

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



ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Moniliophthora*
***perniciosa* NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE**
MARCADORES MICROSSATÉLITES

SANLAI SANTOS LIMA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Maio de 2013

SANLAI SANTOS LIMA

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Moniliophthora perniciosa*
NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

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

Área de concentração:
Biotecnologia e Genômica

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Maio de 2013**

L732

Lima, Sanlai Santos.

Origem e diversidade genética de *Moniliophthora perniciosa* no estado do Espírito Santo por meio de marcadores microssatélites / Sanlai Santos Lima. – Ilhéus, BA : UESC, 2013.

viii,43 f. : il.

Orientadora: Karina Peres Gramacho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências bibliográficas.

1. Cacau. 2. Vassoura-de-bruxa. 3. Diversidade genética. 4. Cacau – Melhoramento genético. 5. Microssatélites (Genética). I. Título.

CDD 633.74

SANLAI SANTOS LIMA

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Moniliophthora perniciosa*
NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

APROVADA: 24 de maio de 2013

Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
(EMBRAPA- Cruz das Almas)

Dr. Ronan Xavier Côrrea
(UESC)

Dr^a. Livia Santos Lima Lemos
(CEPLAC/UESC- Ilhéus)

Dr^a. Karina Peres Gramacho
(CEPLAC/UESC-Orientadora)

**Aos meus pais, Adilson e Marilda.
Dedico!**

“Retenha o teu coração as minhas palavras; guarda os meus mandamentos, e vive.
Adquire sabedoria, adquire inteligência, e não te esqueças nem te apartes das palavras da
minha boca.

Não a abandones e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá.

A sabedoria é a coisa principal; adquire pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na
aquisição de entendimento(...) Apega-te à instrução e não a largues; guarda-a, porque ela é
a tua vida.”

Provérbios 4:4-8; 13.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível esse projeto e por todas as graças concedidas.

Aos meus pais Adilson e Marilda, por serem os maiores incentivadores dos meus estudos.

Aos meus irmãos Elena e Mick, meus eternos incentivadores e meus melhores amigos.

À Malu, minha sobrinha linda, por cada sorriso e abraço que recebi ao chegar em casa e pela ajuda para separar os fungos ‘fedorentos’.

À Dr.^a Karina Peres Gramacho, pela orientação, pela contribuição indispensável para minha formação profissional. Por ser um ser um exemplo de profissional pela disponibilidade para ajudar sempre. Obrigada pela oportunidade.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), a todos os professores e funcionários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela contribuição à minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento do Projeto.

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

À CEPLAC/CEPEC/FITOMOL, pela infraestrutura laboratorial para realização de todos os trabalhos.

Ao Dr. Carlos Alberto Spaggiari, por ceder tempo e orientação nas coletas de material, pela acolhida e ensinamentos na Estação Experimental Filogônio Peixoto.

À Gerência de Extensão e Pesquisa da CEPLAC/GERES - Linhares/ES.

Ao Dr. Didier Clément, pela coorientação e investimento na minha formação.

À Dr.^a Fernanda Gaiotto, pela valorosa coorientação.

À Dr.^a Lahyre Gomes pelo ensinamento, sugestões, correções e ajuda nas análises.

À Louise Brito, pela amizade, companheirismo, palavras de incentivo, carinho e broncas em todos os momentos dessa trajetória de vários anos.

Aos amigos do Laboratório, em especial Nara Braz e Bruna Melo, pela amizade e todos os momentos inesquecíveis que compartilhamos nesses dois anos. E por saber que essa amizade continua mesmo com ausência física. A Caliandra Andrade, pelas palavras de apoio e confidências e por ser um exemplo de ser humano. A Lívia Lemos, por todos os momentos e desabafos compartilhados ao longo desses cinco anos de convivência. À Rangeline Azevedo e Everton Cruz, que sem dúvidas, permitiram que esse último ano fosse mais alegre e divertido.

À todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e agregados: Rogério Mercês, Francisca Jucá, Kaleandra Sena, Eline Lima, Leila Lima, Jandiara Dezidério, Rodrigo Ganem, Mariana Carvalho, Mariana Andrade, Júlia Etinger, Keila dos Reis, Taty Magalhães, Tami Messias, Renata Aguiar, Maria Rafaela, João Mello, Guilherme Malta, Ana Paula Santos, Ildete Avelino, Walnize Serra, Joselito Moraes, Analine Nascimento, Geovane Campanha, Dayse Drielly, Eduardo Catarino, Lurdinha e Seu Rubem. À José Reis, pelos ensinamentos e pela ajuda imprescindível nas coletas e isolamento.

À todos da CEPLAC/GERES: Dr. Marco Antônio, Dr. Paulo Siqueira, Bernadino Binda, Seu Daury Gasparini, Seu Manoel, Leonardo, Cândido e demais colegas.

À todos do Escritório Regional de Camacan e Escritório Local de Uruçuca.

Ao Setor de Transportes do CEPEC: Reinaldo Malta, por sempre facilitar o nosso transporte entre a UESC e a CEPLAC, a Moqueca pela companhia durante as coletas e pelas conversas, a Bispo, Loyola e Buda, pelo convívio ao longo das viagens.

À Naiara Pacheco, Gui e Rô pela acolhida e amizade.

Em especial à Adriano Pinheiro, pela ajuda com o ‘trabalho mecânico’, pelo incentivo, pela força, confiança, por nossa linda amizade e pelo Amor, que “tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”. Obrigada, Dri!

Obrigada a todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho, pois contribuíram também para o meu crescimento profissional e pessoal!

EXTRATO

LIMA, Sanlai Santos, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Maio de 2013.
Origem e diversidade genética de *Moniliophthora perniciosa* no estado do Espírito Santo por meio de marcadores microssatélites. Orientadora: Dr^a. Karina Peres Gramacho. Coorientadores: Dr. Didier Pierre Clément e Dr^a Fernanda Amatto Gaioto.

O patógeno *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa foi introduzido e disperso para longe de sua área nativa, tornando esta doença o maior problema fitopatológico para a lavoura cacaueteira no Brasil. Visando caracterizar a diversidade genética e inferir sobre a origem de *M. perniciosa* no Estado do Espírito Santo (ES), nove marcadores microssatélites foram utilizados em 225 isolados de 6 subpopulações de *M. perniciosa* coletadas no estado do Espírito Santo. Somando-se a estes, foram utilizados 68 isolados da Bahia, agrupados em duas populações, uma antiga e outra contemporânea e 26 isolados do Norte do Brasil para inferir a origem da doença no estado. Detectaram-se níveis moderados de diversidade gênica, com maior valor encontrado na subpopulação de Maria Bonita, primeiro local de introdução da doença no estado. A diversidade genotípica foi maior que 60% em todas as subpopulações e análise hierárquica de variância molecular revelou que a maior parte da variação foi encontrada dentro das subpopulações. Testes de diferenciação populacional mostraram não haver diferenças significativas entre as subpopulações de Maria Bonita e São Mateus, Regência e ESFIP e São Luiz e Piraquê. A análise bayesiana separou as subpopulações em dois grupos e apoiam a hipótese de duas introduções de *M. perniciosa* no ES. Exceto a subpopulação de São Luiz, a hipótese de acasalamento aleatório foi aceita para todas as subpopulações. A comparação dos dois grandes grupos do ES com as populações da região Norte e Bahia

ocasionou a formação de 3 grupos. O agrupamento dos isolados da Bahia com um grupo de isolados do ES aponta para a Bahia ter sido uma provável origem da vassoura-de-bruxa nesse estado.

Palavras-chave: cacau, *Moniliophthora perniciosa*, genética de populações, SSR, vassoura-de-bruxa.

ABSTRACT

LIMA, Sanlai Santos, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, May 2013. **Origin and genetic diversity of *Moniliophthora perniciosa* in the state of Espírito Santo through markers microsatellite.** Advisor: PhD. Karina Peres Gramacho. Advisor Committee Members: DSc Didier Pierre Clément and DSc Fernanda Amatto Gaioto.

The plant pathogen *Moniliophthora perniciosa* that cause witches' broom disease of cacao, was dispersed far away from its native area has become the biggest phytopathological trouble for cocoa plantations in Brazil. Aiming to characterize the genetic diversity in and infer the origin of *M. perniciosa* in the Espírito Santo (ES) State, nine microsatellite markers were used in 225 isolates of six subpopulations of *M. perniciosa* collected in the state. A total of 68 isolates of two populations from the Bahia, an older and a contemporary one, and 26 isolates from the northern region of Brazil were added in this study to infer the origin of the disease in ES. The total ES population showed moderate levels of genetic diversity with higher value found in the subpopulation from Maria Bonita, confirming that this place is, probably, the first point of introduction of the disease in the state. Genotypic diversity was greater than 60% in all subpopulations and molecular hierarchical analysis of variance revealed that most of the variation was found within the subpopulations. Tests of population differentiation showed no significant differences among subpopulations from Maria Bonita, São Mateus, Regencia and ESFIP, and between São Luiz and Piraquê. Bayesian analysis showed that the subpopulations were grouped into two groups, supporting the hypothesis of two introductions of *M. perniciosa* in ES. Except for the subpopulation from São Luiz, the random mating hypothesis was accepted. Comparison of the two ES groups with the populations from the North region of the Country and Bahia

revealed the formation of three groups. The cluster analysis indicate that the Bahia is one probable origin of the witches' broom disease in the State of ES.

Keywords: cocoa, *Moniliophthora perniciosa*, population genetics, SSR, witches' broom disease.

ÍNDICE

EXTRATO	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE <i>M. PERNICIOSA</i>	11
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA	15
3.3. GENOTIPAGEM POR MICROSSATÉLITES.....	15
3.4. ANÁLISE DOS DADOS.....	17
3.4.1. <i>Análise discriminativa dos locos</i>	17
3.4.2. <i>Variabilidade genética das populações</i>	17
3.4.3. <i>Descrição hierárquica da estrutura genética</i>	18
3.4.4. <i>Associação multilocus e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS LOCOS MICROSSATÉLITES	19
4.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA NO ESPÍRITO SANTO	20
4.3. ACASALAMENTO ALEATÓRIO.....	24
4.4. INFERÊNCIAS SOBRE A ORIGEM DA VASSOURA-DE-BRUXA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO	25
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

As introduções de fitopatógenos em novas áreas são eventos comuns na agricultura. Conseqüentemente, novas doenças estão sempre emergindo devido a sua introdução e dispersão em novos agroecossistemas. A requeima da batata, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, introduzida do México na Europa (GOODWIN *et al.*, 1994; DOWLEY *et al.*, 2000) e o cancro da castanheira, causada pelo ascomiceto *Cryphonectria parasitica*, introduzido da Ásia na América do Norte (ANAGNOSTAKIS, 1987) são exemplos históricos de como a introdução de um fitopatógeno em uma nova área levou a epidemias devastadoras. Diversas outras doenças também foram disseminadas por mecanismos e trajetórias distintas: a queima da bainha em arroz (BERNARDES DE ASSIS *et al.*, 2009), a requeima da soja (CIAMP *et al.*, 2008), a murcha de ceratocystis em cacau (ENGELBRECHT, *et al.*, 2007), mancha foliar no trigo (STUKENBROK *et al.*, 2006), a ferrugem asiática na soja (SCHNEIDER *et al.*, 2005), a sigatoka amarela na banana (HAYDEN, *et al.*, 2003), o cancro em coníferas (HAMELIN *et al.*, 1998), a sarna da maçã (GLADIEUX *et al.*, 2008) e a vassoura-de-bruxa no cacauero (RINCONES, 2006; ANDERBRAHN, 1999).

De origem amazônica (ALMEIDA, 2001), o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), agente causal da vassoura-de-bruxa, foi descrito como patógeno do cacauero em 1895, no Suriname (STAHEL, 1919) e em 1989 foi detectada duas introduções da doença no sul da Bahia (PEREIRA *et al.*, 1989), nos municípios de Uruçuca e Camacan (ROCHA *et al.*, 1993; PEREIRA *et al.*, 1996; ANDEBRHAN *et al.*, 1999) com rápida disseminação para as demais regiões produtoras no estado.

