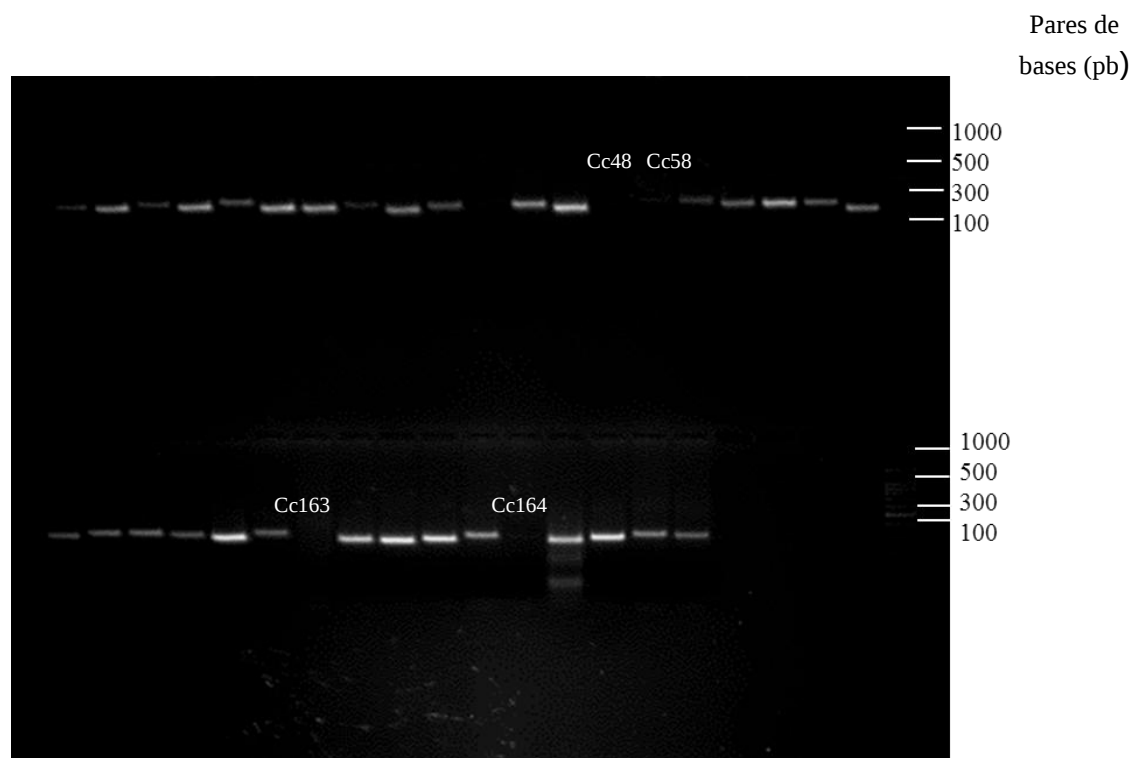


Figura4: Produtos de PCR em gel de agarose a 3%. DNA ladder de 100 pb. Na imagem aparecem 3 (Cc33, Cc48, Cc58 e Cc163) dos isolados que tiveram ausência de bandas.

4. Discussão

O número de alelos encontrados por loco (3 a 13) foram próximos aos resultados obtidos por Engelbrecht et al. (2007) (2 a 10) ao comparar a diversidade genética entre populações de *C. cacaofunesta* do Equador, Costa Rica, Colômbia e Brasil. Neste trabalho, os locos mais polimórficos foram CfCAT9X (13 alelos), CfCAG15 (12 alelos), CfCAA15 (12 alelos), o que diferiu dos resultados do trabalho de Ferreira et al. (2010), no qual para populações de *C. cacaofunesta* o loco mais polimórfico foi o CfCAA9 (7 alelos), que no presente estudo apresentou 8 alelos. A variação alélica identificada pode estar relacionada a características específicas das populações analisadas.

Os índices diversidade genética (H) observados neste estudo foram diferentes dos achados de Engelbrecht et al. (2007) e semelhantes aos resultados reportado por Ferreira et al. (2011), em um estudo que envolveu populações de uma espécie correlata, *C. fimbriata*, em plantações de eucalipto em Minas Gerais e algumas regiões da Bahia. De acordo com McDonald (1997) os sistemas agrícolas, práticas agronômicas, diferenças ambientais podem influenciar na diversidade genética dos fitopatógenos.

