

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



**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SSR ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA A VASSOURA-DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA E  
COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM UMA PROGÊNIE ENTRE OS  
CLONES CCN-51 X SIC-864 DE *THEOBROMA CACAO***

**GEOVANE CAMPANHA GONÇALVES**

**ILHÉUS – BA – BRASIL  
Dezembro de 2014**

**GEOVANE CAMPANHA GONÇALVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SSR ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA A VASSOURA-DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA E  
COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM UMA PROGÊNIE ENTRE OS  
CLONES CCN-51 X SIC-864 DE *THEOBROMA CACAO***

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

**Área de Concentração:** Genética e Biologia Molecular

**ILHÉUS – BA – BRASIL  
Dezembro de 2014**

G635 Gonçalves, Geovane Campanha.  
Identificação de marcadores SSR associados à resistência a vassoura-de-bruxa e podridão parda e componentes de produção em uma progênie entre os clones CCN-51 x SIC-864 de Theobroma cacao / Geovane Campanha Gonçalves. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

x, 55 f. : il. ; anexo.

Orientador: Didier Pierre Louis Clément.

Co-orientador: Uilson Vanderlei Lopes.

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

Referências bibliográficas: f. 46-54.

1. Cacaueiro – Doenças e pragas – Bahia. 2. Vassoura-de-bruxa (fitopatologia). 3. Podridão parda (fitopatologia). 4. Cacau – Melhoramento genético.
- I. Título.

CDD 633.74

GEOVANE CAMPANHA GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SSR ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA A VASSOURA-DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA E  
COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM UMA PROGÊNIE ENTRE OS  
CLONES CCN-51 X SIC-864 DE *THEOBROMA CACAO*

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

**Área de Concentração:** Genética e  
Biologia Molecular

APROVADO: 10 de dezembro de 2014

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa  
(UESC)

Prof. Dr. Ronaldo Carvalho Santos  
(CEPLAC)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Peres Gramacho  
(CEPLAC / UESC)

Prof. Dr. Didier Pierre Louis Clément  
(CEPLAC / CIRAD - Orientador)

*Aos meus amados pais, João Gonçalves dos Santos (in memoriam) e Aracy Campanha Gonçalves, pelos momentos de carinho, confiança, incentivo aos estudos e todos os valores que aprendi desde muito cedo e levo comigo em todos os momentos da minha vida.*

*À minha família, que sempre se fez presente nessa caminhada, não deixando que eu me sentisse sozinho nunca. Sempre se mantendo por perto e proporcionando momentos únicos que jamais esquecerei.*

*À minha namorada, Maisa Darla, que teve paciência em me esperar durante esses dois anos, nunca me abandonando, mesmo quando eu mais me mantive distante e ausente.*

*Aos meus colegas de moradia, Antenor e Jocelma, que me suportaram todo esse tempo, ouvindo minhas lamentações e acompanhando de perto toda a caminhada.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a DEUS por ser tão maravilhoso em minha vida, sempre me guiando nos caminhos por onde andei. E por mais que eu tenha fraquejado em muitos momentos, nunca permitiu que eu desistisse de seguir. Obrigado Pai!

Ao Programa de Genética e Biologia Molecular da UESC e aos professores, por terem me recebido de braços abertos e terem me oferecido a oportunidade de estudar e adquirir um pouco mais de conhecimento nessa vida.

À professora Dr<sup>a</sup> Fabienne Micheli, que sempre me manteve informado das possibilidades de ingresso no programa, durante o edital de seleção.

Às secretárias do programa, Fabrícia, Mara e Kátia, que sempre foram muito atenciosas, prestativas, pacientes e simpáticas comigo.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus colegas do CBG, especialmente Lívia Santana, Mara, Suzam, Rodrigo Bezerra e Joise Hander, que sempre foram muito legais comigo. Levarei comigo lembranças muito agradáveis da companhia de vocês.

Aos meus colegas do laboratório de Fitopatologia da CEPLAC, Analine, Nara, Sanlai, Rafaela Andrade, Rogério, Lívia, Mariana Carvalho, Loíse, Francisca, Rafaela do Mar, Rodrigo, Rangeline, Everton, Kaleandra, Yaska, Marlon, Keidmille, Tamiles, Uine e Keyla, por todos os conhecimentos compartilhados e companhia durante esse tempo. Especialmente ao grande Marcos, que nunca mediu esforços pra me ajudar, principalmente nos momentos mais conturbados da reta final. Cara, você foi um irmão pra mim, obrigado por tudo!

À equipe da Mars Cacau, pela atenção e suporte durante os trabalhos de campo.

À CEPLAC e todos os funcionários do CEPEC, com quem tive a oportunidade de conviver.

À Dr<sup>a</sup> Karina Gramacho, pelos conselhos e ensinamentos que me fizeram crescer como pessoa e como profissional, obrigado 'mainha'.

Ao meu co-orientador Dr. Uilson Lopes, pelos valiosos momentos de aprendizado e dicas de como lidar com os problemas de uma maneira mais prática e simples. Queria poder ter passado mais tempo ouvindo seus conselhos, certamente eu seria muito melhor. Obrigado por tudo.

Ao meu orientador Dr. Didier Clément, pela orientação, pela confiança, sempre me ensinando coisas novas por ter me suportado todo esse tempo. Obrigado pelos puxões de orelha e pelos conselhos valiosos sobre a pesquisa. Jamais me esquecerei!

Muito obrigado por tudo!

## ÍNDICE

EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. <i>Theobroma cacao</i> L. ....	4
2.1.1. Origem, dispersão geográfica e diversidade genética .....	4
2.1.2. Importância econômica da cacauicultura.....	5
2.1.3 Variedade CCN-51 como nova fonte de resistência .....	6
2.2. <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	7
2.2.1. Classificação do patógeno e Sintomatologia no cacauero .....	7
2.2.2. Origem, epidemiologia e controle da doença .....	8
2.3. Podridão parda do cacauero .....	9
2.4. Interação planta-patógeno .....	10
2.5. Marcadores Moleculares Microssatélites – SSR .....	11
2.6. Mapeamento de genes de interesse .....	12
2.6.1. Mapas genéticos e suas aplicações .....	12
2.6.2. Mapeamento do cacauero e detecção de QTLs .....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
3.1. Progenie utilizada .....	16
3.2. Coleta de material vegetal em campo .....	16
3.3. Extração de DNA .....	17
3.4. Genotipagem da população utilizando marcadores SSR .....	18
3.4.1 Amplificações .....	18
3.4.2 Eletroforese em Poliacrilamida e revelação com AgNO <sub>3</sub> .....	18
3.4.3 Genotipagem em Sequenciador ABI3100 .....	19

3.5. Avaliações Fenotípicas .....	19
3.6. Mapeamento genético .....	20
3.7. Análises estatísticas e análise de QTLs .....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
4.1. Estatísticas descritivas .....	21
4.1.1. Análise da progênie CCN-51 x SIC-864 (tipo C-S) .....	21
4.1.2. Análise geral das progênies (tipo C-S e tipo S-C) juntamente com as testemunhas.....	23
4.2. Genotipagem em géis de poliacrilamida 6% .....	31
4.3. Genotipagem em sequenciador ABI3100 .....	31
4.4. Controle da legitimidade da progênie .....	32
4.5. Mapeamento genético parcial da progênie .....	33
4.6. Associação Marca-Fenótipo .....	35
4.6.1. Vassouras vegetativas e vassouras de almofada floral .....	36
4.6.2. Caracteres de produção da progênie .....	39
4.6.3. Sintomas de doença nos frutos .....	42
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>



## EXTRATO

GONÇALVES, Geovane Campanha, MSc, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Dezembro de 2014. **Identificação de marcadores SSR associados à resistência a vassoura-de-bruxa e podridão parda e componentes de produção em uma progênie entre os clones CCN-51 x SIC-864 de *Theobroma cacao***. Orientador: Didier Pierre Louis Clément. Co-orientador: Uilson Vanderlei Lopes.

A espécie *Theobroma cacao* L. é alvo de vários fitopatógenos, entre eles, o *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora sp*, causadores da vassoura-de-bruxa e podridão parda, respectivamente. Estratégias de melhoramento genético do cacaueteiro, com a introdução de variedades resistentes à doenças, são alternativas muito eficientes no combate aos fitopatógenos. Com os avanços das ferramentas moleculares, aliados ao melhoramento clássico, é possível utilizar marcadores moleculares para mapear regiões do genoma que estão associadas às características quantitativas de interesse agrônomo. Visando mapear uma progênie F1 de 139 indivíduos, descendente dos genitores CCN-51 e SIC-864, que são contrastantes para vários caracteres, e associar marcadores moleculares aos caracteres fenotípicos de interesse, 30 microssatélites SSR foram utilizados numa matriz de genotipagem para análises nos softwares Join Map 4.1 e MapQTL 6.0. Variabilidade fenotípica considerável foi detectada na população, apresentando variação tanto nos níveis de resistência a doenças como também para a produtividade de frutos. Teste de comparação de médias mostraram que houve diferença significativa entre os indivíduos da progênie. Foram detectados marcadores potencialmente ligados à regiões de QTLs para resistência e produção, baseando-se nos resultados das análises não paramétricas de Kruskal-Wallis e o test T student, os microssatélites mTcCIR127, mTcCIR109, mTcCIR274 e mTcCIR126 apresentaram uma significativa associação aos caracteres de resistência à vassoura-de-bruxa. O marcador mTcCIR184 pode estar fortemente associado à resistência à podridão parda e o marcador mTcCIR32 provavelmente associado aos caracteres de produtividade.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao* L, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sp.*, vassoura-de-bruxa, podridão parda, QTL, mapeamento molecular.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Geovane Campanha, MSc, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Dezembro de 2014. **Identification of SSR markers linked for the resistance to witches' broom and black pod diseases and components of production from a progeny between clones CCN51 and SIC864 of *Theobroma cacao*.** Orientador: Didier Pierre Louis Clément. Co-orientador: Uilson Vanderlei Lopes.

*Theobroma cacao* L. species is target of several plant pathogens, including *Moniliophthora perniciosa* and *Phytophthora sp*, causing the witches' broom and black pod diseases, respectively. Breeding strategies of cacao, with the introduction of varieties resistant to diseases, are very efficient alternative against pathogens. With the advances of molecular tools, combined with classical breeding, it is possible to use molecular markers to map regions of the genome associated with quantitative traits of agronomic interest. In order to map a F1 progeny of 139 individuals, descendant of the CCN-51 and SIC-864 parents, which are contrasting for several characters, and associated molecular markers for phenotypic traits of interest, 30 microsatellite SSR were used in a genotyping array for analysis in software Join Map 4.1 and MapQTL 6.0. A considerable phenotypic variability was detected in the population, both showing variation in levels of disease resistance as well as for the fruit yield. Mean comparison test showed that there was significant difference between individuals of the progeny. Were detected markers potentially related with regions of QTLs for resistance and production, based on the results of non-parametric Kruskal-Wallis and T student test analyses, microsatellites mTcCIR127, mTcCIR109, mTcCIR274 and mTcCIR126 showed a significant association with resistance characters to the witches' broom disease. The mTcCIR184 marker can be strongly associated with resistance to black pod disease and the mTcCIR32 marker probably related to productivity characters.

**Keywords:** *Theobroma cacao* L, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sp*, witches' broom, black pod, QTL, molecular mapping.

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo e a exploração comercial da espécie *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), gera renda para diversos produtores no Brasil e no mundo há várias décadas. Trata-se de uma planta pertencente à família Malvaceae, de porte arbóreo, perene e nativa das regiões tropicais da América do Sul (ALVERSON et al., 1999). Suas amêndoas são matéria prima para a produção de cosméticos, produtos a base de cacau, mas principalmente na fabricação do chocolate. Além de ser uma importante fonte de renda para pequenos e grandes produtores, estudos recentes, também demonstraram que o chocolate pode proporcionar benefícios para a saúde cardiovascular através de uma variedade de mecanismos fisiológicos, tais como proteção antioxidante e homeostasia vascular (STEINBERG et al., 2003).

