

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



ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOVAS FONTES DE
RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO

VALÉRIA RODRIGUES LAVIGNE DE MELLO PAIM

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
JULHO de 2005

P143

Paim, Valéria Rodrigues Lavigne de Mello

Estudo da diversidade genética de novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero / Valéria Rodrigues Lavigne de Mello Paim. – Ilhéus, BA : UESC, 2005.

xi, 79f. : il. ; anexos.

Orientadora : Edna Dora Martins Newman Luz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Bibliografia: f. 64-73.

1. Cacau - Melhoramento genético.
2. Vassoura-de-bruxa
3. Cacauero - Doenças e pragas I. Título.

CDD 633.7496

VALÉRIA RODRIGUES LAVIGNE DE MELLO PAIM

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOVAS FONTES DE
RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO**

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

VALÉRIA RODRIGUES LAVIGNE DE MELLO PAIM

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOVAS FONTES DE
RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO

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

Aprovada, 13 de Julho de 2005

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC

Dr. Uilson Vanderlei Lopes
CEPLAC/CEPEC

Prof. Dra. Edna Dora Martins Newman Luz
CEPLAC – Orientadora

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Eduardo César, e ao meu filho Pedro Eduardo, por toda compreensão, incentivo, amor e carinho, ofereço.

Aos meus pais, Almir e Carmélia, ao meu irmão, Wendell (*in memoriam*), pelo exemplo de vida, amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda luz e proteção para cumprir mais esta etapa em minha vida.

À minha grande mãe-orientadora, Prof^a Dr^a Edna Dora M. N. Luz, por todos os ensinamentos, amizade, dedicação, equilíbrio, paz, segurança e incentivo.

Ao meu co-orientador, Dr. José Luís Pires, pelos seus ensinamentos, por sua imensa dedicação, boa vontade e colaboração no decorrer das atividades.

Ao amigo fiel Dr. Jorge T. de Souza, por sua imensa colaboração, dedicação, ensinamentos e amizade.

À Dr^a Karina P. Gramacho, por todo auxílio e sugestões apresentadas, pela sua competência, dedicação e companheirismo.

Ao Dr. José Luiz Bezerra, por sua preciosa amizade e colaboração nos seminários e na revisão da dissertação.

Ao amigo Lindolfo, por sua estimada colaboração e boa vontade na organização dos dados.

Ao meu amigo e ex-orientador Dr. Jacques Delabie, por ter me mostrado o mundo da pesquisa, pelos seus ensinamentos e amizade.

À Dr^a Stela Dalva, por sua orientação e boa vontade no decorrer das atividades.

Ao Dr. Milton Macoto Yamada, por todo apoio, dedicação e orientação.

À minha amiga e irmã Cristiane, por sua infinita amizade, sempre com muita dedicação e companheirismo.

Ao meu amigo de Fé, Reinaldo, pela imensa e preciosa ajuda na execução das atividades laboratoriais, pelos seus ensinamentos e amizade.

À minha amiga Clélia, por todas as palavras de conforto e resignação nos momentos mais difíceis.

Ao amigo, Zózimo, por sua boa vontade e alegria com que sempre me recebeu.

À seção de genética do Centro de Pesquisas do Cacau, por ter permitido o desenvolvimento das atividades moleculares no laboratório de Biotecnologia.

Às minhas companheiras de fé e luta, Márcia e Ademilde, pelos ensinamentos.

Aos meus companheiros da SEFIT, Denise, Cenilda, Lourdinha, Magnaldo, Joel, Virgínia, Vanessa, Orlando, Marcos e Tita, por todo auxílio na realização das atividades de campo e laboratório e pelo incentivo.

Aos colegas, Jeiza, Stênio, Maysa, Sônia, Dahyana, Brena, Mônica, Ricardo, Ronaldo e Alfredo, pelo auxílio e companheirismo.

À coordenação e aos funcionários do colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo grande apoio.

Ao WCF pelo financiamento de equipamentos e materiais de consumo utilizados na realização das atividades desta pesquisa e pela manutenção dos experimentos de campo que deram origem a este trabalho.

Ao projeto CFC/ICCO/BIOMOL, pelo auxílio financeiro.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de mestrado e em especial a coordenadora Cristina Neves, pela boa vontade com que sempre atendeu as minhas necessidades.

Ao CNPq/PADRT pelo apoio financeiro na compra de alguns reagentes.

À Prof^a Dr^a Mônica Rosa Bertão, pela competência, dinamismo e pela sincera amizade.

Ao Prof^o Ronan Xavier Corrêa, meu conselheiro, por todo auxílio, ensinamentos e dedicação.

Ao Prof^o Leandro Loguercio, por todas as palavras de conforto e incentivo.

À minha secretária Tânia, por toda dedicação e carinho com que cuidou do meu filho nos meus momentos de ausência.

ÍNDICE

EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Theobroma cacao</i> L.: Origem, distribuição e importância econômica	4
2.2. Recursos genéticos na Amazônia Brasileira	6
2.3. A doença vassoura-de-bruxa	8
2.4. Melhoramento genético do cacaueteiro visando resistência à vassoura-de-bruxa	11
2.5. Marcadores microssatélites	13
2.6. Coleção núcleo	16
3. CAPÍTULO 1: SELEÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA A <i>CRINIPPELLIS PERNICIOSA</i> EM CACAUEIROS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
3.1. INTRODUÇÃO	21
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.3. RESULTADOS	25
3.4. DISCUSSÃO	31
3.5. AGRADECIMENTOS	33
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

4. CAPÍTULO 2: ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE CACAUEIROS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA FORMAÇÃO DE UMA COLEÇÃO NÚCLEO	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1 Seleção do material genético	41
3.2.2 Coleta de material e extração de DNA	44
3.2.3 Seleção dos primers microssatélites	45
3.2.4 Reações de microssatélites	45
3.2.5 Análise dos dados moleculares	46
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
5. CONCLUSÕES GERAIS	63
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	64
7. ANEXO	74

EXTRATO

PAIM, Valéria Rodrigues Lavigne de Mello, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Julho de 2005. Estudo da diversidade genética de novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa do cacau. Orientadora: Edna Dora Martins Newman Luz. Co-orientador: José Luís Pires. Colaboradores: Jorge Teodoro de Souza e Karina Peres Gramacho.

A vassoura-de-bruxa causada por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer é o principal entrave ao cultivo do cacau no sudeste da Bahia. O manejo integrado desta doença envolve práticas culturais, uso de fungicidas, de agentes biocontroladores e de variedades resistentes, sendo bastante oneroso. Quanto mais resistentes e mais diversos geneticamente forem os genótipos usados no plantio, mais econômico para os produtores será o controle da doença. Os objetivos deste trabalho foram identificar novas fontes de resistência e conhecer a diversidade genética entre genótipos selecionados para formação de uma coleção núcleo de cacau a ser usada no melhoramento genético do cacau. Para isso foram testados em condição de campo, durante seis anos, progênies de polinização aberta de 40 acessos CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) provenientes da coleção de germoplasma da CEPLAC em Marituba-PA e pré-selecionadas através de inoculações artificiais em casa-de-vegetação. Estes acessos foram coletados em 10 bacias hidrográficas localizadas nos Estados de Rondônia, Acre e Amazonas. Houve diferenças no número de vassouras vegetativas em algumas progênies CAB quando comparadas às progênies de Scavina 6, uma das fontes de resistência do material cultivado atualmente na Bahia. Detectou-se um incremento no número de vassouras para os descendentes de Scavina 6 no decorrer do experimento, fato não observado para as progênies dos clones CAB 64, 66, 194, 195 e 269. Isto indica a existência de

genes de resistência diferentes dos encontrados nos descendentes de Scavina 6 em progênies de alguns clones coletados na Amazônia Brasileira. Para o estudo de diversidade foram selecionados 75 genótipos dentre as progênies CAB estudadas, com base em um índice que considerou, além da resistência, a produtividade das plantas. Os onze *primers* microssatélites usados mostraram uma ampla diversidade dos genótipos provenientes dos estados do Amazonas e do Acre, quando comparados àqueles coletados no estado de Rondônia, e aos 15 outros genótipos utilizados como referência de diversidade neste estudo. A heterozigose dos genótipos CAB variou de 0 a 72,7%, evidenciando a importância desses genótipos para a ampliação da estabilidade e durabilidade da resistência a *Crinipellis perniciosa*. Tinta e três genótipos foram selecionados para compor a coleção núcleo considerando resistência e diversidade genética, treze desses genótipos, não apresentaram vassouras vegetativas durante os seis anos de avaliação no campo. Evidenciou-se a importância dos genótipos provenientes da Amazônia Brasileira para o melhoramento genético do cacaueteiro e a necessidade de coletas adicionais naquela região, tendo em vista a ampla diversidade genética observada no reduzido número de acessos estudados.

ABSTRACT

PAIM, Valéria Rodrigues Lavigne de Mello, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Julho de 2005. Study of the genetic diversity of new sources of resistance to witches' broom disease of cacao. Advisor: Edna Dora Martins Newman Luz. Co-advisor: José Luís Pires. Committee members: Jorge Teodoro de Souza and Karina Peres Gramacho.

The witches' broom disease caused by *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer is the main constraint for the cultivation of cacao in Southeast Bahia. The integrated management of this disease is costly and involves several practices, among them the use of resistant varieties is the most promising. Higher the resistance and genetic diversity of the genotypes used in cultivation, the more economic disease control will be for farmers. The objectives of this study were to identify new sources of resistance and to gain knowledge on the genetic diversity among genotypes selected for the formation of a cacao core collection to be used in genetic improvement. To accomplish that, progenies derived from open pollination of 40 CAB (Brazilian Amazon Cacao) accessions from CEPLAC's germplasm collection in Marituba-PA and pre-selected through artificial inoculation in greenhouse were tested under field conditions for six years. These accessions were collected in 10 river basins located in States of Rondônia, Acre and

Amazonas. There were differences in the number of vegetative brooms observed in some CAB progenies when compared to Scavina 6 progenies, one of the sources of resistance of the material currently cultivated in Bahia. An increment in the number of vegetative brooms was detected for Scavina 6 descendants during the experiment. This increment was not observed for the progenies of CAB clones 64, 66, 194, 195, and 269. This indicates the existence of different genes of resistance in progenies of some accessions collected in the Brazilian Amazon when compared to descendants of Scavina 6. For the study of diversity, 75 genotypes were selected among the CAB progenies studied on the basis of an index that considered, besides resistance, the productivity of the plants. The eleven microsatellites primers used showed a high level of diversity of the genotypes from the States of the Amazonas and Acre when compared to those collected in the State of Rondônia and the other 15 genotypes used as reference for diversity in this study. The heterozygosis of the CAB genotypes varied from 0 to 72,7%, giving evidence to the importance of these genotypes for the amplification of the stability and durability of resistance to *Crinipellis pernicioso*. Thirty-three genotypes were selected to compose the core collection, considering resistance and genetic diversity. Thirteen of these genotypes did not present any vegetative broom during the six years of field evaluation. In conclusion, it is shown the importance of genotypes deriving from the Brazilian Amazon for the genetic improvement of cacao and the need for additional collection expeditions in that region, given the wide genetic diversity observed in the reduced number of accessions studied.

1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é nativo das regiões de floresta tropical úmida das Américas Central e do Sul, sendo o seu centro de origem, provavelmente, a região do Alto Amazonas (CHEESMAN, 1944). Da região de origem o cacauzeiro se expandiu em duas direções, o que resultou em dois principais grupos: Criollo e Forastero. O grupo Criollo se disseminou em direção à América Central e norte da América do Sul, sendo considerado o primeiro cacau domesticado. O grupo Forastero se disseminou na América do Sul, na região da bacia amazônica e também em direção às Guianas, subdividindo-se em Forasteros Alto e Baixo Amazônicos. Este grupo, principalmente os materiais botânicos originários do Alto Amazonas, apresenta maior diversidade genética e melhor desempenho agrônômico (LOCKWOOD, 1976; MARITA, 1998; MARITA et al. 2001; PIRES, 2003). Os tipos híbridos entre Forasteros do Alto e do Baixo Amazonas e Criollos da América do Sul, definidos como Trinitários, surgiram espontaneamente em Trinidad, e apresentam, ampla variação de caracteres (DIAS, 2001).

Em 1746 o cacauzeiro foi introduzido na Bahia, no município de Canavieiras, procedente do estado do Pará, tornando-se uma das principais culturas do estado. A região sul da Bahia chegou a ser responsável por aproximadamente 80% da produção nacional de cacau e a possuir mais de 700.000 ha plantados, distribuídos em vinte e nove mil propriedades, gerando cerca de 300 mil empregos diretos (SOUZA & DIAS 2001). Entretanto, com a chegada da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, no final dos anos 80, a cultura do cacau entrou em declínio. Em muitas propriedades

houve perdas na produção de até 90%, gerando abandono das fazendas, desemprego, descapitalização dos produtores, desmatamentos desenfreados e êxodo rural (TREVIZAN, 1996).

Visando solucionar este problema sócio-econômico, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) direcionou o seu programa de melhoramento genético do cacaueiro para a busca de distintas fontes de resistência, visando a ampliação e a durabilidade da mesma. Porém, a grande maioria dos materiais recomendados como resistentes a *Crinipellis perniciosa* descendem de uma única fonte de resistência, os clones Scavina, sendo indispensável a busca de novas e distintas fontes de resistência para ampliar a base genética do programa de melhoramento.

A existência de variabilidade é a condição básica para que o melhoramento e a evolução das espécies possam ocorrer. As coletas exploratórias de Pound (1938, 1943) no rio Amazonas e em alguns de seus tributários no Peru e Equador, visando encontrar material resistente à vassoura-de-bruxa, resultaram na identificação dos clones Scavina e na constatação da expressiva variabilidade genética existente no material nativo. Isto motivou a realização de várias outras missões de coleta (ALMEIDA & DIAS, 2001).

A CEPLAC tem realizado, desde 1965 (VELLO & MEDEIROS, 1965), coletas na Amazônia Brasileira, visando explorar a variação genética em populações naturais e cultivadas daquela região. Sabe-se que a região compreende a mais extensa área de populações de cacau silvestre do grupo Forastero Amazônico, o mais cultivado em todo o mundo, representando, portanto, um material potencialmente rico em diversidade genética (ALMEIDA & DIAS, 2001).

Atualmente, a coleção de germoplasma em Marituba-PA, resultante destas coletas, possui cerca de 1.800 acessos procedentes de 36 bacias hidrográficas (ALMEIDA et al., 1995). O programa de melhoramento genético do cacaueiro desenvolvido pela CEPLAC visa, entre outros aspectos, a conservação, caracterização, avaliação e utilização desses recursos genéticos. Estes genótipos provenientes das expedições exploratórias estão sendo avaliados pela CEPLAC em áreas experimentais, objetivando a seleção de materiais resistentes e com ampla diversidade genética (PINTO & PIRES, 1998).

O ciclo longo da cultura do cacauero torna o seu melhoramento lento e com um custo alto. Através do uso de marcadores moleculares o tempo e o custo podem ser reduzidos. A seleção assistida por marcadores possibilita a identificação precoce dos genótipos mais desejáveis, diminuindo o tamanho da população a ser avaliada e aumentando a eficiência do melhoramento. A variação na frequência de alelos dos marcadores genéticos permite também a caracterização da diversidade genética de indivíduos e populações, independente do efeito ambiental (FIGUEIRA & CASCARDO, 2001).

Entre os marcadores moleculares, os microssatélites apresentam um notável valor, por sua natureza multialélica, em função do número variável de repetições, resultante da alta taxa de mutações. Estas mutações são decorrentes do “escorregamento” na replicação do DNA e “crossing-over” desigual. Estes marcadores apresentam ainda outras vantagens: serem co-dominantes, apresentarem uma extensiva cobertura do genoma e requererem quantidade mínima de DNA para a análise genética (GARRIDO, 2001).

Considerando-se a ampla diversidade encontrada nos materiais provenientes da Amazônia Brasileira e a possível oferta de novos genes de resistência à vassoura-de-bruxa, teve-se como objetivo avaliar progênies de acessos de cacaueros da Amazônia Brasileira, nas condições ambientais da Bahia, quanto à resistência à vassoura-de-bruxa, visando encontrar novas fontes de resistência e conhecer a diversidade genética entre esses acessos CAB, para construir uma coleção núcleo de cacau.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Theobroma cacao* L.: ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta da família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999), perene, arbórea, diplóide ($2n = 20$), preferencialmente alógama, típica de clima tropical e nativa da floresta Amazônica, sendo esta espécie separada botanicamente em três grupos denominados de Criollos, Forasteros Alto e Baixo Amazônicos e os Trinitários (CHEESMAN, 1944).

As populações de Criollos cultivadas originalmente na América Central, vão desde o México até o sul da Costa Rica. São pouco produtivos, seus frutos apresentam coloração verde ou vermelha quando imaturos, tornando-se roxos ou amarelos quando maduros, apresentam casca macia, com dez sulcos profundos e superfície rugosa, suas amêndoas são grandes arredondadas, apresentam tempo curto de fermentação, em média dois dias, e resultam em um chocolate fino devido ao seu sabor e às suas qualidades organolépticas superiores. Entre os Criollos, pode-se encontrar populações classificadas em bases geográficas, como aquelas provenientes do norte da América do Sul (Criollos venezuelanos e colombianos), apresentando maior variação genética e os da América Central (Criollos mexicanos e nicaragüenses) (DIAS, 2001).

Os cacaueteiros do grupo Forastero estão localizados na América do Sul, na região da bacia Amazônica, possuem amplo potencial de produção, frutos verdes quando imaturos, tornando-se amarelos quando maduros, apresentam casca

dura, com a superfície lisa e dez sulcos pouco pronunciados. O chocolate produzido é relativamente amargo (DIAS, 2001). Entre os Forasteros são encontradas as populações do Alto e Baixo Amazonas, onde a primeira apresenta cacauzeiros vigorosos, precoces e resistentes a certos patógenos.

Um terceiro grupo é conhecido como Trinitários, surgindo de forma espontânea em Trinidad, resultante do cruzamento entre Forasteros do Alto e do Baixo Amazonas e Criollos da América do Sul. Esse grupo híbrido é originário de hibridação natural, quando as plantações de Criollos foram dizimadas por doença em meados do século XVIII, e os cacauzeiros mortos foram substituídos por cacauzeiros do grupo Forastero, interplantados, à época, com os remanescentes de Criollos (CHEESMAN, 1944).

A partir da Amazônia, o cacauzeiro foi levado para a África, através das ilhas de São Tomé, Príncipe e Fernando Pó, expandindo assim seu cultivo em vários países, como Gana, Nigéria, Costa do Marfim e Camarões, de onde provêm, hoje, mais de 70% da produção mundial. Em 1746, sementes de cacau do Pará foram levadas para o município de Canavieiras, onde foram plantadas na fazenda Cubículo, localizada à margem direita do Rio Pardo, no sul da Bahia, de onde a cultura se expandiu por vários municípios do sul do Estado. O material genético plantado recebeu a denominação de “cacau comum da Bahia” (VELLO & GARCIA, 1971).

Sob o ponto de vista econômico, a cultura do cacau é mundialmente importante não apenas para a produção de chocolate, mas para outros ramos da indústria, como a de cosméticos e farmacêutica, de sucos, geléias e licores obtidos através do processamento da polpa do fruto do cacauzeiro. Estima-se que o valor total da sua produção atinja cerca de três bilhões de dólares anuais (CHARTERS & WILKINSON, 2000). Cerca de 70% da produção mundial provém dos cinco maiores países produtores de cacau: Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Brasil e Malásia.

No Brasil, o cacau é importante fonte de divisas agrícolas nos estados de Rondônia, Amazonas, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, sendo esse último o responsável pela maior produção do país. Nas duas últimas safras a produção da Bahia foi de 176 mil toneladas (2003/2004) e 149 mil toneladas (2004/2005) (SESOE, 2005). A região sul da Bahia, possui atualmente em torno

de 37.500 propriedades rurais (SisCENEX, 2001), e apresentou uma produtividade média nas duas últimas safras agrícolas de aproximadamente 290 Kg/ha e 240 Kg/ha respectivamente (SESOE, 2005). A produção da região cacauera da Bahia representa hoje 40% daquela registrada nos anos 80 quando o país foi o segundo maior produtor mundial de cacau.

2.2. RECURSOS GENÉTICOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

As populações naturais de *Theobroma cacao* na Amazônia Brasileira são encontradas nas regiões situadas, aproximadamente, entre as longitudes 44 ° 00' leste (no Maranhão) e 72° 46' oeste (Acre) e as latitudes 3° 41' norte (Roraima) e 11° 47' sul (Rondônia), incluindo os Estados do Amazonas, Pará, Amapá e Mato Grosso, nas áreas da chamada Hiléia Amazônica (ALMEIDA, 1996).