Doze anos após a introdução da doença nos cacauzeiros baianos, em fevereiro de 2001, a doença foi constatada na Fazenda Maria Bonita, em Linhares, no estado do Espírito Santo (PEDEAG, 2007). Segundo os cacauicultores da região, especula-se que três outros focos de introdução tenham ocorrido: em outubro de 2002 na região de Piraquê, em 2002 na região de São Luiz e em 2003 no município de São Mateus a 100 Km da Fazenda Maria Bonita, em todos os casos, já ocasionando perdas na produção.

Atualmente, o Espírito Santo é o quarto estado em volume de produção de cacau no Brasil, com oito mil toneladas de amêndoas por safra (IBGE, 2012) e a vassoura-de-bruxa está presente em 95% das fazendas no estado (informação pessoal, CEPLAC/ GERES, Linhares). O impacto econômico e ecológico da doença nas lavouras cacauzeiras no Espírito Santo já se compara ao dano causado na Bahia, contudo, estudos sobre o patógeno no estado do Espírito Santo ainda não foram realizados e, ao contrário da Bahia, as vias de sua origem e introdução ainda não foram documentadas.

Moniliophthora perniciosa apresenta alta variabilidade genética, o que favorece o aparecimento de variantes do patógeno. Populações de *M. perniciosa* de Cacaúlândia, Ji-Paraná e Ariquemes, regiões de ocorrência endêmica de cacau e do patógeno, apresentaram maior diversidade genética em relação às populações da Bahia (SILVA, 2007). Os dois grupos de isolados encontrados na Bahia por ANDEBRAHN *et al.*, (1999), possuem alta correlação com as duas introduções independentes do patógeno ocorridas na Bahia, advindas da Amazônia (RINCONES *et al.*, 2006; PLOETZ *et al.*, 2005, PEREIRA *et al.*, 1996).

Diferenças genéticas em *M. perniciosa* foram também observadas nas seguintes condições: i) entre países e entre regiões dentro de países; ii) entre fazendas de um mesmo município; iii) entre partes de uma mesma planta (frutos, almofadas, gemas vegetativas); iv) entre anos de observação em um mesmo grupo de plantas (MOREIRA, 2006; GRAMACHO *et al.*, 2002; GRAMACHO *et al.*, 2005; GRAMACHO *et al.*, 2005b; PLOETZ *et al.*, 2005; BRAZ *et al.*, 2008; PATROCÍNIO *et al.*, 2012) e v) entre municípios dentro da região cacauzeira da Bahia (GRAMACHO *et al.*, 2003).

Eventos de introdução de doenças podem envolver o efeito fundador, que ocorre quando uma pequena fração dos indivíduos da população original é responsável pela formação de uma nova população, muito menos diversificada que a população fundadora. Esse cenário é consistente com as distintas introduções do patógeno que ocorreram no sul da Bahia (PEREIRA *et al.*, 1996), que apresentaram menor diversidade que a região

endêmica da doença. Múltiplas introduções, seguida de recombinação sexual podem ter favorecido o aparecimento de novos genótipos do patógeno na Bahia.

As análises da variação de marcadores moleculares em conjunto com as teorias de genética de populações compõem numa eficiente abordagem para inferir sobre a origem e as vias de introdução de fitopatógenos (GLADIEUX, 2008). Marcadores microssatélites estão entre as mais variáveis sequências encontradas em um genoma (ELLEGRÉN, 2004). São marcadores multialélicos, co-dominantes, polimórficos, facilmente reproduzíveis (BORÉM e CAIXETA, 2006) e já foram desenvolvidos com sucesso para *M. perniciosa* (GRAMACHO *et al.*, 2007 e SILVA *et al.*, 2008), sendo bastante úteis para estudos evolutivos e de genética de populações para essa espécie.

O comportamento do patógeno vem sendo estudado com sucesso e tendo em vista o impacto econômico causado pela doença, o conhecimento da sua variabilidade genética em todas as áreas de ocorrência, sob o ponto de vista da genética de populações, fornecerá subsídios para o seu manejo. Baseado nas hipóteses de que as populações de *M. perniciosa* no Espírito Santo são geneticamente homogêneas e que são oriundas de múltiplas introduções do patógeno, os objetivos deste estudo foram caracterizar a diversidade genética e inferir sobre a possível origem de *M. perniciosa* no Estado do Espírito Santo, utilizando-se nove marcadores microssatélites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Movimentos amplos de espécies e produtos vegetais têm permitido o transporte acidental de patógenos longe de sua área nativa (YARWOOD, 1970). A origem e as rotas de introdução de muitos patógenos invasivos de culturas importantes são desconhecidas, possivelmente porque muitas introduções ocorrem quando muito pouca atenção foi dada aos riscos associados com a doença (PALM, 2011; WINGFIELD *et al.*, 2010). A erradicação de pragas e doenças geralmente é pouco efetiva, então impedir a introdução, limitar a propagação e compreender a biologia da doença tornam-se a melhor medida de controle.

Para que ocorra uma doença, três componentes são necessários: (i) hospedeiro suscetível, (ii) agente patogênico virulento e (iii) um ambiente propício (AGRIOS, 1997). A adaptação do patógeno é regida pela flexibilidade genética da sua população, sua eficiência reprodutiva e sua capacidade de se dispersar. Já população da planta hospedeira deve ser amplamente suscetível ao ataque do patógeno, pois a disponibilidade de tecido suscetível modula a invasão e a persistência da epidemia. Ainda assim, mesmo que o hospedeiro seja suscetível e o patógeno virulento, a doença poderá não ocorrer, caso o ambiente não favoreça o seu desenvolvimento (KEANE e KERR, 1997).

A maioria, senão todas as plantas cultivadas têm patógenos que atacam um ou mais tecidos durante algum estágio de seu desenvolvimento (FLETCHER, 2010) e tais organismos podem ser dispersos por vários mecanismos e trajetórias diferentes. Movimentos a curtas distâncias estão envolvidos no desenvolvimento local da doença e na área afetada, enquanto que movimentos a longa distância tem implicações muito mais amplas (MUNDT *et al.*, 2010) não só na produção agrícola, mas também sobre questões

políticas e econômicas. Os mecanismos naturais de propagação incluem o tempo, as características biológicas tais como a morfologia dos esporos, o envolvimento de vetores biológicos, dispersão pela água, por sementes ou pólen, etc. Os métodos não naturais de propagação do patógeno influenciados por seres humanos incluem a importação/exportação de *commodities* e plantas ornamentais, contrabando de alimentos e plantas, contaminação inadvertida de roupas ou pertences dos viajantes, sabotagem econômica e bioterrorismo (FLECHER, 2010).

A disseminação da doença é um evento natural e patógenos evoluem ao longo do tempo para assegurar a sua própria sobrevivência, o que implica necessariamente em encontrar novos ambientes propícios a sua colonização. Quando um agente patogênico tem o potencial para infectar uma vasta gama de hospedeiros, pesquisas devem ser realizadas rapidamente para um melhor controle ou atenuação de epidemias emergentes. Além do cacauzeiro e cupuaçuzeiro, espécies de importância econômica do gênero *Theobroma*, a vassoura-de-bruxa ocorre em diversas espécies de plantas, como urucuzeiro e alguns cipós, tomate, pimenta, pimentão, berinjela, jiló e jurubeba (PATROCÍNIO, 2011). Assim, abordagens genéticas e moleculares clássicas no desenvolvimento de novas variedades e cultivares resistentes às doenças mais importantes e prejudiciais à agricultura devem ser realizadas.

Essas abordagens lançam mão de valiosa ferramenta, os marcadores moleculares. As análises da variação desses marcadores, em conjunto com as teorias de genética de populações, correspondem a uma poderosa alternativa para inferir sobre a origem, vias de introdução e diversidade de populações de fitopatógenos (GLADIEUX, 2008). A utilização de marcadores moleculares vem sendo realizada com sucesso em diversos patossistemas (DUTECH *et al.*, 2012; BERNARDES *et al.*, 2009; CIAMP *et al.*, 2008; GLADIEUX *et al.*, 2008; ENGELBRECHT, *et al.*, 2007; STUKENBROK *et al.*, 2006). Dentre os marcadores utilizados, os microssatélites estão entre os mais populares.

Marcadores microssatélites possuem as mais variáveis sequências encontradas em um genoma (ELLEGREN, 2004), apresentam comportamento mendeliano, são multialélicos, polimórficos, de herança codominante, necessitam de pouca quantidade de DNA para análise genética e possuem fácil detecção por PCR (HAMADA *et al.*, 1982). O polimorfismo de locos microssatélites é detectado pela amplificação do DNA total usando um par de iniciadores, que flanqueiam e definem o loco microssatélite (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989). O alto poder discriminativo deste marcador é o motivo pelo

qual o torna amplamente utilizado em estudos que buscam avaliar a diversidade genética nas populações (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A diversidade genética é resultado do processo evolutivo atuando sobre a população e se torna importante por determinar o potencial de adaptação do patógeno às condições adversas (McDONALD e LINDE, 2002a). Em relação a *M. pernicioso*, grandes avanços têm sido feitos acerca do entendimento da sua biologia. A variabilidade genética do patógeno tem sido avaliada por meio marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (ANDEBRHAN *et al.* 1999; ANDEBRHAN e FURTEK 1994; NIELLA *et al.*, 2000), marcadores nuclear e mitocondrial (ARRUDA *et al.* 2003), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (PLOETZ *et al.*, 2005) PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (RINCONES *et al.*, 2006) e marcadores microssatélites (GRAMACHO *et al.*, 2007). Diferenças genéticas foram encontradas entre nos para um mesmo grupo de isolados, entre países e entre regiões dentro de países, entre e dentro de municípios dentro da região cacauífera da Bahia, e entre partes de uma mesma planta (frutos, almofada, gema vegetativa) (PATROCÍNIO *et al.*, 2012; GRAMACHO *et al.*, 2003; 2006; 2007; MOREIRA, 2006; BRAZ *et al.*, 2006).

O reconhecimento da diversidade do patógeno é a principal motivação para inferir sobre sua história evolutiva e buscar novas fontes de resistência que poderiam melhorar a produtividade na lavoura. O mais alto índice de diversidade genética de uma população encontra-se no centro de origem da espécie, evidenciada por alta variabilidade e elevadas taxas de migração (MCDONALD, 2012). Em geral, a domesticação de plantas tem sido acompanhada pela domesticação e especialização de seus correspondentes patógenos (STUKENBROCK *et al.*, 2007). Com a vassoura-de-bruxa acredita-se que o patógeno co-evoluiu com o hospedeiro (*Theobroma cacao* L.) no vale do Rio Amazonas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005, PLOETZ *et al.*, 2005) provável centro de origem do cacauífera (CHEESMAN, 1944).

A produção brasileira de amêndoas de cacau tem apresentado um sutil crescimento, com produção de 245 mil toneladas em 698 mil hectares plantados com a cultura na safra de 2011/2012 (IBGE, 2012). O estado da Bahia continua a ser o maior produtor brasileiro, responsável por mais de 60% da produção nacional (156 mil toneladas). Entretanto, embora detentor da maior produção, o rendimento médio das lavouras cacauíferas no estado da Bahia é o mais baixo entre os principais estados produtores (293kg/ha). O Pará é o estado que mais cresce em produção de cacau, que com 1/6 da área plantada em relação as

lavouras baianas, possui rendimento médio de 750kg/ha, o que lhe garante a segunda colocação no ranking da produção brasileira. O estado de Rondônia também vem crescendo em produção e nas últimas duas safras superou o estado do Espírito Santo e consiste hoje no terceiro estado produtor, com 15 mil toneladas de amêndoas produzidas. O estado do Espírito Santo é o quarto maior produtor nacional, com 22 mil hectares plantados e oito mil toneladas de amêndoas de cacau produzidas, com rendimento médio de 367 Kg/ha (IBGE, 2012). Os baixos preços da arroba de cacau no mercado internacional, aliado ao elevado custo de produção na lavoura, pressionado pela mão-de-obra escassa e a baixa produtividade, devido principalmente a vassoura-de-bruxa, tem diminuído a receita do cacauicultor nos últimos anos e favorecido o abandono de muitas lavouras (PEDEAG,2007).