No presente estudo, a maior diversidade foi encontrada na subpopulação do Baixo Sul, região onde as culturas agrícolas predominantes são o tabaco, citros e a cana-de-açúcar (PAZ et al., 2016), diferente, por exemplo, da subpopulação Ilhéus-Itabuna, na qual a principal cultura agrícola é o cacaueiro. As populações de *C. cacaofunesta* na Bahia apresentaram uma alta diversidade genética, o que indica que essas populações sejam nativas do local e não introduzidas como sugerido nos resultados obtidos por Engelbrecht et al., (2007).

Os índices de diversidade das subpopulações e da população total podem também ser considerados altos para espécies que se reproduzem por homotalismo (HARRINGTON et al., 1998). O tipo de reprodução ou sistema de acasalamento do fitopatógeno tem influência na distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, contribuindo com a existência de diferentes graus de diversidade genotípica. Fitopatógenos que apresentam reprodução sexuada apresentam uma maior diversidade genotípica quando comparados aos de reprodução assexuada, isso porque, a reprodução sexual permite a recombinação de alelos (McDONALD; LINDE, 2002). O tipo de reprodução pode facilitar a ocorrência de mudanças evolutivas rápidas e a adaptação de fungos ao ambiente (GLADIEUX, 2015) e apesar do homotalismo limitar a diversidade, nessa via de reprodução ainda ocorre recombinação. No presente estudo

as frequências de ambos os *mating-types* sugerem uma baixa ocorrência de recombinação, visto que, a segregação desses genes tem sido observada nas espécies de *Ceratocystis* a uma proporção de 1:1 (WITTHUHN et al., 2000). Os resultados obtidos nos testes de *mating-type* também sugerem que os isolados analisados onde foi detectada a ausência do gene MAT2, pode ter havido a deleção dessa região. Witthuhn et al. (2000) sustentam que nas espécies de *Ceratocystis* que são homotáticas, a autofecundação resulta em progênes com ascósporos que se comportam como autoférteis (MAT2) e outros como autoestéreis (MAT1). Pois, durante o acasalamento há uma aparente deleção do *gene mating-type* MAT2 e as progênes se comportarão como MAT1, sendo essa mudança de expressão irreversível e possível apenas para as linhagens MAT2, por isso chamada de troca unidirecional de *mating-type*.

A alta diversidade genética observada nas subpopulações de *C. cacaofunesta* pode estar relacionada também a mutações (WHITLLE et al., 2011), uma vez que eventos de mutação levam a mudanças em sequências gênicas e geram novos alelos e populações com mais alelos apresentarão uma maior diversidade genética (McDONALD, 2004). Neste estudo não foram realizados experimentos voltados para investigar as taxas de mutações existentes na espécie, mas essa hipótese pode ser válida. De acordo com D'ávila et al., (2016) as mutações se caracterizam como uma das principais fontes de variação genética em fungos, principalmente em populações com altos índices de endogamia ou nos casos de espécies com reprodução clonal.

A população de *C. cacaofunesta* na Bahia mostrou uma moderada estruturação ($\theta_{ST} \cong 0.07$). Engelbrecht et al. (2007) analisara a diferenciação entre as populações de *C. cacaofunesta* encontradas na Bahia com as populações do Equador, Costa Rica, Colômbia e Rondônia, e sugeriram que as populações baianas se diferenciava das demais e apresentava características de populações introduzidas. Todavia, os resultados encontrados neste estudo, apesar de apontarem para uma moderada estruturação genética, mostraram alta diversidade o que contrapõe a hipótese de introdução. Foi observada diferenciação genética entre as subpopulações Baixo Sul e Vale do Jiquiriçá com a subpopulação Ilhéus-Itabuna. Uma das hipóteses para essa diferenciação é que as regiões localizadas no Vale do Jiquiriçá e no Baixo Sul apesar de diferirem nos tipos de culturas agrícolas, essas possuem características relativas à macro e micro clima, solo, mais semelhantes entre si. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a diferenciação genética ocorreu principalmente dentro das populações (92.26%) e que entre as subpopulações, ocorreu menor variação (7,74%). Os resultados obtidos neste estudo trazem uma importante contribuição ao evidenciar que o nível

de diversidade genética foi alto, quando comparado aos observados por Engelbrecht et al. (2007) que sinalizavam pouca diversidade da espécie na Bahia. A diversidade encontrada nas populações atuais de *C. cacaofunesta* na Bahia possivelmente pode estar relacionada às características tanto da espécie como próprias do local e são condizentes com populações nativas.