Na sua região de origem o cacauero está distribuído de forma espontânea nas matas de terra firme e nas várzeas dos rios que compõem as bacias hidrográficas da região (DUCKE, 1940 e 1953). Em terra firme ocorre tanto em solos de baixa como de alta fertilidade natural e em relevo que pode variar de plano a fortemente ondulado. Nas várzeas, o cacauero é encontrado freqüentemente vegetando nas partes pouco inundáveis, em altitude que não ultrapassa 80m, em solos com fertilidade natural elevada (ALMEIDA & DIAS, 2001).

Na Amazônia Brasileira o cacau pode ser encontrado de três formas básicas: espontânea - sem interferência do homem; subespontânea – árvores silvestres exploradas pelo homem; e cultivada – plantas provenientes de sementes de cacaueros silvestres (BARTLEY, 1977).

A existência de ampla variabilidade fenotípica nas populações de cacaueros silvestres na Amazônia Brasileira começou a ser evidenciada quando a CEPLAC realizou a primeira expedição científica nesta região (VELLO & MEDEIROS, 1965). As coletas realizadas naquela ocasião foram concentradas, principalmente, nos Estados do Amazonas, Acre e Rondônia, abrangendo diversas zonas do vale do rio Amazonas, contemplando as bacias dos rios Solimões, Purus, Japurá, Jiparaná, Içá, Juruá e Tapajós entre outros, nas quais

se verificou uma vasta e variada dispersão da espécie (ALMEIDA et al., 1987; ALMEIDA, 1996).

Visando a coleta, preservação e utilização dos recursos genéticos do cacauero na Amazônia Brasileira, 16 outras missões de coleta foram realizadas em 36 bacias hidrográficas. Foram coletadas, sempre que possível, borbulhas e frutos de cada planta considerada interessante pelos membros das expedições. As borbulhas deram origem aos clones da série CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) e as progênies, obtidas a partir dos frutos, receberam a mesma numeração dos clones, porém, adicionou-se ao número do clone uma barra com o número da planta de onde provieram (BARRIGA et al., 1985; ALMEIDA et al., 1987). Foram observados também a fenologia da planta, sua produção, o ataque de pragas e doenças e outros dados agrônômicos de interesse. Este conjunto de dados tem demonstrado a grande variabilidade genética existente entre os componentes da série CAB (BARRIGA et al., 1985; BARTLEY et al., 1988; KOBAYASHI et al., 2001).

Atualmente a coleção de germoplasma situada na Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH) em Marituba-PA, é constituída por 1.817 acessos, em sua maioria de genótipos regionais silvestres, representados por 940 clones e 877 famílias (ALMEIDA et al., 1995).

As análises de variabilidade entre e dentro de populações silvestres da Amazônia Brasileira foram conduzidas para manejar, eficientemente, os recursos genéticos de cacau, utilizando-os racionalmente em programas de melhoramento (ALMEIDA & ALMEIDA, 1987; DIAS et al., 2000; SERENO et al., 2003; MOTA et al., 2003).

Com a utilização de marcadores moleculares, foi possível avaliar melhor a variabilidade genética de alguns genótipos coletados na Amazônia Brasileira (SERENO, 2001; SERENO et al., 2003; MOTA, 2003; FALEIRO et al., 2004). Entretanto, outros estudos precisam ser realizados no sentido de explorar melhor o potencial de diversidade dos materiais genéticos disponíveis no BAG-SUPOR.

2.3. A DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA

A vassoura-de-bruxa do cacauero foi descrita inicialmente por Alexandre Rodrigues Ferreira, entre os anos 1785 e 1787, porém só se tornou conhecida quando os sintomas ocorridos no Suriname, em 1895, foram descritos por Went em 1904 (GRIFFITH et al., 1994).

A vassoura-de-bruxa é uma das principais doenças do cacauero, sendo causada pelo fungo *C. pernicioso* (Stahel) Singer, um basidiomiceto, hemibiotrófico pertencente à ordem Agaricales, família Tricholomataceae, o qual é capaz de infectar todos os tecidos em crescimento da planta (ramos, almofadas florais e frutos). A infecção inicia-se quando os tubos germinativos dos basidiósporos penetram em tecidos meristemáticos da planta (MUSE et al., 1996). A colonização e o desenvolvimento do fungo se dão de forma rápida, iniciando-se nos tecidos novos e em crescimento, de onde o patógeno retira os nutrientes das células vivas e se estabelece como parasita (fase biotrófica). Posteriormente, na fase denominada saprofítica, o fungo causa a necrose dos tecidos e aparecem os basidiocarpos, os quais produzem muitos basidiósporos que são responsáveis pela disseminação da doença. A liberação dos esporos está associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar. Os esporos têm vida curta, são sensíveis à luz e não vivem mais que uma hora. A disseminação pode acontecer através da corrente do vento, pela água e através do transporte de sementes contaminadas (ROCHA & WHEELER, 1985).

O período de incubação do patógeno pode durar poucos dias até oito semanas após o lançamento foliar, dependendo dos fatores abióticos, como temperatura e umidade e bióticos, como o estágio de desenvolvimento do órgão atacado (LUZ et al., 2001). Quando a penetração do fungo ocorre na base de uma gema apical ou axilar, por um nó ou internódio em crescimento ativo, estimula a formação de um broto hipertrofiado, que se constitui em uma vassoura vegetativa (SILVA et al., 2002).

Os frutos infectados apresentam diversos sintomas, podendo ocorrer a formação de frutos com formas parecidas com o morango, quando a infecção se

dá nas almofadas florais, estes frutos não se desenvolvem, tornando-se negros e petrificados quando secos. Caso a infecção ocorra diretamente nas flores das almofadas florais, os frutos resultantes destas flores tomam o formato de cenoura. Nos frutos atacados em outros estágios de desenvolvimento, o sintoma característico é o aparecimento de uma mancha negra, dura e irregular, ficando as sementes grudadas entre si e inaproveitáveis para o plantio (SILVA et al., 2002).

No patossistema *Theobroma cacao* X *Crinipellis perniciosa*, o hospedeiro é uma planta perene e o patógeno se reproduz de forma sexuada, o que favorece o aparecimento de novos tipos do patógeno (ANDEBRHAN et al., 1998). Diferenças nas populações do patógeno em diferentes países foram inicialmente reportadas por Stahel (1919), com base nos níveis de severidade da doença e na coloração dos basidiocarpos (ANDEBRHAN et al., 1998). Wheeler e Mepsted (1988) demonstraram a existência de dois grupos de patótipos, o grupo de isolados do Equador, Colômbia e Bolívia e o grupo do Brasil, Venezuela e Trinidad-Tobago.

Andebrhan e Almeida (1984), realizando testes de compatibilidade micelial detectaram variação genética entre isolados de *C. perniciosa* do cacauzeiro em Rondônia e ausência de variação nos isolados testados no Pará. Em experimentos realizados no município de Castanhal – PA e Ouro-Preto d'Oeste – RO observou-se diferenças na patogenicidade entre os isolados testados (ALMEIDA et al., 1983; ALMEIDA & ANDEBRHAN, 1984). Entretanto, em experimentos envolvendo inoculações em mudas e frutos, não identificou-se variação de patogenicidade entre isolados de Altamira-PA e Belém (ALMEIDA & ANDEBRHAN, 1991). Estudos de diversidade genética do patógeno usando marcadores RAPD demonstraram que os isolados da Bahia e de Rondônia apresentaram uma alta similaridade (ANDEBRHAN et al., 1999).

A vassoura-de-bruxa está presente nos países produtores de cacau da América do Sul e Central como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Peru, Venezuela, Panamá e nas ilhas do Caribe, Trinidad, Tobago, Granada, Santa Lucia e São Vicente. Seu primeiro registro de ocorrência foi no Suriname, em 1895, após este, ela foi identificada na Guiana Inglesa, em 1906; na Colômbia, em 1917 e no Equador, em 1918 (HOLLIDAY, 1952 citado por SILVA et al., 2002). Stahel, em 1920, detectou a doença na região do rio Tapajós, afluente do rio

Amazonas, na Amazônia Brasileira, sugerindo que os cacauais do Vale do Amazonas estavam na sua maioria infectados pela doença. Desse modo as terras baixas do Amazonas, da Bolívia, do Peru e da Colômbia estavam dentro da zona de ocorrência da vassoura-de-bruxa (SILVA et al., 2002).

Na Bahia esta doença foi detectada em maio de 1989 (PEREIRA et al., 1990), no município de Uruçuca, onde foi realizada uma operação de erradicação, porém, 5 meses após, ela foi detectada em Camacan. As prospecções que se seguiram demonstraram uma rápida disseminação para outros municípios produtores, como Ilhéus, Itabuna, Buerarema, São José da Vitória, Lomanto Júnior, Itajuípe, Coaraci, Almadina, Floresta Azul, Ibicaraí, Itapé, Jussari, Pau Brasil, Mascote, Santa Luzia e Arataca, desencadeando um efeito devastador na produção de cacau do Estado que resultou em um desequilíbrio econômico, social e ecológico nos municípios afetados por essa enfermidade (TREVIZAN, 1996). Em 2001 a vassoura-de-bruxa foi detectada em algumas propriedades no Espírito Santo, ultrapassando, pois, a barreira natural do rio Jequitinhonha (SILVA et al., 2002).

No patossistema cacauero-*Crinipellis perniciosa* o progresso da doença está diretamente ligado às condições ambientais, as quais influenciam a produção de basidiósporos do patógeno e a fenologia do hospedeiro (ANDEBRHAN, 1982; RUDGARD, 1987). Assim, precisam ser realizados estudos epidemiológicos em cada localidade onde a doença ocorre para embasar e melhorar a eficácia dos métodos de controle (LUZ et al., 1997b).

Recomenda-se para o controle da vassoura-de-bruxa uma série de medidas que englobam métodos culturais, químicos, biológicos e genéticos. O controle genético, utilizando genótipos resistentes é a base para a economicidade das demais técnicas de manejo integrado (LUZ et al., 1997b). Para evitar os riscos do surgimento de novos patótipos do fungo, mais virulentos e aptos a quebrar a resistência do hospedeiro é de fundamental importância o uso de materiais genéticos provenientes de fontes distintas de resistência.

A poda fitossanitária, a primeira medida de controle da vassoura-de-bruxa recomendada por Stahel em 1915, é essencial para diminuir o potencial de inóculo do patógeno, que produz os basidiocarpos sobre as vassouras secas e frutos mumificados. O número e a época de remoções tem um calendário

estipulado com base em resultados epidemiológicos para a região cacaujeira da Bahia (LUZ et al., 1997b). Para o controle químico existe a recomendação de óxido cuproso na proteção de frutos quanto à infecção tanto por *Phytophthora* spp. como por *Crinipellis pernicioso*. Entretanto, este fungicida tem pouca ou nenhuma ação no controle da doença em outras partes da planta (OLIVEIRA & LUZ, 2005). O fungicida sistêmico Tebuconazole é recomendado para controle da vassoura-de-bruxa tanto em viveiro como em campo, mostrando eficácia na redução de infecções em almofadas florais, em lançamentos foliares e em frutos, além de reduzir também a esporulação do fungo em frutos e em vassouras (OLIVEIRA, 2004a e b). As recomendações de manejo integrado da vassoura-de-bruxa incluem também o uso de um produto biológico, o Tricovab, que foi desenvolvido e formulado a partir do fungo *Trichoderma stromaticum*, Samuels e Pardo-Skulteiss (BEZERRA et al., 2000; COSTA et al., 2000;). A utilização conjunta de todas as práticas do manejo integrado é imprescindível para obter-se um resultado positivo e mais duradouro (OLIVEIRA & LUZ, 2005).

2.4. MELHORAMENTO GENÉTICO DO CACAUEIRO VISANDO RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA

O melhoramento objetivando a resistência do cacaujeiro à vassoura-de-bruxa foi iniciado nas décadas de 30 e 40, por Pound, com a busca de materiais resistentes a esta doença na região do Alto Amazonas, onde os clones Scavina 6 e 12 foram encontrados. Um programa de melhoramento foi então estruturado em Trinidad, em que clones Alto Amazônicos foram cruzados com seleções locais, resultando em clones da série TSH (“Trinidad Selected Hybrids”). Posteriormente, os clones Sca 6 e Sca 12 e seus descendentes comportaram-se como suscetíveis à vassoura-de-bruxa no Equador (BARTLEY, 1977), em Rondônia (ANDEBRHAN, 1998;) e no Peru (RIOS-RUIZ, 1989).

Nos últimos anos, acessos de cacau, provenientes da América do Sul, especialmente da bacia do Amazonas, têm sido identificados como fontes de resistência. Entretanto, a reação a doenças da maioria dos genótipos das coleções de cacau mantidas em todo mundo é pouco conhecida e fontes

silvestres, potencialmente resistentes, quase não são utilizadas em programas de melhoramento. Este fato também tem ocorrido no Brasil, onde os genótipos Amazônicos, coletados em grande número, nas décadas de 60, 70 e 80 têm sido ainda pouco utilizados (RIOS-RUIZ & DIAS, 2001).

O programa de melhoramento genético do cacaueteiro no CEPEC foi inicialmente direcionado para a produção de híbridos. O plantio de uma mistura de híbridos solucionaria o problema de auto-incompatibilidade e aumentaria a heterogeneidade genética do material plantado. Somente no final da década de 80, após a chegada da vassoura-de-bruxa, foi dado ênfase ao uso de clones (PIRES, 2003).

A busca por materiais resistentes à vassoura-de-bruxa teve início no CEPEC com o estabelecimento, em 1992, de um projeto de *screening* utilizando um sistema automatizado de inoculação/incubação adaptado por Frias (1987) do patossistema ferrugem fusiforme x *Pinus* na Carolina do Norte, para a vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. Este sistema, montado no CEPEC e adequado às condições da Bahia (SILVA et al., 1999), iniciou a triagem de progênies de polinização aberta tanto de materiais do BAG CEPEC, como de seleções provenientes de fazendas da região (série VB) e de materiais da Amazônia Brasileira. Dezenas dessas progênies apresentaram boas indicações de resistência para serem usadas no programa de melhoramento (LUZ et al., 1996, 1997a, 2000, 2004; SILVA et al., 1999, 2000).

Com base nas indicações do projeto *screening* e de outras avaliações no campo, nos inúmeros ensaios do programa de melhoramento, foi possível a distribuição, em etapas, de materiais com resistência à vassoura-de-bruxa. Foram identificadas entre os materiais avaliados fontes de resistência distintas da encontrada nos clones Scavina, incluindo clones das séries Cruzeiro do Sul e RB, provenientes do Acre, IMC, NA e Pound do Peru, CCN do Equador, e Playa Alta da Venezuela. Em conjunto, estudos ao nível de DNA, visando informações sobre as distâncias genéticas entre estas fontes estão auxiliando o direcionamento de cruzamentos que visam a associação de genes de resistência (PIRES et al., 1996a, 1996b; PINTO & PIRES, 1998).

Até o momento, 36 clones foram recomendados pela CEPLAC aos produtores, dentre os quais, 16 são recomendados em pequena escala, mediante

assinatura do termo de responsabilidade por parte do produtor. Em decorrência da urgência dos produtores em obter materiais mais diversos e resistentes, bem como da necessidade de se avaliar simultaneamente um maior número de clones, vem sendo realizado um melhoramento participativo envolvendo os produtores. Tanto as seleções dos produtores quanto às desenvolvidas pelo CEPEC estão sendo avaliadas, sob condições de fazenda (LOPES et al., 2003).

Em aproximadamente 150 mil hectares já houve a substituição das variedades suscetíveis pelas variedades desenvolvidas pela CEPLAC/CEPEC e por seleções realizadas por produtores (LOPES et al., 2003). Outras atividades voltadas para o melhoramento genético do cacau, visando formar populações base produtivas e resistentes e ampliar as fontes de resistência foram e vem sendo realizadas tanto na Bahia como na Amazônia (LUZ et al., 1996, 1997a, 1999, 2000, 2004; PINTO et al., 1996; PIRES et al., 1996a, 1996b, 2003; MELO et al., 2003; LOPES et al., 2003; SILVA et al., 1999, 2000; ALBUQUERQUE et al., 1999; SILVA et al., 2000;). Procurou-se avaliar a distância genética entre acessos de cacau (PIRES et al., 2000, 2001, 2003; FALEIRO et al., 2004, YAMADA et al., 2003; MOTA, 2003, SANTOS, 2004; LEAL, 2004), e a resistência de cruzamentos entre progenitores do Alto e Baixo amazonas, já previamente selecionados como resistentes (SILVA et al., 2000, 2001). Além disso, estão em desenvolvimento estudos sobre a diversidade genética entre isolados de *Crinipellis pernicioso* (GOMES et al., 2000; PIRES, 2003; GRAMACHO et al., 2004), e os mecanismos de interação *Theobroma cacao* x *Crinipellis pernicioso* (FALEIRO et al., 2001a).

A descoberta de novas fontes de resistência, distantes geneticamente daquelas já em utilização será de grande importância para as atividades do programa de melhoramento genético do cacau em andamento no CEPEC.

2.5. MARCADORES MICROSSATÉLITES

Em um programa de melhoramento é de fundamental importância que se realize uma seleção precisa de materiais superiores, com menor gasto de tempo. Em se tratando de culturas perenes, como é o caso do cacau, o tempo necessário para se completar um ciclo de seleção é o principal entrave dos

programas de melhoramento (PEREIRA et al., 1997). Buscando suprir as limitações geradas por marcadores morfológicos, inúmeros marcadores moleculares vêm sendo desenvolvidos. Por se tratarem de unidades herdáveis simples, estes marcadores quando associados a características de interesse podem ampliar a eficiência na seleção ao identificar diferenças herdáveis (STAUB et al., 1996).

Especificamente os marcadores microssatélites são considerados uma importante ferramenta em estudos genéticos de plantas. Esses marcadores vêm sendo utilizados na caracterização da diversidade genética entre acessos provenientes de seleções de cacauzeiros identificados como resistentes em plantações comerciais (YAMADA et al., 2003; LEAL, 2004); em estudos para validação de marcadores moleculares associados a QTL para resistência à vassoura-de-bruxa no cacauzeiro (SANTOS, 2004); avaliação da associação de marcas moleculares com genes de resistência (QUEIROZ, 2003; DANTAS NETO, 2004); na caracterização de variedades clonais de cacauzeiros recomendadas pelo CEPEC (FALEIRO et al., 2001b); em análise da variabilidade genética entre acessos de cacauzeiros resistentes a vassoura-de-bruxa (PIRES et al., 2001; FALEIRO et al., 2002; PIRES, 2003; LEAL, 2004); na construção de mapas de ligação (RISTERUCCI et al., 2000) e na análise de algumas populações naturais de cacau da Amazônia (SERENO, 2001; SERENO et al., 2003; MOTA, 2003; FALEIRO et al., 2004).

Os *primers SSR* específicos para cacau, desenvolvidos por Lanaud et al. (1999), são bastante polimórficos permitindo a identificação em alguns casos de locos com mais de 10 alelos. A variação na frequência alélica dos marcadores microssatélites tem sido uma ferramenta bastante útil na caracterização da diversidade genética de indivíduos e populações, independente do efeito ambiental. Este marcador pode ser utilizado na caracterização de germoplasma, identificação de acessos duplicados ou relacionados, otimizando o estabelecimento de coleções nucleares, na avaliação do sistema de coleta e manutenção através da identificação de regiões geográficas de maior diversidade, na identificação de cultivares e na seleção de genitores a serem usados em programas de melhoramento.

Os microssatélites são altamente polimórficos, co-dominantes e densamente distribuídos por todo o genoma eucariótico, podendo ser amplificados por PCR com *primers* específicos para as regiões que flanqueiam as seqüências repetidas por apresentarem ampla variabilidade e relativa facilidade de “escorear” são considerados excelentes marcadores genéticos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites são definidos como curtos e repetitivos segmentos de DNA, denominados *motifs*, com repetições (*repeats*) de 2-6 pares de nucleotídeos organizados em *tandem*. Estes segmentos repetitivos de DNA podem ser constituídos por um único tipo de nucleotídeo ou por repetições multiméricas longas ou curtas, formadas por unidades homogêneas, unidades mistas ou *motifs* degenerados que apresentam substituições em uma ou mais bases em alguns *repeats* (VAN BELKUM, 1998). A variação no número de repetições parece originar-se de “crossing-over” desigual entre cromátides irmãs ou escorregamento (“slippage”) da DNA polimerase durante o processo de replicação do DNA.