A vassoura-de-bruxa é considerada uma doença monocíclica, uma vez que os tecidos infectados não produzem esporos capazes de iniciar novas infecções na mesma safra: apesar dos basidiósporos serem liberados durante toda a estação (LUZ *et al.*, 1994), eles são oriundos de basidiomas desenvolvidos em tecidos infectados em estações anteriores (LUZ *et al.*, 2006). Seu ciclo de vida é realizado em duas fases (hemibiotrófico). A fase parasítica é monocariótica, constitui-se de micélio primário, com crescimento intercelular originado a partir dos basidiósporos (STAHLE, 1915). Na fase saprofítica, o micélio apresenta grampos de conexão, característica típica dos basidiomicetos e crescimento tanto intracelular como intercelular (EVANS, 1980). O ciclo da doença é encerrado com a produção dos basidiomas, sob condições de alternância entre períodos secos e chuvosos (PURDY E SCHMIDT, 1996; ROCHA e WHEELER, 1982) e com a liberação dos basidiósporos, disseminados pelas correntes de ar que ao serem depositados sobre os locais de infecção no hospedeiro, germinam e penetram (Figura1).

Os processos de penetração e infecção devem ocorrer rapidamente após a liberação dos basidiósporos, uma vez que eles são sensíveis à radiação solar e dessecação e perdem a viabilidade. O micélio saprofítico do fungo é capaz de sobreviver por vários anos no interior dos tecidos infectados (vassouras vegetativas, frutos e folhas), que quando expostos aos efeitos alternados de chuva e sol, podem produzir basidiomas e recomeçar o ciclo (BASTOS, 1990; NIELLA *et al.*, 1999).

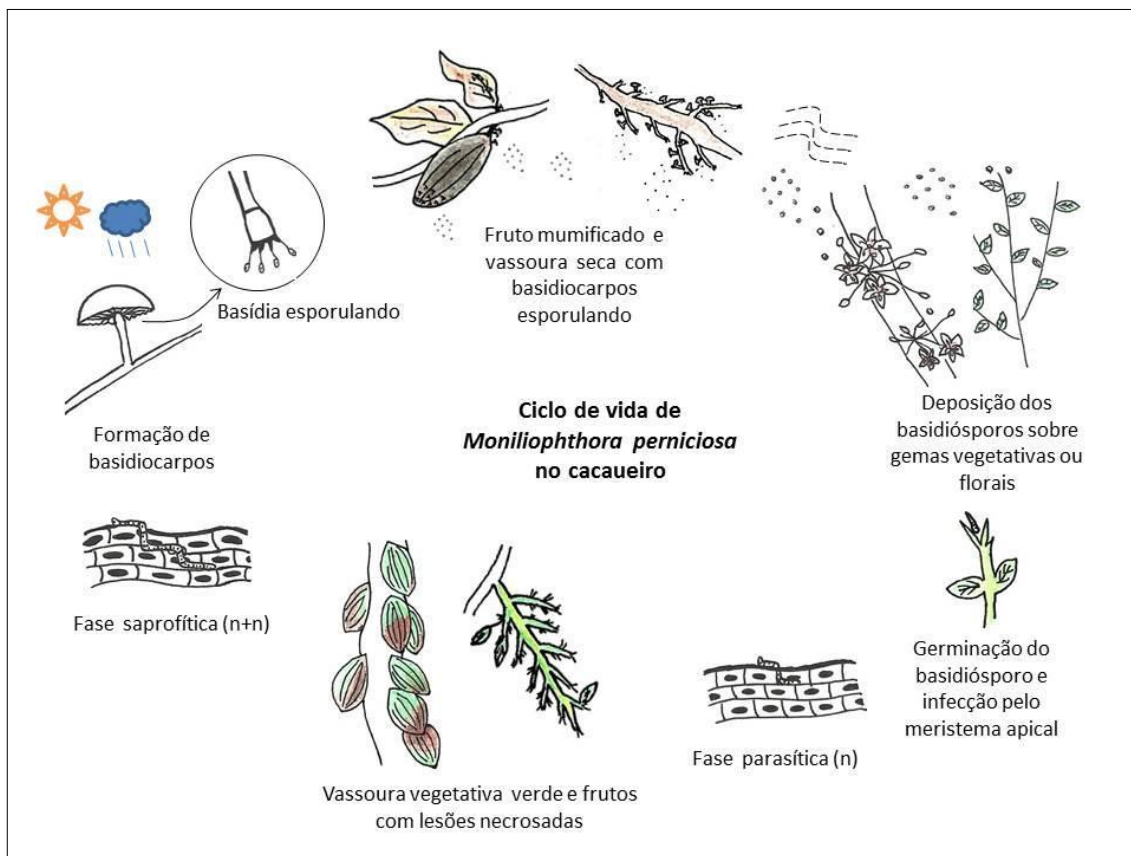


Figura1. Ciclo de vida de *M. perniciosa* no cacaueteiro, adaptado de Nunes, 2001.

A sintomatologia da doença se manifesta inicialmente nos ramos, com um inchaço seguido pela emissão acentuada de brotos laterais, induzindo a formação de vassouras vegetativas, consideradas o sintoma típico da doença (Figura2 A, B, C). Nas almofadas florais infectadas ocorre a formação de flores hipertrofiadas, vassouras e frutos partenocárpicos denominados “morangos” e “cenouras”, que não evoluem em tamanho, seguido de morte celular e necrose generalizada dos tecidos (SILVA *et al.*, 2002). (Figura2 E, F, G). Nos frutos infectados, os sintomas característicos são lesões circulares na superfície externa de coloração negra que evoluem a necrose total até tornarem-se mumificados, onde após um período de dormência, o micélio saprofitico cresce e acumula energia, resultando no aparecimento dos basidiomas (Figura2 H, I, J). As sementes totalmente necrosadas e fortemente aderidas umas as outras não possuem valor para comercialização (SILVA *et al.*, 2002; BASTOS, 1990).



Figura 2. Sintomas típicos da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro causado por *M. pernicioso*: (a) vassoura vegetativa verde; (b) vassoura seca com sintoma de engrossamento e presença de basidiomas; (c) cacauzeiro infectado; (d) basidiomas nas nervuras das folhas secas; (e,f) vassoura de almofada e frutos modificados no formato morango e cenoura; (g) frutos em formato de morango e cenoura mumificados; (h) lesão na superfície externa do cacau; (i) fruto lesionado com sementes fortemente aderidas e necrosadas; (j) frutos mumificados com presença de basidiomas. Fotos: Sanlai Lima.

Devido a biologia de *M. pernicioso*, sua dispersão natural pela ação do vento ou chuva ocorre de modo eficiente em curtas distâncias - até 100m da fonte de inóculo e com menor eficiência, até 300m (BAKER *et al.*, 1941). A única maneira de propagação a longa distância é mediada por intervenção humana mediante transporte de material vegetal infectado (MONTEIRO E AHNERT, 2012). O trajeto de dispersão desse patógeno tem sido realizado com sucesso nas principais regiões produtoras de cacau. Estudos a partir de dados genéticos de suas populações comprovaram que a introdução na Bahia em 1989 teria ocorrido por intervenção humana, a partir de duas introduções distintas de material infectado originário da Região Amazônica (ANDERBRAHN, 1999 PEREIRA *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1993), entretanto a origem e diversidade do patógeno no estado do Espírito Santo ainda não foi documentada.

A introdução do cacauzeiro no estado do Espírito Santo ocorreu em 1980, mas a expansão do cultivo se deu a partir de 1917, no município de Linhares, nas terras da

floresta do baixo Rio Doce, região que apresentava o ambiente propício para a cacauicultura sob o denominado sistema cacau-cabruca (LOBÃO e VALERI, 2009). A abertura da rodovia Linhares-Vitória em 1937 impulsionou o desenvolvimento da lavoura cacauera, entretanto em 1950 a cacauicultura entrou em profunda crise, causada pela baixa cotação do produto no mercado e constantes secas. Para driblar a crise, a partir da década de 60, iniciou-se a modernização e industrialização da lavoura, com redução do sombreamento excessivo, expansão da área plantada, oferta de crédito rural, utilização de inseticidas e fungicidas e instalação de sistemas de irrigação, em função dos persistentes períodos de seca. Tais medidas acarretaram na elevação da produção e produtividade, contudo levaram também ao endividamento e descapitalização dos produtores em meados da década de 80, quando uma nova queda de preços não sustentou os custos de produção devido ao alto investimento aplicado. Como resultado, houve o abandono dos tratamentos culturais e fitossanitários e conseqüente queda na produtividade, com crescente endividamento e dessa vez sem a oferta de crédito rural aos produtores (PEDEAG, 2007). A crise agravou-se ainda mais com a constatação da vassoura-de-bruxa nos cacauais capixabas em fevereiro de 2001. Atualmente, verifica-se crescimento exponencial da doença no estado, com mais de 95% das lavouras afetadas (Informação pessoal- Carlos Alberto Sppagiari).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e isolamento de *M. pernicioso*

Plantas de cacau com sintomas característicos da vassoura-de-bruxa foram amostradas e as vassouras secas foram coletadas. As coletas ocorreram em seis áreas de cultivo de cacau no Estado do Espírito (Figura3), que em conjunto, representam as principais áreas de cultivo de cacau do estado (cerca de 80%), das quais quatro (Maria Bonita, Piraquê, São Luiz e São Mateus) estão relacionadas ao histórico de introdução da vassoura-de-bruxa no estado. Além dessas regiões do Espírito Santo, isolados do estado da Bahia obtidos em duas épocas diferentes foram incluídos neste trabalho: 1- isolados obtidos entre os anos de 2001 e 2003, oriundos de diversos municípios e 2- isolados obtidos no ano de 2011, representando a população contemporânea da Bahia, obtidos através de coletas de vassouras secas em quatro municípios, incluindo os municípios relatados como focos iniciais da doença (Uruçuca e Camacan). Esses isolados representam a população antiga (BA₁) e contemporânea da Bahia (BA₂). Soma-se a estes, isolados obtidos da região Norte do Brasil proveniente dos estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Acre representando área de origem do patógeno. Essas localidades representam as mais importantes áreas produtoras de cacau do Brasil (Tabela 1).

Os isolados da BA₁ e do Norte foram obtidos da coleção Brasileira de *Moniliophthora pernicioso* da CEPLAC/CEPEC/FITOMOL; número de registro 921 na WDCF (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/921). Os demais isolados foram obtidos através de coletas de vassouras secas que ocorreram entre outubro de 2011 e dezembro de 2012. A amostragem foi realizada de acordo com um caminhamento em W. De cada fazenda foram selecionadas 100 vassouras secas, sendo cinco vassouras por árvore

em vinte árvores distintas com aproximadamente 12 m de distância entre elas. O local de coleta de cada amostra foi georreferenciado. As amostras foram etiquetadas e transportadas em sacos de aniagem e levadas ao vassoureiro para produção de basidiomas.