Os valores de índice de associação detectados foram condizentes com os observados em outros estudos realizados com *C. cacaofunesta* (ENGELBRECHT et al., 2007) e com outras espécies do gênero (Ferreira et al., 2010). O alto índice de associação apresentado tanto entre as subpopulações como na população total, demonstram desequilíbrio gamético e sugerem que a reprodução ocorre principalmente via autofecundação (FERREIRA et al., 2010) e, portanto, a hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada. A deriva genética ou subdivisão da população, o fluxo gênico e a seleção são alguns dos fatores que favorecem ao desequilíbrio gamético (BURGER; AKERMAN, 2011). Uma das possibilidades para explicar o desequilíbrio gamético observado nas subpopulações analisadas, pode ser a existência de fluxo gênico. Mesmo não sendo observado o compartilhamento de genótipos, observou-se o compartilhamento de alelos entre as 4 subpopulações.

Apesar dos índices de associação sugerirem baixa frequência de recombinação, foi verificado um alto número de genótipos distintos na população. McDonald e Linde (2002) sustentam que a diversidade genotípica diz respeito à frequência de genótipos multilocus ou genótipos distintos presentes em uma população, estando essa sob a influência de eventos de seleção, mutação e sistemas de acasalamento. Segundo Lehner (2011) em situações em que há ausência de forte pressão seletiva é comum se observar um alto número de genótipos, os quais aparecem em baixa frequência na população. Neste estudo, mesmo diante de um elevado número de diferentes genótipos, a análise multilocus mostrou similaridade dos isolados e, portanto, a riqueza genotípica observada pode estar relacionada eventos de mutação pontuais combinados a eventos de recombinação, que mesmo em baixa frequência ocorrem. Sob o ponto de vista da mutação, essa variação genotípica pode ser esperada, especialmente pela sensibilidade da técnica utilizada, visto que regiões microssatélites são instáveis e podem mutar a uma taxa entre 10^3 e 10^6 por célula (GEMAYEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2016).

Foi testada a hipótese nula de que as populações de *C. cacaofunesta* no Sul da Bahia apresentam pouca diversidade genética. Os resultados obtidos forneceram evidências de alta diversidade genética nas populações analisadas, como também da existência de uma

estruturação moderada na população total, com uma tendência de separação entre a subpopulação Ilhéus-Itabuna com o Vale do Jiquiriçá e Baixo Sul, rejeitando assim a hipótese nula.

A diversidade exibida por um fitopatógeno e o padrão de distribuição desta diversidade, tem implicação nas práticas de manejo de doenças, tanto em nível de seleção de fontes mais resistentes, como na adoção de medidas fitossanitárias (McDONALD, 2015). Os resultados deste estudo possuem relevância para o delineamento de estratégias de controle da Murcha de *Ceratocystis*. Entre as possibilidades de controle está a adoção de um manejo integrado que inclua, melhoramento genético, práticas fitossanitárias a nível local e medidas quarentenárias a nível regional, no sentido de se reduzir o movimento do patógeno.

Referências

- ALMEIDA, L. C. C.; COSTA, A. Z. M.; LOPES, J. R. M.; BEZERRA, J. L. Distribuição geográfica da murcha de *ceratocystis* do cacauero na Bahia, Brasil, **Agrotrópica**, n 17, p. 83, 2005.
- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS A. C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, n 93, p. 1274-1284, 2003.
- BASTOS, C. N; EVANS, H.C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. e Halst. na Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, n 8, p. 543-544, 1978.
- BELKHIR, K. **Genetix**: Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060, 1999.
- BEZERRA, J. L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, n1, v 6, 1997.
- _____; ALMEIDA, O.C.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v 23, n 228, 1998.
- BURGER, R.; AKERMAN, A. The effects of linkage and gene flow on local adaptation: A two-locus continent–island model, **Theoretical Population Biology**, v 80, p. 272-288, 2011.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v 24, p.270-276, 1939.
- CHOI, Y. W.; HYDE, K. D.; HO, W. H. Single spore isolation of fungi, **Fungal Diversity**, v. 3, p. 29-38, 1999.