Os microssatélites são obtidos através da identificação das seqüências que flanqueiam as regiões repetitivas do DNA. Normalmente, são construídas bibliotecas genômicas com DNA isolado da espécie-alvo das quais os clones positivos são identificados através de sondas marcadas, isolados e seqüenciados. Após a identificação das seqüências repetitivas, as seqüências flanqueadoras são obtidas e utilizadas para a estruturação dos *primers*, através de softwares apropriados. Em seguida estes *primers* são avaliados visando a amplificação e polimorfismo (GARNER et al., 2002), onde é necessário um *primer* de cada lado da seqüência repetitiva do DNA, denominados de verso (*forward*) e reverso (*reverse*).

Os fragmentos microssatélites gerados via PCR podem ser identificados através da coloração por brometo de etídeo, bastante simples, porém menos sensível, utilizado geralmente em géis de agarose, a coloração com prata ou radioatividade em géis denaturantes de poliacrilamida e a identificação por fluorescência em géis de poliacrilamida ou eletroforese capilar. Neste caso, a detecção se dá por meio de indução por laser em unidades semi-automatizadas eletroforese (sistemas ABI para produtos fluorescentes) (HARKER, 2001).

2.6. COLEÇÃO NÚCLEO

A idéia de se estruturar coleções núcleo surgiu no início da década de 80, quando Frankel, enfatizou a necessidade de reduzir o tamanho das coleções de germoplasma existentes (BROWN,1989). As coleções nucleares devem então reunir a maior variabilidade com o mínimo de repetitividade.

Brown (1989) sugeriu com base no modelo de alelos neutros que 10% do total dos acessos disponíveis em uma determinada coleção de germoplasma representam aproximadamente 70% da variabilidade genética da mesma. Os alelos comuns e localizados, selecionados de forma natural ou artificial para adaptação a condições ecológicas ou agrícolas específicas, são considerados como potencialmente os mais importantes para os programas de melhoramento (ALLARD, 1992). É, portanto, indispensável que a coleção nuclear englobe o maior número possível desses alelos, respeitando-se, no entanto, o número máximo de acessos considerado aceitável para este tipo de coleção (BROWN, 1989).

As informações sobre a origem dos acessos, caracterização, incluindo informações taxonômicas, de marcadores moleculares e caracteres agronômicos são de fundamental importância para a formação de uma coleção núcleo (NASS, 2001).

Segundo Nass (2001) o aspecto dinâmico de uma coleção nuclear talvez seja a sua característica mais importante, permitindo que após sua formação e validação, novos acessos sejam incorporados ou excluídos. Destaca-se também a reduzida probabilidade da coleção manter acessos muito semelhantes, estando este fato relacionado diretamente aos critérios utilizados na sua estratificação.

Algumas culturas, como alfafa (BASIGALUP et al., 1995), amendoim (HOLBROOK et al., 1993), milho (TABA et al., 1994 e 1999), mandioca (CORDEIRO et al., 1995), arroz (ABADIE et al., 2005), entre outras, possuem coleções nucleares, entretanto, há necessidade de validar essas coleções, no sentido de verificar se realmente estão representando a variabilidade existente

nas respectivas coleções de base (NASS, 2001). A caracterização do germoplasma da coleção nuclear por marcadores moleculares e enzimáticos pode contribuir com informações adicionais que, juntamente com dados morfológicos, geográficos e agronômicos, podem auxiliar na avaliação da diversidade genética e modificar a composição inicial da coleção nuclear (CROSSA et al., 1994).

3. CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA A *CRINIPPELLIS* *PERNICIOSA* EM CACAUEIROS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA¹

VALÉRIA R. L. de M. PAIM ⁽¹⁾; EDNA DORA M. N. LUZ ⁽²⁾; JOSÉ LUÍS PIRES ⁽³⁾;
STELA DALVA V. M. SILVA ⁽²⁾; PAULO S. B. ALBUQUERQUE ⁽⁵⁾; LINDOLFO P.
SANTOS FILHO ⁽⁴⁾; JORGE T. SOUZA ⁽³⁾.

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45.650-000, BA. ²SEFIT, ³SEGEN, ⁴SESOC, Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, 45600-970, Itabuna, BA. ⁵CEPLAC/SUPOR/ERJOH, Cx. Postal 46, CEP 67105-970, Belém, PA. e-mail: mellopaim@ig.com.br.

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Genética em 06/07/2005)

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2005)

RESUMO

A doença vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* é o principal problema fitossanitário para o cultivo do cacau no Brasil. O controle da doença envolve práticas agronômicas com ênfase na resistência como um componente do manejo integrado. O programa de melhoramento genético do cacau conduzido pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Ilhéus, Bahia, Brasil é direcionado à associação de genes de resistência a *C. perniciosa* e utilização, em cultivo, de materiais genéticos que apresentem resistência mais durável. Objetivou-se, assim, identificar novas fontes de resistência em 40 progênies de polinização aberta de acessos de Cacau da Amazônia Brasileira (CAB). Os acessos foram coletados em 10 bacias hidrográficas da Amazônia Brasileira e comparados com progênies de Scavina 6 e 12, do Peru. Progênies de 40 acessos foram avaliadas no campo por seis anos para resistência à vassoura-de-bruxa. Utilizou-se análise multivariada e de medidas repetidas para analisar os efeitos de progênie, ensaio, ano e suas interações. Os resultados mostraram diferenças no número de vassouras vegetativas em algumas das progênies CAB e de Scavina 6. Houve também um incremento no número de vassouras para os descendentes de Scavina 6 no decorrer do experimento, fato não observado para as progênies dos clones CAB 64, 66, 194, 195 e 269. Estes elementos indicam a existência, em progênies de alguns acessos coletados na Amazônia Brasileira, de genes de resistência diferentes dos encontrados nos descendentes de Scavina 6, fonte tradicional de resistência e base das variedades atualmente distribuídas. As novas fontes de resistência serão importantes para a piramidação de genes para a ampliação da estabilidade e durabilidade da resistência.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, melhoramento genético, resistência à vassoura-de-bruxa, avaliação de campo, análise multivariada.

ABSTRACT

The witches' broom disease caused by the fungus *Crinipellis pernicioso* is the main phytosanitary constraint to the cacao production in Brazil. The control of the disease involves agronomic practices with resistance as one of the components. The breeding program conducted by CEPLAC, Ilhéus, BA, Brazil is directed toward the association of resistance genes from different sources to achieve a more durable resistance. Our objective in this study was to look for novel sources of resistance in progenies from 40 cacao accessions from the Brazilian Amazon (CAB). These accessions were collected in the basins of 10 Amazonian rivers and compared with progenies from the Peruvian clones Scavina 6 and 12 that are widely used as resistance standards. Seedlings from progenies of 40 accessions collected in the Brazilian Amazon and Scavina progenies were evaluated in the field for six years for witches' broom symptoms. Multivariate and analysis of repeated measures were used to evaluate the effect of progeny, trial, year and their interactions. The results showed differences in the mean number of vegetative brooms on some CAB progenies and Scavina 6 descendants. There were also an increase in the number of brooms in the last year for Scavina 6 progenies, fact not observed for the progenies of CAB 64, 66, 194, 195, and 269. These results indicate the existence of different genes of resistance in CAB progenies as compared to the traditional Scavina 6 accessions. These new sources of resistance will be important for the association of resistance genes and consequently increase the stability and durability of the resistance to witches' broom.

Keywords: *Theobroma cacao*, Breeding, resistance, field evaluation, witches' broom disease, multivariate analysis

3.1. INTRODUÇÃO

O cacaueteiro, *Theobroma cacao* L., é uma espécie perene que se desenvolve de forma espontânea nas planícies úmidas das Américas do Sul e

Central (CUATRECASAS, 1964). Sua cultura é explorada racionalmente em vários estados brasileiros e representa importante fonte de divisas na economia nacional. O estado da Bahia ainda é o maior produtor brasileiro de cacau, embora sua produção tenha caído, acentuadamente, a partir dos anos 90 em função da doença vassoura-de-bruxa, o que resultou em uma crise econômica e social (TREVIZAN, 1996).

Esta doença, causada pelo fungo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, provocou um desastre econômico na região sudeste da Bahia, conhecida como região cacauzeira baiana, compreendendo 102 municípios cuja economia tem como base principal a produção de cacau (SisCENEX, 2001). Após sua introdução, descoberta em 1989 (PEREIRA et al., 1990), teve início o declínio acentuado da produção nos municípios cacauzeiros que chegou a atingir, uma década após a introdução da doença, aproximadamente 1/4 da maior produção registrada na década de 80, quando o país era o segundo maior produtor mundial de cacau (LUZ et al., 2005). Segundo Trevizan (1996), a crise da região provocada pelo desastre social que foi a introdução da vassoura-de-bruxa resultou na falência de inúmeros produtores, no desemprego e êxodo de trabalhadores rurais e, conseqüentemente, na derrubada de grande parte dos remanescentes da mata Atlântica para instalação de outras culturas, de pastagens e para venda de madeira visando o sustento dos proprietários das terras.

O controle da vassoura-de-bruxa envolve o uso integrado de técnicas culturais, aplicação de fungicidas e de produtos biológicos, como o Tricovab e principalmente o uso de cultivares resistentes (LUZ et al., 1997; OLIVEIRA & LUZ, 2005). Todas estas medidas tendem a baixar o potencial de inóculo nas áreas agrícolas e a favorecer os efeitos da adubação e de outras práticas culturais que viabilizem a sustentabilidade da cultura do cacau no Estado. O uso de alguns clones, com diferentes níveis de resistência, em associação a outras práticas do manejo integrado da vassoura-de-bruxa, têm possibilitado avanços na recuperação da lavoura cacauzeira sul baiana (LUZ et al., 2005).

A busca por fontes de resistência à vassoura-de-bruxa começou na década de 30, através de diversas expedições à Amazônia, durante as quais foram coletados frutos de cacauzeiros silvestres aparentemente livres da doença, cujas

progênies foram introduzidas em vários países, principalmente em Trinidad (FONSECA, 1988). As principais fontes obtidas no Peru, através das coletas de Pound (1938, 1943), são os clones Scavina 6 e Scavina 12, que se mostraram imunes à doença em Trinidad (BARTLEY, 1994), apresentando, no entanto, posteriormente, suscetibilidade no Equador (BARTLEY, 1977), no Brasil (Rondônia) (ANDERBRHAN et al., 1998) e no Peru (RIOS-RUIZ, 1989).

Os clones Scavina e seus descendentes são utilizados pelo Programa de Melhoramento Genético do Cacaueiro (PMGC) do CEPEC, mas o seu comportamento variável em outras regiões e a existência de variações do patógeno detectadas na Bahia (PIRES, 2003; GRAMACHO et al., 2004), evidenciam a necessidade de aumentar as fontes de resistência em programas de melhoramento. Assim, a utilização de genótipos que comportem um número maior de diferentes genes ligados à resistência é uma estratégia fundamental para a obtenção de uma resistência mais durável (PINTO & PIRES, 1998).

A Amazônia Brasileira destaca-se por seu grande potencial em termos de recursos genéticos da espécie *Theobroma cacao*, sendo considerada a maior reserva de variabilidade genética do cacaueiro, caracterizada por ampla variação fenotípica, em produtividade e também em resistência a enfermidades (BARRIGA et al., 1985; ALMEIDA et al., 1987; BARTLEY et al., 1988; ALMEIDA & DIAS, 2001). Silva et al (1998) e Sereno (2001) demonstraram a variabilidade do material proveniente de cacaueiros silvestres da Amazônia Brasileira, através do uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites, respectivamente.

As coletas realizadas por expedições científicas, promovidas pela CEPLAC na Amazônia Brasileira, resultaram na implantação em Marituba-PA de uma coleção de germoplasma de cacau proveniente de 36 bacias hidrográficas nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia e Pará. Este material constitui uma fonte fecunda de importantes genes para a cultura do cacau (BARRIGA et al., 1985; ALMEIDA et al., 1987; ALMEIDA et al., 1995, KOBAYASHI et al., 2001). Genes para resistência à vassoura-de-bruxa devem estar inclusos neste material, pois, o hospedeiro e o patógeno coexistem no mesmo centro de origem há mais de um século.

No presente trabalho, objetivou-se identificar fontes de resistência entre progênies de polinização aberta,

obtidas de 40 clones CAB (Cacau da Amazônia brasileira) provenientes da Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH), em Marituba-PA, que foram avaliadas em condições de campo no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), na Bahia, por 6 anos quanto à resistência à vassoura-de-bruxa.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de polinização aberta de 40 clones da série CAB (Cacau da Amazônia Brasileira), provenientes da Estação de Recursos Genéticos “José Haroldo” (ERJOH), Marituba-PA (Tabela 1), foram enviadas à Seção de Fitopatologia do CEPEC, em 1997, como parte do projeto “*Screening* de germoplasma para resistência à vassoura-de-bruxa” para serem avaliadas quanto à resistência a *C. pernicioso* nas condições da Bahia.

Este material, antes de ser levado ao campo para avaliação da resistência em condições naturais foi previamente inoculado artificialmente em casa-de-vegetação como segue: as sementes dos clones CAB ao chegarem ao CEPEC, na Bahia, devidamente identificadas, foram pré-germinadas por 48 horas em água corrente, plantadas em tubetes plásticos com capacidade para 288 cm³, contendo terriço esterilizado, e mantidas em casa-de-vegetação. Plântulas no segundo lançamento foliar, aproximadamente 4 semanas após a germinação, com pelo menos uma folha com no máximo 1,5 cm de comprimento, receberam, através do sistema semi-automatizado, 1 ml de uma suspensão contendo $7,5 \times 10^4$ basidiósporos de *C. pernicioso*. As plântulas foram deixadas por 24 h no interior de uma câmara climatizada, à temperatura de aproximadamente 25° C e 100% de umidade relativa, sendo então transferidas para casa-de-vegetação sob as condições normais de ambiente (LUZ et al, 2000). De cada progênie foram inoculadas 112 plântulas, sendo 28 plântulas para cada uma das 4 repetições e, sessenta dias após a inoculação, as plântulas foram avaliadas individualmente quanto à presença de sintomas da doença vassoura-de-bruxa.

Somente trinta e seis plântulas de cada progênie dentre as que não apresentaram sintomas da doença em casa-de-vegetação foram transplantadas

para o campo, juntamente com igual número de plântulas das progênies de Scavina 6 e 12, usadas como padrões de resistência, e de Catongo, utilizadas como padrão de suscetibilidade em todos os ensaios para resistência realizados no CEPEC.

Tabela 1. Origem e localização, por ensaio de campo, dos genótipos de cacaueteiro da Amazônia Brasileira avaliados para resistência à vassoura-de-bruxa neste trabalho

Estado/País	Bacia Hidrográfica	Progênies^a	Ensaio^b
Amazonas/Brasil	Japurá/Solimões	CAB 264, 265, 266, 269	1
		CAB 526	2
	Japurá	CAB 486	3
	Acre	CAB 160	2
		CAB 160	3
	Solimões/Amazonas	CAB 271, 272, 273, 274, 275	1
		CAB 5336/16, 5336/19, 329/05	2
		CAB 327, 328, 329	3
	Solimões	CAB 334	3
	Içá	CAB 364	3
	Itaquai	CAB 356	3
	Purus	CAB 191, 193, 194, 195	1
	Acre/Brasil	Acre	CAB 145, 148, 153, 154, 156
CAB 153			3
Caeté/Iaco		CAB 64, 65, 66, 67, 69	1
Rondônia/Brasil	Jamarí	CAB 219, 221, 233, 383, 388	3
Peru	Ucayali	Sca 6 e Sca 12	1, 2 e 3

^a CAB - Cacau da Amazônia Brasileira e SCA - Scavina.

^b Áreas dentro da estação experimental "Arnaldo Medeiros" onde as progênies foram plantadas.

Na quadra H' da Estação Experimental Arnaldo Medeiros (ESARM) no CEPEC, foram implantados três ensaios de campo com o material proveniente das 40 progênies (Tabela 1). Todos os experimentos tiveram testemunhas comuns, plantas das progênies Sca 6, Sca 12 e Catongo. O delineamento usado nos experimentos foi de blocos ao acaso, com três repetições de 12 plantas (4 x 3) por parcela, em espaçamento de 3,0 x 1,5 m plantados sob cacaueteiros adultos (safreiros) com alta infecção por *C. pernicioso* (LUZ et al., 2000).

À medida que as plantas dos genótipos CAB foram se desenvolvendo, as copas dos cacaueteiros safreiros foram raleadas para permitir o pleno crescimento

das plantas jovens. As plantas de todas as progênies foram avaliadas mensalmente, durante 6 anos (1999 a 2004), quanto aos sintomas de vassoura-de-bruxa (período sem a doença; número total de vassouras por planta); número total de frutos sadios e número total de frutos com sintomas de vassoura-de-bruxa.

A variável considerada para este estudo foi o número médio de vassouras vegetativas por planta/ano e, para comparação, foi tomado, em um único período (março de 2005), o número de vassouras vegetativas presentes em 30 plantas de cacauzeiros híbridos safreiros utilizados no experimento como fonte natural de inóculo.

A variável número de vassouras vegetativas foi analisada a partir de sua divisão conforme os seis anos de avaliação e interpretada como seis variáveis, usando-se PROC GLM – MANOVA, para o estudo dos efeitos de ensaio, repetição dentro de ensaio, progênie e interação testemunhas comuns x ensaios. Para a interpretação dos efeitos de ano e das interações progênies x ano, foi utilizada a metodologia de análise de medidas repetidas - PROC GLM – REPEATED (SAS INSTITUTE INC, 1988).

Para separar o valor da interação progênie x ano, cada um dos anos foi removido da análise e observada a contribuição individual de cada um deles para a interação através do efeito no valor do teste F. Todas as progênies estudadas foram comparadas através de contrastes com Scavina 6 e também com a progênie CAB que apresentou menor número de vassouras vegetativas.

3.3 RESULTADOS

Das 108 plantas (36 em cada ensaio) das progênies de um clone Catongo, utilizadas como testemunhas susceptíveis, apenas seis plantas sobreviveram, devido à alta pressão de inóculo de *Crinipellis pernicioso* presente na área. Em função disso, esta testemunha foi desconsiderada nas análises. A média do número de plantas sobreviventes entre as progênies CAB estudadas foi de 24 plantas por progênie, enquanto a média de sobreviventes nas progênies Scavina foi de 29.

A maior média anual de vassouras vegetativas por planta observada para as progênies estudadas foi de 22,6 vassouras por planta (média da progênie do

clone CAB 272 no ano de 2004 – Tabela 2), no entanto, a média das trinta plantas escolhidas ao acaso entre as plantas dos cacauzeiros safreiros mantidas na área como fontes de inóculo foi de 71,8 vassouras para uma única remoção.

De acordo com as análises realizadas, a interação entre testemunhas comuns (Scavina) e ensaios não foi significativa a 10% (probabilidade de F para o teste de Willk = 0,1981), o que mostra que o comportamento das progênies de Scavina (6 e 12) não teve grande distinção de acordo com o ensaio e, portanto, que não há maiores limitações para a consideração conjunta dos ensaios para análise.

Os efeitos de ensaio e repetição dentro de ensaio foram significativos (probabilidade de F para o teste de Willk = 0,0001). Assim, as médias das progênies foram corrigidas para estes dois fatores e para estas, também, foram observadas diferenças significativas ($P > 0,0001$). Houve, portanto, diferenças de reação à doença entre as progênies estudadas.

Na análise de medidas repetidas, foram observados como significativas as interações entre ano de avaliação e progênie (probabilidade de F para o teste de Willk = 0,0001). Identificou-se a ocorrência de variação no comportamento de resistência ao longo dos anos entre as progênies. É possível ver, na Tabela 2, um maior aumento no número médio de vassouras no último ano de avaliação (2004), principalmente, quando se observa as progênies descendentes de Scavina para as quais houve um aumento absoluto da intensidade de doença, no ano de 2004 (e proporcional em 2002 e 2003), enquanto que as progênies CAB 64, 66, 194, 195 e 269 não apresentaram este aumento (Figura 1). Outras das progênies testadas acompanharam o desempenho das progênies do clone Sca.