Entre o final da década de 80 e início da década de 90 o surto de uma doença, conhecida como vassoura-de-bruxa, atingiu as lavouras de cacau do sul da Bahia e causou perdas substanciais na produção de amêndoas (PEREIRA et al. 1989). Essa doença é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), Aime & Phillips-Mora (2005), e até os dias de hoje é considerada um dos principais problemas fitossanitários das regiões cacaueiras do Brasil e de países produtores de cacau da América do Sul. Esse patógeno infecta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento: brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos da doença com hipertrofia dos tecidos infectados (ALBUQUERQUE et al., 2005). Podendo ocasionar numa redução da produção agrícola acima de 80%, e causando a morte das plantas após ciclos sucessivos, principalmente quando associada a estresses abióticos (ANDEBRHAN, 1984), caso não sejam adotadas medidas de prevenção e controle da doença.

Ao longo das últimas décadas, muitos programas de melhoramento genético foram desenvolvidos com a finalidade de obter cultivares altamente resistentes à vassoura-de-bruxa. Medidas de controle químico e cultural têm sido relativamente onerosas, não muito eficazes quando não são realizados dentro dos critérios técnicos da pesquisa e frequentemente provocam poluição ambiental. Assim, a busca por variedades resistentes e com alta capacidade de produção tornou-se uma alternativa para se manejar a doença (PINTO e PIRES, 1998). A mais conhecida e provavelmente a principal fonte de resistência, são os

clones da série Scavina, como Scavina-6, clone altamente distribuído e utilizado na maioria dos programas de melhoramento do cacaueteiro (MONTEIRO et al., 2008). Seleccionados no Peru, esses clones têm sido a fonte mais utilizada de resistência à vassoura-de-bruxa (LOPES et al. 2011, PIRES et al. 2012). Além disso, o Scavina-6 é uma fonte muito utilizada no melhoramento genético pela resistência a podridão parda (LUZ et al., 1997; TAHI et al., 2006).

A busca pela resistência à doença gerou trabalhos científicos que, juntamente com a utilização de técnicas avançadas de biologia molecular, aliadas ao melhoramento clássico, tornou-se possível o mapeamento de genes envolvidos na expressão de um caráter de interesse, usando marcadores moleculares, como nas análises de “*Quantitative Trait Loci*” (QTL). Embora outros tipos de marcadores tenham sido usados anteriormente em mapeamentos, mais recentemente, os mapeamentos genéticos do cacaueteiro estão sendo realizados apenas com marcadores co-dominantes SSR (*Single Sequence Repeat*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e DArT (*Diversity Arrays Technology*). Foram realizadas em diversos países e instituições de pesquisa e também na CEPLAC, mapeamentos genéticos e análises para detecções de QTLs relacionados resistência à vassoura-de-bruxa.

Embora haja um elevado número de mapeamentos genéticos, incluindo os dados de LANAUD et al., 1995; RISTERUCCI et al., 2000; PUGH et al., 2004; LIMA et al., 2010; FOUET et al., 2011; ALLÈGRE et al., 2012 e também trabalhos de detecção de QTLs (QUEIROZ et al., 2003; BROWN et al., 2005; FALEIRO et al. 2006; LANAUD et al., 2009; CLEMENT et al. 2012; SANTOS et al. 2014), é extremamente importante mapear os genes de novas fontes de resistência a partir de outros cultivares. Pires et al. (2012) apontam o CCN-51, de origem equatoriana, como um bom candidato a tais estudos. Resultados obtidos por Dantas Neto et al. (2007), analisando uma população F1 do cruzamento entre CCN-51 e SIC-864, indicaram 32 marcadores microssatélites potencialmente relacionados à resistência contra à vassoura-de-bruxa. A disponibilidade de novos marcadores favorece a realização de novos estudos de identificação de QTLs de resistência.

Tendo como base essas informações, temos como objetivos neste trabalho: 1) Fazer o mapeamento genético de uma progênie resultante do cruzamento entre CCN-51 e SIC-864, que apresentam diversas características contrastantes, inclusive resistência a doenças e produção; 2) Analisar os dados fenotípicos coletados em campo durante o período de 2008 a 2014; 3) Identificar associações entre locos SSR e regiões do genoma (QTLs) envolvidas na expressão da resistência à *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora sp.*, como também à componentes de produção.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Theobroma cacao* L.

O gênero *Theobroma* compreende 22 espécies, dentre elas, o *Theobroma cacao* L. (CUATRECASAS, 1964), conhecida popularmente como cacaueiro. Esta espécie é perene, alógama e possui um genoma  $2n = 20$  cromossomos. Trata-se de uma planta dicotiledônea, ou seja, suas sementes apresentam dois cotilédones, que são a parte economicamente aproveitável para fabricação do chocolate. É cauliflora, pois, as flores se formam nas regiões do caule e ramos secundários e terciários, formando estruturas conhecidas como almofadas florais, compostas por flores hermafroditas e pentâmeras, com pétalas, sépalas, estames e estaminóides (ENGELS, 1981; FIGUEIRA et al., 1992; ALVERSON et al., 1999).

#### 2.1.1. Origem, dispersão geográfica e diversidade genética.

O mais provável centro de origem da espécie fica localizado no Alto Amazonas, na confluência dos rios Caquetá, Putamayo e Solimões (BARTLEY, 2005), e partir daí teria se disseminado para o norte e oeste, enfrentando barreiras geográficas como as cordilheiras andinas e uma outra parte se disseminou para o leste do continente, não encontrando muitas barreiras naturais, chegando assim ao Brasil (PIRES, 2003). Conforme Cheesman (1944), *Theobroma cacao* L. apresenta três grupamentos genéticos: o grupo Criollo, cultivados originalmente na América Central e que apresenta amêndoas grandes, arredondadas e de cotilédones brancos ou coloração rósea clara, frutos de casca enrugada de coloração verde ou vermelho quando imaturos, tornando-se roxos ou amarelados quando maduros; o grupo Forastero ou Amazônico, que se subdivide em Baixo e Alto Amazônicos, de acordo com a origem do material. Esses apresentam sementes com pigmentação violeta escuro, frutos ovóides de casca lisa, quando imaturos são verdes, tornando-se amarelos quando maduros; o grupo Trinitário é constituído de híbridos naturais entre os dois primeiros, apresentando

características de ambos. Embora a espécie tenha sido classificada em 3 grandes grupos genéticos, mais recentemente, Motamayor et al. (2008), apresentam uma nova classificação em 10 grupos: Nacional, Marañon, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Curaray, Guiana e Purús, que favorece a utilização de estratégias mais acuradas e eficazes para o melhoramento genético.

### **2.1.2. Importância econômica da cacauicultura**

De acordo com a Organização Mundial de Cacau (ICCO, 2014), no biênio 2011/2012, a produção mundial das amêndoas do cacau atingiu uma quantia de pouco mais de 4 milhões de toneladas, dos quais 71,5% dessa produção concentrou-se no continente africano, principalmente em países como Costa do Marfim e Gana. Seguidos da América com 16% da produção, dos quais se destacam o Brasil e o Equador, e a Ásia e Oceania com 12,5%, principalmente na Indonésia. Além disso, as estimativas para o próximo biênio indicam um aumento de 1,85% na produção mundial de amêndoas. Embora muitas perdas na produção tenham ocorrido em decorrência do ataque de pragas nas últimas décadas, os dados mais recentes de produção de amêndoas no Brasil têm apresentado resultados com ganhos significativos.

O cacau é usado tanto como matéria prima na produção de cosméticos como na produção alimentícia. No Brasil, a polpa das sementes é utilizada na produção de sucos, bebidas destiladas, geleias entre outros itens alimentícios, mas é a produção do chocolate e derivados que impulsionam os grandes ganhos econômicos desde o século 17 a partir das suas primeiras utilizações na Europa.

Várias características são levadas em consideração para o processo de fabricação do chocolate, entre elas, a acidez, adstringência e sabor do cacau. O processo pós-colheita é um fator considerável na qualidade do produto, incluindo técnicas de secagem e fermentação das sementes. No entanto, há variedades tradicionalmente destacáveis no quesito qualidade, como é o caso do cacau Nacional cultivado no Equador e variedades cultivadas na América Central (PIRES, 2003). A composição bioquímica do cacau e do chocolate apresenta uma variedade de substâncias benéficas na saúde do consumidor. Steinberg et al. (2003), relatam que o chocolate pode proporcionar ganhos para a saúde cardiovascular através de uma variedade de mecanismos fisiológicos, tais como proteção antioxidante e homeostasia vascular.

Outro fator importante na cacauicultura é que ela contribui, em parte, para a conservação ambiental em locais onde é cultivado em sistemas agroflorestais do tipo

cabruças, particularidade da cultura do cacau no Sul da Bahia. Pois, o cultivo de cacau associado com árvores nativas tem favorecido a preservação de biomas impactados, especialmente a Mata Atlântica. Recentemente, o governo do estado da Bahia assinou o decreto florestal 15.180/2014, visando disciplinar, organizar e viabilizar o cultivo do cacau cabruça, sistema agroflorestal sustentável fortemente voltado para a preservação ambiental (CEAMA, 2014).

### **2.1.3 Variedade CCN-51 como nova fonte de resistência**

Durante o período entre 1890 e 1915, o Equador foi o país que mais exportou cacau. A partir daí, a produção de amêndoas sofreu um decréscimo de aproximadamente 63%, decorrente do ataque sucessivo de enfermidades como a monilíase e a vassoura-de-bruxa do cacaueiro. Após algum tempo, no entanto, as variedades de cacau utilizadas comumente naquela época foram substituídas por variedades conhecidas como CCN-51, que eram notavelmente resistentes, especialmente à vassoura-de-bruxa. Isso levou os produtores de cacau a experimentar novamente bons resultados na produção e exportação (QUINGAÍSA, 2007; citada por SANTOS, 2012).

CCN-51 (Colección Castro Naranjal), variedade desenvolvida nos anos 60 no Equador, por Homero Castro, utilizando o cruzamento: [ICS-95 (Imperial College Selection) x IMC-67(Iquitos Mixed Cabacillo) = F1 x 'Oriente-1'. A variedade 'Oriente-1' é relatada como sendo um acesso coletado durante a primeira viagem de Homero Castro ao Vale Canelos, localizado na Amazônia equatoriana. Os primeiros relatos do CCN-51 sendo utilizados em plantações, foram numa fazenda chamada 'Sofia', numa região conhecida como 'Naranjal' do sul de Guayaquil (CASTRO, 1981; citado por BOZA et al., 2014).

Segundo Amores et al. (2011), o CCN-51 apresenta alta produtividade, é resistente a doenças e é também precoce quando comparada com outras variedades, pois produz grandes frutos e sementes em apenas 2 anos após o plantio no campo. Além disso, suas amêndoas tem um alto teor de manteiga (54%), sendo uma das maiores produções de manteiga da indústria cacaueira. Com uma secagem apropriada antes da fermentação, o cultivar produz uma baixa acidez e um sabor aceitável, mas ainda assim não satisfaz a qualificação para amêndoas de sabor fino. Esta variedade possui um alto rendimento quando comparado com outras variedades. Com um manejo adequado desde seu plantio até a colheita e secagem das sementes, o CCN-51 pode ser usado como cacau de qualidade na produção de chocolate (ANDINO et al., 2005).



## 2.2. *Moniliophthora perniciosa*.

### 2.2.1. Classificação do patógeno e Sintomatologia no cacauero

Entre o final da década de 80 e início da década de 90, uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa, atingiu as lavouras de cacau do sul da Bahia. A vassoura-de-bruxa do cacauero, causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), Aime & Phillips-Mora (2005), é um dos principais problemas fitossanitários nas regiões cacaueiras da América do Sul. Na Bahia, região responsável por cerca de 70% da produção nacional de cacau, esta doença é o principal fator associado ao declínio na produção.