D'ÁVILA, L. S.; LEHNER, S. M.; FILIPPI, M. C. Genetic structure and mating type analysis of the *Pyricularia oryzae* population causing widespread epidemics in southern Brazil, **Tropical Plant Pathology**, p. 289-297, 2016.

DELGADO, R.; SUÁREZ, C. Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao. **XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal**. Latacunga, Ecuador, p.19-21, 2003.

DeSCENZO, R. A.; HARRINGTON, T. C. Use of (CAT)₅ as a DNA fingerprinting probe for fungi, **Phytopathology**, v. 84, p. 534-540, 1994.

ENGELBRECHT, C.J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, v 97, n 1, p. 57–69, 2005.

_____.; HARRINGTON, T.C.; ALFENAS, A.C.; SUAREZ, C. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. **Plant Pathology**, v 56, p. 923-933, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p.564–567, 2010.

FERREIRA, E. M; HARRINGTON, T.C.; THORPE, D. J.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, v 59, p.721–735, 2010.

FERREIRA, M. A.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. C.; MIZUBUTI, E. S. G. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among Eucalyptus plantations in Brazil. **Phytopathology**, v 101, p.1005-1012, 2011.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K. J. Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v 3, p.461-480, 2012.

GLADIEUX, P.; FEURTEY, A.; HOOD, ME.; SNIRC, A.; CLAVEL, J.; DUTECH, C.; ROY, M.; GIRAUD, T. The population biology of fungal invasions, **Molecular Ecology**, v.24, n 9, p. 1969-1986, 2015.

GRUNWALD, N. J.; GOODWIN, S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, v. 93, n.6, p. 738-746, 2003.

HARRINGTON, T.C.; STEIMEL, J.; KILE, G. Genetic variation in three *Ceratocystis* species with outcrossing, selfing and asexual reproductive strategies. **European Journal of Forest Pathology**, v 28, n 4, p. 217–226, 1998.

_____. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v 25, p. 262–263, 2000.

_____.; Thorpe, D. J, Alfenas, A. C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*, **Phytopathology**, v 101, 2011, p. 555–566.

JOHNSON, J. A.; HARRINGTON, T. C.; ENGELBRECHT, C. J. B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex, **Mycologia**, v 97, n 5, p.1067–1092, 2005.

LEHNER, M. S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoad em Minas Gerais**. Dissertação. 2011. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

MCDONALD, B.A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, v. 87, p.448-453, 1997.

_____.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review Phytopathology**, p. 349–379, 2002.

_____.Population genetics of plant pathogens, **The plant health instructor** (2004). Disponível em: www.apsnet.org. Acesso em: 04 nov. 2017.

_____. How can research on pathogen population biology suggest disease management strategies? The example of barley scald (*Rhynchosporium commune*). **Plant Pathology**, p. 1005-1013, 2015.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Maryland, v.89, p.583-590, 1978.

OLIVEIRA, L. S.; HARRINGTON, T. C.; FERREIRA, M. A.; DAMACENA, M. B.; AL-SADI, A. M.; AL-MAHMOOLI, I. H.; ALFENAS, A. C. Species or Genotypes? Reassessment of four recently described species of the *Ceratocystis* Wilt Pathogen, *Ceratocystis fimbriata*, on *Mangifera indica*, **Phytopathology**, v. 105, n 9, p.1229- 44, 2015.

PAZ, M. G. F.; RIBEIRO, D. C.; PREREIRA, H. N.; SANTOS, A. P.; SILVA, N. S. Um olhar sobre a agricultura familiar no Recôncavo Baiano e o Baixo Sul pelo movimento de apoio a agricultura familiar e agroecologia – Agrovida, **Cadernos Macambira**, v 1, n 2, p. 102- 106, 2016.

RORER, J.B. Enfermedades y plagas de cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo de cacao. **Asociación de Agricultores del Ecuador**, 1918.

ROUSSET, F. Genepop’007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

SANTOS, R. M. F.; SILVA, M. V. D. S.; SENA, K.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. **Tropical Plant Biology**, v. 6, p.37-45, 2013.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SHANNON C. E.; WIENER, W. **The mathematical theory of Communication**. University of Illinois Press, Urbana, 1949.

STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*, **Molecular Ecology Notes**, v 4, p. 215-218, 2004.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotype diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics**, v 118, p.705–711, 1988.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful, **Genetic Molecular Biology** [online], v 39, n 3, p. 312-328, 2016.

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

WHITTLE, C.; NYGREN, K.; JOHANNESSON, H. Consequences of reproductive mode on genome evolution in fungi. **Fungal Genetic Biology**, v 48, p. 661–667, 2011.

WITTHUHN, R. C.; HARRINGTON, T. C.; WINGFIELD, B. D.; STEIMEL, J. P.; WINGFIELD, M. J. Deletion of the MAT-2 mating-type gene during uni-directional mating-type switching in *Ceratocystis*. **Current Genetics**, v 38, n.1, p. 48–52, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Diferença significativa entre os protocolos de extração X meio de cultivo, sendo que o protocolo SDS em interação com o meio de cultivo malte apresentou melhores resultados em relação à concentração de DNA obtida e qualidade da amostra de acordo com as razões de absorbância $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$.
- ✓ A população apresentou alta diversidade, o que é compatível com populações nativas. O que sugere que as subpopulações estudadas são nativas do Sul da Bahia. A maior diversidade foi exibida pela subpopulação do Baixo Sul e a menor no Extremo Sul.
- ✓ A população de *C. cacaofunesta* na Bahia apresenta baixa estruturação, havendo uma maior diferenciação dentro das subpopulações do que entre. Houve diferenciação apenas entre as subpopulações Baixo Sul e Vale do Jiquiriçá com Ilhéus-Itabuna.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS A. C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*.

Phytopathology 93, p. 1274-1284, 2003.

BEZERRA, J. L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, Ghana, v. 1, p.6, 1997.

_____.; ALMEIDA, O.C., LUZ; E.D.M.N.; SILVA, S. D.V. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v 23, n 228, (Resumo 117), 1998.

CABRERA, O. G.; MOLANO E. P. L.; JOSÉ, J.; JAVIER CORREA ÁLVAREZ, J. C.; PEREIRA, G. A. G. *Ceratocystis Wilt Pathogens*: history and biology—highlighting *C. cacaofunesta*, the causal agent of wilt disease of cacao. In: Bailey B., Meinhardt L. (eds) Cacao Diseases. Springer, Cham, 2016.

COUTO, V. de A.. O território do cacau no contexto da mundialização, **Bahia Análises & Dados**. Salvador-BA. SEI v.9, n.4, p.38-52, 2000.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, v 789, p. 187–219, 2014.

DELGADO, R.; SUAREZ, C. Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao. **XII Seminário Nacional de Sanidad Vegetal**, Latacunga, Ecuador, 2003.

ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J.; CAPRETTI, P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*, **Molecular Ecology**, v 13, n 10, p. 2995–3005, 2004.

ENGELBRECHT, C.J. B; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, v 97, n 1, p. 57–69, 2005.

_____.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. *Ceratocystis* wilt of cacao—A disease of increasing importance. **Phytopathology**, 97, p. 1648-1649, 2007.

_____.; HARRINGTON, T.C.; ALFENAS, A.C.; SUAREZ, C. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. **Plant Pathology**, v 56, p. 923-933, 2007b.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

FERREIRA, E. M; HARRINGTON, T.C; THORPE, D. J.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, v 59, p.721–735, 2010.

FERREIRA, M. A.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. C.; MIZUBUTI, E. S. G. Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among Eucalyptus plantations in Brazil. **Phytopathology**, v 101, p.1005-1012, 2011.

_____.; HARRINGTON, T. C.; PIVETA, G.; ALFENAS, A. C. Genetic variability suggests that three populations of *Ceratocystis fimbriata* are responsible for the *Ceratocystis* wilt epidemic on kiwifruit in Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 42, n 2, p. 86-95, 2017.

FUTUYMA, D. J. **Biologia reprodutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K. J. Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v 3, p.461-480, 2012.

HALSTED, B. D.; FAIRCHILD, D. G. Sweet-potato black rot (*Ceratocystis fimbriata*, Ell. & Hals.), **The Journal of Mycology**, v 7, n 1, p. 1–11, 1891

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Ohio, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.

HARRINGTON, T. C.; MCNEW, D. L. Self-fertility and uni-directional mating-type switching in *Ceratocystis coerulescens*, a filamentous ascomycete. **Current Genetics**, v 32, n 1, p. 52–59, 1997.