Tabela 2. Número médio corrigido de vassouras vegetativas por planta e média geral do período observado para progênies em avaliação no CEPEC durante os anos de 1999-2004

Progênie ^a	Ano						Média Geral 1999-2004
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
CAB 064	7,45	3,22	0,61	- 0,12	- 0,05	- 0,35	1,79
CAB 065	5,71	9,05	2,72	1,82	0,26	4,65	4,04
CAB 066	5,58	3,72	- 0,22	- 0,76	- 0,86	- 1,79	0,94
CAB 067	4,60	6,39	1,34	1,24	- 0,28	4,07	2,89
CAB 069	4,86	4,44	1,92	1,78	- 0,09	2,39	2,55
CAB 145	4,97	7,00	2,26	3,55	1,01	6,05	4,13
CAB 148	5,31	7,78	1,17	2,61	0,96	4,97	3,80
CAB 153	2,39	2,33	0,71	2,16	1,04	5,59	2,37
CAB 154	4,90	5,94	1,50	3,33	1,05	5,53	3,71
CAB 156	3,37	4,75	0,78	2,10	0,60	3,00	2,44
CAB 160	4,98	4,84	1,18	3,29	1,43	6,62	3,72
CAB 191	7,53	7,69	2,80	6,19	1,28	4,68	5,03
CAB 193	6,84	4,84	1,69	3,13	1,25	8,21	4,33
CAB 194	2,95	3,42	0,12	0,28	- 0,04	- 1,59	0,85
CAB 195	3,49	3,00	- 0,08	- 0,95	- 0,83	- 3,15	0,25
CAB 219	1,92	1,93	0,71	2,20	0,72	4,46	1,99
CAB 221	2,48	1,34	0,54	1,75	0,80	2,77	1,61
CAB 233	2,76	3,77	0,84	2,28	1,18	4,01	2,47
CAB 264	9,96	9,66	2,15	3,33	0,35	7,11	5,43
CAB 265	8,40	5,33	1,34	1,88	0,11	5,24	3,71
CAB 266	7,73	5,04	1,09	1,40	0,46	2,32	3,00
CAB 269	4,17	2,57	0,43	0,36	- 0,41	- 0,73	1,06
CAB 271	5,52	6,97	1,85	3,41	1,94	7,58	4,55
CAB 272	7,34	8,00	5,14	10,44	2,26	22,59	9,30
CAB 273	6,64	6,03	0,19	0,17	0,49	4,75	3,05
CAB 274	3,25	3,85	0,73	- 0,30	0,34	3,36	1,87
CAB 275	8,93	9,90	2,19	4,58	1,22	10,82	6,27
CAB 327	5,72	3,96	1,23	3,35	3,25	10,76	4,71
CAB 328	3,75	2,89	1,00	2,55	1,00	5,50	2,78
CAB 329	3,56	2,73	0,88	2,26	1,44	6,89	2,96
CAB 334	3,33	2,54	0,85	2,60	1,51	6,39	2,87
CAB 356	4,42	3,49	0,95	3,06	1,27	5,32	3,08
CAB 364	2,40	1,64	0,71	2,03	1,48	5,67	2,32

Continua ...

Tabela 2. Continuação

Progênie ^a	Ano						Média Geral 1999-2004
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
CAB 383	2,26	3,03	0,64	2,14	1,67	7,53	2,88

CAB 388	2,89	3,16	0,73	3,03	1,23	4,31	2,56
CAB 486	5,35	3,98	1,76	3,09	2,53	9,70	4,40
CAB 526	8,21	11,65	4,08	6,11	3,48	10,35	7,31
CAB 329/05	7,14	7,70	2,08	3,50	1,48	10,33	5,37
CAB 533616	6,61	14,41	3,30	8,92	2,11	11,80	7,86
CAB 533619	4,50	2,84	1,55	2,73	1,88	6,10	3,27
Sca 12	2,25	2,29	0,97	2,23	1,81	8,57	3,02
Sca 6	2,12	1,74	1,02	2,19	1,26	6,52	2,48

^a CAB – Cacau da Amazônia Brasileira e Sca - Scavina

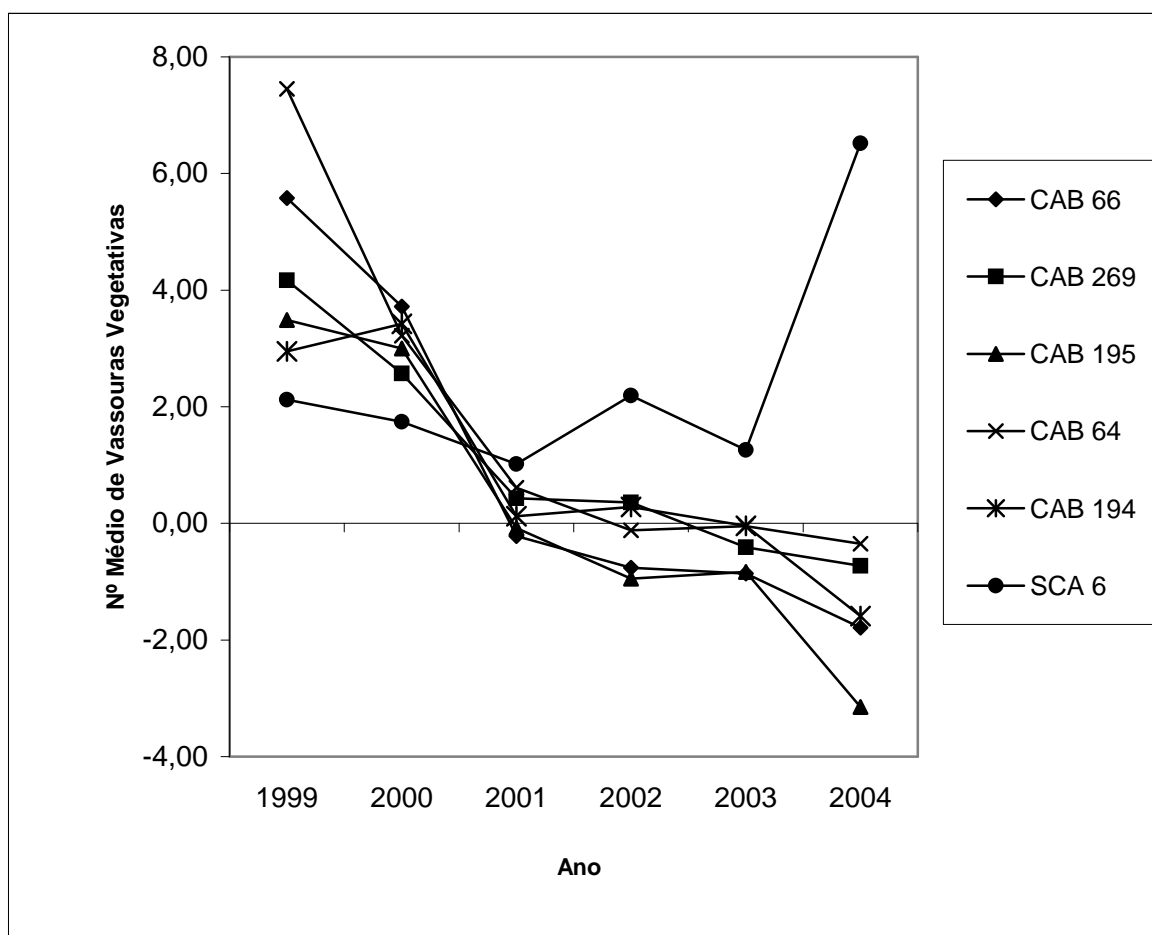


Figura 1. Número médio corrigido de vassouras vegetativas por planta de cinco progênies de cacau da Amazônia Brasileira e a média da progênie Scavina 6 durante os anos de 1999 a 2004.

Usando uma forma simplificada para fracionar o valor da interação progênies x ano, a saber: repetição das análises com a exclusão de um dos 6 anos, verificou-se, com a exclusão de 1999, 2000, 2001, 2002 e 2003,

respectivamente, os valores: 3,3734; 3,7888; 3,9941, 3,6096 e 3,3031 para o F da interação, enquanto a remoção do ano de 2004 da análise resultou no menor valor de F, 3,2826, mostrando que as diferenças nas mudanças comportamentais no ano de 2004 são o principal elemento constituinte da interação.

As progênies dos clones CAB 145, 148, 154, 156, 160, 191, 193, 194, 195, 264, 265, 266, 269, 271, 272, 273, 274, 275, 327, 329/05, 486, 526, 64, 65, 66, 67, 69 e 533616, mostraram-se distintas, a 5%, quando contrastadas com a progênie Scavina 6 (Tabela 3); e entre estas as dos CABs 64, 66, 194, 195, 269 e 274 apresentaram médias gerais corrigidas para os 6 anos inferiores à apresentada pela progênie de Scavina 6 (Tabela 2).

Tabela 3. Valores de probabilidade de erro para a rejeição da hipótese de nulidade de contrastes entre as médias das progênies estudadas e as das progênies Sca 6 e CAB 195

Progênies^a	Contraste - Sca 6	Contraste - CAB 195
	*Pr > F	*Pr > F
CAB 064	0,0001	0,0406
CAB 065	0,0005	0,0124
CAB 066	0,0001	0,6451
CAB 067	0,0004	0,0345
CAB 069	0,0056	0,1035
CAB 145	0,0016	0,0041
CAB 148	0,0001	0,0191
CAB 153	0,9131	0,0012
CAB 154	0,0304	0,0235
CAB 156	0,0455	0,1311
CAB 160	0,0072	0,0010
CAB 191	0,0001	0,0001
CAB 193	0,0009	0,0001
CAB 194	0,0029	0,7669
CAB 195	0,0001	-
CAB 219	0,9034	0,0018

Continua ...

Tabela 3. Continuação

Progênie ^a	Contraste - SCA 6	Contraste - CAB 195
	*Pr > F	*Pr > F
CAB 221	0,6197	0,0671
CAB 233	0,5160	0,0295
CAB 264	0,0001	0,0001
CAB 265	0,0001	0,0001
CAB 266	0,0001	0,0712
CAB 269	0,0002	0,8381
CAB 271	0,0111	0,0001
CAB 272	0,0001	0,0001
CAB 273	0,0001	0,0043
CAB 274	0,0355	0,1251
CAB 275	0,0001	0,0001
CAB 327	0,0008	0,0001
CAB 328	0,7053	0,0344
CAB 329	0,8508	0,0088
CAB 334	0,8467	0,0042
CAB 356	0,1784	0,0118
CAB 364	0,9740	0,0100
CAB 383	0,7871	0,0010
CAB 388	0,4841	0,0157
CAB 486	0,0356	0,0001
CAB 526	0,0001	0,0001
CAB 329/05	0,0001	0,0002
CAB 533616	0,0001	0,0001
CAB 533619	0,1419	0,0015
Sca 12	0,4085	0,0001
Sca 6	-	0,0001

^a CAB – Cacau da Amazônia Brasileira e Sca – Scavina.

* Nível descritivo para F, considerando o teste Lambda de Wilk significativo a 5%.

A progênie CAB 195 que apresentou a menor média geral de número de vassouras vegetativas por planta foi escolhida para realização de contraste com as demais progênie CAB visando conhecer, principalmente, se havia distinção entre as progênie de bom desempenho. Os valores de probabilidade de erro para a rejeição da hipótese de nulidade deste contraste (Tabela 3) foram significativos para 31 casos entre os 39 analisados. Dentre as cinco progênie CAB de realce pelo comportamento de resistência verificado neste experimento foi observada diferença significativa entre as progênie CAB 195 e CAB 64.

3.4 DISCUSSÃO

A pressão de inóculo na área foi adequada para seleção do material resistente. Isto pode ser observado pelo elevado número de vassouras vegetativas contadas nas trinta árvores selecionadas ao acaso, dentre aquelas que foram deixadas na área experimental até o final do período de avaliação do experimento, e pela mortandade das plantas das progênies Catongo.

Quinze das progênies CAB avaliadas apresentaram número médio de vassouras vegetativas, para os seis anos de experimento, inferior ou aproximadamente igual aos das progênies Scavina (Tabela 2). Deve-se ressaltar que as progênies CAB, como um todo, englobam materiais de grande resistência à vassoura-de-bruxa (FONSECA & ALBUQUERQUE, 1996), o que está comprovado, pois, estas progênies sofreram seleção precoce (*screening*) e alta pressão de inóculo no campo.

O efeito significativo observado no experimento para progênies, traduzindo a ocorrência de diferenças entre elas com relação a reação à doença, evidencia a possível existência de diferenças gênicas relacionadas à resistência. Ao contrastar-se as progênies CAB com a progênie de Sca 6 (Tabela 3), observou-se que a grande maioria delas (28) mostraram-se distintas desta, portanto, com genes diferenciados. Isto é particularmente marcante para as progênies CAB 64, 66, 194, 195, 269 e 274 que tiveram um comportamento de resistência superior às demais (menores médias gerais de número de vassouras – Tabela 2), e principalmente, em relação as progênies de Sca 6 no último ano (2004), o que indica, para estas, um melhor desempenho geral e ilustra a excepcional potencialidade do material avaliado. É válido considerar que os clones Scavinas são referências históricas de resistência (POUND, 1938, 1943; BARTLEY, 1994) e ainda constituem a principal base das variedades indicadas para plantio comercial na Bahia (PIRES, 2003).

As diferenças gênicas são, no entanto, mais nitidamente evidenciadas quando da consideração da evolução do comportamento das progênies no decorrer do período avaliado. Pode-se constatar, através da Tabela 2, que a distinção das progênies com destaque em relação à progênie de Scavina 6 (com

diferenças significativas e baixas médias gerais) deve-se, principalmente, aos desvios de comportamento destas progênies no período final de avaliação. Como casos extremos temos as progênies de CAB 69 e 266, com médias gerais ligeiramente superiores a da progênie de Scavina 6, mas incidência de doença muito menor no último ano.

Com os contrastes entre as demais progênies CAB e a do CAB 195 ficou evidente a ocorrência de distinção entre progênies com excelente desempenho e que foram significativamente distintas de Scavina 6 e, portanto, também, a existência de diferenças genéticas entre as progênies mais resistentes (CAB 195 e CAB 64).

Estudos analisando a variabilidade entre e dentro de populações silvestres de cacauero da Amazônia Brasileira (ALMEIDA & ALMEIDA, 1987; SERENO et al., 2003; MOTA et al., 2003) confirmaram a expressiva diversidade genética entre os materiais amazônicos disponíveis no Banco de Germoplasma da CEPLAC/SUPOR.

O *screening* para resistência precoce à vassoura-de-bruxa de progênies de polinização aberta desses materiais, realizado entre 1997 e 2001, demonstrou o potencial de resistência existente entre essas progênies para o inóculo do Pará (SILVA et al., 1999).

Os materiais destacados como fontes de resistência para o programa de melhoramento genético através deste estudo foram coletados em bacias hidrográficas diferentes. As progênies CAB 64 e CAB 66 são provenientes de coletas na bacia do Caeté/lago; as dos CABs 194 e 195 são da bacia do Purus; e a do CAB 269 da bacia do Japurá/Solimões. Isto comprova a riqueza gênica do material amazônico já ressaltada por outros pesquisadores (BARRIGA et al., 1985; ALMEIDA et al., 1987; ALMEIDA et al., 1995).

As diferenças constatadas neste trabalho em respeito a alteração do comportamento de progênies em resposta a alterações do ambiente confirmam a existência de diferentes genes de resistência. Alterações comportamentais deste tipo, para descendentes de Scavina, já foram constatadas em outra área próxima, também dentro dos limites do CEPEC: foi identificada, na coleção de Germoplasma do CEPEC, a redução do destaque de descendentes da fonte tradicional de resistência e base das variedades atualmente distribuídas, o

Scavina 6, em relação à média de 180 clones testemunhas. Foi, ainda, captado um processo de evolução do patógeno: isolados amostrados em materiais resistentes diferiram geneticamente dos amostrados em genótipos susceptíveis, conforme marcadores RAPD, mostrando que o maior nível de dano se devia ao aumento da frequência de tipos do patógenos mais agressivos ao Scavina (PIRES, 2003).

Dois aspectos importantes se realçam neste estudo: a mudança comportamental de progênies de Scavina, ilustrando a necessidade premente de se identificar novos genes de resistência para, com a associação de genes e ampliação da diversidade em cultivo, se alcançar uma maior durabilidade de resistência; e a identificação de genótipos com diferenças genéticas em relação ao Scavina, o que permitirá esta associação de genes/ampliação da diversidade em cultivo.

AGRADECIMENTOS

À equipe da seção de fitopatologia da Ceplac/Cepec: Denise Argolo, Joel Augusto Feitosa, Magnaldo Nascimento, Vanessa Paim, Cenilda Rocha, Márcia Paim, e Virginia Damaceno pela total colaboração na coleta dos dados e aos pesquisadores e professores Dr. José Luíz Bezerra, Dr. Milton Macoto Yamada, Dr. Ronan Xavier Corrêa, Dr^a Karina P. Gramacho e ao Engenheiro Agrônomo Eduardo César Paim, pelas correções no texto e sugestões apresentadas; e ao ACRI/WCF por financiar o projeto de resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero, do qual este trabalho se originou; ao CFC/ICCO/CEPLAC – “Projeto Biomol” pelo auxílio financeiro e a FAPESB pela concessão de bolsa ao primeiro autor.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA, C.M.V.C.; BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; BARTLEY, B.G.D. Evolução do programa de conservação dos recursos genéticos de cacau na Amazônia Brasileira. CEPLAC, DEPEA, Belém. **Boletim Técnico** 5. 108p,1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.C. Coleta de cacau Silvestre no Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Theobroma** 17: 65-92, 1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; MACHADO, P.F.R.; BARRIGA, J.P.; SILVA, F.C.O.D. Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia Brasileira: uma abordagem histórica e analítica . CEPLAC/ SUPOC, Porto Velho. **Informe Técnico**. 92p, 1995.

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

ANDEBRHAN, T; ALMEIDA, L.C.; NAKAYAMA, H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica** 10 (2): 49-60, 1998.

BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.G. Preservação e utilização dos recursos genéticos de cacau na Amazônia Brasileira. In: **Proceedings of the 9th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers`Alliance, London. p. 73-79, 1985.

BARTLEY, B.G.D. The status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: **Conferencia Internacional de Investigación en Cacao**, 6, Caracas. Cocoa Producers`Alliance, Actas, Lagos. p. 57-69, 1977.

BARTLEY, B.G.D., MACHADO, P.F.R., AHNERT, D., BARRIGA, J.P.; ALMEIDA, C.M.V.C. Descrição de populações de cacau da Amazônia brasileira. I - observações preliminares sobre populações de Alenquer, Pará. In: **Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers`Alliance, London. p. 665-672, 1988.

BARTLEY, B.G.D. A review of cacao improvement. Fundamental methods and results. In: **Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies**. Kuala Lumpur: Malaysia. p.16, 1994.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contrib. US **Nat. Herb**, 35, 377-605, 1964.

FONSECA, S.E.A. **Assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* in cocoa aceses and callus culture**. 1988. 250p. Tese de Doutorado - Faculty of Science of the University of London, Berkshire. 1988.

FONSECA, S.E.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In:

Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference. Cocoa Producer's Alliance. Salvador, Bahia, Actas. Lagos, p.149-153, 1996.

GRAMACHO, K.P.; PIRES, J.L. ; PEREIRA, N.N. Caracterização molecular de isolados de *Crinipellis pernicioso* de clones de cacaueteiro com diferentes níveis de resistência à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, V. 29 (Supl), p. 218-218, 2004.

KOBAYASHI, R.S.; SANTOS, A.O. da S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F.C.O. da; SCERNE, R.M.C. Caracterização morfológica de frutos e sementes de clones de cacaueteiros (*Theobroma cacao* L.) Silvestres da Amazônia Brasileira. Belém, PA, Brasil, CEPLAC/SUPOR. **Boletim Técnico** 19, 58p, 2001.

LUZ, E. D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V. de; OLIVEIRA, M.L. de. Cacau (*Theobroma cacao* L.) controle de doenças. In: RIBEIRO, V.F.X.; ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas-grandes culturas.** Viçosa, UFV, v.2, p. 617-622, 1997.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; GRAMACHO, K.P., LOPES, U.V., ALBUQUERQUE, P.S.B. Cocoa progenies responses to *Crinipellis pernicioso* under field and controlled environment conditions in Bahia, Brazil. **Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, p. 537-543, 2000.

LUZ, E.D.M.N., SGRILLO, R.B.; SANTOS FILHO, L.P. Estimativas de danos e perdas causadas por doenças no cacaueteiro. **Anais do primeiro workshop de epidemiologia de doenças de plantas.** Viçosa, 2004 (in press), 2005.