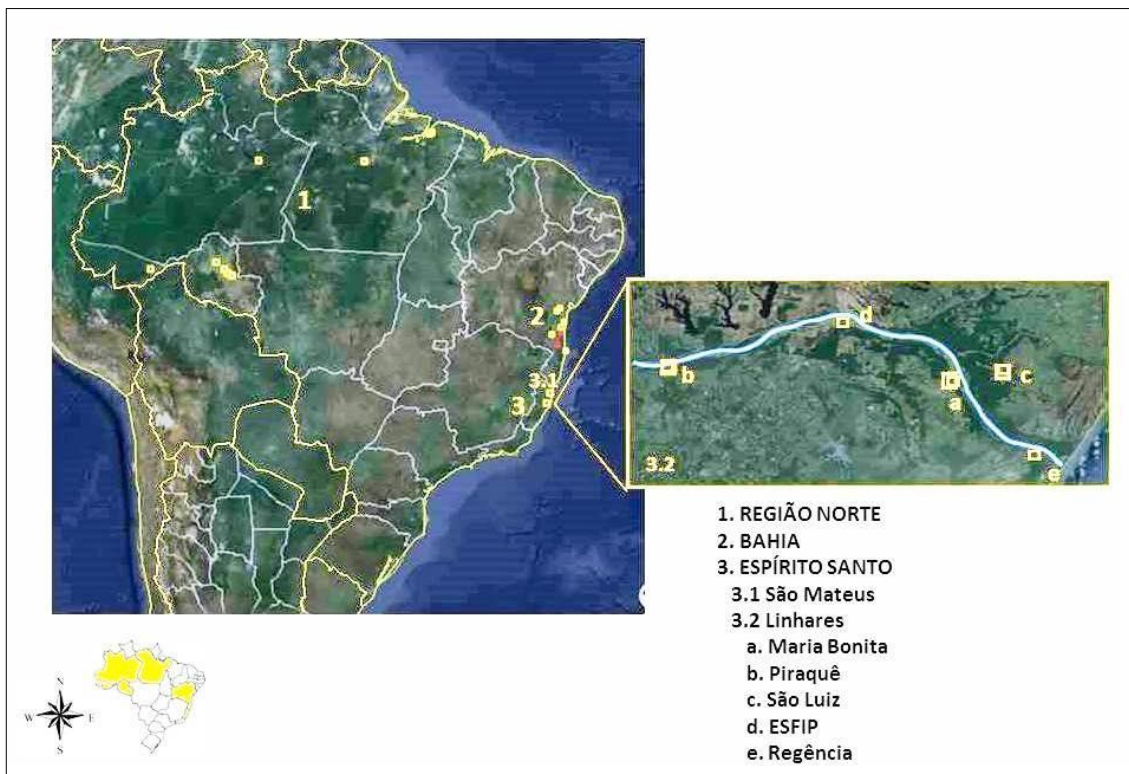


Figura3. Mapa do Brasil onde estão assinalados os locais de coleta de vassoura-de-bruxa. Em destaque, região de coleta no município de Linhares/ES.

Tabela1. Descrição dos locais de coleta.

Região/Local de coleta	Número de Isolados	Georreferenciamento (UTM)		Ano de coleta
REGIÃO NORTE (26)				
Acre				
Rio Branco	5	18M	9155819 757059	2003
Amazonas				
Manaus	10	20M	9648966 826733	2003
Pará				
Marituba	2	22M	9850591 795120	2003
Medicilândia	2	22M	9618090 291296	2003
Belém	2	22M	9836919 763247	2003

Continua ...

Região/Local de coleta	Número de Isolados	Georreferenciamento (UTM)			Ano de coleta
Rondônia					
Jaru	2	20L	8848282	557889	2003
Ouro Preto d'Oeste	1	20L	582863	881554	2003
Ariquemes	2	20L	8906131	494701	2003
BAHIA (68)					
BA₁(antiga)					
Arataca	1	24L	8312567	455558	2001
Belmonte	1	24L	8242206	488639	2003
Buerarema	1	24L	8346199	467741	2001
Camamu	1	24L	8444432	487604	2001
Dario Meira	1	24L	8403879	402152	2001
Floresta	1	24L	8357054	428998	2001
Ibicaraí	2	24L	8356522	436769	2001
Ibicuí	1	24L	8358921	393814	2001
Iguaí	1	24L	8368396	382798	2001
Ilhéus	1	24L	8365023	494739	2001
Itabuna	1	24L	8364938	470107	2001
Itajuípe	1	24L	8377279	459625	2001
Itapé	1	24L	8352937	454735	2001
Jequié	1	24L	8467737	382872	2001
Jussari	1	24L	8320507	446831	2001
Muniz Ferreira	2	24L	8562555	488072	2001
Mutuípe	1	24L	8537497	445287	2003
Nilo Peçanha	1	24L	8496631	488431	2001
São Miguel das Matas	1	24L	8557536	450578	2001
Santo Antônio de Jesus	1	24L	8566260	471711	2001
Ubaíra	1	24L	8533156	428204	2003
Ubaitaba	1	24L	8417657	465190	2001
Uruçuca	1	24L	8386695	469423	2001

Continua...

Região/Local de coleta	Número de Isolados	Georreferenciamento (UTM)		Ano de coleta
BA₂(contemporânea)				
Camacan	17	24L	8346199 467741	2011
Itagibá	8	24L	8295281 446799	2011
Santa Luzia	6	24L	8417462 405396	2011
Uruçuca	9	24L	8294208 464177	2011
ESPÍRITO SANTO (225)				
São Mateus				
Foco São Mateus	3	24L	8398657 464510	2011
Fazenda Campo Formoso	11	24K	7944717 372838	2011
Fazenda São Domingos	13	24K	7030819 387146	2011
Linhares				
Foco Maria Bonita				
Fazenda Maria Bonita	17	24K	7845655 402756	2011
Fazenda Primor	18	24K	7844199 402878	2011
Fazenda Luciana	12	24K	7845648 402749	2011
Fazenda Luzitânea	15	24K	7848136 399811	2011
Fazenda Esperança	11	24K	7846142 395127	2011
Foco São Luiz				
Fazenda São Luiz	17	24K	415996 7836973	2012
Fazenda Califórnia	18	24K	418528 7837476	2012
Fazenda Valão da Anta	15	24K	404193 7852570	2011
Fazenda São José	3	24K	403601 7850659	2011
Foco Piraquê				
Fazenda Ilha do Sossego	17	24K	359942 7842341	2012
Fazenda Piraquê	9	24K	367594 7847703	2011
Fazenda Ipiranga	14	24K	365596 7843275	2011
Área Mediana				
ESFIP*	16	24K	7852932 388198	2011
Área Regência				
Fazenda Petrópolis	19	24K	7835639 414005	2011

*ESFIP: Estação Experimental Filogônio Peixoto

O isolamento do fungo foi realizado transferindo-se o estipe do basidiocarpo ou fragmentos da vassoura infectada para placas de petri contendo meio seletivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) + sulfato de estreptomicina 1% + benzimidazol 1%. As placas foram incubadas a 25°C no escuro. Após sete dias do isolamento, culturas puras de *M. pernicioso* foram obtidas por transferência de discos de micélio extraídos das bordas das colônias e transferidos para placas de petri com meio BDA. As culturas foram armazenadas pelo método de Castellani (1939) e depositadas na Micoteca de *M. pernicioso* do CEPEC/CEPLAC. Após sete dias de cultivo do fungo, dois discos de micélio com 5 mm de diâmetro de cada isolado foram transferidos para 50 mL de meio líquido mineral (10g de glicose, 1g de NH₄H₂PO₄, 0,2g de CuSO₄.5H₂O a 5%, 1 ml de ZnSO₄.7H₂O a 1 %) e novamente incubados em Erlenmeyers de 250 mL durante 14 dias. Após esse período, o micélio foi lavado com água destilada e seco em papel filtro esterilizado, liofilizados e estocados em ultrafreezer a -80°C.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de Zolan e Pukilla (1986) com algumas modificações no tampão de extração (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8.0). O *pellet* obtido foi ressuscitado em 80 µL de TE 1X com adição de RNase a (2mg/ml) e incubado a 37°C por 2 h. O DNA extraído foi armazenado a -20°C. A concentração do DNA genômico das amostras de *M. pernicioso* foi quantificado em espectrofotômetro Picodrop®.

3.3. Genotipagem por microssatélites

Onze marcadores microssatélites (SSR) de polimorfismo conhecido (Gramacho *et al.*, 2007 e Silva *et al.*, 2008) foram usados para genotipagem de cada isolado usando *primers* marcados com fluorescência (Tabela2). Reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas por meio de combinações do tipo multiplex. Cada PCR multiplex baseou-se na amplificação simultânea dos locos descritos a seguir:

Multiplex1. Mscepec_Cp15, Mscepec_Cp16, Mscepec_Cp64;

Multiplex2. Marcadores mMpCena3, mMpCena4, mMpCena8;

Multiplex3. Marcadores mMpCena11, mMpCena12, Mscepec_Cp11.

As reações de PCR dos marcadores Mscepec_Cp19 e Mscepec_Cp45 foram realizadas individualmente e foi realizado multiplex com os produtos do PCR no momento da injeção no sequenciador. As reações foram feitas em volume final de 20 µL, contendo 1µL de DNA [20 ng/mL], 0,4 µL de cada *primer* [10mM], 1,5 µL MgCl₂ [25 mM], 1,6 µL de dNTP (Fermentas Biotecnologia Ltda), 2,0 µL de tampão [10X] e 0,15µL de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas Biotecnologia Ltda) e realizadas em termociclador *Veriti- Applies Biosystems* seguindo as condições de amplificação descritas por Gramacho *et al.*, 2007 e Silva *et al.*, 2008.

Tabela2. Descrição das sequências dos *primers* para locos de microssatélites utilizado e tamanho esperado dos alelos amplificados.

Loco	Sequencia do primer (5'-3')	Motivo de repetição	Fluoróforo	Ta (°C)	Tamanho (pb)	Referência
mMpCena3	F: CGACAGGAGAGAGAGAAAAA R: CGTTATGGATTGGGCTTAC	(CAG)8	NED	52	146-152	Silva <i>et al.</i> , 2008
mCpCena4	F: ATTTGGCTTCGTTGCTGGT R: AATCAGAGGCGGGATAGGG	(CCA)11	6-FAM	52	292-298	Silva <i>et al.</i> , 2008
mCpCena8	F: TCGGAAACCAACCAAGAAG R: AGGAAGGAGTCAGAGAGCA	(TCA)7	VIC	52	268-274	Silva <i>et al.</i> , 2008
mCpCena11	F: ATGCTGATGAAGAGGAAGAG R: TGGAAGAGAAGAGATGATGG	(ACC)8	VIC	50	250-259	Silva <i>et al.</i> , 2008
mCpCena12	F: GGGACCACCACCATAGAGA R: CATTCCAGGATCTCCACCAC	(ACC)8	6-FAM	50	278-284	Silva <i>et al.</i> , 2008
Mscepec_ Cp 11	F: GGGACCACCACCATAGAGA R: TGGAAGAGAAGAGATGATGG	(TGA)11	NED	50	189	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_ Cp15	F: AAAGGGAGGAAGCGAAGTCT R: TGTCGAGCACTAGCATGTGA	(GAT)7(GAA)6	VIC	48	177-200	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_ Cp 16	F: CGCACTTTGGCTGATGTA R: GTCCCAGAGGGAAAAGAGGAT	(GAT)8	NED	48	212-221	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_ Cp 19	F: TCCCACAACCCCAAAGATAG R: CCCCTCAAGGTCGTATTCCT	(GAT)8	NED	48	197-200	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_ Cp 45	F: ATGACCAGACAAATGAAAC R: CAAAGAGAAATCACAGAGC	(AGAT)5	6-FAM	51	234-266	Gramacho <i>et al.</i> , 2007
Mscepec_ Cp 64	F: GCA ACA AAT CTC CTT CGT C R: AAA AAA ACC AAC CAT CCA T	[TGG]6	6-FAM	48	274-311	Gramacho <i>et al.</i> , 2007

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1,5%) e em seguida foram diluídos 4X em água ultra-pura, sendo 1 µl de cada produto diluído adicionados 8 µl de formamida HIDI e 1µl de LIZ500. A leitura foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI3100 (*Applied Biosystems*) seguindo o protocolo do fabricante. As análises dos

fragmentos e a identificação dos alelos foram efetuadas pelo programa Genemarker versão demo 3.7.

3.4. Análise dos dados

Neste trabalho considerou-se como uma subpopulação um conjunto de isolados de uma determinada área geográfica coletados no mesmo período (Maria Bonita, Piraquê, São Luiz, São Mateus, ESFIP e Regência) e uma população isolados coletados numa determinada área geográfica, independente do período (Região Norte, Bahia antigo, Bahia contemporânea e Espírito Santo)(TAYLOR, 2000).

3.4.1. Análise discriminativa dos locos

A diversidade de cada loco foi caracterizada pelo número de alelos por loco (N_a) e a heterozigosidade esperada (H_E) não enviesada de Nei (1978), ambas calculadas para cada população por meio do programa Genetix versão 4.05.2 (BELKHIR *et al.*, 1999). A análise de alelos nulos e evidências de exclusão alélica ou de erros de nomeação gerados por *stuttering* foi realizada pelo Microchecker versão 2.2.3.