O *Moniliophthora perniciosa* é uma espécie de ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, apresenta uma fase parasítica ou biotrófica, caracterizada pela instalação de um micélio primário, monocariótico, sem grampos conectivos, que germinam a partir dos basidiósporos e crescem nos espaços intercelulares do hospedeiro (STAHHEL, 1915; citado por OLIVEIRA & LUZ, 2012), e uma fase saprofítica ou necrotrófica, que surge entre três a nove semanas de infecção. Esta fase se caracteriza por apresentar micélio mais delgado, que pode agora estar não apenas no espaço intercelular, mas também no intracelular, com células dicarióticas e grampos de conexão (EVANS & BASTOS, 1980).

Existe uma variabilidade genética considerável nesta espécie, levando-a a ser classificada em 4 biótipos associados a diferentes hospedeiros: Biótipo C – infectam predominantemente espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*; Biótipo S – ocorrem em espécies da família Solanaceae; Biótipo L – predominantemente saprofítico e associado a *Arrabidaea verrucosa*; Biótipo B – infectam *Bixa orellana* (urucunzeiro), hospedeiro ocasional, só tendo sido registrado uma única vez (BASTOS & ANDEBRHAN, 1986).

Os sintomas mais evidentes da doença são superbrotamentos de lançamentos foliares, com a proliferação de gemas laterais e a hipertrofia dos tecidos infectados em crescimento, especialmente os tecidos meristemáticos. Quando o fungo penetra nos meristemas apicais ou gemas laterais em crescimento, dá origem a uma vassoura vegetativa, que pode ser terminal ou axilar, conforme o local de surgimento. Almofadas florais infectadas também produzem vassouras vegetativas, flores anômalas e os frutos formados são frequentemente partenocárpicos, de morfologia anormal. Quando a infecção se dá diretamente no fruto em desenvolvimento, podem ser observados sintomas como amarelecimento precoce, com ou sem lesões necróticas. Os danos internos em frutos são mais severos que os da podridão

parda, com as amêndoas, na maioria das vezes, completamente danificados (OLIVEIRA & LUZ, 2012).

Na ausência de medidas de controle da vassoura-de-bruxa, a doença pode ocasionar uma redução da produção agrícola superior a 80% e causar a morte das plantas após ciclos sucessivos do patógeno, principalmente quando associados a estresses abióticos (ANDEBRHAN, 1984).

### **2.2.2. Origem, epidemiologia e controle da doença**

A vassoura-de-bruxa foi descrita pela primeira vez no município de Saramacca, no Suriname, no ano de 1904, e desde então, métodos e alternativas de controle da doença vem sendo adotados. Controle químico, podas fitossanitárias, controle biológico e mais recentemente o uso de variedades geneticamente resistentes (OLIVEIRA & LUZ, 2005).

A prática de remoção das vassouras (poda fitossanitária), inicialmente recomendada por Stahel (1915), ainda é bastante utilizada nos dias de hoje, embora não resolva o problema definitivamente, trata-se de uma alternativa eficaz na redução das fontes de inóculo, o que retarda temporariamente a proliferação da doença, mas é uma prática cara para o produtor. O uso de fungicidas não tem sido a alternativa mais indicada, embora possa apresentar resultados positivos no controle, é facilmente lavável dos tecidos com as chuvas periódicas e, além disso, são relativamente de alto custo para a maioria dos pequenos produtores e quantidades elevadas podem poluir sistematicamente o solo e os recursos hídricos. Uma alternativa menos impactante do ponto de vista da preservação ambiental é a utilização de microrganismos como controle biológico (BASTOS et al., 1981; BASTOS et al., 1996), pois, geram interações competitivas e mecanismos de antibiose e hiperativismo entre microrganismos antagônicos (OLIVEIRA & LUZ, 2005).

A utilização de plantas do cacauero melhoradas geneticamente visando resistência às doenças também é uma alternativa de controle da doença. Essa prática teve início no Equador em 1918, através da seleção de plântulas originadas de árvores que não apresentavam sintomas. Posteriormente, na década de 40, coletas e avaliações quanto à resistência foram realizadas em cacaueros silvestres do Vale Amazônico, em território peruano, para serem utilizados nos programas de melhoramento genético (POUND, 1943). Embora exista hoje um número relativamente grande de trabalhos realizados na busca de plantas resistentes a doenças, a maioria dos programas vem utilizando clones provenientes da série Scavina, e até

mesmo clones de ordem secundária, como as variedades IMC-67 e TSH-1188, que apresentam resistência mediana (BARTLEY, 1986).

Os mecanismos que envolvem a resistência do cacaueteiro a doenças, muitos deles ainda desconhecidos, são eventualmente modificados ao longo de algumas gerações, provavelmente pela ampla variabilidade genética tanto do patógeno como do próprio hospedeiro. Na Bahia, Pires (2003) e Gramacho et al. (2003) demonstraram que clones da série Scavina, especialmente o Scavina-6, vêm apresentando um aumento significativo no número de vassouras vegetativas e vassouras de almofada floral, o que indica que a estabilidade temporal desses genótipos estaria diminuindo. Sendo assim, torna-se necessário ampliar as bases genéticas da resistência, e uma promissora alternativa é a utilização de novas fontes de resistência. De acordo com Amores et al. (2011) e Pires et al. (2012), o CCN-51 é um ótimo candidato para tais estudos, pois, além de ter demonstrado que é altamente produtivo e possuir características aceitáveis na indústria do chocolate, vêm apresentando características de resistência de grande interesse para os melhoristas.

### **2.3. Podridão parda do cacaueteiro**

A podridão parda do cacaueteiro é uma doença não menos importante que a vassoura-de-bruxa no Brasil, mas na África, a espécie *Phytophthora megakarya* é a mais agressiva e pode chegar a provocar uma perda de produção de 100% (NYASSÉ, S.; EFOMBAGN, M. I. B. e ESKES, A. B., 2003). Embora as perdas na produção de frutos sejam menores, a podridão parda está amplamente disseminada em várias regiões do mundo, ao contrário do patógeno *M. perniciosa*, que apesar de causar perdas maiores na produção, encontra-se restrita a determinadas regiões da América Latina (LUZ & SILVA, 2001).

Os primeiros relatos que se tem da doença no Brasil, segundo Zehntner (1914), citado por Oliveira & Luz, (2012), datam do início do século, no ano de 1909. Embora existam várias espécies do gênero *Phytophthora* descritas na literatura, aqui no Brasil, a doença é causada principalmente pelos fungos oomicetos *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora capsici* e *Phytophthora citrophthora*. Embora a espécie *P. citrophthora* seja a mais agressiva aos hospedeiros (incluindo citrus e algumas rosáceas de regiões temperadas), *P. palmivora* é a mais amplamente distribuída e infecta muitas outras culturas de importância econômica, sendo encontrado em 41 famílias de plantas. Além da habilidade de infectar não só os frutos, mas também outras partes da planta (folhas, flores e raízes). *P. capsici*, além de causar doença

nos cacaueiros, infecta também hospedeiros das famílias solanácea e cucurbitácea (ERWIN & RIBEIRO, 1996; citados por OLIVEIRA & LUZ, 2012).

#### **2.4. Interação planta-patógeno**

A interação que ocorre entre plantas e patógenos pode ser de dois tipos: a interação do tipo compatível, onde o patógeno consegue superar as defesas do hospedeiro propiciando o desenvolvimento da doença; e a interação do tipo incompatível, da qual o patógeno não consegue ultrapassar as barreiras de defesa do hospedeiro (JACKSON & TAYLORBI, 1996).

Naturalmente, o desenvolvimento de doenças em plantas é algo menos comum do que se parece. Na maioria dos casos, as interações entre plantas e microrganismos patogênicos são do tipo incompatíveis (AGRIOS, 2005), mas ainda assim, interações compatíveis responsáveis por várias doenças são sistematicamente prejudiciais para a agricultura.

Embora as plantas não apresentem um sistema imunológico com anticorpos de defesa como nos animais, a presença de barreiras físicas e/ou químicas que surgiram ao longo de sua evolução, tem proporcionado a elas um sistema de defesa altamente eficaz contra microrganismos patogênicos e até mesmo herbívoros.

Parlevliet (1997) conceitua resistência como sendo a habilidade da planta em suprimir, retardar ou prevenir a entrada ou a subsequente atividade do patógeno (crescimento e desenvolvimento) em seus tecidos. Segundo Van der Plank (1968), existem tipos de resistências que são eficazes apenas contra algumas raças do patógeno, esse tipo era conhecido como resistência vertical e hoje chamada de resistência qualitativa. Há também tipos de resistências que são efetivas contra todas as raças de um determinado patógeno, em níveis variados, posteriormente chamada de resistência horizontal e conhecida hoje como resistência quantitativa.

A resistência vertical, monogênica ou oligogênica, também conhecida como resistência qualitativa, devido a sua fácil distinção entre plantas resistentes e suscetíveis, está relacionada com os conceitos da teoria gene-a-gene (FLOR, 1971; citado por VIEIRA & VALLE, 2012). Tal teoria preconiza que, se um determinado hospedeiro apresenta um gene de resistência específico para uma determinada raça de patógeno, esta não conseguirá causar infecção, pois o hospedeiro é resistente à aquela raça, e o patógeno por sua vez é avirulento. Mas se outra raça consegue infectar o hospedeiro, neste caso o patógeno é portador de um gene para virulência e o hospedeiro não possui um gene de resistência. A teoria da resistência gene-a-

gene é aceita até hoje, contudo, alguns autores consideram que ela se aplica somente à resistência vertical (VIEIRA & VALLE, 2012).

Por outro lado, a resistência horizontal, também conhecida como resistência quantitativa, pode ser caracterizada como tendo comumente a participação de muitos genes (poligênica) na expressão de características, e cada um desses genes têm pequeno efeito sobre a resistência ao patógeno (CHAVES, 1976). Contudo, ela se encontra, em maior ou menor grau, em todas as espécies de plantas hospedeiras, agindo contra todas as raças de um determinado patógeno, em níveis variáveis de resistência (VAN DER PLANK, 1968). A grande vantagem em se ter esse tipo de resistência é que ela é relativamente mais duradoura, tendo em vista que, para esse tipo de resistência ser contornada pelo patógeno, ele teria de ser capaz de vencer muitos genes. Porém, torna-se muito desafiador para os melhoristas, somar todos esses genes num único genótipo.

## **2.5. Marcadores Moleculares Microssatélites – SSR.**

Com o surgimento de novas técnicas de biologia molecular nos anos 80, estudos de identificação caracterização e mapeamento genético estão sendo realizados com mais rapidez e eficácia. A utilização de marcadores moleculares possibilitou estudos de variabilidade genética intra e interespecífica. Assim sendo, técnicas de mapeamento influenciaram positivamente a utilização de marcadores moleculares na busca de novos alelos que puderam ser incorporados aos programas de melhoramento (BERED et al., 1997).

Marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que são muito abundantes nos genoma das plantas e não sofrem influência ambiental, podendo revelar polimorfismos de sequências de DNA. Esses marcadores podem ser baseados ou não na amplificação de segmentos através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e têm sido amplamente utilizados em programas de melhoramento genético de plantas, na caracterização de populações, construção de mapas de ligação e detecção de QTLs, entre outras aplicações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Um bom marcador molecular é aquele que apresenta alto nível de polimorfismo, está amplamente distribuído no genoma, não apresenta efeito seletivo e seja de herança co-dominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Embora outros tipos de marcadores tenham sido utilizados no mapeamento do cacauero: marcadores isoenzimáticos, RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* e RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (LANAUD et al., 1995); AFLP – *Amplified*

*Fragment Length Polymorphism* (RISTERUCCI et al., 2000; QUEIROZ et al., 2003), mapeamentos mais recentes têm sido feitos com uso de marcadores SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* e SSR – *Simple Sequence Repeat* (ALLEGRE et al., 2012).