MOTA, J.W.S. **Análise da diversidade genética de germoplasma de Theobroma cacao L. da Amazônia brasileira por microssatélites.** 2003. 87p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p, 2005.

PEREIRA, J.L.; RAM, A. FIGUEIREDO, J.M. de; ALMEIDA, L.C.C. de. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brasil. **Tropical Agriculture**. 67(2):188-189,1990

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

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueteiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças.** 2003. 220p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de viçosa, Viçosa. 2003.

POUND, F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Report on a visit to

Ecuador, the Amazon Valley and Colombia, April 1937-April 1938. Yulle's Printerie, **Port of Spain**, 58p, 1938.

POUND, F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*). Report on a recent visit to the Amazon territory of Peru, September 1942- February 1943. Yulle's Printerie, **Port of Spain**, 14p, 1943.

RIOS-RUIZ, R.A. Manejo de enfermedades en cacao y café en Tingo María. Informe de Consultoría (Proyecto AD/PER/86/459, OSP/PNUD) (não publicado), 1989.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.03. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1028p, 1988.

SERENO, M.L. **Estimación de la diversidad genética de poblaciones silvestres de *Theobroma cacao* L. amazônico brasileiro, mediante microssatélites**. 2001. 70p. Tese de Mestrado – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

SERENO, M.L.; FIGUEIRA, A.V.O.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOVSKY, R. Avaliação da diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L) silvestres da Amazônia brasileira. IN: **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro, Bahia. Anais-CD, 2003.

SILVA, F.C.O.; NETO, E.F.; KODAMA, K.R.; FIGUEIRA, A. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa, através de marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, 21: 205 (supplement), 1998.

TREVISAN, S.D.P. Mudanças no Sul da Bahia associadas à vassoura-de-bruxa do cacau. In: **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producer's Alliance. Salvador, Bahia, Actas. Lagos. p.1109-1116,1996.

4. CAPÍTULO 2

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE CACAUEIROS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA FORMAÇÃO DE UMA COLEÇÃO NÚCLEO²

VALÉRIA R. L. de M. PAIM ⁽¹⁾; EDNA DORA M. N. LUZ ⁽²⁾; JOSÉ LUÍS PIRES ⁽³⁾;
KARINA P. GRAMACHO ⁽²⁾; JORGE T. SOUZA ⁽³⁾; LINDOLFO P. SANTOS FILHO
⁽⁴⁾; PAULO S. B. ALBUQUERQUE ⁽⁵⁾

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45.650-000, BA; ²SEFIT, ³SEGEN, ⁴SESOE, Centro de Pesquisas do Cacau, CEPLAC/CEPEC, Cx. Postal 07, 45600-970, Itabuna, BA; ⁵CEPLAC/SUPOR/ERJOH, Cx. Postal 46, CEP 67105-970, Belém, PA. e-mail: mellopaim@ig.com.br

(Artigo a ser submetido à Revista Crop Science)

²Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2005)

RESUMO

Objetivando-se a formação de uma coleção núcleo com ênfase na resistência à vassoura-de-bruxa, realizou-se inicialmente a seleção de 75 plantas CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) pertencentes a 31 progênies avaliadas por seis anos em condição de campo na Bahia. Para o estudo da diversidade os genótipos foram selecionados com base em um fator de resistência definido neste estudo que levou em consideração a resistência à vassoura-de-bruxa e a produtividade. Os onze *primers* microssatélites usados mostraram alta diversidade dos genótipos provenientes do estado do Amazonas quando comparados àqueles coletados no Acre e em Rondônia. As bacias dos rios Japurá e Jamarí foram as que apresentaram menor diversidade genética enquanto as demais bacias estudadas englobaram ampla diversidade, sendo esta maior que a dos 15 genótipos utilizados como referência de diversidade. A heterozigose dos genótipos CAB variou de 0 a 72,7%, evidenciando a utilidade destes genótipos na associação de genes para a resistência à vassoura-de-bruxa e produtividade. A escolha dos melhores genótipos para composição da coleção núcleo foi feita de maneira a considerar resistência e diversidade. Trinta e três genótipos foram selecionados, 13 dos quais não apresentaram vassouras vegetativas durante os seis anos de avaliação no campo. Destaca-se a importância da diversidade dos genótipos provenientes da Amazônia Brasileira para o melhoramento genético do cacauero. Tendo em vista a ampla diversidade genética observada em reduzido número de acessos estudados enfatiza-se a necessidade de coletas adicionais na região.

Palavras-chave: Cacau da Amazônia Brasileira, *Theobroma cacao*, melhoramento genético, resistência, *Crinipellis pernicioso*, produtividade.

ABSTRACT

Studies on the genetic diversity of CAB genotypes to compose a cacao core collection

With the objective of composing a cacao core collection with emphasis on witches' broom resistance, 75 CAB (cacao from the Brazilian Amazon) genotypes were selected on the basis of a resistance factor (FR) defined in this study. These genotypes belong to 32 progenies which were evaluated for six years under field conditions in Bahia State and the FR was calculated taking into account the level of resistance to witches' broom and productivity. Eleven microsatellite primers revealed the high level of genetic diversity of the genotypes from the Amazonas State, as compared to the ones from Acre and Rondônia States. Genotypes from Japurá and Jamari river basins showed the lowest level of genetic diversity when compared to the ones obtained in the other river basins. The level of diversity among the CAB genotypes was higher than the one obtained for 15 genotypes used as diversity standards. The heterozygosis of the CAB genotypes ranged from 0 to 72.7%, making evident the utility of these genotypes in the association of genes for resistance and productivity. The composition of the core collection was done by considering the resistance and diversity levels. Among the 33 genotypes selected to compose the core collection, 13 did not show any vegetative broom during the six years of field evaluation. In this work, it was made evident the importance of the diversity observed among the CAB genotypes in the cacao breeding programs. Because of the high level of diversity detected in a low number of accessions, new collection expeditions will be of extreme importance to gain more knowledge on the whole diversity harbored by the Brazilian Amazon.

Keywords: Cacao from the Brazilian Amazon, *Theobroma cacao*, breeding, resistance, *Crinipellis pernicioso*, productivity.

4.1 INTRODUÇÃO

A importância dos recursos genéticos naturais da Amazônia Brasileira é reconhecida mundialmente. Sua riqueza em espécies vegetais inclui o cacauero (*Theobroma cacao* L.) que lá vegeta espontaneamente em pequenas populações naturais ao lado de outras plantas arbustivas ou árvores frondosas, principalmente margeando os grandes rios e seus afluentes. A Amazônia Brasileira concentra indubitavelmente a maior reserva de variabilidade genética do cacauero, conforme comprovado através de estudos morfológicos dos genótipos coletados (BARRIGA et al., 1985; ALMEIDA et al., 1987, BARTLEY et al., 1988; ALMEIDA & DIAS, 2001), de componentes da produção (DIAS et al., 2002; 2003), de marcadores RAPD (SILVA et al., 1998) e de microssatélites (SERENO, 2001; SERENO et al., 2003; MOTA, 2003).

Parte desta diversidade natural está sendo preservada na Estação de Recursos Genéticos do Cacau José Haroldo (ERJOH) mantida pela CEPLAC em Marituba-PA e necessita ser melhor explorada e conhecida para que tenha um uso mais racional no melhoramento genético do cacauero realizado tanto na Bahia, como no Pará e em Rondônia. Com a chegada da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer) na Bahia tornou-se maior ainda a necessidade de buscar fontes de resistência no material mantido no Banco de Germoplasma da CEPLAC no Pará. Partindo-se da premissa de que se patógeno e hospedeiro dividem o mesmo nicho ecológico sem que o hospedeiro tenha sido destruído, deve haver no material genético do cacauero que lá vegeta, genes para resistência ao patógeno.

Quarenta progênies de clones da Série CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) foram enviadas de Belém e testadas quanto à resistência à vassoura-de-bruxa através de inoculações artificiais em casa-de-vegetação (LUZ et al., 2000). As plantas que não apresentaram sintomas da doença foram levadas ao campo e plantadas sob cacaueros altamente infectados que serviram como fonte de inóculo (LUZ et al., 2000). Após seis anos de avaliação no campo, para infecção natural, o comportamento dessas progênies foi analisado e contrastado ao da progênie de Scavina 6 usada como padrão, por ser a base da resistência dos genótipos até o momento distribuídos na Bahia. Observou-se algumas

progênies com comportamento superior ao da progênie Scavina 6 e com genes de resistência diferentes (capítulo 1).

No presente trabalho, objetivou-se analisar a diversidade genética por meio de marcadores microssatélites de 75 genótipos elite selecionados de 31 dessas progênies CAB por apresentarem resistência à vassoura-de-bruxa na Bahia. Com este material CAB selecionado, objetiva-se estruturar uma coleção núcleo com ampla diversidade genética e resistência a *Crinipellis perniciososa*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Seleção do material genético

Um total de 982 descendentes de 40 acessos provenientes da ERJOH em Marituba-PA foram avaliados individualmente na ESARM, BA, durante o período de 1999 a 2003, para as seguintes variáveis: número de meses livre de sintomas de vassoura-de-bruxa, número de meses com sintomas de vassoura-de-bruxa, número de vassouras vegetativas, número total de frutos, número de frutos sadios e com vassoura-de-bruxa. Esses acessos foram coletados em dez bacias hidrográficas da Amazônia Brasileira, nos estados do Amazonas, Acre e Rondônia (Tabela 1 e Figura 1, capítulo 1).

Com base nas variáveis mencionadas acima definiram-se as características positivas (número total de meses livre de sintomas de vassoura-de-bruxa, total de frutos e número de frutos sadios) e as negativas (número de vassouras vegetativas, número de meses com sintomas de vassoura-de-bruxa e número de frutos com vassoura-de-bruxa). Selecionaram-se as progênies que apresentaram as menores médias das características negativas e as maiores das positivas. Trezentos e quatro plantas pertencentes a 31 progênies foram pré-selecionadas.

Posteriormente, com o objetivo de se obter uma representação da diversidade genética entre os genótipos CAB, associando resistência à vassoura-de-bruxa e produção, realizou-se uma nova seleção onde os genótipos CAB elite para resistência à vassoura-de-bruxa foram selecionados com base em um fator de resistência (FR) definido neste estudo conforme:

FR = (IS + IFS) – (INV + IFVB), onde:

IS = razão entre o total de meses sem apresentar a doença e o número máximo de meses de observação;

INV = a razão entre o número total de vassouras e o valor máximo observado de vassouras;

IFS = a razão entre o número total de frutos sadios e o valor máximo observado de frutos sadios;

IFVB = razão entre o número total de frutos com vassoura-de-bruxa e o valor máximo observado de frutos com vassoura-de-bruxa.

Para a seleção dos genótipos utilizados no estudo de diversidade genética, atribuiu-se igual peso às variáveis usadas na obtenção do fator de resistência, devido ao interesse não somente de selecionar plantas resistentes, mas também produtivas. Dessa forma, escolheu-se os genótipos que apresentaram os maiores FR dentro de cada progênie.

Quinze genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma do CEPEC, representantes dos grupos Trinitários, Criollo, Alto Amazônico e Baixo Amazônico, foram incluídos na análise de diversidade como padrões para fins de comparação (Tabela 2).

Tabela 1. Genótipos de Cacau da Amazônia Brasileira utilizados neste estudo

Estado/País	Bacia Hidrográfica	Genótipo/Plantas*
Amazonas/Brasil	Japurá/Solimões	CAB 265/15; CAB 269/26 e 27; CAB 526/33;
	Japurá	CAB 486/6, 21 e 27;

	Acre	CAB 160/16 e 35;
	Solimões/Amazonas	CAB 271/3 e 18; CAB 272/11; CAB 273/12; CAB 274/9, 10 e 18; CAB 327/4 e 16; CAB 328/1, 21 e 30; CAB 329/24, 28 e 29; CAB 533619/ 2, 27 e 33;
	Solimões	CAB 334/13, 15, 21 e 23;
	Içá	CAB 364/26, 32 e 35;
	Itaquiá	CAB 356/1, 3, 4, 14, 28, 24 e 25;
	Purus	CAB 194/ 3; CAB 195/19 e 33
Acre/Brasil	Acre	CAB 145/9 e 29; CAB 148/3 e 8; CAB 153/16, 17, 31a, 31b, 32 e 36; CAB 154/34; CAB 156/33;
	Caeté/Iaco	CAB 64/11; CAB 67/24; CAB 69/28
Rondônia/Brasil	Jamarí	CAB 219/2, 29 e 30; CAB 221/10, 27, 28, 30, 31; CAB 233/2, 14, 24; CAB 383/27; 388/12 e 29

* Número da planta pertencente a determinada progênie, nos ensaios de campo.

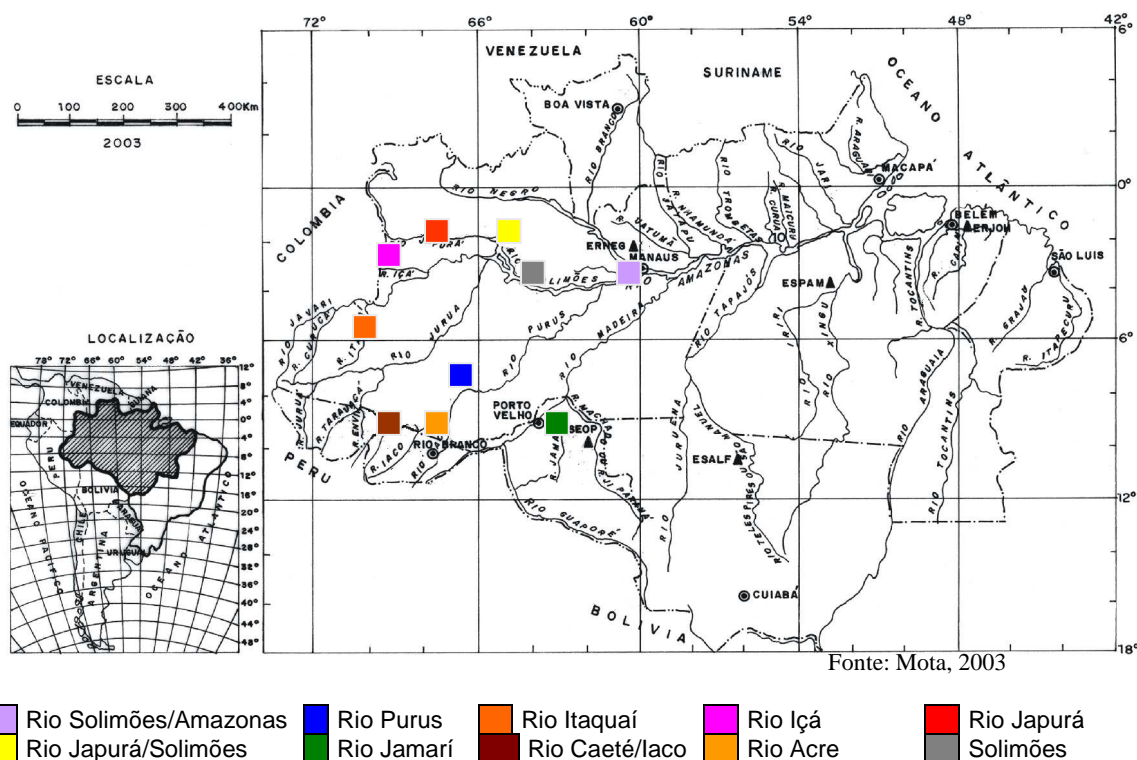


Figura 1. Localização geográfica das bacias hidrográficas de onde foram coletados os progenitores das progênies analisadas.

Tabela 2. Genótipos usados neste estudo como referencial da diversidade da espécie

Genótipos	Número da	Tipos
-----------	-----------	-------

Planta		
EB Rosa Maria	1	Variedade nacional do Equador
CCN 10	3	Híbrido com Trinitário
ICS 32	9	Trinitário
SCA 6	3	Alto Amazônico
COCA 3370	1	Alto Amazônico
C. Sul 3	4	Alto Amazônico
LCTEEN 37	4	Alto Amazônico
MO 20	2	Alto Amazônico
Pound 04B	2	Alto Amazônico
RB 39	4	Alto Amazônico
GU 171c	1	Baixo Amazônico
MA 16	1	Baixo Amazônico
SIC 19	2	Baixo Amazônico
Pentagona	1	Criollo
Playa Alta 4	10	Criollo

4.2.2. Coleta de material e extração do DNA

Coletou-se de cada planta três folhas em estágio intermediário de maturação. As folhas foram cortadas em discos de aproximadamente 3 cm de diâmetro, e lavados com água destilada estéril. Cada amostra (planta) foi constituída por 10 discos, os quais foram liofilizados por 24 horas para posterior extração de DNA. Para a extração de DNA, realizou-se uma repetição de cada amostra, na qual, em cada tubo eppendorf de 2,0 mL, foram colocados cinco discos liofilizados e macerados na presença de nitrogênio líquido.

O DNA foi extraído segundo o método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), otimizado por Faleiro et al. (2002). Após a extração, objetivando verificar a integridade e pureza do DNA, retirou-se de cada amostra 5 µL do DNA concentrado e adicionou-se 3 µL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e sacarose (40%). Estas misturas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.2.3. Seleção dos primers microssatélites polimórficos

Os *primers* foram pré-selecionados a partir dos resultados de polimorfismo obtidos por Mota (2003). Para a seleção final dos *primers* microssatélites, realizou-se as reações de PCR (*Polymerase chain reaction*) com amostras de DNA escolhidas de forma aleatória. As seqüências dos *primers* microssatélites foram isoladas e caracterizadas por Lanaud et al. (1999). O resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose 3%. Onze *primers* foram selecionados em função da sua resolução e polimorfismo (Tabela 3).

Tabela 3. *Primers* utilizados neste estudo para a amplificação dos microssatélites e estudo da diversidade dos genótipos

Nome do Marcador	Sequência de bases (5'-3')	Ta (°C)	Bases Repetidas	Fragmento amplificado (bp)	Fluorescência
mTcCIR10	F ACA GAT GGC CTA CAC ACT R CAA GCA AGC CTC ATA CTC	46	(TG) ₁₃	208	FAM
mTcCIR18	F GAT AGC TAA GGG GAT TGA R GGT AAT TCA ATC ATT TGA GGA TA	51	(GA) ₁₂	345	VIC
mTcCIR24	F TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA R TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA	46	(AG) ₁₃	198	VIC
mTcCIR30	F TGA AGA TCC TAC TGT TGA G R TGA TAA TAA CTG CTT AGT GG	46	(CA) ₁₁	182	NED
mTcCIR33	F TGG GTT GAA GAT TTG GT R CAA CAA TGA AAA TAG GCA	51	(TG) ₁₁	285	NED
mTcCIR35	F TTT CCT TGT ATT GAC CTA R ATA TAA ACA CAC TTC AGA GAT	46	(GT) ₁₁	235	FAM
mTcCIR40	F AAT CCG ACA GTC TTT AAT C R CCT AGG CCA GAG AAT TGA	51	(AC) ₁₅	286	FAM
mTcCIR43	F TCA TGA GAA TGC ATG TG R CTG GAC ATG AAG AAG TTA T	46	(TG) ₅ (TA)(GA) ₁₅	206	NED
mTcCIR44	F CCC ATC AAA AGT ATT AGA AG R ATC AAG CAA TGG TCA AC	51	(GT) ₁₀	178	VIC
mTcCIR54	F AAC CTC TTG TCA CTG TA R GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT	46	(CA) ₁₅	165	FAM
mTcCIR60	F CGC TAC TAA CAA ACA TCA AA R AGA GCA ACC ATC ACT AAT CA	51	(CT) ₇ (CA) ₂₀	207	NED

Ta: temperatura de anelamento;

F: Forward;

R: Reverse

4.2.4. Reações com os *primers* microssatélites

As reações com os *primers* microssatélites foram realizadas em um volume total de 17 µL, contendo Tris-HCl pH 8 10 mol L⁻¹, KCl 50 mol L⁻¹

¹, MgCl₂ 2,4 mol L⁻¹ dNTP 0,15 mol L⁻¹ (Promega), 2 µM de cada um dos pares de *primers* (*Forward* e *Reverse*) específico para cada microssatélite, uma unidade da enzima *Taq* polimerase (Promega) e 30 ng de DNA.