3.4.2. Variabilidade genética das populações

A diversidade genotípica foi estimada pelos índices de Shannon-Wiener (I) (SHANNON e WIENER, 1949) e Stoddart e Taylor (STODDART E TAYLOR, 1988). Devido ao índice Stoddart e Taylor's (G) ser influenciado pelo número de amostras em uma população, este índice foi escalonado por rarefação pelo menor tamanho amostrado (G_{16}) (GRUNWALD *et al.*, 2003) e calculado pelo programa R versão 2.6.2 (R *Development Core Team*, 2007). De forma análoga foi calculada a equitabilidade (E_5). O número de genótipos multilocos diferentes e a fração clonal (a proporção de isolados proveniente de reprodução assexuada), calculada como $1 - [(\text{número de diferentes genótipos})/(\text{número total de isolados})]$ foram estimados. A diversidade gênica de Nei foi calculada pelo programa Genetix versão 4.05.2 (BELKHIR *et al.*, 1999).

3.4.3. Descrição hierárquica da estrutura genética

Para estudar a subdivisão da população e estimar a estruturação dentro e entre populações foi efetuada análise de variância molecular (AMOVA) calculada com o programa Arlequin versão 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006). A diferenciação genética entre as populações foi comparada por meio da estatística theta - ϕ (WEIR e COKERHAM 1984), equivalente ao F_{ST} de Wright para dados diploides e imparcial ao tamanho das amostras, com *bootstrap* de 1100 re-amostragens. O valor encontrado em cada par de subpopulações indica se há diferenciação genética entre elas. Da mesma forma, foi calculado o número de migrantes (Nm) pelo programa Genetix versão 4.05.2. A estrutura genética de população foi analisada com o modelo *admixture*, com *burn-in* de 10.000 e 100.000 interações “Monte-Carlo Markov Chains (MCMC)” no programa Structure versão 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000), com 5 simulações para cada K. Para estimar a melhor subdivisão que se ajusta aos dados, o valor de ΔK de Evano *et al.* (2005) foi calculado no aplicativo Structure Harvester (EARL *et al.*, 2012).

3.4.4. Associação multilocus e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg

O programa Multilocus versão 2.1 (2003) foi usado para calcular o desequilíbrio gamético (BROWN *et al.*, 1980; MAYNARD SMITH *et al.*, 1993). O índice de associação (I_A) e sua estatística alternativa (r_d) que independe do número de locos foram calculados para testar a hipótese de equilíbrio gamético, ou seja, verificar se há indícios de acasalamento aleatório entre os indivíduos. Para isso, as estimativas de desequilíbrio de ligação (I_A e r_d) foram comparadas com as esperadas no caso de acasalamentos ao acaso (hipótese nula). As associações entre locos foram examinadas usando como teste de desequilíbrio gamético, o teste exato de Fisher (GARNIER-GERE e DILLMANN, 1992), baseado em algoritmo MCMC, com 1100 simulações usando o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Dois locos foram considerados em desequilíbrio gamético (ou desequilíbrio de ligação) quando valores de P foram iguais ou inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Análise descritiva dos locos microssatélites

Para a análise da diversidade genética, onze marcadores microssatélites foram utilizados em 225 isolados do estado do Espírito Santo, 68 isolados da Bahia e 26 isolados da região Norte do país, totalizando 319 isolados de *M. pernicioso*.

Todos os locos analisados apresentaram polimorfismo, porém os locos mCpCena4 e MsCepec11 apresentaram falhas na amplificação superior a 40% e foram retirados das análises. Na amostra total (319 isolados), os nove locos polimórficos restantes amplificaram um total de 56 alelos; média de 6,22 alelos/loco e amplitude alélica variando de 134 a 314 pares de bases (Tabela 3). O número de alelos por loco variou de quatro (Mscepec_Cp 19, Mscepec_Cp64) a nove (mCpCena11) e com diversidade gênica variando de 0,15 (Mscepec_Cp 15) a 0,76 (mCpCena11); média de 0,41. Ao considerar as populações separadamente, a maior diversidade gênica foi encontrada na população do Norte ($H_E=0,50$) seguido da Bahia ($H_E=0,49$) e do Espírito Santo ($H_E=0,43$).

O comprimento dos alelos diferiu geralmente por incrementos de 3 ou 4 pares de bases, o que era esperado porque os marcadores possuem motivos de tri ou tetra nucleotídeo. Não foi detectado desequilíbrio de ligação (DL) entre locos após correção de Bonferroni ($P<0,001389$). A análise de alelos nulos, realizada pelo Microchecker versão 2.2.3, não revelou a presença significativa de alelos nulos para nenhum dos locos utilizados neste estudo. Também não foram encontradas evidências de exclusão alélica ou de erros de nomeação gerados por *stuttering*.

Tabela 3. Número de alelos e diversidade gênica por loco em cada população de *Moniliophthora Perniciosa* do estado do Espírito Santo, Bahia e Região Norte.

Loco	Amplitude alélica	Amostra total (319)		Espírito Santo (225)		Bahia (68)		Norte (26)	
		Na	H_E	Na	H_E	Na	H_E	Na	H_E
mCpCena3	134-164	6	0,52	4	0,52	4	0,23	4	0,34
mCpCena8	250-280	8	0,45	4	0,45	8	0,60	5	0,79
mCpCena11	244-280	9	0,76	8	0,75	6	0,69	5	0,69
mCpCena12	269-287	6	0,49	3	0,49	5	0,64	4	0,67
Mscepec_15	170-200	6	0,15	3	0,18	4	0,58	6	0,55
Mscepec_16	211-250	8	0,28	4	0,45	5	0,40	5	0,79
Mscepec_19	194-203	4	0,47	4	0,48	3	0,4	2	0,30
Mscepec_45	251-279	5	0,22	3	0,26	5	0,4	2	0,38
Mscepec_Cp64	302-314	4	0,40	3	0,43	3	0,43	3	0,27
TOTAL		56	0,41	36	0,43	43	0,49	36	0,50

Na=número total de alelos.

H_E =heterosigoidade esperada não viesada segundo Nei (1978).

4.2. Análise da diversidade genética no Espírito Santo

Nas subpopulações do Espírito Santo, 156 genótipos multilocus distintos foram encontrados entre os 225 isolados analisados. Embora a maioria dos genótipos multilocus tenha sido principalmente únicos (156 em 180), 24 foram compartilhados entre as subpopulações. O número de genótipos compartilhados variou de 1, entre as subpopulações de Maria Bonita e Regência, a 6 entre São Luiz e Piraquê (Figura 4).

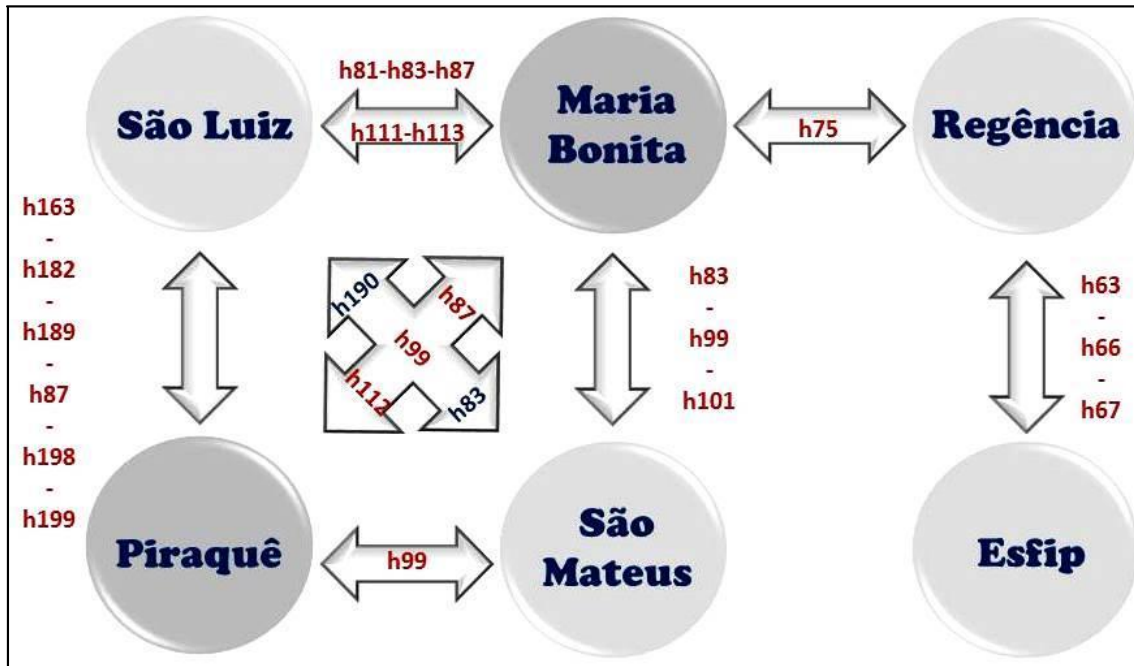


Figura4. Genótipos compartilhados entre as subpopulações de *Moniliophthora perniciosa* do Espírito Santo.

Foi observada alta diversidade genotípica ($G_{16}=15,62$) estimada por rarefação para o menor tamanho amostral (G_{16}). A diversidade genotípica, foi maior nas subpopulações de São Luiz ($G_{16}=15,24$) e Maria Bonita ($G_{16}=15,12$) (Tabela 4). Por outro lado, a de ESFIP apresentou a menor diversidade genotípica ($G_{16}=10$). A fração clonal variou de 0,15 na subpopulação de São Luiz e São Mateus a 0,38 em ESFIP. Todos os genótipos de *M. perniciosa* do estado do Espírito Santo foram heterozigotos para ao menos um loco. A diversidade gênica (H_E) e riqueza alélica (I) total das seis subpopulações em conjunto foram de 0,33 e 3,06; respectivamente. As subpopulações de Maria Bonita, Piraquê e São Luiz apresentaram os mais altos índices de diversidade gênica ($H_E=0,40$; 0,39; 0,38; respectivamente) e de riqueza alélica ($I=3,98$; 3,45; 3,75). Enquanto ESFIP e Regência exibiram os menores índices de diversidade gênica e também apresentaram os menores níveis de riqueza alélica ($H_E=0,19$ e 0,20; $I=1,92$ e 2,41). A distribuição dos genótipos (equitabilidade, E_5) foi variável entre as subpopulações, variando de 0,38 na ESFIP a 0,88 em São Luiz. No geral, não houve diferença entre os valores da diversidade gênica após a correção por clones.

Tabela 4. Medidas de diversidade genética nas populações e subpopulações de *Moniliophthora perniciosa*.

População	N	G	Na/loco	Fração clonal ^a	H _E ^b	I ^c	E ₅	G ₁₆	P	Corrigido para clones	
										N	H _E
ESPÍRITO SANTO											
Maria Bonita	73	59	3,11	0,19	0,40	3,98	0,78	15,12	11	68	0,43
Piraquê	40	34	3,00	0,15	0,39	3,45	0,81	14,82	05	34	0,41
São Luiz	53	45	3,33	0,15	0,38	3,75	0,88	15,24	10	45	0,39
São Mateus	24	19	2,55	0,21	0,36	2,87	0,83	13,67	01	19	0,38
Regência	19	13	2,44	0,32	0,29	2,41	0,69	11,40	01	15	0,32
ESFIP	16	10	2,00	0,38	0,19	1,92	0,38	10,00	00	10	0,27
Total	225	156	16,43	0,20	0,33	3,06	0,85	15,62	28	191	0,10
BAHIA											
BA ₁	43	40	3,78	0,02	0,47	3,66	0,39	15,60	15	40	0,48
BA ₂	25	23	3,56	0,00	0,44	3,11	0,66	15,20	20	23	0,44
Total	68	63	7,34	0,07	0,45	4,12	0,94	15,74	35	63	0,09
NORTE	26	21	2,00	0,04	0,50	2,94	0,66	13,79	4,0	22	0,51
TOTAL	319	243	25,77	0,20	0,43	5,32	0,64	154,42	95	276	0,13

N= Total de isolados na população.

G= Número de genótipos observados.

Na=Número de alelos.

^a Fração clonal calculada por $1 - [(\text{número de genótipos distintos})/(\text{número total de isolados})]$.