Marcadores moleculares SSR, também chamados de microssatélites, são altamente informativos, permitindo identificar polimorfismo entre indivíduos com muita eficiência. Microssatélites têm sido usados amplamente nos estudos do melhoramento genético, uma vez que se baseiam na detecção da variação existente em locos de sequências repetitivas (dinucleotídeos, trinucleotídeos ou tetranucleotídeos), que estão flanqueados por regiões altamente conservadas, permitindo que primers especificamente complementares a essas regiões sejam sintetizados e utilizados para amplificar essas sequências via PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Tais marcadores podem ser obtidos através do desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas para sequências microssatélites, sequenciamento dos clones contendo o DNA repetitivo e por fim o desenho de primers complementares as sequências flanqueadoras das regiões repetitivas. Mais recentemente, com o avanço das técnicas massivas de sequenciamento de genomas inteiros de espécies de interesse agrônomo, marcadores microssatélites estão sendo desenvolvidos com base nas informações dessas sequências nos bancos de dados (BRONDANI, 2003; FOUET et al., 2011).

## **2.6. Mapeamento de genes de interesse**

### **2.6.1. Mapas genéticos e suas aplicações**

A construção de mapas genéticos tornou-se uma estratégia bastante útil nos programas de melhoramento genético de plantas, pois permitem uma ampla cobertura de genomas. Auxiliam também na decomposição completa de caracteres mais complexos, na localização de regiões genômicas que controlam características importantes e de interesse agrônomo, a quantificação do efeito destas regiões no fenótipo do indivíduo, além de facilitar a seleção assistida por marcadores e a clonagem de genes baseada em mapas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O mapeamento baseia-se na determinação das distâncias genéticas encontradas entre os marcadores, indicando a co-segregação durante a meiose, quando eles estão situados muito próximos nos cromossomos, e a possibilidade de permutação gênica quando estes se localizam distantes uns dos outros e com isso posiciona-os ao longo dos grupos de ligação (MARTINS, 1998). Em outras palavras, se dois ou mais marcadores situam-se muito

próximos uns dos outros no mesmo cromossomo, é pouco provável que ocorra um *crossing-over* ou permuta, entre eles, e desta forma, a chance deles serem herdados juntos é muito alta. Por outro lado, quando eles estão localizados mais distantes uns dos outros, essas chances aumentam consideravelmente, favorecendo altas taxas de recombinação gênica. Programas computacionais específicos estimam todas as combinações de locos e calculam essas taxas de recombinação através da comparação das frequências haplotípicas observada e esperada (LIU, 1998).

O tipo de população utilizada para mapeamento é uma etapa muito importante para o sucesso dos resultados, no entanto, independentemente do tipo de cruzamento, é importante que exista o máximo de polimorfismo entre os genitores utilizados e que sejam produzidas gerações que apresentem locos com desequilíbrio de ligação (TANKSLEY, 1993). Podemos entender como desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes quando estes, ao longo de sucessivas gerações, tendem manter-se ligados, e esta ligação física entre eles, atua na redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas no mesmo cromossomo (COELHO, 2000).

O mapeamento de genes pode ser considerado como uma das aplicações mais ousadas e impactantes da tecnologia dos marcadores moleculares. Com ele é possível, entre outras estratégias, selecionar indivíduos agronomicamente superiores com base apenas no marcador, sem que haja necessidade de avaliar diretamente a característica. Conhecida como Seleção Assistida por Marcadores (SAM), esta estratégia tem sido de grande utilidade para os melhoristas, especialmente nos casos de cultivo de plantas perenes, em que as avaliações são caras, demoradas e difíceis, devido aos longos ciclos de gerações, maturidade da planta e características fenotípicas de baixa herdabilidade (SOUZA, 2001). Contudo, outras estratégias de seleção baseada em marcadores também vêm sendo muito aplicadas nos programas de melhoramento. Os mapeamentos por associação podem ser realizados em populações naturais, coleções de germoplasma, conjunto de materiais elite, entre outras (PRITCHARD et al. 2000). A Seleção Genômica (SG) vem se tornando cada dia mais promissora nos programas de melhoramento genético, tanto animal, quanto vegetal, pois, estimam não somente os genes de grande efeito na variação fenotípica, mas todos os genes de pequeno e grande efeito (MEUWISSEN, 2001).

## 2.6.2. Mapeamento do cacauero e detecção de QTLs

Algumas características são de herança monogênica ou oligogênica e, portanto são controladas por um ou poucos genes. No entanto, a grande maioria das características de interesse agrônomo para os melhoristas, como por exemplo, produtividade de grãos, teor de gordura, açúcares e proteínas, altura e vigor da planta e até mesmo a resistência a doenças, são características controladas por vários genes, denominadas de poligênicas, quantitativas e de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs - *Quantitative Trait Loci*, (TANKSLEY, 2003). A detecção de QTLs num mapeamento permite mensurar o número de locos envolvidos na herança quantitativa, bem como suas localizações, modo de ação gênica (heterose, epistasia, dominância), além de possibilitar a decomposição da interação genótipos por ambientes, ao nível de cada QTL (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Contudo, a detecção de um QTL depende muito da expressividade do seu efeito sobre a característica, do tamanho da progênie avaliada, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como a herdabilidade da característica (TANKLEY, 1993). Além disso, é importante dispor de dados fenotípicos acurados de cada indivíduo da população que se pretende mapear.

A utilização de marcadores moleculares para construção de mapas genéticos em cacauero teve início com os estudos realizados por Lanaud et al. (1995). Eles utilizaram marcadores do tipo isoenzimáticos, RFLP e RAPD. A população utilizada foi uma progênie de 100 indivíduos do cruzamento entre dois genótipos contrastantes para resistência a doenças e a qualidade do chocolate produzido, os genótipos UPA402 e UF676. Trabalhos posteriores foram realizados também usando esta população, com adição de novos marcadores, aumentando assim a saturação dos mapas (RISTERUCCI et al., 2000; CROUZILLAT et al., 2001; CLEMENT, 2003a), e posteriormente, bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites foram utilizadas para mapeamento do cacauero (PUGH et al., 2004).

Diversos mapeamentos de QTLs foram realizados avaliando a resistência do *T. cacao* a doenças. Lanaud et al. (2000) e Clement et al. (2003a) identificaram QTLs relacionados com a resistência à podridão parda no grupo de ligação 4; Queiroz et al. (2003) e Faleiro et al. (2006) encontraram no grupo de ligação 9, QTLs envolvidos com a resistência à vassoura-de-bruxa; Brown et al. (2005) localizaram QTLs envolvidos com a resistência à vassoura-de-bruxa nos grupos de ligação 1 e 9; Albuquerque (2006) detectou um QTL relacionado com a resistência à vassoura-de-bruxa no grupo de ligação 4; Brown et al. (2007) identificaram QTLs envolvidos com a resistência à podridão parda nos grupos de ligação 4, 8 e 10.



Recentemente, Lanaud et al. 2009, por meio de uma meta-análise de 16 experimentos envolvendo QTLs, elaboraram um mapa consenso, no qual foram mapeados 76 QTLs relacionados com características de resistência à doenças do cacaueteiro, não somente para podridão parda e vassoura-de-bruxa, mas também para monilíase. Mais recentemente, Allègre et al. 2012, por meio de um mapeamento consenso feito com uma população F<sub>2</sub> da Ceplac (Sca6 x ICS1) e do CIRAD (UPA402 x UF676), obtiveram um mapa genético consenso com 1262 marcadores co-dominantes (SSRs e SNPs).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Progênie utilizada**

Inicialmente a população era composta apenas por 67 indivíduos (SIC-864♀ x CCN-51♂) cujas mudas eram de origem seminal, que estavam dispostas no campo experimental da CEPLAC desde 1996. Posteriormente, esta progênie foi ampliada clonalmente para novos estudos e foram obtidos 166 indivíduos utilizando os mesmo genitores, porém, com fecundação inversa (CCN-51♀ x SIC-864♂). Em seguida, cada indivíduo desses dois cruzamentos (67+166=233) foi clonado em 3 repetições e plantados entre 2006 e 2007, em um delineamento inteiramente casualizado em 3 blocos, com uma planta por parcela. Estas (233 x 3=699) plantas juntos com clones testemunhas, também repetidos, estão dispostas, na área experimental da Mars Cacau, Fazenda Almirante, situada no Km 2 da rodovia BR 101 no sentido Itabuna – Itajuípe, município de Barro Preto, Bahia (Anexo 1).

Neste estudo, iniciados em 2013 foram avaliadas 529 plantas (das 699 iniciais derivados dos dois cruzamentos), 390 plantas correspondendo ao cruzamento CCN-51 como genitor feminino e SIC-864 como genitor masculino (progênie tipo C-S) e 139 correspondendo ao cruzamento SIC-864 como genitor feminino e o CCN-51 como genitor masculino (progênie tipo S-C). Foram avaliados também, instalado no mesmo dispositivo, 73 plantas correspondendo às repetições dos clones testemunhas: CCN-51, SIC-864, Sca-6, SIC-23, PA-150 e UF-221 .

#### **3.2. Coleta de material vegetal em campo**

A coleta das folhas foi feita entre Abril e Maio de 2013. Para cada planta, foram coletadas três folhas em estágio intermediário de desenvolvimento. Todas foram devidamente identificadas em campo e logo em seguida levadas ao CEPEC. Cada folha passou por um

processo de assepsia com algodão umedecido numa solução de água contendo hipoclorito de sódio (NaClO). Após a limpeza, as folhas foram fracionadas em pequenos discos com auxílio de um cortador, acondicionadas em tubos eppendorf 2 ml com as respectivas identificações e em seguida estocadas em freezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após 48 horas de congelamento, as amostras foram liofilizadas em liofilizador LioBras L202 e depois estocadas em câmara fechada contendo sílica, que minimiza a umidade do ar, deixando as amostras por mais tempo desidratadas.

### 3.3. Extração de DNA

O DNA das amostras liofilizadas foi extraído seguindo o protocolo MATAB (Mixed AlkylTrimethylAmmonium Bromide) utilizado por Risterucci et al. (2000), adaptado por Santos et al. (2014), o qual é feito com a fragmentação de quatro discos foliares (aproximadamente 1 cm de diâmetro) dentro de tubos eppendorf 2 ml contendo uma esfera de aço inoxidável de 6 mm. Os tubos são inicialmente imersos e congelados em nitrogênio líquido e depois passam por uma agitação contínua e uniforme que resulta na trituração completa do material. Em seguida, foram adicionados 850  $\mu\text{L}$  de tampão de extração [Tris-HCl 100  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0; EDTA 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0; NaCl 1,4  $\text{mol.L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  10 mM; 1% PEG 6000; 2% MATAB] aquecido a  $-74^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. O MATAB foi utilizado porque ele maximiza as quantidades de DNA ao fim da extração, assim como demonstra ser um detergente mais eficiente na dissociação das paredes de células vegetais.

As amostras ficaram durante uma hora em banho-maria a  $74^{\circ}\text{C}$ , e a cada quinze minutos era feita uma agitação em vortex para homogeneizar a solução. Em seguida foram acrescidos a cada tubo 800  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram submetidas a uma centrifugação de 13200 rpm, durante trinta minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante resultante foi coletado e transferido para novos tubos que receberam 700  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado, homogeneizados gentilmente e em seguida colocados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo uma hora ou mais tempo (over night) para promover a precipitação. O próximo passo foi coletar os *pellets* e transferi-los para novo tubo, contendo uma solução de 200  $\mu\text{l}$  de TE (10  $\text{mmol.L}^{-1}$  Tris-HCl, EDTA 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0) + RNase a 1% e incubados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, e depois estocados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ao final do processo foi feita a verificação da integridade do DNA recém-extraído. Para isso, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra acrescida de 3  $\mu\text{L}$  do corante tipo IV (Bromofenol Blue a 0,25 %, sacarose 40 %) e 2  $\mu\text{L}$  de gel-red [1  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ], foi aplicada em gel de agarose a 2

%, utilizando como tampão de corrida o TAE 1X (EDTA 2 mol.L<sup>-1</sup>; Tris-acetato 9 mol.L<sup>-1</sup>) para realização de corrida eletroforética [V= 120, mA=300, W=80] em cuba horizontal por quarenta minutos.