_____.; STEIMEL, J.; KILE, G. Genetic variation in three *Ceratocystis* species with outcrossing, selfing and asexual reproductive strategies. **European Journal of Forest Pathology**, v 28, n 4, p. 217–226, 1998.

_____. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v 25, p. 262–263, 2000.

JOHNSON, J. A.; HARRINGTON, T. C.; ENGELBRECHT, C. J. B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex, **Mycologia**, v 97, n 5, p.1067–1092, 2005.

KAMGAN, N. G.; JACOBS, K.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. *Pesotum australi* sp. nov. and *Ophiostoma quercus* associated with *Acacia mearnsii* trees in Australia and Uganda, respectively. **Australasian Plant Pathology**, v 37, p. 406 – 416, 2008.

MALAGUTI, G. *Ceratostomella fimbriata* on Cacao in Venezuela. **Acta Científica Venezolana**, v 3, n. 3, p. 94–97, 1952.

MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. **Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi**. In M. J. Wingfield, K. A. Seifert.; Webber, J. F. (Eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and pathology* St. Paul, MN: APS Press, 1993.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002.

_____.; How can research on pathogen population biology suggest disease management strategies? The example of barley scald (*Rhynchosporium commune*), **Plant Pathology**, v 64, p. 1005-1013, 2015.

Moura, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. 2005. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras - UFLA Lavras.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.

PAULIN-MAHADY, A. E.; HARRINGTON, T. C.; McNew, D. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. **Mycologia**, v 94, n1, p. 62–72, 2002.

POÈGGELER, S. Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homothallic and heterothallic ascomycetes, **Current Genetics**, v 36, p. 222-223, 1999.

RORER, J.B. Enfermedades y plagas de cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo de cacao. **Asociación de Agricultores del Ecuador**, 1918.

ROUX, J.; COUTINHO, T. A.; BYABASHAIJA, D. M.; WINGFIELD, M. J. Diseases of plantation Eucalyptus in Uganda, **South African Journal of Science**, v 97, p.16–18, 2001.

SANTOS, R. M. F.; SILVA, M. V. D. S.; SENA, K.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. **Tropical Plant Biology**, v. 6, p.37-45, 2013.

SPATAFORA, J. W.; BLACKWELL, M. The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. **Mycological Research**, v 98, n 1, p. 1–9, 1994.

STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*, **Molecular Ecology Notes**, v 4, p. 215-218, 2004.

TEMPLETON A. R. **Genética de Populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética-SBG, 2011.

THOROLD, C. A. **Diseases of Cocoa**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1975.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1995.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v 10, p. 967–981, 2000.

TSCHURTSCHENTHALER, N. N.; VIEIRA, E. S. N.; NORA, T. D.; SCHUSTER, I. Variabilidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* avaliada por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, vol.47, n.2, 2012, p.181-186, 2012.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful, **Genetic Molecular Biology** [online], vol.39, n.3, p. 312-328, 2016.

WITTHUHN, R. C.; HARRINGTON, T. C.; WINGFIELD, B. D.; STEIMEL, J. P.; WINGFIELD, M. J. Deletion of the MAT-2 mating-type gene during uni-directional mating-type switching in *Ceratocystis*. **Current Genetics**, v 38, n.1, p. 48–52, 2000.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Diseases in Cocoa**. ed.4. Oxford: Blackwell, 2001.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 2: Quantificação das amostras de DNA obtidas com os meios SDS, MATAB e SDS em associação com os meios de cultivo malte e mineral.