^b Diversidade genética de Nei (ou heterozigosidade), calculado pelo Genetix 4.0.

^c Índice Shannon calculado pela fórmula $H_{\text{máx}} = \ln(1/S)$, onde S é número total de genótipos.

E₅ =Índice de equitabilidade baseado na razão entre (G_o-1/G-1).

G₁₆ =Índice de diversidade genotípica de Stoddart, calculada segundo Stoddart e Taylor (1988), escalonado para o máximo de 16 amostras.

P=Número de alelos privados.

A análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte da variação foi encontrada dentro das subpopulações (84,5%) (Tabela5). O valor theta (ϕ_{ST}) foi 0,16 ($P < 0,001$), indicando um alto nível de diferenciação entre as subpopulações. Por sua vez, a comparação entre pares de subpopulações indicou não haver diferenças entre as subpopulações de Maria Bonita e São Mateus, Regência e ESFIP, e entre São Luiz e Piraquê ($P < 0,01$) (Figura 5). No geral a diferenciação de todas as subpopulações em relação a Maria Bonita foi moderada ($\phi_{ST} > 0,08$) e alta entre as subpopulações de São Luiz e Piraquê e São Luiz e ESFIP ($\phi_{ST} > 0,15$). O número de migrantes em cada subpopulação variou de 0,56 em São Luiz a 3,98 em Regência (Tabela 6).

Tabela 5. Análise de variância molecular nas subpopulações de *Moniliophthora perniciosa* do Espírito Santo.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação	
Entre as subpopulações	5	103,854	0,27322 Va	15,49	($P < 0,001$)
Dentro das subpopulações	444	661,726	1,49037 Vb	84,51	
TOTAL	449	765,58	1,76		

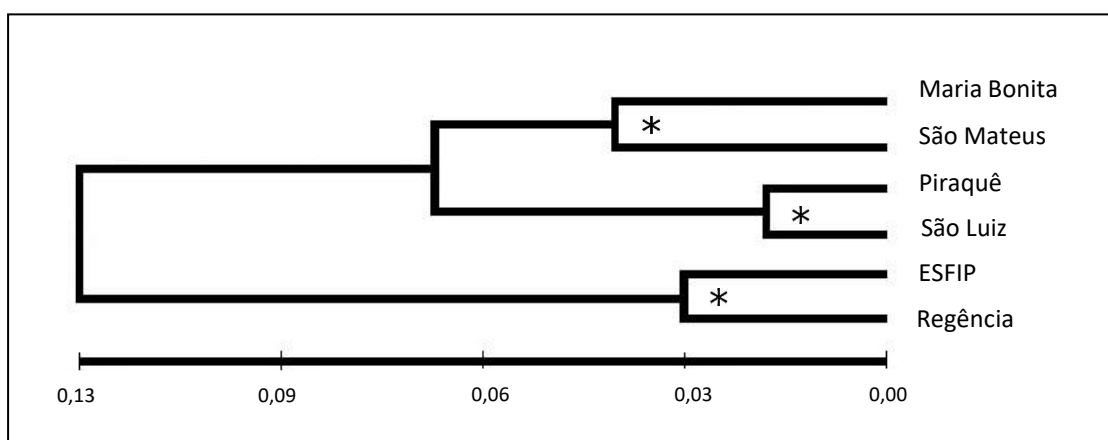


Figura 5. Dendrograma UPGMA gerado pelo programa GDA com base nas distâncias genéticas para as subpopulações de *Moniliophthora perniciosa*. * Valores não significativos.

Tabela 6. Acima da diagonal encontram-se as medidas de diferenciação genética entre as subpopulações de *Moniliophthora perniciosa* do Espírito Santo e abaixo da diagonal o número de migrantes [$0,25(1 - \phi_{ST})/\phi_{ST}$] entre as subpopulações.

	ESFIP	Maria Bonita	Regência	São Luiz	São Mateus	Piraquê
ESFIP	–	0,14	0,06 ^{ns}	0,31	0,25	0,28
Maria Bonita	1,55	–	0,11	0,08	0,08 ^{ns}	0,11
Regência	3,98	1,97	–	0,26	0,19	0,20
São Luiz	0,56	2,77	0,70	–	0,16	0,03 ^{ns}
São Mateus	0,75	2,94	1,05	1,27	–	0,16
Piraquê	0,64	2,08	0,97	7,03	1,30	–

A análise bayesiana executada pelo programa *Structure* utilizando a estimativa de ΔK proposta por Evanno *et al.* (2005) para os resultados de atribuição de indivíduos as subpopulações gerou dois grandes grupos ($\Delta K=2$), com ocorrência de mistura de genótipos entre eles: o grupo 1(ES_1) apresentou o maior número de isolados das

subpopulações de São Luiz (57,3%) e Piraquê (58,8%) e o grupo 2 (ES₂), mais homogêneo, foi formado principalmente por isolados das regiões de Maria Bonita, São Mateus, ESFIP e Regência, (>85%) (Figura 6). O resultado indica haver diferenciação entre os indivíduos amostrados nas subpopulações.

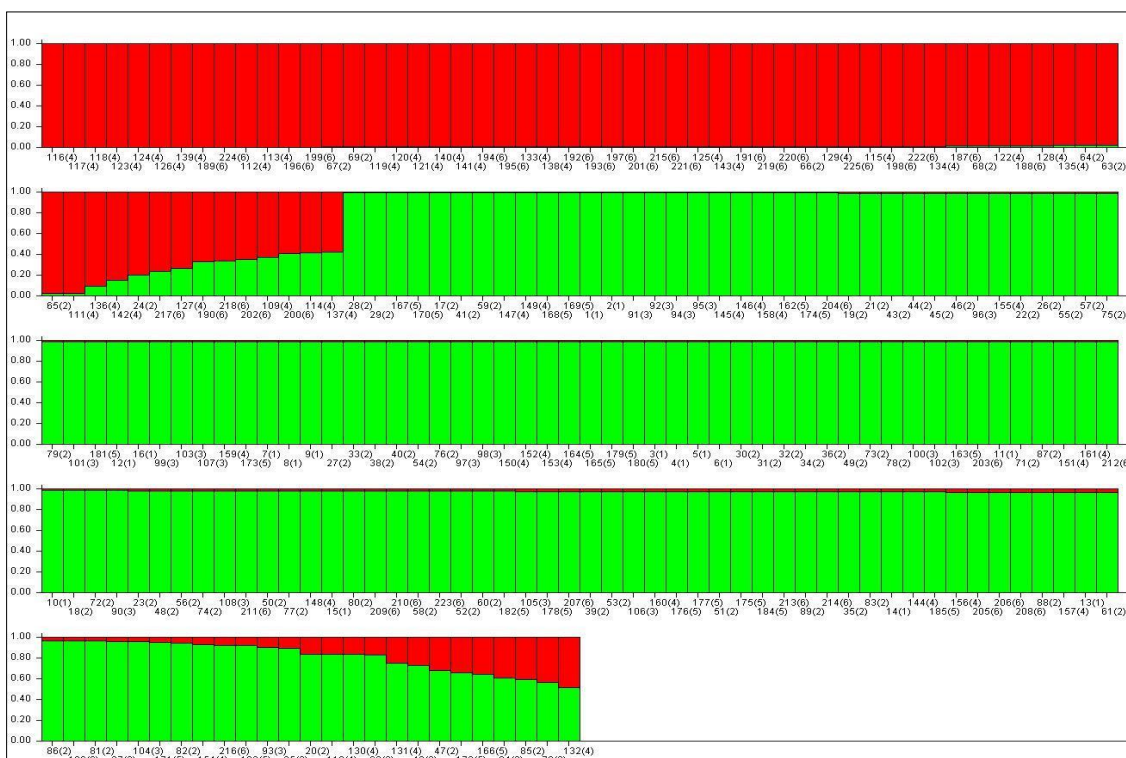


Figura 6. Distribuição dos isolados (barras verticais) dentro dos grupos ($\Delta K=2$) para os 225 isolados de *M. perniciosa* de seis subpopulações do Espírito Santo (barras em vermelho= ES₁, barras em verde= ES₂).

4.3. Acasalamento aleatório

Considerando a população total de *M. perniciosa* no estado do Espírito Santo, o índice de associação $I_A=0,019$ ($P=0,317$) e a hipótese de acasalamento aleatório foi aceita, com exceção da subpopulação de São Luiz, onde as medidas de associação multilocus foram significativas ($P<0,001$), com valor $I_A=0,347$ e $r_d=0,044$ (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativas do desequilíbrio de ligação por meio do índice de associação e da estatística alternativa do índice de associação multilocus (r_d) entre as subpopulações estudadas e nível de significância associado (P).

População	I_A	r_d	P
Maria Bonita	-0,001	0,000	0,468
Piraquê	0,082	0,011	0,227
São Luiz	0,347	0,044	< 0,001
São Mateus	0,216	0,027	0,087
Regência	0,125	0,016	0,285
ESFIP	0,252	0,043	0,154
TOTAL	0,019	0,002	0,317

4.4. Inferências sobre a origem da vassoura-de-bruxa no estado do Espírito Santo

Inferências sobre a origem da doença vassoura-de-bruxa nas lavouras cacauceiras do Espírito Santo foram realizadas comparando as duas populações da Bahia e da Região Norte do Brasil aos dois grupos do Espírito Santo obtidos pela estimativa de $\Delta K=2$. Sendo assim, o Grupo 1 (ES₁) corresponde as subpopulações de São Luiz e Piraquê, e o Grupo 2 (ES₂) às subpopulações de Maria Bonita, São Mateus, Regência e ESFIP. Não foi encontrada diferença significativa entre as populações BA₁ e Norte (Tabela8).

Tabela 8. Medidas par-a-par de diferenciação genética, estimada por theta (φ) entre as populações de *Moniliophthora perniciosa* do Espírito Santo, Bahia e Norte ao nível de 1% de significância.

	BA₁	BA₂	ES₂	ES₁
NORTE	0,06 ^{ns}	0,11	0,22	0,16
ES₁	0,16	0,15	0,12	
ES₂	0,17	0,14		
BA₂	0,09			

Considerando as populações da Bahia e Norte, 84 genótipos multilocus distintos foram encontrados entre os 94 isolados analisados. As populações da Bahia apresentaram baixos níveis de fração clonal e diversidade genotípica (G_{16}) alta, com valores próximos do máximo esperado ($BA_2=15,60$ e $BA_1=15,20$) e considerável número de alelos privados. A região Norte apresentou menor diversidade genotípica $G_{16}=13,79$ (Tabela 3) e maior diversidade gênica ($H_E=0,50$).

Foram compartilhados quatro genótipos multilocus entre essas populações e as subpopulações do Espírito Santo. Três genótipos foram compartilhados entre a população BA₂ e o Espírito Santo: o genótipo h44 foi compartilhado com ESPIP e o genótipo h31 foi compartilhado com Maria Bonita e São Luiz e o genótipo h26 com Maria Bonita. Houve compartilhamento do genótipo h141 entre a Região Norte e a subpopulação de Piraquê (Ilha do Sossego).

A análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) revelou alta diferenciação genética entre as populações ($\phi=0,10$; $P<0,000$). A maior parte da diferença foi detectada dentro das populações (79,07%), contudo considerável variação foi detectada entre as populações e entre as populações dentro do grupo (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de variância molecular entre 319 isolados de *Moniliophthora perniciosa*.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre grupos				
Entre as populações	3	121	0,16954	9,25
Entre as populações dentro do grupo	8	88	0,21409	11,68
Dentro das populações	626	907	0,44889	79,07
Total	637	1.116	1,83252	

O programa Structure detectou a existência de três grandes grupos ($\Delta K= 3$) para amostra utilizada, com ocorrência de mistura entre os indivíduos nas várias populações (Figura 7). O grupo 1 apresentou 56% de representantes correspondentes as subpopulações de ES₁, o grupo 2, apresentou 79% dos isolados são originários da população do Norte e 57% da BA₁. O grupo 3 apresentou 57% de representantes da população da BA₂ e 60% das subpopulações de ES₂.