As amplificações foram feitas utilizando o seguinte programa: denaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, 10 ciclos de denaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento de *primer* a 55 °C por 1 minuto, diminuindo 1 °C a cada ciclo, alongamento a 72 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 45 °C por 1 minuto, alongamento a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 4 minutos, sendo que após a amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4 °C.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 4,75% em um seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Os pares de *primers* selecionados foram agrupados em três triplex e um duplex, de acordo com a fluorescência: amarela (NED), verde (VIC) e azul (FAM) para a separação no sequenciador. Os produtos de PCR foram diluídos nas seguintes razões: para os *primers* marcados com as fluorescências FAM e VIC, 1:10 e para o *primer* marcado com NED 1:5. Utilizou-se para cada amostra 2,0 µL dos produtos de PCR amplificados pelos *primers* marcados com FAM e VIC; 4,0 µL do produto de PCR obtido com o *primer* NED; 52 µL de Água Milli-Q. O duplex foi obtido através das mesmas diluições realizadas para os triplex, utilizando-se 2,0 µL do produto de PCR composto pelo *primer* FAM e 4,0 µL do produto de PCR composto pelo *primer* NED mais 34 µL de Água Milli-Q. A análise dos fragmentos foi feita com os programas Genescan e Genotyper (Applied Biosystems). Calculou-se o tamanho de cada fragmento amplificado em número de pares de bases com base no marcador GeneScan 500 – ROX Size Standard (Applied Biosystems).

4.2.5. Análise dos dados moleculares

Os marcadores microssatélites foram transformados em matriz numérica, a partir da qual foram calculadas as distâncias genéticas entre os genótipos estudados.

As distâncias genéticas foram calculadas pelo seguinte procedimento:

$$DG_{ij} = 1 - [(\sum_k PLC_{ijk})/NTL_{ij}];$$

sendo:

DG_{ij} = distância genética entre o acessos i e j;

PLC_{ijk} = proporção de alelos coincidentes de cada loco analisado (k), com os valores: 1 para 2 alelos coincidentes (em homozigose ou heterozigose); 0,5 para um alelo coincidente e zero para nenhum, dos genótipos i e j.

NTL_{ij} = número total de locos sem dados perdidos em i ou j.

Definida a matriz de distâncias, o espaço multidimensional foi reduzido a tridimensional pelo método 'Multidimensional Scaling' – MDS SAS (SAS INSTITUTE, 1988) e este apresentado em representação gráfica, obtida por SAS G3D (SAS INSTITUTE, 1988).

Estimou-se a relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

Foi analisada a formação de agrupamentos por CLUSTER, modelo centróide (SAS INSTITUTE, 1988), sendo a coleção núcleo resultante da seleção dos genótipos com menores médias de vassouras nos anos 1999-2004, dentro de cada agrupamento.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo da diversidade, foram selecionados 75 genótipos elite pertencentes a 31 progênies da série CAB com base no fator de resistência (FR). O FR calculado para as 304 plantas pré-selecionadas através das médias de resistência e produção variou de 1,69 a - 0,75 enquanto que para os 75 genótipos elite selecionados esta variação foi de 1,69 para a planta número 1 da progênie CAB 356 e 0,32 para a planta número 33 da progênie CAB 526 (Tabela 4). O FR definido neste estudo considerou variáveis que refletem tanto a resistência quanto a produtividade da planta, permitindo uma adequada seleção dos genótipos.

Os onze *primers* microsatélites utilizados no presente trabalho permitiram a identificação de um elevado número de alelos por loco, sendo todos os *primers* polimórficos. Para as progênies CAB observou-se uma variação de quatro a treze alelos por loco, atingindo média de 8,2 alelos/loco. Considerando-se os 90

genótipos (75 CABs mais os 15 referenciais), a média de alelos/loco foi 8,7 e um total de 96 alelos foram detectados, seis dos quais identificados apenas entre os 15 genótipos utilizados como referência para diversidade. O tamanho dos alelos variou de 143 bp a 347 bp para os genótipos estudados (Tabela 5).

O alto número de alelos/loco identificado neste trabalho foi devido provavelmente a dois fatores principais, a diversidade do material estudado e a pré-seleção de *primers* polimórficos para a análise. Entretanto, o número médio de alelos/loco obtido neste trabalho foi similar ao observado por Mota (2003), que trabalhou com outros genótipos CAB.

Tabela 4. Valores do fator de resistência e das demais variáveis usadas no cálculo deste fator para cada um dos 75 genótipos elites utilizados neste estudo

Nome	Nº da Planta	Sadia ^a	Doente ^b	NVAS ^c	FS ^d	FVB ^e	IS ^f	INV ^g	IFS ^h	IFVB ⁱ	FR ^j
CAB 356	1	46	0	0	44	1	1,00	0,00	0,72	0,03	1,69
CAB 221	30	45	1	1	47	2	0,98	0,02	0,77	0,05	1,68
CAB 233	14	37	9	14	61	0	0,80	0,26	1,00	0,00	1,54
CAB 334	15	46	0	0	33	1	1,00	0,00	0,54	0,03	1,51
CAB 153	16	46	0	0	27	1	1,00	0,00	0,44	0,03	1,42
CAB 221	31	46	0	0	25	1	1,00	0,00	0,41	0,03	1,38
CAB 334	21	46	0	0	27	3	1,00	0,00	0,44	0,08	1,36
CAB364	32	44	2	2	27	0	0,96	0,04	0,44	0,00	1,36
CAB 334	13	43	3	3	37	5	0,93	0,06	0,61	0,13	1,35
CAB 153	17	57	0	0	24	3	1,00	0,00	0,39	0,08	1,31
CAB 153	36	46	0	0	18	0	1,00	0,00	0,30	0,00	1,30
CAB 274	18	56	0	0	21	2	1,00	0,00	0,34	0,05	1,29
CAB 356	4	40	6	9	37	2	0,87	0,17	0,61	0,05	1,25
CAB 486	6	44	2	2	20	0	0,96	0,04	0,33	0,00	1,25
CAB 154	34	49	8	8	37	3	0,86	0,15	0,61	0,08	1,24
CAB 533619	33	54	3	1	29	7	0,95	0,02	0,48	0,18	1,22
CAB 334	23	46	0	0	16	2	1,00	0,00	0,26	0,05	1,21
CAB 221	27	46	0	0	22	6	1,00	0,00	0,36	0,16	1,20
CAB 221	10	46	0	0	10	0	1,00	0,00	0,16	0,00	1,16
CAB 221	28	46	0	0	10	0	1,00	0,00	0,16	0,00	1,16
CAB 356	24	42	4	3	31	8	0,91	0,06	0,51	0,21	1,15
CAB 145	29	50	7	7	36	7	0,88	0,13	0,59	0,18	1,15
CAB 329	28	43	3	2	17	1	0,93	0,04	0,28	0,03	1,15
CAB 388	29	46	0	0	15	4	1,00	0,00	0,25	0,11	1,14
CAB 156	33	57	0	0	10	1	1,00	0,00	0,16	0,03	1,14
CAB 486	21	44	2	3	24	6	0,96	0,06	0,39	0,16	1,14
CAB 219	2	41	5	7	30	5	0,89	0,13	0,49	0,13	1,12
CAB364	35	46	0	0	12	3	1,00	0,00	0,20	0,08	1,12
CAB 328	30	46	0	0	6	0	1,00	0,00	0,10	0,00	1,10
CAB 153	32	54	3	0	9	0	0,95	0,00	0,15	0,00	1,09
CAB 329	2	45	1	1	13	3	0,98	0,02	0,21	0,08	1,09
CAB 160	35	45	1	1	11	2	0,98	0,02	0,18	0,05	1,09
CAB364	26	45	1	1	19	7	0,98	0,02	0,31	0,18	1,09
CAB 356	14	41	5	5	32	9	0,89	0,09	0,52	0,24	1,08
CAB 219	30	46	0	0	8	2	1,00	0,00	0,13	0,05	1,08

CAB 233	24	42	4	4	19	3	0,91	0,08	0,31	0,08	1,07
CAB 356	25	42	4	4	19	3	0,91	0,08	0,31	0,08	1,07
CAB 153	31b	45	1	1	13	4	0,98	0,02	0,21	0,11	1,07
CAB 233	2	46	0	0	6	1	1,00	0,00	0,10	0,03	1,07

Continua ...

Tabela 4. Continuação

Nome	Nº da Planta	Sadia ^a	Doente ^b	NVAS ^c	FS ^d	FVB ^e	IS ^f	INV ^g	IFS ^h	IFVB ⁱ	FR ^j
CAB 388	12	46	0	0	5	1	1,00	0,00	0,08	0,03	1,06
CAB 153	31a	57	0	0	3	0	1,00	0,00	0,05	0,00	1,05
CAB 383	27	46	0	0	3	0	1,00	0,00	0,05	0,00	1,05
CAB 486	27	40	6	3	16	1	0,87	0,06	0,26	0,03	1,05
CAB 329	29	45	1	1	7	1	0,98	0,02	0,11	0,03	1,05
CAB 195	33	56	0	0	6	2	1,00	0,00	0,10	0,05	1,05
CAB 274	9	54	2	2	12	3	0,96	0,04	0,20	0,08	1,04
CAB 533619	27	55	2	2	15	5	0,96	0,04	0,25	0,13	1,04
CAB 160	16	45	1	1	13	5	0,98	0,02	0,21	0,13	1,04
CAB 356	3	38	8	10	26	1	0,83	0,19	0,43	0,03	1,04
CAB 328	1	46	0	0	2	0	1,00	0,00	0,03	0,00	1,03
CAB 195	19	52	4	4	17	4	0,93	0,08	0,28	0,11	1,03
CAB 269	26	52	4	1	7	0	0,93	0,02	0,11	0,00	1,02
CAB 269	27	56	0	0	3	1	1,00	0,00	0,05	0,03	1,02
CAB 533619	12	50	7	4	23	6	0,88	0,08	0,38	0,16	1,02
CAB 388	1	46	0	0	1	0	1,00	0,00	0,02	0,00	1,02
CAB 329	24	46	0	0	1	0	1,00	0,00	0,02	0,00	1,02
CAB 219	29	42	4	4	12	1	0,91	0,08	0,20	0,03	1,01
CAB 271	3	56	0	0	2	1	1,00	0,00	0,03	0,03	1,01
CAB 271	18	56	0	0	10	6	1,00	0,00	0,16	0,16	1,01
CAB 145	9	53	4	4	15	4	0,93	0,08	0,25	0,11	0,99
CAB 356	28	46	0	0	1	1	1,00	0,00	0,02	0,03	0,99
CAB 274	10	55	1	2	2	0	0,98	0,04	0,03	0,00	0,98
CAB 194	3	50	6	1	6	0	0,89	0,02	0,10	0,00	0,97
CAB 328	21	41	5	1	9	2	0,89	0,02	0,15	0,05	0,97
CAB 148	3	52	5	1	9	3	0,91	0,02	0,15	0,08	0,96
CAB 273	12	50	6	1	5	0	0,89	0,02	0,08	0,00	0,96
CAB 327	16	45	1	1	3	2	0,98	0,02	0,05	0,05	0,96
CAB 148	8	54	3	3	3	0	0,95	0,06	0,05	0,00	0,94
CAB 272	11	52	4	6	5	0	0,93	0,11	0,08	0,00	0,90
CAB 327	4	45	1	2	6	6	0,98	0,04	0,10	0,16	0,88
CAB 69	28	45	11	3	19	8	0,80	0,06	0,31	0,21	0,85
CAB 64	11	55	1	1	9	11	0,98	0,02	0,15	0,29	0,82
CAB 67	24	54	2	5	0	2	0,96	0,09	0,00	0,05	0,82
CAB 265	15	39	17	10	24	6	0,70	0,19	0,39	0,16	0,74
CAB 526	33	38	19	16	20	14	0,67	0,30	0,33	0,37	0,32

^a Número de meses que a planta ficou livre de sintomas da vassoura-de-bruxa;

^b Número de meses que a planta apresentou sintomas da vassoura-de-bruxa;

^c Número de vassouras vegetativas;

^d Frutos livres de sintomas de vassoura-de-bruxa;

^e Frutos com sintomas de vassoura-de-bruxa;

^f Razão entre o total de meses sem apresentar a doença e o número total de meses de observação na área;

^g Razão entre o número total de vassouras vegetativas e o valor máximo observado de vassouras vegetativas;

^h Razão entre o número total de frutos livres de sintomas de vassoura-de-bruxa e o valor máximo observado de frutos sadios;

ⁱ Razão entre o número total de frutos com vassoura-de-bruxa e o valor máximo observado de frutos doentes;

^j FR= (is+ifs) - (Inv + Ifvb)

Tabela 5. Alelos identificados na amplificação de onze microssatélites observados em 90 genótipos de cacauero

Loco	Fragmento clonado (pb)**	Alelos identificados	Número de Alelos/Loco
mTcCIR 10	208	202 204 206 208 210 212	6
mTcCIR 18	345	331 333 335 337 343 345 347	7
mTcCIR 24	198	186 188 194 196 198 200 *202	8
		*204	
mTcCIR 30	182	174 176 *180 182 184 186	6
mTcCIR 33	285	261 263 265 271 273 275 279 281	16
		*283 285 289 291 *296 *297 301	
		307	
mTcCIR 35	235	223 229 231 233 239 237	6
mTcCIR 40	286	258 260 262 264 268 270 276 274	13
		278 280 282 284 286	
mTcCIR 43	206	198 200 202 204 206 208 210 212	12
		214 216 218 220	
mTcCIR 44	178	166 168 170 180	4
mTcCIR 54	165	143 145 147 151 153 155 157 159	9
		165	
mTcCIR 60	207	189 191 193 195 197 205 211 213	9
		215	

* Alelos identificados exclusivamente entre os 15 genótipos referenciais de diversidade.

** Tamanho (pb) do fragmento amplificado por Lanaud et al., 1999.

A heterozigose observada variou de 0% na planta 33 da progênie CAB 526 a 72,7% na planta 29 da progênie CAB 329, e entre os genótipos referência, de 20,0% na planta 1 do acesso EB Rosa Maria a 81,8% nas plantas 2 do acesso Pound 04B e 4 do acesso RB 39 (Tabelas 6 e 7). A heterozigose das progênies estudadas apresentou uma variação adequada para o emprego em programas de melhoramento. Observaram-se desde genótipos altamente homozigotos (baixa taxa de heterozigose) até materiais altamente heterozigotos. Os genótipos mais homozigotos são mais adequados para obtenção de híbridos mais uniformes e com maior potencial quanto aos efeitos aditivos (FALEIRO et al, 2001). Em contrapartida, os genótipos amplamente heterozigotos são interessantes quando se deseja produzir progênies visando selecionar indivíduos para algumas características agronômicas de interesse (MOTA, 2003).

Tabela 6. Porcentagem da heterozigose observada em genótipos elite obtidos de progênies de Cacaueiros da Amazônia Brasileira

Progênies/Plantas	Estados	Bacias Hidrográficas	Heterozigose (%)
CAB 526/33	Amazonas	Japurá/Solimões	0,0
CAB 221/10	Rondônia	Jamarí	9,0
CAB 153/17	Acre	Acre	18,1
CAB 327/4	Amazonas	Solimões/Amazonas	18,2
CAB 145/29	Acre	Acre	20,0
CAB 195/19	Amazonas	Purus	20,0
CAB 364/35	Amazonas	Içá	20,0
CAB 156/33	Acre	Acre	25,0
CAB 153/32	Acre	Acre	25,0
CAB 334/23	Amazonas	Solimões	25,0
CAB 148/8	Acre	Acre	27,2
CAB 334/21	Amazonas	Solimões	27,2
CAB 329/2	Amazonas	Solimões/Amazonas	27,2
CAB 338/1	Rondônia	Jamarí	27,2
CAB 383/27	Rondônia	Jamarí	27,2
CAB 69/28	Acre	Caeté/Iaco	27,3
CAB 153/31a	Acre	Acre	30,0
CAB 154/34	Acre	Acre	30,0
CAB 269/26	Amazonas	Japurá/Solimões	30,0
CAB 160/35	Amazonas	Acre	30,0
CAB 364/26	Amazonas	Içá	30,0
CAB 356/28	Amazonas	Itaquai	30,0
CAB 328/30	Amazonas	Solimões/Amazonas	30,0
CAB 328/21	Amazonas	Solimões/Amazonas	30,0
CAB 64/11	Acre	Caeté/Iaco	36,3
CAB 148/3	Acre	Acre	36,3
CAB 272/11	Amazonas	Solimões/Amazonas	36,3
CAB 271/18	Amazonas	Solimões/Amazonas	36,3
CAB 194/3	Amazonas	Purus	36,3
CAB 274/10	Amazonas	Solimões/Amazonas	36,3
CAB 533619/12	Amazonas	Solimões/Amazonas	36,3
CAB 356/24	Amazonas	Itaquai	36,3
CAB 486/21	Amazonas	Japurá	36,3
CAB 233/2	Rondônia	Jamarí	36,3
CAB 233/24	Rondônia	Jamarí	36,3
CAB 388/12	Rondônia	Jamarí	36,3
CAB 533619/27	Amazonas	Solimões/Amazonas	37,5
CAB 153/16	Acre	Acre	40,0

Tabela 6. Continuação ...

Progênes/Plantas	Estados	Bacias Hidrográficas	Heterozigose (%)
CAB 269/27	Amazonas	Japurá/Solimões	40,0
CAB 334/13	Amazonas	Solimões	40,0
CAB 364/32	Amazonas	Içá	40,0
CAB 219/29	Rondônia	Jamarí	40,0
CAB 221/30	Rondônia	Jamarí	40,0
CAB 153/36	Acre	Acre	45,4
CAB 265/15	Amazonas	Japurá/Solimões	45,4
CAB 271/3	Amazonas	Solimões/Amazonas	45,4
CAB 356/1	Amazonas	Itaquai	45,4
CAB 356/4	Amazonas	Itaquai	45,4
CAB 486/27	Amazonas	Japurá	45,4
CAB 486/6	Amazonas	Japurá	45,4
CAB 327/16	Amazonas	Solimões/Amazonas	45,4
CAB 388/27	Rondônia	Jamarí	45,4
CAB 219/2	Rondônia	Jamarí	45,4
CAB 221/28	Rondônia	Jamarí	45,5
CAB 533619/33	Amazonas	Solimões/Amazonas	50,0
CAB 334/15	Amazonas	Solimões	50,0
CAB 160/16	Amazonas	Acre	50,0
CAB 219/30	Rondônia	Jamarí	50,0
CAB 67/24	Acre	Caeté/Iaco	54,5
CAB 145/9	Acre	Acre	54,5
CAB 153/31b	Acre	Acre	54,5
CAB 273/12	Amazonas	Solimões/Amazonas	54,5
CAB 356/3	Amazonas	Itaquai	54,5
CAB 328/1	Amazonas	Solimões/Amazonas	54,5
CAB 233/14	Rondônia	Jamarí	54,5
CAB 221/27	Rondônia	Jamarí	54,5
CAB 221/31	Rondônia	Jamarí	54,5
CAB 195/33	Amazonas	Purus	60,0
CAB 356/25	Amazonas	Itaquai	60,0
CAB 329/28	Amazonas	Solimões/Amazonas	60,0
CAB 329/24	Amazonas	Solimões/Amazonas	60,0
CAB 356/14	Amazonas	Itaquai	63,6
CAB 274/18	Amazonas	Solimões/Amazonas	66,6
CAB 274/9	Amazonas	Solimões/Amazonas	66,6
CAB 329/29	Amazonas	Solimões/Amazonas	72,7

Tabela 7. Porcentagem de heterozigose observada em genótipos utilizados como referência para o estudo de diversidade

Genótipos	Tipos	Heterozigose (%)
EB Rosa Maria/1	Equador	20,0
LCTEN 37/4	Alto Amazônico	27,2
Pentagona/1	Criollo	30,0
MA 16/1	Baixo Amazônico	36,3
C. Sul 3/4	Alto Amazônico	54,5
SCA 6/3	Alto Amazônico	54,5
MO 20/2	Alto Amazônico	54,5
GU 171c/1	Baixo Amazônico	63,6
Playa Alta 4/10	Criollo	63,6
CCN 10/3	Híbrido com Trinitário	70,0
COCA 3370/1	Alto Amazônico	72,7
SIC 19/2	Baixo Amazônico	72,7
ICS 32/9	Trinitário	72,7
Pound 04 B/2	Alto Amazônico	81,8
RB 39/4	Alto Amazônico	81,8

A similaridade entre os genótipos no estado do Amazonas variou de 81% entre as plantas 12 e 33 da progênie CAB 533619 a 0% entre a planta 32 da progênie CAB 153 e a planta 33 da progênie CAB 526, e também, entre a planta 27 da progênie CAB 269 e a planta 1 da progênie CAB 328, assim como, entre a planta 32 da progênie CAB 364 e a planta 33 da progênie CAB 526 (dados não mostrados). No estado do Acre a similaridade variou de 75% entre a planta 29 da progênie CAB 145 e a planta 34 da progênie CAB 154 a 0% entre a planta 11 da progênie CAB 64 e a planta 16 da progênie CAB 153. Enquanto que no estado de Rondônia a similaridade variou de 75% entre as plantas 30 e 31 da progênie CAB 221 a 10% entre a planta 1 da progênie CAB 388 e a planta 27 da progênie CAB 383.