Protocolo	Meio de Cultura	A _{260/280}	A _{260/230}	Concentração de DNA em ng
CTAB	Mineral	2,50	1,58	228,8
CTAB	Mineral	2,54	1,41	218,6
CTAB	Mineral	2,49	1,39	252,8
CTAB	Mineral	2,32	1,71	119
CTAB	Mineral	2,47	1,62	209
CTAB	Mineral	2,49	1,29	169,4
CTAB	Mineral	2,41	1,52	199,6
CTAB	Mineral	2,38	1,34	211
CTAB	Mineral	2,54	1,75	143,6
CTAB	Mineral	2,48	1,70	217
CTAB	Mineral	2,31	1,70	120,2
CTAB	Mineral	2,39	1,56	246,2
CTAB	Mineral	2,52	1,31	195,8
CTAB	Mineral	2,47	1,53	160,4
CTAB	Mineral	2,50	1,31	105,8
CTAB	Malte	2,38	1,72	198,2
CTAB	Malte	2,37	1,49	142,6
CTAB	Malte	2,35	1,68	188,8
CTAB	Malte	2,33	1,51	156,2
CTAB	Malte	2,26	1,33	138,4
CTAB	Malte	2,45	1,74	104
CTAB	Malte	2,44	1,44	105,2
CTAB	Malte	2,43	1,52	112,8
CTAB	Malte	2,40	1,29	240,2
CTAB	Malte	2,37	1,69	293,2
CTAB	Malte	2,43	1,34	180,8
CTAB	Malte	2,37	1,43	103
CTAB	Malte	2,36	1,54	342,2
CTAB	Malte	2,53	1,34	294
CTAB	Malte	1,82	1,54	396
SDS	Malte	1,81	1,99	532,8
SDS	Malte	1,86	2,01	539
SDS	Malte	1,77	1,86	635,4
SDS	Malte	1,80	1,99	463,2
SDS	Malte	1,80	2,01	515,4
SDS	Malte	1,81	2,05	523
SDS	Malte	1,80	1,99	528,6
SDS	Malte	1,79	1,95	462,2
SDS	Malte	1,82	2,02	403,2

Protocolo	Meio de Cultura	A_{260/280}	A_{260/230}	Concentração de DNA em ng
SDS	Malte	1,83	2,00	470,8
SDS	Malte	1,82	1,98	568
SDS	Malte	1,78	2,00	470,8
SDS	Malte	1,83	2,00	524,8
SDS	Malte	1,85	1,94	410,8
SDS	Malte	1,90	1,98	556
SDS	Mineral	2,45	1,88	288,4
SDS	Mineral	2,30	1,98	345,6
SDS	Mineral	1,97	1,90	471,6
SDS	Mineral	2,43	1,82	469,4
SDS	Mineral	2,00	1,81	388,6
SDS	Mineral	1,73	2,02	450,6
SDS	Mineral	2,07	1,83	522
SDS	Mineral	1,96	1,84	469,8
SDS	Mineral	2,07	2,53	503,6
SDS	Mineral	2,05	2,35	228,6
SDS	Mineral	2,35	2,34	237,6
SDS	Mineral	2,20	1,32	237,2
SDS	Mineral	2,43	2,01	311,2
SDS	Mineral	2,16	2,01	330,8
SDS	Mineral	2,03	2,33	366,4
MATAB	Mineral	2,39	1,51	205,6
MATAB	Mineral	2,46	2,28	131,2
MATAB	Mineral	2,55	1,38	189,6
MATAB	Mineral	2,52	1,54	101
MATAB	Mineral	2,55	1,49	100,2
MATAB	Mineral	2,43	2,20	108,6
MATAB	Mineral	2,48	2,04	104,6
MATAB	Mineral	2,55	2,18	104,4
MATAB	Mineral	2,37	2,05	203,6
MATAB	Mineral	2,44	2,54	213,6
MATAB	Mineral	2,63	2,00	211,6
MATAB	Mineral	2,15	1,36	246
MATAB	Mineral	2,26	1,45	233
MATAB	Mineral	2,51	1,55	239,8
MATAB	Mineral	2,45	2,00	266,2
MATAB	Malte	2,48	2,03	298,2
MATAB	Malte	2,43	1,99	226,4
MATAB	Malte	2,39	2,07	221,4
MATAB	Malte	2,48	1,82	228,6
MATAB	Malte	2,44	1,84	237,6
MATAB	Malte	2,51	1,99	137,2
MATAB	Malte	2,64	1,97	197,8
MATAB	Malte	2,21	2,02	195,6

Protocolo	Meio de Cultura	A_{260/280}	A_{260/230}	Concentração de DNA em ng
MATAB	Malte	2,32	2,00	113,6
MATAB	Malte	2,54	2,00	112,8
MATAB	Malte	2,33	2,05	202,4
MATAB	Malte	2,42	1,99	304,8
MATAB	Malte	2,37	2,02	346,2
MATAB	Malte	2,36	2,04	395,8
MATAB	Malte	2,53	2,08	360,4