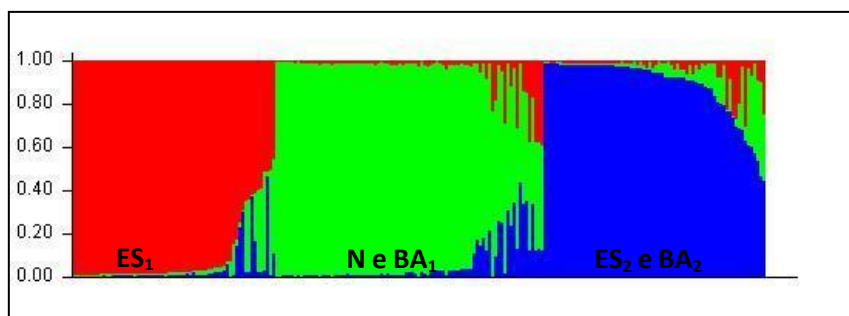


Figura 7. Atribuição populacional de 319 isolados de *M. perniciosa* de cinco populações com base no modelo bayesiano usando Structure.

5. DISCUSSÃO

A diversidade alélica, revelada pelo número de 6,2 alelos por loco, para locos analisados no neste estudo foi mais alta que os estudos realizados por Silva *et al* (2008) com média de 3,2 alelo por loco, utilizando populações em sua maioria composta por isolados da Amazônia; por GRAMACHO, *et al.*, (2007), predominantemente utilizando isolados da Bahia (3,2alelos/loco) e por MOREIRA (2006) utilizando isolados do continente americano (3,9 alelos/loco). Dois dos cinco marcadores utilizados neste estudo (Mscepec_Cp16 e Mscepec_Cp19) apresentaram maior número de alelos em comparação com o trabalho original publicado por Gramacho, *et al.* (2007). O número de alelos descritos por Silva (2008) variou de 3 a 4 alelos por loco e no presente estudo, o número de alelos para os mesmos marcadores variou de 3 a 8.A maior diversidade alélica encontrada nas populações de *M. pernicioso* neste estudo, em relação aos estudos anteriores, é atribuída, possivelmente a sensibilidade da técnica utilizada neste estudo na detecção de diferentes alelos, em relação ao sistema de coloração por nitrato de prata; ao tamanho amostral (N=319) ou as características intrínsecas das populações analisadas.

Neste estudo, as observações confirmaram resultados anteriores de que populações de *M. pernicioso* tem diversidade genética moderadamente alta. Em escala regional, apresenta tendência dos isolados em separar-se geograficamente, com presença de subpopulações dentro das populações (MOREIRA, 2006; SILVA, *et al.*, 2008; GRAMACHO *et al.*, 2002; PLOETZ *et al.*, 2005; BRAZ *et al.*, 2008). Confirma também o poder de resolução deste marcador para determinar a diversidade genotípica e seu potencial uso na análise da estrutura genética deste fitopatógeno, que revelou diversidade genotípica mais alta do que o esperado.

Este estudo representa a primeira análise detalhada de genética de populações de *M. pernicioso* no estado do Espírito Santo. A amostragem de populações foi efetuada ao longo do Rio Doce, região que concentra a maior área produtora de cacau do estado e onde se constatou um grande número de focos iniciais da doença. O conhecimento da variabilidade no estado pode ajudar no manejo da doença, principalmente na seleção de materiais genéticos resistentes.

Na maioria das fazendas amostradas neste estudo havia alta incidência da doença e elevada quantidade de basidiomas, onde são produzidos os basidiósporos, únicas estruturas encontradas em condições de campo, capazes de infectar o cacauzeiro (PURDY e SCHMIDT, 1996).

O acasalamento aleatório nas populações indica a predominância de reprodução sexual e esteve presente em todas as subpopulações, exceto na população de São Luiz, sendo este possivelmente o maior responsável pela diversidade genética do patógeno encontrada no Estado. O fato de não haver predominância de genótipos na população do Espírito Santo sugere que a maioria dos genótipos foi derivada ou por meio de recombinações entre os genótipos fundadores ou por mutações. Dentro de uma mesma subpopulação, os genótipos multilocus dos isolados foram similares, diferindo geralmente em poucos alelos, característica típica de mutações pontuais. Outro mecanismo importante é o envolvimento de elementos transponíveis que são responsáveis por alta taxa de mutação detectada em várias outras espécies fúngicas (KAMOUN, 2003) conferindo variabilidade genética e vantagens adaptativas (McCLINTOCK, 1984). A presença de uma superfamília de transposons ativos no genoma de *M. pernicioso*, denominado *Boto* com expressão ativa durante o ciclo sexual (PEREIRA, *et al.*, 2013) sustenta esta hipótese.

A população de *M. pernicioso* no Espírito Santo está moderadamente estruturada ($\phi_{ST}=0,16$) com presença de subpopulações caracterizadas por elevados valores de diversidade genética. Com base na análise bayesiana, houve a formação de dois grupos, o grupo ES₁, composto pelas subpopulações de Piraquê e São Luiz, e o grupo ES₂, composto por Maria Bonita, São Mateus, Regência, ESFIP. Esses resultados apoiam a hipótese de pelo menos duas introduções de *M. pernicioso* no estado. Provavelmente, a primeira introdução do patógeno no estado ocorreu na região de Maria Bonita, onde existe a maior diversidade do patógeno e em seguida em Piraquê, que além de apresentar alta diversidade genética, agrupou em cluster diferente. Esses resultados corroboram com as informações fornecidas pela CEPLAC/GERES e pelos agricultores, onde, após o diagnóstico da doença

na Fazenda Maria Bonita (em 16 árvores apresentando sintomas de vassoura verde), prospecções foram realizadas na área ao entorno dessa fazenda, mas nenhum outro foco foi encontrado e as medidas para evitar a disseminação da doença foram realizadas. Entretanto, meses depois, em outubro de 2002, a doença foi detectada na região de Piraquê, um segundo foco, a 40 km a noroeste do foco de Maria Bonita, com presença de vassouras secas e basidiomas, já ocasionando perdas na produção. Posteriormente, novos focos da doença foram detectados e o patógeno dispersou-se por toda a região produtora de cacau.

Os resultados obtidos com o presente estudo confirmam que uma população introduzida pode ter a capacidade de se estabelecer numa nova área geográfica (DUTECH, *et al* 2012), e que os mecanismos como reprodução sexual, mutação e fluxo gênico possam estar contribuindo para a diversidade em *M. pernicioso*. As constantes enchentes do Rio Doce podem ter colaborado para o fluxo gênico entre as fazendas situadas a sua margem através do transporte de vassouras secas, já que em muitas propriedades as vassouras são retiradas e amontoadas, mas não são queimadas. Na subpopulação de ESFIP foram encontrados os menores índices de diversidade genética e maior fração clonal. A predominância de poucos genótipos do patógeno nesta subpopulação pode ser influenciada pelas condições locais. A estação experimental ESFIP é caracterizada como uma pequena área de cultivo onde ocorre intenso manejo contra a vassoura-de-bruxa e presença de plantios clonais, propiciando maior homogeneidade dentro dessa subpopulação. Nas outras subpopulações, a produção de cacau é realizada em áreas extensas e embora a região apresente períodos secos prolongados, característica que a diferencia do Espírito Santo das demais regiões de cultivo de cacau, o uso de irrigação pode propiciar um microclima adequado ao desenvolvimento da doença. A presença de hospedeiro suscetível (cacau de origem comum) e o controle cultural não realizado por muitos dos produtores favorecem a produção contínua de inóculo, assegurando sobrevivência do patógeno pelos próprios hospedeiros infectados.

Neste estudo, 15 % da variação foram atribuídas entre populações e maior variação foi encontrada dentro das populações (85%), devido possivelmente a maior probabilidade de recombinação entre indivíduos próximos geograficamente (dentro) que entre indivíduos separados por maiores distâncias. A homogeneidade observada nas populações também pode estar relacionada com a recente introdução do patógeno na região cacauífera do estado do Espírito Santo. Alguns autores afirmam que isolados coletados na mesma região tendem a ser geneticamente semelhantes (ANDEBRHAN *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2000). Em

populações recentemente estabelecidas, baixos níveis de diversidade genética são esperados (FRANÇA, 2011), visto que tais populações são compostas por uma pequena parcela da diversidade genética existente na população fundadora (McDONALD, 1997). Todavia, quando múltiplas introduções ocorrem, as populações apresentam-se muito mais diversificadas (DUTECH, *et al* 2012; STUCKENBROCK *et al.*, 2006; BURGESS *et al.*, 2001).

Importante contribuição deste trabalho foi detectar o compartilhamento de genótipos entre as populações da Bahia e da Região Norte com isolados do Espírito Santo. Possivelmente esses genótipos compartilhados se relacionam com os genótipos de introdução da doença no Estado. Além do compartilhamento, houve o agrupamento de isolados do Espírito Santo (ES₁) com a população da Bahia (BA₂). Os resultados sugerem que a população do Espírito Santo foi fundada por isolados provenientes da Bahia e do Norte do país, provavelmente via transporte de material vegetal assintomático (mudas, estacas e sementes) entre esses locais, que é realizado, especialmente pelos cacauicultores, em busca de material genético superior.

A diversidade genética de fitopatógenos tem um peso significativo nas estratégias de manejo relacionados a durabilidade da resistência do hospedeiro a doenças. Quanto maior a diversidade, maior a chance de adaptação de algum genótipo do patógeno à mudanças do ambiente, o que pode ocasionar a seleção de patógenos com genes que possam torná-lo resistente a fungicidas ou que superem os genes de resistência de plantas (STUKENBROCK, 2006). Elevados índices de diversidade genética, sistema de reprodução misto e potencial de fluxo gênico a longas distâncias (por ação antrópica) enquadram *M. perniciosa* na categoria de alto potencial evolutivo de fitopatógenos proposto por McDonald e Linde (2002b).

Os resultados encontrados possuem implicação para o manejo da vassoura-de-bruxa, uma vez que resistência é a melhor maneira de controlar a doença. A exposição de clones de cacaueteiro a diversidade do patógeno para os dois grupos de isolados encontrados é a melhor forma para avaliar a resistência desses clones, que serão posteriormente recomendados para a recomposição e substituição nas lavouras no Espírito Santo. Sugere-se precaução na aplicação intensiva de fungicidas, que pode promover a seleção de genótipos do patógeno, a substituição gradual dos cacaueteiros suscetíveis para diversos clones com ampla variabilidade genética e a adoção medidas quarentenárias que restrinjam

o movimento de material vegetal não registrado do hospedeiro (mudas, estacas e sementes) entre as regiões de cultivo do cacau.

O movimento de material vegetal e seus patógenos associados é uma tendência que aumenta em virtude da circulação de pessoas e produtos em todo o mundo (BRIGHT, 1998). A introdução de *M. pernicioso* no Espírito Santo ilustra a ineficiência dos esforços de quarentena e os riscos que estão associados com a introdução do patógeno em novas áreas. A expansão dessa doença para as demais regiões produtoras de cacau, na África e na Ásia, seria desastrosa, visto que nessas áreas de cultivo de cacau as condições climáticas também são favoráveis à disseminação da doença, e representaria uma séria ameaça a produção da cacauicultura mundial.

6. CONCLUSÕES

1. As populações de *M. pernicioso* do Estado do Espírito Santo apresentam moderada diferenciação genética;
2. A maior variabilidade genética na Região de Maria Bonita confirma que este é o local de introdução do patógeno no Vale do Rio Doce;
3. As subpopulações do Espírito Santo agruparam-se em duas populações, compatível com a hipótese de pelo menos duas introduções;
4. As evidências de fluxo gênico a longas distâncias e o modo reprodutivo misto nas populações enquadraram *M. pernicioso* na categoria de alto risco de potencial evolutivo para plantações de cacau.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTAKIS, S. L. Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. **Mycology**, v.79, p. 23-37, 1987.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. California: Academic Press, p.93-114, 2005.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of *Marasmiaceae*. **Mycology**, v. 97, p.1012-22,2005.

ALBUQUERQUE, P.S.B; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacauzeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed., Piracicaba: Ceres, cap.18 v.2, p.151-164, 2005

ALMEIDA, L.C. In: SILVA NETO, P. J. *et al*. Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. **Boletim**. Belém, CEPLAC.125p, 2001.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.2 , p.167-175,1999.