### **3.4. Genotipagem da população utilizando marcadores SSR**

#### **3.4.1 Amplificações**

As reações de PCR foram conduzidas em termocicladores Eppendorf MasterCycler Gradient, em um volume final de 10 µL contendo aproximadamente 5ng de DNA a partir de 5µl de uma diluição de 1/100 do DNA concentrado, 0,4 µM para cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1x de solução tampão(ok)e 0,4 µL de Taq Polimerase. As amplificações foram realizadas utilizando-se o seguinte ‘TouchDown’ PCR: Desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguidos por 10 ciclos de desnaturação inicial a 94°C durante 30 segundos, anelamento do primer a 55°C e decréscimo de 1°C a cada ciclo e extensão da fita a 72° por 1 minuto, e 25 ciclos iniciados com denaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento dos primers a 46°C por 1 minuto, extensão final a 72°C durante 5 minutos. As amplificações foram realizadas utilizando duplex de primers com tamanhos de amplicons de no mínimo 50 pares de bases de diferença.

As amplificações através da PCR com os primers em duplex agilizaram o processo de genotipagem, pois, proporcionou a leitura de duas marcas por vez.

#### **3.4.2 Eletroforese em Poliacrilamida e revelação com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>)**

Foi utilizado o protocolo segundo Creste et al. (2001), adaptado por Gramacho et al. (2009). As placas de vidro contendo os géis passaram por uma pré-eletroforese durante uma hora, até alcançar uma temperatura de 55°C. Os amplicons obtidos nas amplificações foram diluídos na proporção 1:1 com o tampão de carregamento (Formamida; EDTA 0,5M; Azul de Bromofenol; Xilenocianol FF), submetidos a uma desnaturação de 4 minutos à 95°C e em seguida aplicados 4 µL da mistura em gel desnaturante (7M de ureia) de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X pH 8.3 (89 mM de Tris-HCl; 89 mM de ácido bórico; 2 mM EDTA) numa eletroforese de duas horas, em cuba de sequenciamento vertical BIORAD. A visualização das bandas é feita após a revelação com nitrato de prata.

### **3.4.3 Genotipagem em Sequenciador ABI3100**

Locos microssatélites polimórficos identificados por Dantas Neto et al. (2007) serviram como referência para desenho de primers marcados com fluorescência. Após as amplificações desses locos utilizando duplex de primers (amplicons e fluorescência diferentes), as amostras foram previamente visualizadas em agarose 2% e posteriormente diluídas para um volume final de 50 µL com água ultra-pura HPLC. Uma alíquota de 1 µL foi retirada e misturada com 8 µL de formamida e 1 µL de LIZ500. Amostras desnaturadas durante 4 minutos à 94°C e em seguida injetadas no sequenciador automático de DNA ABI3100 (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. A análise dos eletroferogramas foi feita com o software GeneMarker versão demo 1.91.

### **3.5. Avaliações Fenotípicas**

De 2008 a 2014, várias observações foram feitas no campo, a fim de se obter uma quantidade significativa de dados fenotípicos da progênie de estudo. As 529 plantas da população F1 juntamente com os dois genitores (CCN-51 e SIC-864) e mais 4 genótipos utilizados como testemunhas (SIC-23, Sca-6, UF-221 e PA-150), entre 2009 e 2013, foram avaliadas pela MARS cacau, a incidência de vassouras vegetativas (VV), vassouras de almofada floral (VA) e o vigor das plantas (diâmetro do tronco a 30 cm de altura). Para parâmetros de produtividade, foram avaliados o número de frutos coletados (NFC), que inclui os sadios, doentes, mumificados e/ou perdidos por outras causas (ataque de roedores, insetos, etc); número de frutos sadios (NFS), que foram os frutos sem a constatação de nenhum sintoma de doença; percentual de frutos com vassoura-de-bruxa (%FVB) e percentual de frutos com podridão parda (%FPP). Sendo que os dados referentes à VV e VA foram obtidos em coletas anuais, juntamente com a remoção das vassouras. Os dados referentes à produtividade foram obtidos ao longo de cada ano, sendo que de 2008 a 2014 foram feitas respectivamente: uma, quatro, seis, cinco, quatro, quatro e duas coletas. Os dados referentes ao vigor foram coletados uma única vez, em Junho de 2014, e eles foram utilizados para ajustar às médias do número de vassouras.

### **3.6. Mapeamento genético**

Das 390 plantas (incluindo as repetições) descendentes do cruzamento CCN-51 x SIC864, 160 foram utilizadas para extração do DNA e genotipagem, sendo que apenas um indivíduo de cada repetição teve seu DNA extraído. Além disso 118 SSR foram utilizados na triagem so com os genitores CCN-51 e SIC-864. As análises da matriz de genotipagem foi baseada na frequência de recombinação máxima de 45%, entre os marcadores e a função Kosambi para estabelecer as distâncias genéticas utilizando o programa JoinMap 4.1 (Van Ooijen, J.W., 2011),

### **3.7. Análises estatísticas e análise de QTLs**

Foram calculadas as estatísticas descritivas da produtividade e da resistência às doenças com auxílio do programa SAS. As variáveis analisadas neste estudo foram: número de vassouras vegetativas (VV), número de vassouras de almofada floral (VA), número de frutos colhidos (NFC), número de frutos sadios (NFS), porcentagem de frutos com vassoura-de-bruxa (%FVB) e porcentagem de frutos com podridão parda (%FPP). Foi analisada também a herdabilidade dessas características para estimar a precisão das variações fenotípicas por efeitos ambientais, através da equação  $H2_{clo} = Vc/[Vc + (Vb/nb) + (Ve/(nb \times nr))]$ , onde:  $H2_{clo}$  = herdabilidade clonal associada às variáveis estudadas;  $Vc$  = componente de variância associado ao efeito de clone;  $Vb$  = componente de variância associado ao efeito de bloco;  $Ve$  = componente de variância associado ao erro experimental;  $nb$  = número de blocos e  $nr$  = número médio de repetições dentro de bloco. Os componentes de variância foram estimados pelo Proc Mixed, do programa estatístico SAS. Os testes para comparação das médias (t-Student) foram feitos com o programa XLSTAT 2014. As análises de associação entre marcas e fenótipos, utilizando os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, foram feitas utilizando-se o software MapQTL 6.0. (Van Ooijen, J.W., 2011)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

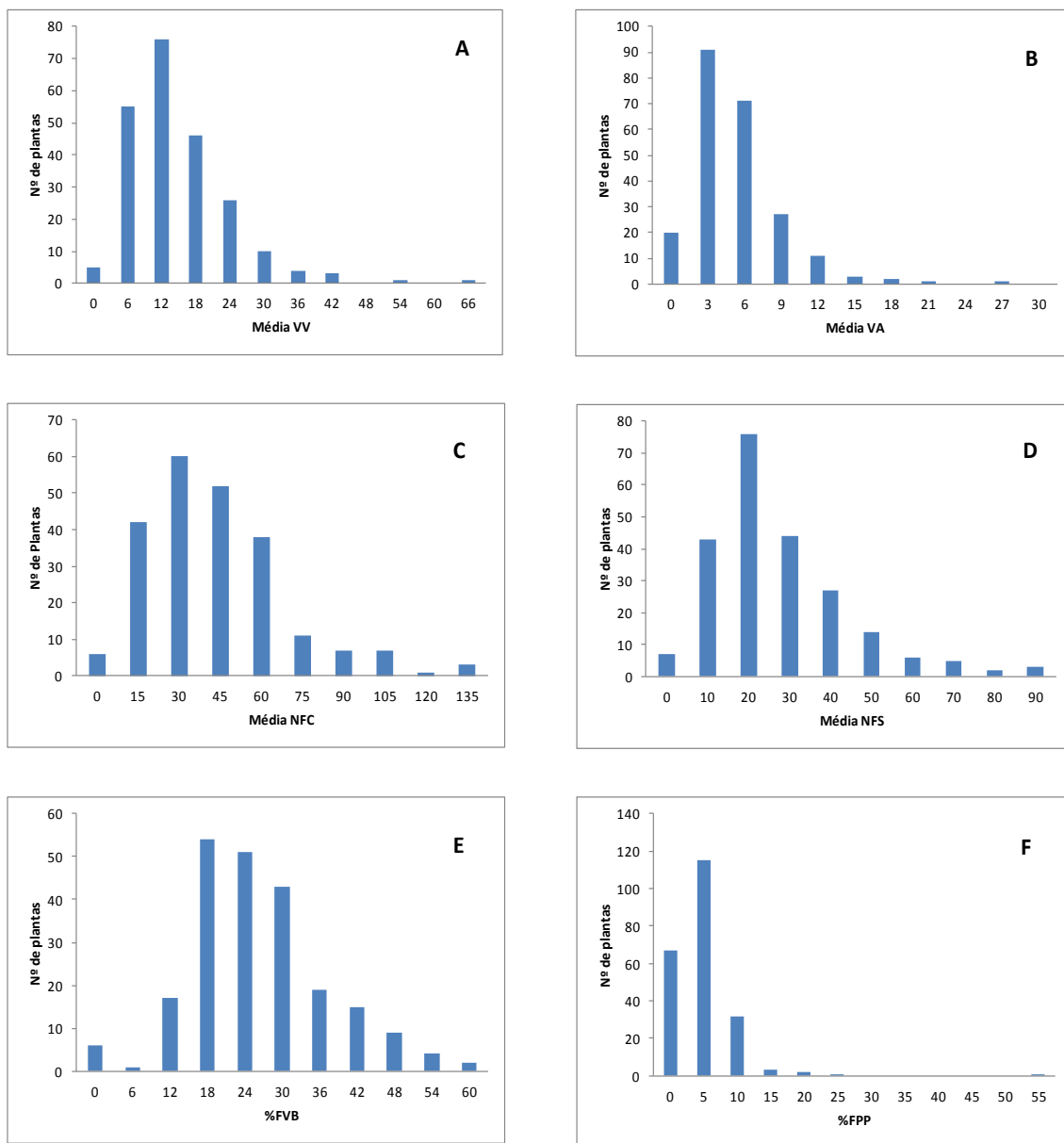
### 4.1. Estatísticas descritivas

#### 4.1.1. Análise da progênie CCN-51 x SIC-864 (tipo C-S)

O histograma de distribuição (Figura 1C) indica que um número relativamente grande de plantas apresentou uma produtividade mediana e até mesmo baixa, enquanto que um número menor de plantas mostraram-se mais produtivas. Verificou-se ainda que (Figura 1D) a distribuição de frutos sadios (NFS) segue uma curva semelhante à de NFC, indicando também que muitas plantas mantiveram seus frutos medianamente saudáveis, enquanto que um número menor de plantas apresentaram taxas mais elevadas de frutos saudáveis. Diante disso, podemos inferir que as características que conferem uma produtividade alta de frutos, presentes em ambos os genitores, foram herdadas por um número reduzido de plantas na progênie em estudo. Vale lembrar que estas plantas estão dispostas num espaçamento 3m x 3m, que vem sendo utilizado tradicionalmente na cultura do cacau, portanto, é pouco provável que essas variações na produtividade entre as plantas tenham ocorrido devido a uma taxa alta de competição entre elas, como nos casos em que o espaçamento entre cada planta é curto e acaba gerando uma competição maior por luz e nutrientes no campo experimental.