Em relação à distância genética entre os genótipos observou-se em média 69% de diversidade no estado do Amazonas, 68% no estado do Acre e 55% no estado de Rondônia. Portanto, os genótipos do estado de Rondônia apresentaram a menor diversidade, enquanto que aqueles provenientes do estado do Amazonas foram os mais diversos, como observado no gráfico de dispersão dos genótipos de acordo com os estados de origem (Figura 2). A existência de menor diversidade genética entre genótipos coletados no estado de Rondônia também

foi observada por Almeida e Almeida (1987) e por Mota (2003). Em contrapartida, os genótipos coletados nos estados do Amazonas e Acre apresentaram ampla diversidade. Os genótipos CAB mostraram-se bem mais dispersos do que os genótipos utilizados como referência de diversidade da espécie (Figura 2). A maior dispersão nos gráficos corresponde a maior dissimilaridade genética. Como a maioria dos genótipos CAB obtidos nestes estados era Alto Amazônico, está comprovada mais uma vez a grande variabilidade deste material, conforme observado anteriormente (MARITA, 1998; MARITA et al., 2001; PIRES, 2003; SERENO, 2001; SERENO et al., 2003). Curiosamente, algumas progênies apresentaram alta similaridade quando comparadas a outras provenientes de estados diferentes. Por exemplo, a planta 2 da progênie CAB 233 do estado de Rondônia foi similar 82% à planta 6 da progênie CAB 486 do estado do Amazonas, bem como a planta 27 da progênie CAB 486 do estado do Amazonas que apresentou 77% de similaridade com a planta 31 da progênie CAB 153 do Acre e a planta 29 da progênie CAB 145 do estado do Acre similar 70% à planta 24 da progênie CAB 233 proveniente do estado de Rondônia. A ocorrência de genótipos com alta similaridade em diferentes bacias reforça a hipótese de um alto fluxo gênico entre essas regiões, provavelmente facilitado pelos canais que interligam as bacias hidrográficas e certamente intensificada pela ação antrópica (ALMEIDA et al., 1987; ALMEIDA et al., 1995; MOTA, 2003).

Quando se considerou o valor médio da heterozigose dos genótipos CAB em função da localização geográfica, verificou-se que os genótipos selecionados nos estados do Acre e Rondônia, em número de 15 para cada estado, apresentaram respectivamente heterozigose média de 35% e 40,2% respectivamente, enquanto os genótipos do Amazonas, em número de 45, apresentaram heterozigose de 41,6% (Tabela 6).

Em relação à distância genética entre os genótipos em função da bacia hidrográfica de origem, as bacias do Solimões/Amazonas (67%), Caeté/laco (67%) e Acre (66%) apresentaram a maior média de diversidade e a bacia do Japurá/Solimões a menor (48%) (Tabela 8). De fato, os genótipos provenientes das bacias Solimões/Amazonas no estado do Amazonas, Caeté/laco e Acre no estado do Acre apresentaram uma ampla dispersão gráfica (Figura 3). Enquanto que os genótipos provenientes das bacias Japurá/Solimões no estado do

devido a alta diversidade genética dos genótipos estudados. Uma análise considerando apenas os genótipos que não apresentaram vassouras durante os seis anos de avaliação em campo foi realizada, identificando-se 13 genótipos entre os quais verificou-se mais uma vez grande diversidade (Figura 6). Os genótipos selecionados nestas condições foram: CAB 153/17, 31a e 32; CAB 156/33; CAB 219/30; CAB 221/10; CAB 233/2; CAB 271/18; CAB 274/18; CAB 328/1; CAB 334/21; CAB 388/1 e 12.

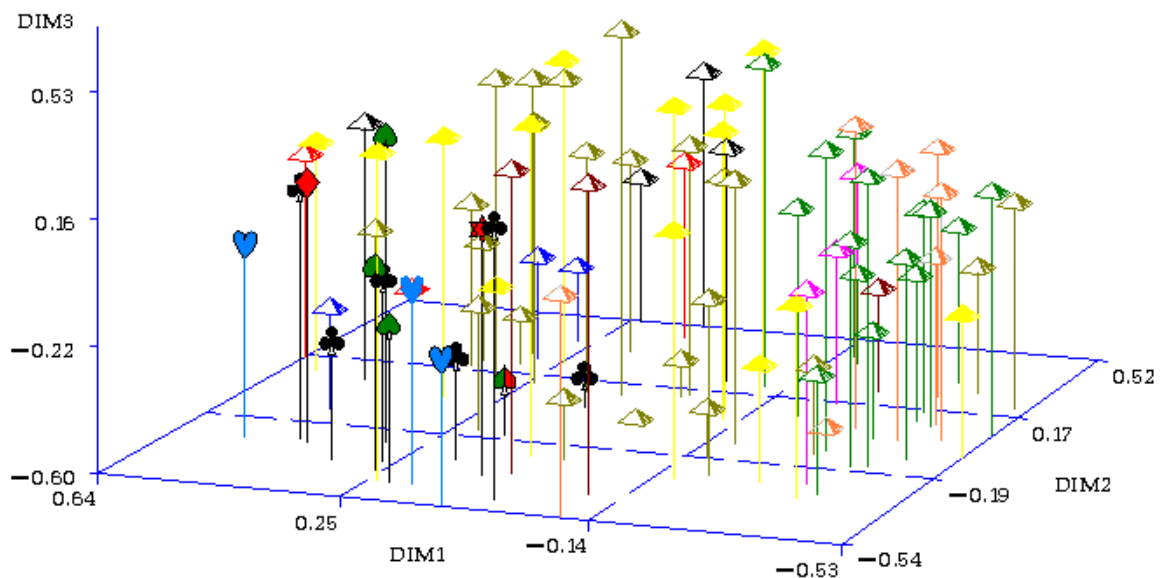


Figura 3. Diversidade genética dos genótipos estudados de acordo com as bacias hidrográficas de origem. Dispersão gráfica dos genótipos CAB distribuídos por bacia hidrográfica de origem em relação aos genótipos utilizados como referência obtida pela redução de dimensões através de escalas multidimensionais (MDS) da matriz de distâncias para marcadores microssatélites com 96 alelos gerados por 11 primers no programa SAS.



Tabela 8. Média da distância genética entre os genótipos de cacaueteiro da Amazônia Brasileira de acordo com a distribuição por bacia de origem

Bacia de origem	Número total genótipo/bacia	Genótipo/planta *	Médias (%)
Acre	14	CAB 156/33; CAB 153/16, 17, 31a,b**, 32, 36; CAB 145/9, 29; CAB 148/3, 8; CAB 160/16,35	63
Caeté/Iaco	03	CAB 67/24; CAB69/28; CAB 64/11	67
Iça	03	CAB 364/26, 32, 35	57
Itaquai	07	CAB 356/1, 3, 4, 14, 28, 24, 25	57
Jamarí	15	CAB 233/2, 14, 24; CAB 219/2, 29, 30; CAB 221/10, 27, 28; CAB 383/27; CAB 388/1, 12, 27	55
Jupará	03	CAB 486/6, 21, 27	58
Jupará/Solimões	04	CAB 265/15; CAB 269/26, 27; CAB 526/33	48
Purus	03	CAB 194/3; CAB 195/19, 33	55
Solimões	04	CAB334/13, 15, 21, 23	52
Solimões/Amazonas	19	CAB 271/3, 18; CAB 272/11; CAB 273/12; CAB 533619/12, 27, 33; CAB 327/4, 16; CAB 328/1, 21, 30; CAB 329/2, 24, 28, 29; CAB 274/9, 10,18	67

* Genótipo/planta = nome da progênie originária do genótipo, seguida do número da planta no experimento de campo;

** Planta a = planta número 31 da progênie CAB 153 no campo 7
 Planta b = planta número 31 da progênie CAB 153 no campo 9

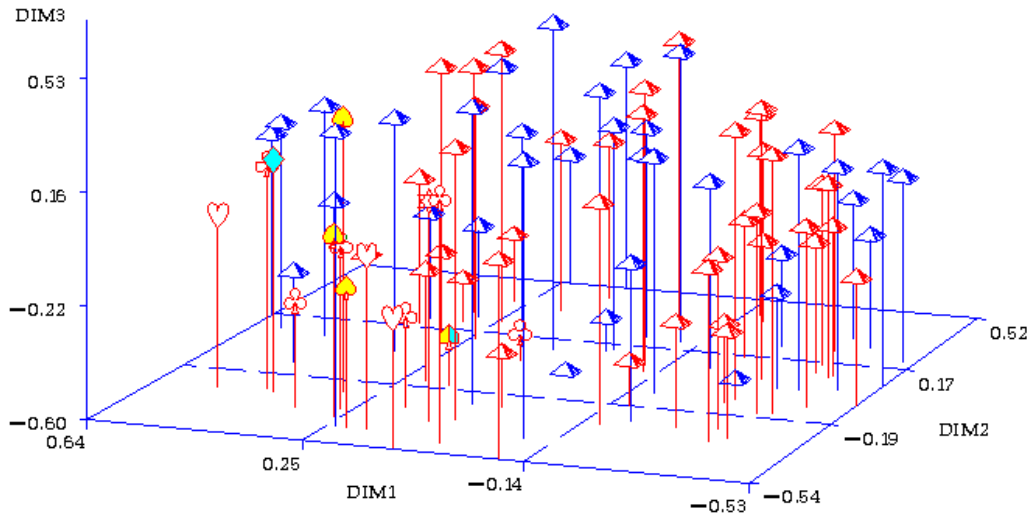


Figura 4. Dispersão multidimensional dos genótipos CAB selecionados, considerando a formação de clusters.

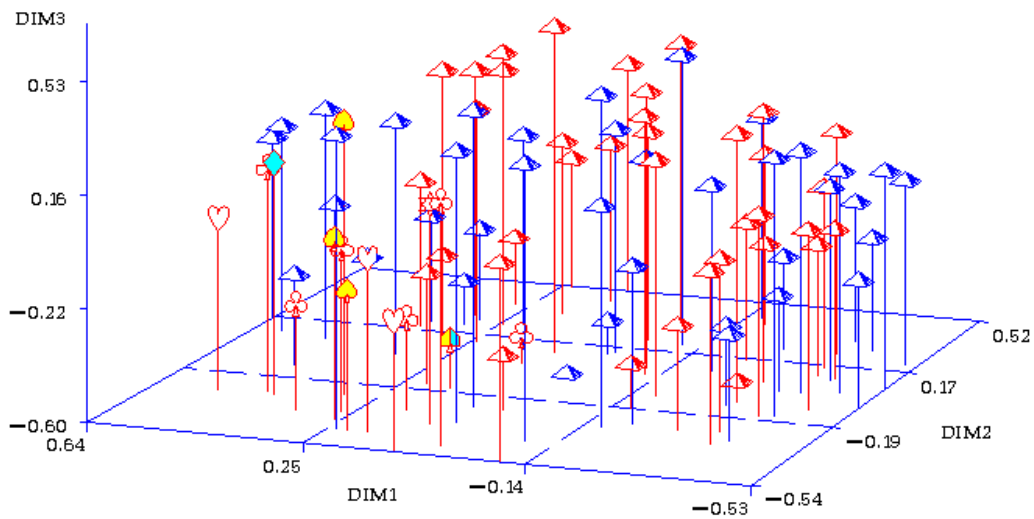
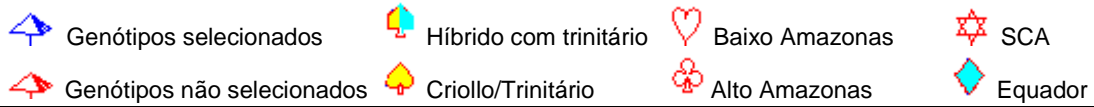
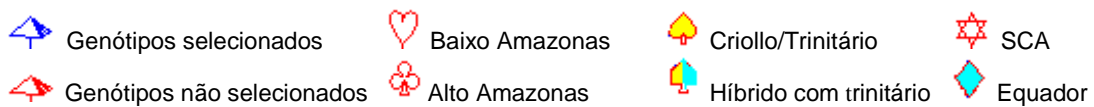


Figura 5. Dispersão multidimensional dos genótipos CAB selecionados sem considerar os clusters.



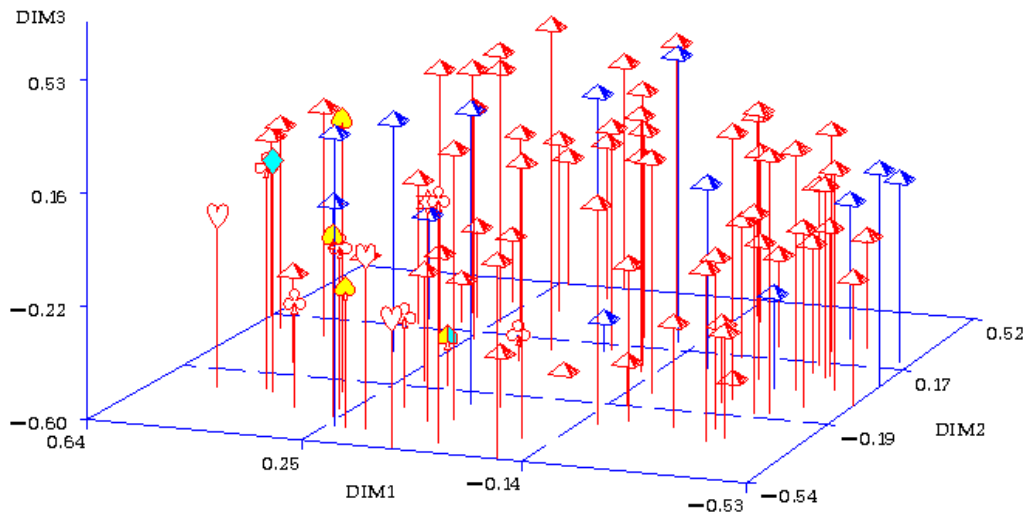
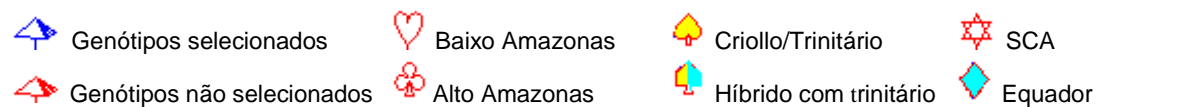


Figura 6. Dispersão gráfica dos genótipos CAB que não apresentaram vassouras vegetativas no período avaliado.



Os resultados obtidos no atual trabalho confirmaram a grande riqueza de diversidade genética presente na Amazônia Brasileira, sendo necessária a realização imediata de novas expedições de coleta, frente ao processo de desmatamento desenfreado que vem ocorrendo, o que pode resultar em uma erosão genética da espécie, onde a diversidade genética pode ser perdida, antes mesmo de ser totalmente conhecida. Até o momento o material coletado nas expedições representa apenas aproximadamente 20% da área total da Amazônia Brasileira.

A coleção núcleo resultante da seleção com base no FR e na diversidade genética compõe-se dos seguintes genótipos: CAB 148/3; CAB 153/17, 31a, 32; CAB 156/33; CAB 160/35; CAB 194/3; CAB 195/33; CAB 219/30; CAB 221/10, 27, 28, 31; CAB 233/2; CAB 269/ 27; CAB 271/3 e 18; CAB 274/9 e 18; CAB 328/1 e 30; CAB 329/2 e 24; CAB 334/21; CAB 356/1 e 28; CAB 364/26, 32 e 35; CAB 383/27; CAB 388/1 e 12; CAB 533619/33. Esta coleção oferece uma base sólida para o programa de melhoramento genético, o qual objetiva a piramidação de

genes que conferem resistência à vassoura-de-bruxa para aumentar a estabilidade e a durabilidade da resistência nos genótipos a serem distribuídos aos produtores.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA, C.M.V.C.; BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; BARTLEY, B.G.D. Evolução do programa de conservação dos recursos genéticos de cacau na Amazônia brasileira. CEPLAC, DEPEA, Belém. **Boletim Técnico** 5. 108p,1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.C. Coleta de cacau Silvestre no Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Theobroma** 17: 65-92, 1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; MACHADO, P.F.R.; BARRIGA, J.P.; SILVA, F.C.O.D. Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia brasileira: uma abordagem histórica e analítica . CEPLAC/ SUPOC, Porto Velho. **Informe Técnico**. 92p, 1995.

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

BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.G. Preservação e utilização dos recursos genéticos de cacau na Amazônia brasileira. In: **Proceedings of the 9th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers´Alliance, London, p. 73-79,1985.

BARTLEY, B.G.D., MACHADO, P.F.R., AHNERT, D., BARRIGA, J.P.; ALMEIDA, C.M.V.C. Descrição de populações de cacau da Amazônia brasileira. I - observações preliminares sobre populações de Alenquer, Pará. In: **Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers´Alliance, London, p. 665-672, 1988.

DIAS, L.A.S.; ALMEIDA, C.M.V.C. Cocoa germplasm: how and how much to collect. **INGENIC Newsletter** 6:8-11, 2002.

DIAS, L.A.S; BARRIGA, J.P; KAGEYAMA, P.Y.; ALMEIDA, C.M.V.C. Variation and its distribution within and between wild cacao populations from Brazilian Amazon. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 46(4), 2003

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13 – 15, 1990.

FALEIRO, F.G; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V. ; FALEIRO, A.S.G; BAHIA, R.C. Heterozigose de acessos de *Theobroma cacao* L. de diferentes origens com base em marcadores microsátélites . In: **Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia. Anais - CD, 2001.

FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.; ANHERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. **Agrotropica** 14 (2): 31 – 34, 2002.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsattellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2141 – 2152, 1999.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; GRAMACHO, K.P., LOPES, U.V., ALBUQUERQUE, P.S.B. Cocoa progenies responses to *Crinipellis perniciososa* under field and controlled environment conditions in Bahia, Brazil. **Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia. p. 537-543, 2000.

MARITA, J.M. **Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD-marker based estimates of genetic distance and recommendations for a core collection to maximize genetic diversity**. 1998. 150p. M. S. Thesis – University of Wisconsin, Wisconsin. 1998.

MARITA, J.M.; NIENHUSIS, J.; PIRES, J.L.; AITKEN, W.M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop Science**, v. 41, p.1305-1316, 2001.

MOTA, J.W.S. **Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao* L. da Amazônia brasileira por microssatélites**. 2003. 87p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacauero com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. 2003. 220p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.03. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1028p, 1988.

SERENO, M.L. **Estimación de la diversidad genética de poblaciones silvestres de *Theobroma cacao* L. amazônico brasileiro, mediante microssatélites**. 2001. 70p. Tese de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

SERENO, M.L.; FIGUEIRA, A.V.O.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCovsky, R. Avaliação da diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L) silvestres da Amazônia brasileira. IN: **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro. Anais-CD, 2003.

SILVA, F.C.O.; NETO, E.F.; KODAMA, K.R. & FIGUEIRA, A. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa, através de marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology** 21: 205 (supplement), 1998.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Foram identificadas progênies de clones coletados na Amazônia brasileira com genes de resistência diferentes dos descendentes de Scavina, fonte tradicional de resistência e base das variedades atualmente distribuídas, o que mostra a possibilidade da piramidação de genes para a ampliação da durabilidade de resistência.

Progênies como as dos CAB 64, 66, 194, 195 e 269 tiveram comportamento superior ao da progênie de Scavina 6 durante os seis anos de avaliação no campo. Englobam, então, genótipos excepcionalmente promissores para o programa de melhoramento genético do cacaueteiro.

Entre os 75 genótipos selecionados com base no fator de resistência e na distribuição geográfica das bacias de coleta encontrou-se ampla diversidade genética, bem maior do que aquela apresentada nos 15 acessos usados como referenciais da diversidade da espécie. Evidenciou-se ampla diversidade genética entre os genótipos provenientes da Amazônia Brasileira.

Entre os três Estados brasileiros onde o material genético foi coletado, a maior diversidade genética foi observada no estado do Amazonas.