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, n.6, p.1020-1027, 1994.

ARRUDA, M. C. C. de; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and host. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.1, p.25-37, 2003.

BAKER, R.; CROWNDY, S. H.; THOROLD, C. A. Witches' broom disease investigations: seasonal variations in the intensity of infections and their effect on control measures. **Tropical Agriculture**, St. Augustine, v. 18, p. 107-116, 1941.

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

BASTOS, C. N. Competição de fungicidas e intervalos de pulverizações no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. In Belém, CEPLAC/ DEPEA. **Informe Técnico**, p. 312-314, 1982

BELKHIR, K. Genetix: Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR9060, 1999.

BERNARDES DE ASSIS, J.; STORARI, M.; ZALA, M.; WANG, W.; JIANG, D.; SHIDONG, L., JIN, M.; MCDONALD, B.A.; CERESINI, P.C. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. **Phytopathology**, v.99, p.1090-1099, 2009.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 374p, 2006.

BRAZ, N. G. R.; GRAMACHO, K. P.; MOREIRA, R. F. C.; SERRA, W. O. Temporal Variability in *Crinipellis pernicioso* in Plantations of Southeast Bahia, Brazil. In: 15th

International Cocoa Research Conference, p. 184-184, 2006.

BROWN, A. H. D.; FELDMAN, M. W.; NEVO, E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. **Genetics**, v.96, p. 523–536, 1980.

BURGESS, T.; WINGFIELD, B.D. ; WINGFIELD, M.J. Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. **Mycological Research**, v.105, p. 1331–1339, 2001.

BUSHNELL, W.R.; ROELFS, A.P. **The cereal rusts**, Saint Paul: Academic Press, 1984.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A microbial population species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. **Molecular Ecology**, v.10, p.947-964, 2001.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939.

CHEESMAN, E.E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. **Tropical Agriculture**, London, v.21, n.8, p.144-159, 1944.

CIAMPI, M. B.; MEYER, M. C.; COSTA, J. N. ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Genetic Structure of Populations of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-1 IA from Soybean in Brazil. **Phytopathology**.v. 98, n.8, 2008.

DOWLEY, L. J.; O'SULLIVAN, E.; GRIFFIN, D.; HARMEY, M. Genetic analysis of Irish populations of *Phytophthora infestans*. **Teagasc**, Dublin, 2000.

DUTECH, C.; BARRES, B.; BRIDIER, J. ROBIN, C.; MILGROOM, M.G.; RAVIGN V. e chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. **Mol. Ecol**, v.21, p. 3931–3946, 2012.

EARL, D. A.; VONHOLDT B. M. Structure harvester: A website and program for visualizing structure output and implementing the evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v.4, p. 359-361, 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews**, v.5, p.435-445, 2004.

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

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

EVANS, H. C. Pleomorphism of *Crinipellis pernicioso* causal agent of witches' broom disease of cacao. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, Zoological Institute, 2006.

FLETCHER, J.; LUSTER, D.; BOSTOCK, R.; BURANS, J.; CARDWELL, K.; GOTTWALD, T.; MCDANIEL, L.; ROYER, M. ; SMITH, K. Emerging Infectious Plant Diseases. In: Scheld, W. M.; Grayson, M.L. ; Hughes, J.M. **Emerging Infections**, ASM Press, Washington, DC, 2010.

FRANÇA, I.F. Estrutura e relações genéticas de *Curvularia eragrostidis* no nordeste do Brasil. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2011.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**. v. 7, n. 6, p. 552-556, 1991.

GLADIEUX,P.; ZHANG, X-G.; AFOUFA-BASTIEN, D.;SANHUEZA,R.; SBAGHI, M. On the Origin and Spread of the Scab Disease of Apple: Out of Central Asia. **Plos one** v.3, 2008.

GOMES, L. M. C.; MELO, G. R. P.; FALEIRO, F. G.; SILVA, S. D. V. M.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C.; MORAES, M. G.; AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis perniciosa* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 377, Suplemento, 2000.

GOODWIN, S. B., COHEN, B. A., DEAHL, K. L.; FRY, W. Migration from Northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. **Phytopathology**,v.84, p.553-558, 1994.

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

GRAMACHO, K. P. *et al.* Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.153–155, 2007.

GRAMACHO, K. P.; LIMA, L. S.; MOREIRA, R. F. C.; SERRA, W O; LIMA, L. S.; BRAZ, N G. Proposta para estabelecimento de diferenciadoras para estudo da evolução do *Crinipellis perniciosa*. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 214-214, 2006.

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

GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA, C.; ZAIDAN, H. Phylogeography of the Witches' broom pathogen in Bahia. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, **Proceedings...** Accra: Chambery, p.1325-1332, 2003.

GARNIER-GERE, P.; DILLMANN, C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibrium in subdivided populations. **Journal Heredity**, v.83, p.239, 1992.

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

HAMADA, H., PETRINO, M. G., AND KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAYDEN, H.L.; CARLIER, J.; AITKEN, E.A.B. Population differentiation in the banana leaf spot pathogen *Mycosphaerella musicola*, examined at a global scale. **Plant Pathology**, v. 52, p. 713-719, 2003.

HAMELIN, R. C., N. LECOURE; G. LAFLAMME. (1998). Molecular Evidence of Distinct Introductions of the European Race of *Gremmeniella abietina* into North America. **Phytopathology**, v. 88(6), p. 582-588, 1998.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE**. Estatística da Produção Agrícola, 2012.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. **Eukaryot Cell**, v. 2, p.191–199, 2003.

KEANE, P.; KERR, A. Factors affecting disease development. In APPS, J. Brown, & H. Ogle (Eds.), **Plant Pathogens and Plant Diseases**, p. 287-298, 1997.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am.J. Hum. Genet**, v. 44, p.397-401, 1989.

LOBÃO, D. E.; VALERI, S.V.Sistema cacau-cabruca:conservação de espécies arbóreas da Floresta Atlântica. **Agrotropica**, v.21, p.43- 54, 2009.

LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J.T.; OLIVEIRA, M. L.; BEZERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Vassoura-de-bruxa do cacau: novos enfoques sobre uma velha doença. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 14, p. 59-111, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, H. A.; MACHADO, R. C. R.Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidiomas e atividade de *Crinipellis pernicioso* em ramos e frutos de cacau na Bahia. In: XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itajaí. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 19. p. 341-341, 1994.

MAYNARD, J.; SMITH; N. H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. How clonal are bacteria? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 90; p. 4384, 1993.

MCCLINTOCK B,The significance of responses oh the genome to challenge. **Science**, v.226, p.792-801, 1984.

MCDONALD, C.M.; MCDONALD, B.; KELLER, B. Evolution and Acquisition of Necrotrophic Effectors by the Fungal Wheat Pathogen *Phaeosphaeria nodorum* and Close Relatives. 213p. **Diss.** ETH, , Zurich, 2012.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plantpathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, p.163-180, 2002a.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 40, p.349-379, 2002b.

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

MOREIRA, R.F.C. Estrutura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. 128p. **Tese** (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MUNDT, C.C.; SACKETT, K.E.; WALLACE, L.D.; COWGER, C., DUDLEY, J.P. Aerial dispersal and multiple-scale spread of epidemic disease. **Ecohealth**. Epub, 2010.

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

NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L.; CASTRO, H. A.; FIGUEIRA, A. R.; SILVA, I. S.; ARAÚJO, L. M.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, F. G. Diversidade genética de isolados monospóricos de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes estados do Brasil utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.400, 2000.

NIELLA, G. R.; CASTRO, H. A.; SILVA, L. H. C. P.; CARVALHO, J. A. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 4, v. 24, p. 523 – 527, 1999.

NUNES, A. M. L.; NUNES, M. A. L.; LIMA, L. M. L. de. Ciclo de vida do *Crinipellis pernicioso* no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). Teresina: Embrapa Meio-Norte; Porto Velho: Embrapa Rondônia, 22 p, 2001.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

PALM, M. Systematics and the impact of invasive fungi on agriculture in the United States. **BioScience**, v. 51, p.141-147, 2001.

PATROCINIO, N.G.R.B. *et al.* Temporal genetic characterization of isolates of *Moniliophthora perniciosa* in southeast of Bahia, Brazil. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v.24 (3), p. 169 - 178. 2012.

PATROCINIO, N.G.R.B. Análise comparativa entre os biótipos C e S de *Moniliophthora perniciosa* na Bahia por morfometria, patogenicidade e análise multilocus. 72p. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

PEDEAG. PLANEJAMENTO ESTRÁTEGICO DE DESENVOLVIMENTO DA AGRICULTURA, 2007-2025. **Secretaria de Agricultura, Abastecimento, Aqüicultura e Pesca – SEAG** – Governo do Estado do Espírito Santo – Linhares-ES, 2007.

PEREIRA, J.F.; ALMEIDA, A.P.; COTA, J.; PAMPHILE, J.A.; DA SILVA, G.F.; DE ARAÚJO, E.F.; GRAMACHO, K.P.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; PEREIRA, G.A.; DE QUEIROZ, M.V. Boto, a class II transposon in *Moniliophthora perniciosa*, is the first representative of the PIF/Harbinger superfamily in a phytopathogenic fungus. **Microbiology**, v.159, p.112-25, 2013.

PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, Salvador: **Cocoa Producers' Alliance**, p.87-89, 1996.

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

PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R. J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C. T.; MOTAMAYOR, J. C.; JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis perniciosa* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.111, n.4, p.317- 326, 2005.

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

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

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

RINCONES, J. *et al.* Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 821-83, 2006.

ROCHA, H. M.; MIRANDA, R. C.; SGRILLO, R. B.; SETUBAL, R. A. Witches' broom in Bahia Brazil. In: RUDGARD, S. A.; MADDISON, A. C.; ANDEBRHAN, T. (Ed.). **Disease Management in cocoa: comparative epidemiology of witches' broom**. London: Chapman and Hall, p.189-200, 1993.

ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. The water balance as an important factor in basidiocarp production by *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of cocoa witches' broom. In International Cocoa Conference, 8. **Proceedings**. Cartagena, Colombia. pp. 381-386, 1982.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

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.

SCHNEIDER, R.W.; HOLLIER, C.A.; WHITHAM, H.K.; PALM, M.E.; MCKEMY, J.M.; HERNANDEZ, J.R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental US. **Plant Disease**, v.89, p.774, 2005

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

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

SILVA, J.R.Q. Caracterização da diversidade genética de isolados Amazônicos de *Crinipellis perniciosa* oriundos de tecido infectado de *Theobroma cacao*. 88p. **Dissertação** (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo., Piracicaba, 2007.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C. de; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauero. **Agrotropica**, v.14, n.1, p.1-28, Edição especial, 2002.

STAHEL, G. Contribution to the knowledge of witch broom disease. (Translated by B. G. Montserim from Bulletin 39, Departement van den Landbouw.). **Tropical Agriculture**, Guildford, v.9, p.167-176, 1919.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec. Department van den Landbouw in Surinam. **Bulletin**, n. 33, p. 1-26, 1915.

STELL, F. Witches' broom disease of cacao and its control. **Bulletin** Department Agriculture. Trinidad Tobago, v.21, p.3-14, 1928.

STUKENBROCK, E.H.; BANKE, S.; MCDONALD, B.A. Global migration patterns in the fungal wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. **Mol Ecol**, v. 15, p. 2895-2904, 2006.

STODDART, J. A., TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction. **Genetics**, Austin, Tex, v. 118, p. 705–711, 1988.

TAYLOR, J.; JACOBSON, W. D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.21–32, 2000.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.388-396, 1989.

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 Genet. Biol.**, v.48, p. 661–667, 2011.

WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B., ROUX, J.; WINGFIELD, B. D. (2010). Fifty years of tree pest and pathogen invasions, increasingly threatening world forests. In D. M. Richardson & D. M. Richardson (Eds.), **Fifty years of invasion ecology: The legacy of Charles Elton**. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 89–99, 2010.

YARWOOD, C.E. Man-Made Plant Diseases. **Science**, v.168, p. 218–220, 1970.

ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA. **Molecular Cell Biology**. Bethesda, v.6, p.195-200, 1986.