A resistência do cacauzeiro à *M. pernicioso*, segundo Pires et al. (1999), é do tipo poligênica, no entanto, as plantas da progênie resultante entre CCN-51 e SIC-864, que apresentaram-se em parte como resistentes à VB, não revelaram curvas de distribuição normal típica nos histogramas da Figura 1. Ao invés disso, mostraram-se sempre com uma tendência maior de resistência em um grupo menor de plantas, sugerindo uma herança do tipo não poligênica, mas com caráter dominante. Resultados similares foram demonstrados por Santos (2007a). Esse tipo de distorção nas curvas no sentido da maior resistência poderia ser justificado com a presença de um QTL de grande efeito. Portanto, é importante que haja uma melhor avaliação e atenção para os marcadores do grupo de ligação 5 apresentados no presente estudo, eles poderão contribuir favoravelmente em trabalhos futuros, visando a

adição de genes de resistência à vassoura-de-bruxa nos programas de melhoramento genético do cacauero.

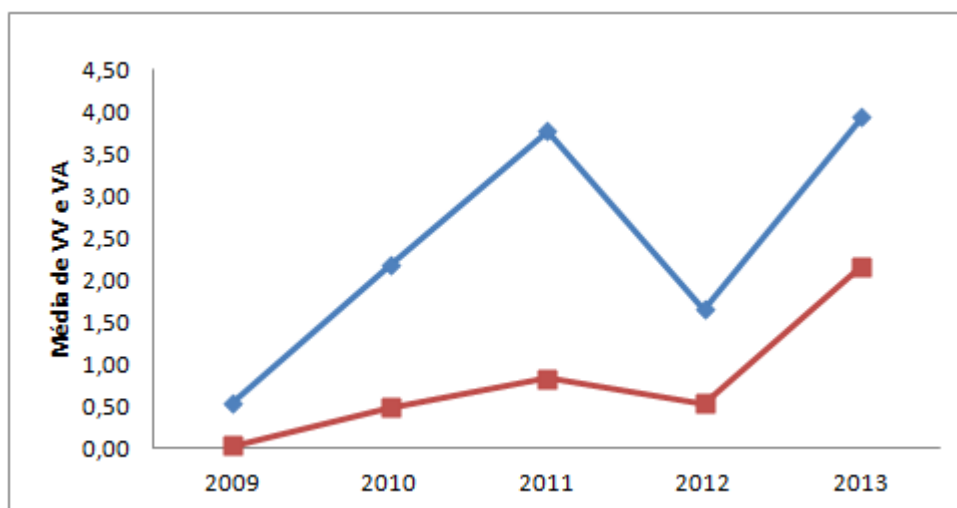


**Figura 1:** Histogramas de distribuição dos sintomas de vassoura-de-bruxa, podridão parda e da produtividade de 139 genótipos da progênie de cacauero CCN-51 x SIC-864, baseada em observações de campo no período de 2009 a 2013, onde VV=vassouras vegetativas, VA=vassouras de almofada floral, NFC=número de frutos colhidos, NFS=número de frutos saudios, %FVB=percentual de frutos com vassoura-de-bruxa, %FPP=percentual de frutos com podridão parda.

Observando as curvas no gráfico da Figura 2, é possível perceber que as médias de VV e VA na progênie de estudo vão aumentando com o passar do tempo, e que os valores de VV são sempre superiores a VA. Essas características podem estar associadas ao fato de que plantas recém-instaladas no campo entram em processo de pressão imposta pelo inóculo



presente no campo, quando o patógeno instala-se inicialmente nas partes aéreas da planta e consequentemente vai infectando outras partes do hospedeiro. Evidentemente, plantas muito jovens ainda não desenvolveram estruturas florais para serem infectadas, contudo, essas mesmas plantas já apresentam estruturas foliares propícias à infecção. Portanto, o aparecimento de VV e seu consequente aumento no hospedeiro são mais precoces do que o desenvolvimento de VA.



**Figura 2:** Incidência de vassouras vegetativas (VV - azul) e vassouras de almofada (VA - vermelho) nas 139 plantas do cruzamento CCN-51 x SIC-864, durante os anos de 2009 a 2013.

#### **4.1.2. Análise geral das progênies (tipo C-S e tipo S-C) juntamente com as testemunhas**

A estatística descritiva das variáveis analisadas apresenta uma amplitude muito grande (diferença entre o máximo e o mínimo) para todas as variáveis (tabela 1), isso indica que os caracteres de resistência a doenças e de produtividade são segregantes na população analisada, correspondendo a totalidade das plantas do cruzamento CCN-51 x SIC-864, SIC-864 x CCN-51 e dos clones testemunhas. As variáveis VA e %FPP foram as que apresentaram maiores coeficientes de variação, indicando que essas características tiveram uma significativa influência do meio contribuindo para essas variações.

**Tabela 1:** Estatística descritiva da severidade dos sintomas de vassoura-de-bruxa, podridão parda e da produtividade de plantas geradas do cruzamento entre os clones CCN-51 e SIC-864 e clones testemunhas (Sca-6, SIC-23, PA-150, UF-221), baseada em observações de campo no período de 2009 a 2013.

	<b>Variáveis*</b>					
	<b>VV</b>	<b>VA</b>	<b>NFC</b>	<b>NFS</b>	<b>%FVB</b>	<b>%FPP</b>
<b>Nº observações</b>	591	591	592	592	544	544
<b>Média</b>	11,60	3,98	34,70	20,87	24,10	2,58
<b>Mínimo</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Máximo</b>	79	43	280	143	100	100
<b>Coef. Variação</b>	86,51	123,96	78,45	85,99	71,63	232,62
<b>Desvio padrão</b>	11,36	5,22	33,93	21,90	17,04	6,20
<b>Herdabilidade</b>	0,38	0,23	0,54	0,56	0,21	0,08

(\*) VV=vassouras vegetativas, VA=vassouras de almofada floral, NFC=número de frutos colhidos, NFS=número de frutos saudáveis, %FVB=percentual de frutos com vassoura-de-bruxa, %FPP=percentual de frutos com podridão parda

Foi analisada também a herdabilidade dessas características para estimar a acurácia das variações fenotípicas. Os coeficientes de herdabilidade (Tabela 1) para as características de produção NFC (0,54) e NFS (0,56) foram relativamente superiores que aquelas para caracteres relacionados à resistência à vassoura-de-bruxa (0,21 – 0,38) (Tabela 1). Valores altos na herdabilidade indicam que grande parte da variação fenotípica observada está associada a fatores genéticos. O baixo coeficiente de herdabilidade observado no percentual de frutos com podridão parda (0,08) indica que esta característica é bastante afetada por fatores ambientais no local de avaliação. Haja visto também que esse valor tão baixo concerne com o valor alto do coeficiente de variação apresentado por %FPP (232,62%), dando mais suporte a ideia de que esta variável responde muito pela influência imposta pelo ambiente local. Em contrapartida, Dantas Neto et al. (2005) encontraram coeficientes de herdabilidade mais altos para as variáveis %FVB (0,43) e especialmente para %FPP (0,49), estimando os valores utilizando a covariância como 1º componente principal.

Quando comparamos a porcentagem de frutos afetados com sintomas de doença, é claramente perceptível uma média maior de frutos afetados por vassoura-de-bruxa (VB) do que de frutos afetados por podridão parda (PP), evidenciando uma suscetibilidade maior dessa progênie à VB ou uma maior ocorrência de vassoura-de-bruxa na área. Uma maior suscetibilidade à vassoura-de-bruxa também foi observada tanto nos genitores do cruzamento (CCN-51 e SIC-864) como nos clones usados como testemunhas (Tabela 2).

Embora Dantas Neto et al. (2005), trabalhando com essa progênie, tenham encontrado resultados não muito discrepantes ao comparar os percentuais de infecção das duas doenças

nos frutos, a média de frutos com podridão parda foi ligeiramente maior que a média de frutos com vassoura-de-bruxa, embora o coeficiente de variação para %FVB tenha sido maior. Esses resultados podem nos levar a questionar se depois de algum tempo sendo inoculadas naturalmente no campo, as plantas tornam-se mais suscetíveis a VB e menos suscetíveis a PP, ou se esses resultados refletem apenas as condições climáticas favorecendo mais a uma doença e menos a outra, ou se existe alguma competição interespecífica entre os patógenos causadores das doenças. Entretanto, vale ressaltar que eles analisaram apenas 67 plantas geradas de um cruzamento utilizando o SIC-864 como genitor feminino e o CCN-51 como genitor masculino, fato este que pode ter gerado dados menos precisos em relação ao período de avaliação. No presente estudo são apresentados tanto dados referentes às plantas geradas utilizando o CCN-51 como genitor masculino e SIC-864 como genitor feminino, assim como o recíproco, o CCN-51 como genitor feminino e SIC-864 como genitor masculino, além de dados referentes a outros genótipos como testemunhas, incluindo suas respectivas repetições (Tabela 1).

**Tabela 2.** Médias das variáveis estimadas durante o período de 2009 a 2013, para os genótipos usados como testemunhas, incluindo os genitores do cruzamento.

Testemunhas	Variáveis*					
	VV	VA	NFC	NFS	%FVB	%FPP
CCN-51	6,72	2,89	22,67	13,11	11,78	1,08
Pa-150	6,42	1,92	10,75	7,92	16,94	0
SIC-23	12,29	4,14	22,5	11,86	43,81	0,84
SIC-864	9,6	2,2	7,9	4,4	20,14	0,22
Sca-6	1,11	1,56	13,33	8	27,07	0,78
UF-221	5,33	7,67	10,11	4,56	45,49	0

(\*) VV=vassouras vegetativas, VA=vassouras de almofada floral, NFC=número de frutos colhidos, NFS=número de frutos sadios, %FVB=percentual de frutos com vassoura-de-bruxa, %FPP=percentual de frutos com podridão parda

Ao comparar os valores dos parentais (Tabela 2), é notável que o genótipo CCN-51 apresentou uma suscetibilidade menor do que o genótipo SIC-864, levando em consideração o número total de vassouras (VV+VA). Além disso, o percentual de frutos infectados com VB foi menor em CCN-51 (11,78), enquanto que em SIC-864 esse percentual foi mais elevado (20,14). Entretanto, quando se refere aos sintomas de podridão parda nos frutos, o SIC-864 apresenta-se menos suscetível do que o CCN-51, indicando que nessa área, embora as médias de frutos com sintomas de podridão tenham sido baixas para todos os genótipos testemunhas, o SIC-864 tenha se comportado como mais resistente que os demais genótipos usados como

testemunhas, exceto os genótipos PA-150 e UF-221, que ambos apresentaram zero nas médias. Contudo, resultados encontrados por Bahia (2007), mostraram um comportamento diferente para os genótipos testados como testemunhas, inoculados com *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora citrophthora*. Embora os dados apresentados sejam referentes aos níveis de infecção avaliados em discos foliares, a média nos níveis de infecção do SIC-864 (catongo) foi de 2,10, enquanto que para o CCN-51 foi de 1,18. Além disso, os genótipos CCN-51 e SIC-864 não diferiram estatisticamente em relação aos níveis de infecção ao *P. palmivora*, enquanto que para os níveis de infecção ao *P. citrophthora* eles diferiram estatisticamente.

A avaliação fenotípica dos sintomas de doença nos frutos foi feita apenas com análise visual, ou seja, detectando ou não a presença do sintoma no fruto. Testes de cultura para identificação das espécies presentes nos tecidos vegetais não foram feitos. Portanto, é provável que nesta área, seja mais comum a presença das espécies *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, que segundo Luz (1989), são consideradas menos agressivas ao cacaueiro, além disso, *P. palmivora* encontra-se mais amplamente disseminada, enquanto que a espécie *Phytophthora citrophthora*, considerada a mais agressiva entre as espécies causadoras de podridão parda, pode não estar ocorrendo nessa área. Áreas com altos índices de infecção causada por *P. citrophthora*, certamente apresentariam uma incidência mais elevada de frutos com sintomas de podridão parda.