Os seguintes genótipos foram selecionados com base na resistência, produtividade e na diversidade genética para compor a coleção núcleo de germoplasma estabelecida por este trabalho: CAB 148/3; CAB 153/17, 31a, 32; CAB 156/33; CAB 160/35; CAB 194/3; CAB 195/33; CAB 219/30; CAB 221/10, 27, 28, 31; CAB 233/2; CAB 269/ 27; CAB 271/3 e 18; CAB 274/9 e 18; CAB 328/1 e 30; CAB 329/2 e 24; CAB 334/21; CAB 356/1 e 28; CAB 364/26, 32 e 35; CAB 383/27; CAB 388/1 e 12; CAB 533619/33.

6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABADIE, T.; CORDEIRO, C.M.T.; FONSECA, J.R.; ALVES, R.B.N.; BURLE, M.L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; CASTRO, E.M.; SILVA, H.T.; FREIRE, M.S.; ZIMMERMANN, F.J.P.; MAGALHÃES, J.R. Construção de uma coleção nuclear de arroz para o Brasil. **Pesquisa Agropecuária brasileira**. Brasília, 40 (2): p.129-136, 2005.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; GOMES, B.E.G. Seleção de genótipos de cacau resistente a *Crinipellis pernicioso*. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1999, Curitiba. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24. p. 261-261, 1999.

ALLARD, R.W. Predictive methods for germplasm identification. In: STALKER, H. T.; MURPHY, J.P. (Eds). **Plant breeding** in the 1990's. Oxon: Wallingford, p.119-146, 1992.

ALMEIDA, L.C. de; ANDEBRHAN, T.; FONSECA, S.E.A. Reação de clones de cacau a *C. pernicioso*. In Belém. CEPLAC/DEPEA. **Informe técnico**, p. 48-50, 1983.

ALMEIDA, L.C.; ANDEBRHAN, T. Reação de clones de cacau a *C. pernicioso*. In Belém. CEPLAC/DEPEA. **Informe Técnico**. 74p. 1984.

ALMEIDA, L.C. de; ANDEBRHAN, T. Patogenicidade de *C. pernicioso* do pólo cacau de Altamira, Pará. In Belém. CEPLAC/DEPEA. **Informe de Pesquisas**, p. 33-34, 1991.

ALMEIDA, C.M.V.C.; BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; BARTLEY, B.G.D. Evolução do programa de conservação dos recursos genéticos de cacau na Amazônia brasileira. CEPLAC, DEPEA, Belém. **Boletim Técnico 5**. 108p, 1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.C. Coleta de cacau Silvestre no Estado de Rondônia, Brasil. **Revista Theobroma** 17: 65-92, 1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; MACHADO, P.F.R.; BARRIGA, J.P.; SILVA, F.C.O.D. Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia brasileira: uma abordagem histórica e analítica . CEPLAC/ SUPOC, Porto Velho. **Informe Técnico**. 92p, 1995.

ALMEIDA, C.M.V.C. Aspectos ecológicos e evolutivos do cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia Brasileira. **Agrotropica**, 8(1): 1-14, 1996.

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

ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFELLER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **Amer. Journal of Bot.** 89:1474-1486, 1999.

ANDEBRHAN, T. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa. Belém: CEPLAC/CEPEC, **Informe Técnico**, p. 314-321, 1982.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. de. Crescimento micelial de *C. pernicioso* oriundo de vários locais da Amazônia Brasileira. *In* Belém. CEPLAC/DEPEA. **Informe Técnico**, p. 42-43, 1984.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. de; NAKAYAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotropica**, 10 (2): 49-60, 1998.

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

BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; ALMEIDA, C.M.V.C.; ALMEIDA, C.F.G. Preservação e utilização dos recursos genéticos de cacau na Amazônia brasileira. *In*: **Proceedings of the 9th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers' Alliance, London, p. 73-79, 1985.

BARTLEY, B.G.D. The status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. *In*: **Conferencia Internacional de Investigación en Cacao**, 6, Caracas. Cocoa Producers' Alliance, Actas, Lagos. p. 57-69, 1977.

BARTLEY, B.G.D., MACHADO, P.F.R., AHNERT, D., BARRIGA, J.P.; ALMEIDA, C.M.V.C. Descrição de populações de cacau da Amazônia brasileira. I - observações preliminares sobre populações de Alenquer, Pará. *In*: **Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers' Alliance, London, p. 665-672, 1988.

BASIGALUP, D.H.; BARNES, D.K.; STUCKER, R.E. Developmente of a core collection for perennial Medicago plant introductions. **Crop Science**, v. 35, p. 1163-1168, 1995.

BEZERRA, J.L.; COSTA, J.C.B.; POMELLA, A.W.V.; ALMEIDA, O.C. Como produzir Tricovab

para controlar a vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 359, 2000.

BROWN, A.H.D. The case for core collection. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O. H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Eds). **The use of plant genetic resources**. Cambridge: University Press, p. 136-156, 1989.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as “in groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical Applied Genetics**, v. 100, p.160 – 166, 2000.

CHEESMAN, E.E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cocoa populations. **Trop. Agric**, 21: 144-159, 1944.

CORDEIRO, C. M.T.; VILELA-MORALES, E.A.; FERREIRA, P.; ROCHA, D.M.S.; COSTA, I.R.S.; VALOIS, A.C.C.; SILVA, S. Towards a Brazilian core collection of cassava. In: HODGKIN, T.; BROWN, A.D.H.; Van HITUM, T.J.L.; VILELA-MORALES, E.A. (Eds). **Core collection of plant genetic resources**. New York: John Wiley, p. 155-167, 1995.

COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; BASTOS, C.N. Ação Antagonista de *Trichoderma stromaticum* sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis perniciosa* no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 366, 2000.

CROSSA, J.; TABA, S.; EBERHART, S.A.; BRETTING, P.; VENCOSKY, R. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 89-95, 1994.

DANTAS NETO, A. **Mapeamento de novos genes de resistência do cacauero à vassoura-de-bruxa e a podridão parda: caracterização quantitativa da população segregante e identificação de marcadores microssatélites**. 2004. 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2004.

DIAS, L.A.S.; BARRIGA, J.P.; KAGEYAMA, P.Y.; ALMEIDA, C.M.V.C. How genetic variation of cacao populations from Brazilian Amazon is distributed? **Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia. p. 183 – 188, 2000.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG. 578 p. 2001.

DUCKE, A. As espécies brasileiras de cacau (gênero *Theobroma* L.) na botânica sistemática e geográfica. **Rodriguesia** 4: 265-276, 1940.

DUCKE, A. As espécies brasileiras do cacau gênero *Theobroma* L. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte** 28: 3-20, 1953.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S.; MONTEIRO, W.R.; CORRÊA, R.X. Diversidade genética de acessos de *Theobroma cacao* L. selecionados por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27 (Supl.), p. S106-S106, 2002.

FALEIRO, F.G.; RESENDE, M.L.; NIELLA, G.R.; CASTRO, H.A.; PEREZ, J.O.; VIANA JUNIOR, C.A.; PIRES, J.L. Resistência horizontal/vertical e agressividade/virulência no patossistema *Theobroma cacao* X *Crinipellis pernicioso*. **Agrotropica**, 14(3):121-126, 2001a.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; GRAMACHO, K.P.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALLE, R.R. Caracterização Molecular de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. Recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC com base em marcadores RAPD, Microssatélites e AFLP. **Agrotropica**, 13(2): 79-86, 2001b.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W. R. ;GRAMACHO, K. P; FALEIRO, A. S. G. ; SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop**

Breeding and Applied Biotechnology 4:227-233, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a. ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220p, 1998.

FIGUEIRA, O.V.O.; CASCARDO, J.C.M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: DIAS, L.A.S. (Eds). **Melhoramento genético do cacauero**. FUNAPE, Viçosa, p.385-437, 2001.

FRIAS, G.A. **An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao**. 1987. 11p. PhD Thesis Gainesville, University of Florida. Plant Pathology Department, 1987.

GARNER, T.W.J. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. **Genome** 45: 212-215. 2002.

GARRIDO, L.R. **Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz (*Oryza sativa*)**. 2001. 193p. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília. 2001.

GRAMACHO, K.P.; PIRES, J.L. ; PEREIRA, N.N. Caracterização molecular de isolados de *Crinipellis pernicioso* de clones de cacauero com diferentes níveis de resistência à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, V. 29 (Supl), p. 218-218, 2004.

GRIFFITH, G.W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F.J.; LEWIS, D.M.; HERGER, J.N. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J.P.; WILLIAMSOM, B. (Eds) **Ecology of Plant Pathogens**. Oxon: CAB Internacional, p. 245-267, 1994.

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

HARKER, N. Collection, reporting and storage of microsatellite data. In: HENRY, R.J. (Eds). **Plant Genotyping: The DNA fingerprinting of plants**. CAB International 17, p. 251-264, 2001

HOLBROOK, C.C.; ANDERSON, W.F.; PITTMAN, R.N. Selection of a core collection from the U. S. germplasm collection of peanut. **Crop Science**, v. 33, p. 859-861, 1993.

KOBAYASHI, R.S.; SANTOS, A.O. da S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F.C.O. da; SCERNE, R.M.C. Caracterização morfológica de frutos e sementes de clones de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) Silvestres da Amazônia Brasileira. Belém, PA, Brasil, CEPLAC/SUPOR. **Boletim Técnico** 19, 58p, 2001.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2141 – 2152, 1999.

LEAL, J.B. **Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. 2004. 50p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2004.

LOCKWOOD, G.A. Comparison of the growth and yield during a 20 year period of amelonado and upper amazon hybrid cocoa in Gana. **Euphytica**. 25:647-58, 1976.

LOPES, U.V.; MONTEIRO, W.R.; MARQUES, J.R.B.; PIRES, J.L.; GRAMACHO, K.P. Avaliação participativa de clones de cacauzeiro em agrossistemas da região cacauzeira da Bahia. **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro. Anais- CD, 2003.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; PINTO, L.R.M.; GRAMACHO, K.P.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; PAIM, M.C.A. Seleção de genótipos de cacau para resistência à vassoura-de-bruxa na Bahia.. In: XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996, Campo Grande. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 369, 1996.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; LOPES, U.V.; GRAMACHO, K.P.; PINTO, L.R. M. Seleção de material genético de cacauzeiro resistente à vassoura-de-bruxa na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (Supl.), p. 279, 1997a.

LUZ, E. D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V. de; OLIVEIRA, M.L. de. Cacau (*Theobroma cacao* L.) controle de doenças. In: RIBEIRO, V.F.X.; ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas-grandes culturas**. Viçosa, UFV, v.2, p. 617-622, 1997b.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Avaliação a campo de progênies de cacauzeiro para resistência à vassoura-de-bruxa na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24 (Supl.), p. 300, 1999.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; GRAMACHO, K.P., LOPES, U.V., ALBUQUERQUE, P.S.B. Cocoa progenies responses to *Crinipellis pernicios* under field and controlled environment conditions in Bahia, Brazil. **Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, p. 537-543, 2000.

LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, H.A.; MACHADO, R.C.R.; FILHO, L.P.S. Sincronismo entre lançamento foliar e aparecimento de sintomas de vassoura-de-bruxa no cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (Supl.), p. 352, 2001.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; PIRES, J.L.; SANTOS FILHO, L.P. Seleção na Bahia de novas fontes de resistência a *Crinipellis pernicios* em cacauzeiros com alta produtividade. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Gramado - RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 188, 2004.

MARITA, J.M. **Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD-marker based estimates of genetic distance and recommendations for a core collection to maximize genetic diversity**. 1998. 150p. M. S. Thesis – University of Wisconsin, Wisconsin. 1998.

MARITA, J.M.; NIENHUSIS, J.; PIRES, J.L.; AITKEN, W.M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop Science**, v. 41, p.1305-1316, 2001.

MELLO, G.R.P.; MACEDO, M.M.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M; FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L. Avaliação fenotípica de seleções de cacauzeiro feitas em plantações comerciais visando resistência à vassoura-de-bruxa. II **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro. Anais-CD, 2003.

MOTA, J.W.S. **Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao* L. da Amazônia brasileira por microssatélites**. 2003. 87p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

MUSE, R.; COLLIN, H.A.; ISSAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease, on and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.) **Plant Pathology**, 45, p. 145-154, 1996.

NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p, 2001.

OLIVEIRA, M.L. Eficácia de fungicidas triazóis no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero causada por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, S149, 2004 a.

OLIVEIRA, M.L. Estrobilurinas, novo grupo de fungicidas com eficácia contra a vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, S285, 2004 b.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p, 2005.

PEREIRA, J.L.; RAM, A. FIGUEIREDO, J.M. de; ALMEIDA, L.C.C. de. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brasil. **Tropical Agriculture**. 67(2):188-189,1990

PINTO, L.R.M.; LOPES, U.V. ; MONTEIRO, W.R. ; LUZ, E.D.M.N. Seleção de genótipos de cacau para resistência à vassoura-de-bruxa em condições de campo. In: XXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996, Campo Grande. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 404, 1996.

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

PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R. ; LUZ, E.D.M.N. ; SILVA, S.D.V.M. ; PINTO, L.R. M. ; FIGUEIRA, A.; GRAMACHO, K.P. ; LOPES, U.V. ; ALBUQUERQUE, P.S.B.; YAMADA, M.M.; AHNERT, D.E.; BRUGNEROTTO, M.I.B. Cocoa breeding for witches' broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. In: International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement - INGENIC, 1996, Salvador. **Proceedings of the Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement**. Reading, UK : INGENIC, p. 91-101, 1996a.

PIRES J.L.; MONTEIRO, W.R.; PINTO, L.R.M.; LUZ, E.D.M.N. Resistance to witches' broom – Evaluation of genotypes from different origins. In: **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producer's Alliance. Salvador, Bahia, Actas. Lagos, p. 389-397, 1996b.

PIRES J.L.; MARITA, J.M.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; AITKEN, W.M.; MELO, G.P.; MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brasil. In: **Proceedings of the international Workshop on New Technologies and Cocoa breeding**, Ingenic, Malaysia, p.72-88, 2000.

PIRES J.L.; FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.G.; MONTEIRO, W.R. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (Supl.), p. 347, 2001

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacauero com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. 2003. 220p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2003.

POUND, F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Report on a visit to Ecuador, the Amazon Valley and Colombia, April 1937-April 1938. Yulle's Printerie, **Port of Spain**, 58p, 1938.

POUND, F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*). Report on a recent visit to the Amazon territory of Peru, September 1942- February 1943. Yulle's Printerie, **Port of Spain**, 14p, 1943.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; ANHERT, D.; SCHUSTER, I.; PEREIRA, M. G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUERCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding** v. 122, p. 268-272, 2003.

RIOS-RUIZ, R.A. Manejo de enfermedades en cacao y café en Tingo María. Informe de Consultoría (Proyecto AD/PER/86/459, OSP/PNUD) (não publicado), 1989.

RIOS-RUIZ, R.A.; DIAS, L.A.S. Recursos genéticos. In: DIAS, L. A. S. (Ed). **Melhoramento genético do cacauero**. FUNAPE, Viçosa, p. 289-324, 2001.

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. **Theor. Appl. Genet.** 101:948-955, 2000.

ROCHA, H.M.; WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosus*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, v.34, p. 319-328, 1985.

RUDGARD, S.A. Witches' broom disease of cocoa in Rondonia, Brazil: infection of vegetative flushes and flower cushions in relation to host phenology. **Plant Pathology**, v.36, p. 523-530, 1987.

SANTOS, R.C. **Diversidade genética de acessos de cacauero e validação de marcadores moleculares para resistência à vassoura-de-bruxa**. 2004. 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2004.

SERENO, M.L. **Estimación de la diversidad genética de poblaciones silvestres de *Theobroma cacao* L. amazônico brasileiro, mediante microssatélites**. 2001. 70p. Tese de Mestrado – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

SERENO, M.L.; FIGUEIRA, A.V.O.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOSKY, R. Avaliação da diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L) silvestres da Amazônia brasileira. IN: **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro. Anais-CD, 2003.

SILVA, R.A.M.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; GEMAQUE, E.B. ; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N. . Avaliação de genótipos de cacauzeiro quanto à resistência à vassoura-de-bruxa em progênies obtidas a partir de polinizações naturais. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2000, Belém. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 423-423, 2000.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Resistência à vassoura-de-bruxa em progênies de cacau da Amazônia Brasileira. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1999, Curitiba. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24 (Supl.), p. 332-332, 1999.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M. Intercruzamento de genótipos de cacauzeiro para resistência a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25 (Supl.), p. 425-425, 2000.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M. Aumento de frequência de genes de resistência a *Crinipellis pernicioso* em progênies de cacauzeiro. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2001, São Pedro. **Fitopatologia Brasileira**. Anais, 26, p. 353-353, 2001.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, O.C.; GRAMACHO, K.P.; BEZERRA, J.L. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiro. **Agrotrópica**, 14(1): 1-24, 2002.

SOUZA, C.A.S.; DIAS, L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L.A.S. (Eds). **Melhoramento genético do cacauzeiro**. FUNAPE, Viçosa, p.1- 47, 2001.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; E GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience** 31: 729-741, 1996.

TABA, S.; PINEDA, F.E.; CROSSA, J. Forming core subsets from the Tuxpeno race complex. In: TABA, S. (Ed.) **The CIMMYT maize germplasm bank: genetic resources, preservation, regeneration, maintenance and use**. Mexico, p. 60-61, 1994.

TABA, S.; DIAZ, J.; RIVAS, M. Evaluation of dent maize races from Brazil to develop a core subset. IN: **Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe** – SIRGEALC, 2. Brasília: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia. Anais- CD, 1999.

TREVISAN, S.D.P. Mudanças no Sul da Bahia associadas à vassoura-de-bruxa do cacau. In: **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producer's Alliance. Salvador, Bahia, Actas. Lagos. p.1109-1116,1996.

YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.;FLORES, A.B.; MELO, G.R.P. Diversidade e origem de seleções de cacau (*Theobroma cacao* L) feitas em fazendas para resistência à vassoura-de-bruxa. **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Porto Seguro. Anais- CD, 2003.

van BELKUM, A.; SCHERER, S.; van ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microb. and Mol. Biol. Rev.** 62: 275-293, 1998.

VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v. 1(2), p. 3 -10, 1971.

VELLO, F.; MEDEIROS, A.G. Expedição botânica à Amazônia brasileira. **Cacau atualidades** (Brasil) 2 (4): 47-5,1965.

WHEELER, B.E.J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology** 37 (4): 475-488, 1988.

ANEXO

Anexo. Códigos de identificação das plantas utilizadas no estudo de dissimilaridade genética

Códigos	Progênie	Nº da Planta	Códigos	Progênie-CAB	Nº da Planta
p1	CAB 265	15	p38	CAB 160	35
p2	CAB 269	26	p39	CAB 388	1
p3	CAB 269	27	p40	CAB 388	27
p4	CAB 69	28	p41	CAB 388	12
p5	CAB 67	24	p42	CAB 219	2
p6	CAB 272	11	p43	CAB 219	29
p7	CAB 271	3	p44	CAB 219	30
p8	CAB 271	18	p45	CAB 221	27
p9	CAB 273	12	p46	CAB 221	28
p10	CAB 195	19	p47	CAB 221	30
p11	CAB 195	33	p48	CAB 221	31
p12	CAB 64	11	p49	CAB 221	10
p13	CAB 194	3	p50	CAB 383	27
p14	CAB 274	18	p51	CAB 364	26
p15	CAB 274	9	p52	CAB 364	32
p16	CAB 274	10	p53	CAB 364	35
p17	CAB 156	33	p54	CAB 356	1
p18	CAB 153	17	p55	CAB 356	25
p19	CAB 153	31a	p56	CAB 356	14
p20	CAB 153	32	p57	CAB 356	3
p21	CAB 148	3	p58	CAB 356	4
p22	CAB 148	8	p59	CAB 356	28
p23	CAB 145	29	p60	CAB 356	24
p24	CAB 145	9	p61	CAB 486	27
p25	CAB 154	34	p62	CAB 486	6
p26	CAB 533619	27	p63	CAB 486	21
p27	CAB 533619	33	p64	CAB 328	1
p28	CAB 533619	12	p65	CAB 328	30
p29	CAB 526	33	p66	CAB 328	21
p30	CAB 233	2	p67	CAB 329	2
p31	CAB 233	14	p68	CAB 329	28
p32	CAB 233	24	p69	CAB 329	29
p33	CAB 334	13	p70	CAB 329	24
p34	CAB 334	15	p71	CAB 327	4
p35	CAB 334	21	p72	CAB 327	16
p36	CAB 334	23	p73	CAB 153	16
p37	CAB 160	16	p74	CAB 153	31b