A incidência de frutos com sintomas apresentou uma amplitude muito grande, sendo os valores mínimos e máximos para as variáveis %FVB e %FPP, foram respectivamente 0 e 100. Entretanto, a média percentual de frutos infectados por VB foi maior que aquela por PP, indicando que a progênie de estudo é mais suscetível à vassoura-de-bruxa.

A Tabela 3 mostra as análises de variância obtidas para as plantas da progênie, genitores e também para as testemunhas, em relação aos clones e blocos. Utilizando como fontes de variação os clones e os blocos, é possível observar que houve tanto variações significativas como não significativas para as variáveis analisadas, mostrando também que existe uma variabilidade notável entre as plantas do cruzamento, entre os genitores e também entre os genótipos testemunhas.

As análises de variância para as variáveis NFC e NFS apresentaram variações significativas para os efeitos de clones e de blocos. Estes resultados mostram que há variação estatisticamente significativa entre os clones estudados, para as estas duas características. Contudo, observando as análises de variância das variáveis %FVB e %FPP, os efeitos de clone não foram estatisticamente significativas, mostrando que a severidade da doença pode

estar sendo influenciada por condições ambientais (clima, solo, relevo), mas muito provavelmente, devido à baixa incidência da doença na área, particularmente para o caso da podridão parda (2,58% - Tabela 1).

Observando os dados da Tabela 1, referentes ao número de vassouras vegetativas (VV) e vassouras de almofada floral (VA), percebe-se que o número médio de vassouras vegetativas por planta, bem como a amplitude (diferença entre máximo e mínimo), foi superior àquele observado para vassouras de almofada. Estas tendências também podem ser observadas nas Figuras 1A e 1B. Na Tabela 1 e nas Figuras 1A e 1B observa-se uma razoável variação entre os indivíduos da população CCN-51 x SIC-864 e que parte desta variação é geneticamente controlada ( $H^2 = 0,23-0,38$ ), indicando que esta população é adequada para estudos mapeamento de genes associados àquelas duas variáveis (VV e VA). A herdabilidade clonal associada VV foi 1,6 vezes maior que aquela associada à VA, indicando que os fatores ambientais afetaram menos a variação em VV. Esses dados permitem especular que essa população apresenta-se mais suscetível a vassouras vegetativas do que a vassouras de almofada floral. Contudo, fazer comparações entre suscetibilidade à VV e VA pode gerar resultados contraditórios, levando em consideração que a maior incidência de VV pode estar relacionada com a maior quantidade de pontos de infecções nas copas das plantas, em relação aos pontos de infecção nas almofadas. Por outro lado, se tivermos situações em que os pontos de infecção nas almofadas forem superiores, é provável que uma incidência maior de VA seja detectada.

Resultados apresentados por Pires (2003), avaliando a presença de vassouras vegetativas e vassouras de almofada em vários acessos do germoplasma da ceplac, mostraram que variedades de cacau da Bahia (séries CEPEC, SIC) e do Espírito Santo (EEG), comportaram-se mais suscetíveis às vassouras vegetativas, ao passo que, variedades do Acre (séries RB, AC) e grupos não amazônicos do México e Costa Rica (séries RIM, MEX e UF) apresentaram maior suscetibilidade a vassouras de almofada floral. A série CCN que também foi avaliada apresentou médias muito próximas entre VV e VA, contudo, essas médias foram significativamente mais baixas quando comparadas com a maioria das outras variedades testadas, dando destaque à série CCN como possível fonte de genes de resistência para programas de melhoramento.

**Tabela 3:** Análise de variância dos sintomas de vassoura-de-bruxa, podridão parda e da produtividade de plantas geradas do cruzamento entre os clones CCN-51 e SIC-864 e clones testemunhas (Sca-6, SIC-23, PA-150, UF-221), baseada em observações de campo no período de 2009 a 2013.

Variável*	Fonte	GL	SQ	QM	F	Probabilidade	
VV	Clone	232	36200,38	156,04	1,55	0,0001	
	Bloco	2	3040,46	1520,23	15,09	<0,0001	
	Erro	356	35862,54	100,74			
VA	Clone	232	6677,83	28,78	1,18	0,0807	NS
	Bloco	2	647,01	323,50	13,26	<0,0001	
	Erro	356	8685,39	24,40			
NFC	Clone	232	337101,93	1453,03	2,01	<0,0001	
	Bloco	2	24066,53	12033,27	16,63	<0,0001	
	Erro	356	257630,34	723,68			
NFS	Clone	232	154018,45	663,87	2,06	<0,0001	
	Bloco	2	13582,46	6791,23	21,08	<0,0001	
	Erro	356	114695,57	322,18			
%FVB	Clone	226	62339,26	275,84	0,92	0,7422	NS
	Bloco	2	502,55	251,27	0,84	0,4328 NS	
	Erro	314	93948,79	299,20			
%FPP	Clone	226	9459,00	41,85	1,15	0,1216 NS	
	Bloco	2	15,99	7,99	0,22	0,8024 NS	
	Erro	314	11393,39	36,28			

(\*) VV=vassouras vegetativas, VA=vassouras de almofada floral, NFC=número de frutos colhidos, NFS=número de frutos sadios, %FVB=percentual de frutos com vassoura-de-bruxa, %FPP=percentual de frutos com podridão parda

Provavelmente, a variabilidade genética detectada entre diferentes isolados de *M. pernicioso* seja responsável por diferentes manifestações sintomáticas no que diz respeito ao tipo e quantidade de vassoura num hospedeiro. Jucá (2009), utilizando isolados de VV e VA tanto de clones resistentes como de suscetíveis, constatou uma agressividade superior dos isolados provenientes de VA em relação aos isolados de VV. Além disso, os isolados provenientes de genótipos resistentes à vassoura-de-bruxa foram mais agressivos em clones resistentes, no entanto, os isolados de genótipos suscetíveis foram menos agressivos em genótipos resistentes.

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação entre as variáveis utilizadas nas análises. Os coeficientes de correlação entre NFC, NFS e PSU foram muito altos e positivos, indicando que esses caracteres de produção estão intimamente relacionados. Assim, em programas de seleção, pode-se medir somente uma das três variáveis em vez de medir as três, reduzindo-se os custos e o tempo de avaliação. Como a avaliação do número de frutos é mais rápida que a do peso de sementes úmidas e as correlações entre elas são elevadas, pode-se medir somente o primeiro, ou seja, avaliando somente NFS o pesquisador estaria estimando

os valores de PSU, sem ter que necessariamente abrir os frutos, remover todas as sementes e pesar as mesmas. Além disso, essas mesmas variáveis mostraram-se correlacionadas com o diâmetro do tronco e a altura das plantas. Teoricamente, plantas de maior porte apresentam maiores áreas de superfície no tronco e nos galhos, oferecendo áreas de superfície maiores para o desenvolvimento de almofadas florais, e teoricamente, mais frutos podem ser produzidos.

A correlação entre VV e VA, embora altamente significativa estatisticamente, não foi tão elevada ( $r= 0.471$ , Tabela 4) sugerindo que pelo menos alguns dos genes controlando a resistência na copa e nas almofadas são diferentes. Assim, o melhorista ao selecionar plantas resistentes à vassoura-de-bruxa deve considerar o nível de severidade da doença nos dois locais da planta. Já as correlações entre VV/VA e a porcentagem de frutos infectados por vassoura-de-bruxa foram bastante baixas, sugerindo que resistência nas almofadas ou copa não implica em resistência no fruto.

As correlações entre o número de vassouras (VV, VA) e as variáveis de produção (NFC, NFS, PSU) foram positivas e cerca 0,3 (Tabela 4). Assim, pelo menos nesta população, plantas mais produtivas tendem a ter mais vassouras na copa e nas almofadas. Entretanto, com este valor de correlação deve existir na população indivíduos com elevada produção, sem necessariamente ter elevada severidade por vassoura na copa e almofada.

A progênie avaliada neste trabalho segrega para várias características, inclusive para resistência a vassoura-de-bruxa, podridão parda e também para caracteres de produtividade. Nota-se uma grande amplitude de variação em todas as características, fornecendo subsídios que dão importância a essa população em estudos de mapeamento genético objetivando a ampliação das bases genéticas do melhoramento do *Theobroma cacao* L.

**Tabela 4:** Coeficientes da correlação de Pearson, probabilidade deste não ser diferente de zero e número de pares de valores usados na correlação.

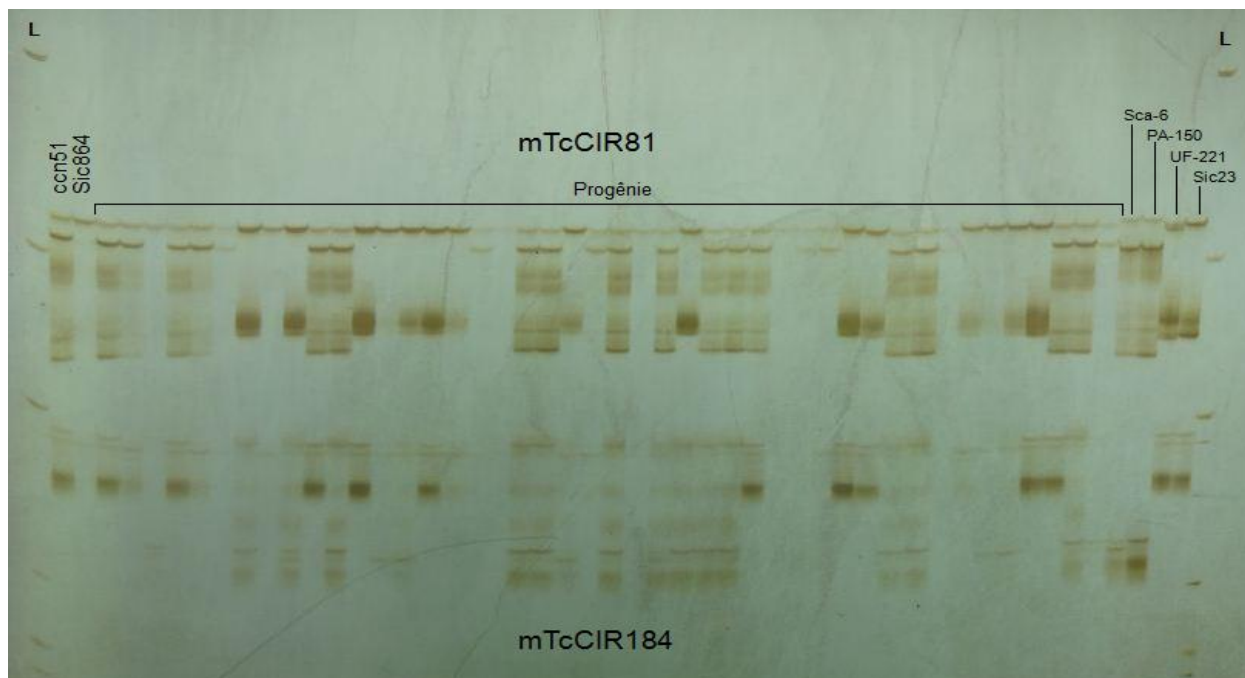
	<b>VV</b>	<b>VA</b>	<b>NFC</b>	<b>NFS</b>	<b>PSU</b>	<b>%FVB</b>	<b>%FPP</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Altura</b>
<b>VV</b>	1	0,471	0,365	0,303	0,293	0,043	-0,031	0,421	0,126
		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3178	0,4722	<0,0001	0,0021
	591	591	591	591	591	543	543	588	588
<b>VA</b>	0,471	1	0,234	0,204	0,170	0,094	-0,050	0,323	0,102
	<0,0001		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0283	0,2452	<0,0001	0,0135
	591	591	591	591	591	543	543	588	588
<b>NFC</b>	0,365	0,234	1	0,923	0,861	-0,166	-0,004	0,518	0,331
	<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001	0,0001	0,934	<0,0001	<0,0001
	591	591	592	592	592	544	544	588	588
<b>NFS</b>	0,303	0,204	0,923	1	0,945	-0,248	-0,028	0,482	0,342
	<0,0001	<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001	0,5109	<0,0001	<0,0001
	591	591	592	592	592	544	544	588	588
<b>PSU</b>	0,293	0,170	0,861	0,945	1	-0,230	-0,025	0,491	0,332
	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		<0,0001	0,5569	<0,0001	<0,0001
	591	591	592	592	592	544	544	588	588
<b>%FVB</b>	0,043	0,094	-0,166	-0,248	-0,230	1	-0,057	-0,091	-0,116
	0,3178	0,0283	0,0001	<0,0001	<0,0001		0,1875	0,0346	0,0071
	543	543	544	544	544	544	544	541	541
<b>%FPP</b>	-0,031	-0,050	-0,004	-0,028	-0,025	-0,057	1	-0,136	0,068
	0,4722	0,2452	0,934	0,5109	0,5569	0,1875		0,0015	0,1136
	543	543	544	544	544	544	544	541	541
<b>Diâmetro</b>	0,421	0,323	0,518	0,482	0,491	-0,091	-0,136	1	0,100
	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0346	0,0015		0,0157
	588	588	588	588	588	541	541	588	588
<b>Altura</b>	0,126	0,102	0,331	0,342	0,332	-0,116	0,068	0,100	1
	0,0021	0,0135	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0071	0,1136	0,0157	
	588	588	588	588	588	541	541	588	588

VV=vassouras vegetativas, VA=vassouras de almofada floral, NFC=número de frutos colhidos, NFS=número de frutos sadios, %FVB=percentual de frutos com vassoura-de-bruxa, PSU=peso de sementes úmidas, %FPP=percentual de frutos com podridão parda



## 4.2. Genotipagem em géis de poliacrilamida 6%

Dos 118 SSR da série mTcCIR de microssatélites que foram utilizados na triagem dos marcadores polimórficos com os genitores CCN-51 e SIC-864, 62 amplificaram nas condições da PCR citadas na metodologia, dos quais 30 apresentaram polimorfismo entre os genitores, e estes foram utilizados na genotipagem da população em acrilamida.



**Figura 3:** Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata mostrando o padrão de bandas para dois marcadores microssatélites (mTcCIR81 e mTcCIR184) e as segregações do tipo 1:1 esperadas para locos onde um genitor é homocigoto e o outro heterocigoto.

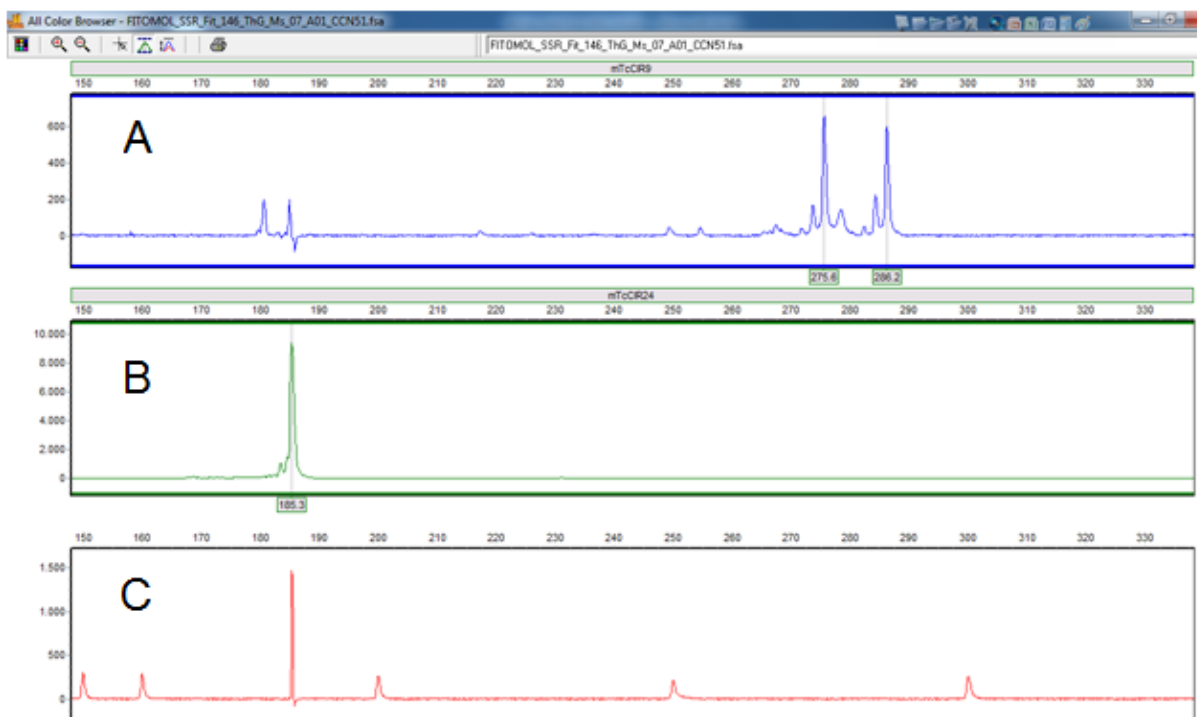
Dentre os 30 marcadores utilizados na genotipagem em géis de poliacrilamida, apenas 20 apresentaram uma boa leitura suficiente para não gerar erros de genotipagem devido a algumas revelações de baixa qualidade que prejudicaram as visualizações e foram conservados na matriz de genotipagem.

## 4.3. Genotipagem em sequenciador ABI3100

Adicionalmente, 18 primers microssatélites (também da série mTcCIR) polimórficos, marcados com fluorescência, identificados por Dantas Neto et al. (2007) foram utilizados também na genotipagem da progênie em sequenciador ABI3100. Dentre eles, somente 10 marcadores mostraram-se aptos para serem utilizados na matriz de genotipagem para o JoinMap4.1, os demais foram descartados por apresentarem uma leitura não confiável nos

tamanhos dos alelos, ou por apresentar distorções na segregação mendeliana clássica esperada.

Eventualmente, alguns marcadores apresentam uma segregação mendeliana não esperada, e nesses casos, fica a critério do pesquisador decidir se eles entram ou não no mapeamento. Alguns autores não recomendam o uso de marcadores com distorção de segregação, justificando que estes podem dificultar os testes de detecção de ligação gênica, influenciando negativamente as estimativas de distância e ordem dos marcadores nos grupos de ligação (YAO et al., 1999; BEARZOTI, 2000). Entretanto, outros autores utilizam marcadores com segregações distorcidas em estudos de mapeamento genético (OLIVEIRA et al., 2004), detectam grupos de ligação baseados no nível de probabilidade utilizado em testes de segregação individual, contudo, não conseguem afirmar ao certo os efeitos provenientes da utilização destes marcadores.



**Figura 4:** Interface do software GeneMarker 1.91, utilizado nas leituras dos eletroferogramas resultantes da genotipagem dos 18 primers marcados com fluorescência. Onde A= amplicons de 275 e 286 pb gerados pelo primer mTcCIR9; (B)= amplicons de 185 pc gerados pelo primer mTcCIR24 e (C)= amplicons de tamanhos padronizados, gerados pelo LIZ500.

#### 4.4. Controle da legitimidade da progênie

Dentre as 160 plantas da progênie genotipadas, 21 apresentaram um padrão de segregação não esperado para os locos analisados, caracterizando possivelmente, indivíduos não pertencentes à população. Tais eventos não são raros em cacau, considerando as diversas

chances de erro que ocorrem da polinização ao estabelecimento das plantas no campo, passando pela enxertia de grande número de plantas. As plantas avaliadas neste trabalho foram desenvolvidas inicialmente através do plantio de sementes, na CEPLAC. Depois de algum tempo elas foram repetidas em triplicatas de clones e posteriormente transportadas para o campo experimental da MARS Cacau, na Fazenda Almirante, onde estão hoje plantadas. A fim de evitar resultados inconsistentes, essas 21 plantas detectadas como potencial erro foram removidas das análises de mapeamento, portanto, nossa progênie de mapeamento foi reduzida para 139 plantas. Devido a presença de 13% de plantas ilegítimas dos 160 indivíduos genotipados, recomenda-se para o futuro deste estudo fazer uma genotipagem de todas as plantas representativas, das progenies CCN-51 x SIC-864 e SIC-864 x CCN-51 e dos clones testemunhas (CCN-51, SIC-864, Sca-6, SIC-23, PA-150 e UF-221)

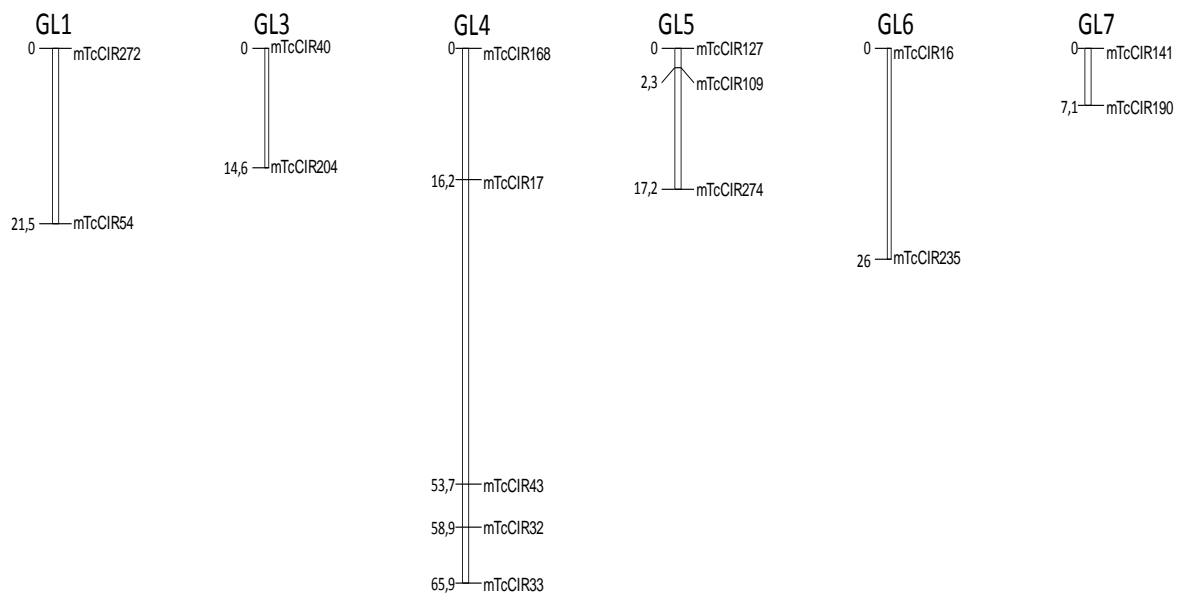
#### **4.5. Mapeamento genético parcial da progênie**

A matriz de genotipagem total foi montada com 30 marcadores microssatélites (tabela 5) e 139 indivíduos descendentes do cruzamento entre os genótipos CCN-51 e SIC-864. Os dados moleculares dos locos e as suas respectivas frequências de recombinações foram analisados com o software JoinMap4.1 e o mapeamento parcial desse cruzamento é apresentado com 16 marcadores (14 marcadores não agregaram em nenhum grupo de ligação) apresentados na Tabela (5) com frequência em cada locus e com os grupos de ligação na figura 4. Além disso, dentre as diversas combinações possíveis resultantes de um cruzamento entre dois heterozigotos os 16 locus da tabela (5) mostraram uma segregação somente do tipo heterozigoto para CCN-51 (Im) e homozigoto para SIC864 (II). O número reduzido de marcadores utilizados neste mapeamento parcial não pode permitir estimar corretamente as distâncias entre os marcadores ordenados como nos mapas saturados (PUGH et al. 2004; ALLÈGRE et al, 2012).

**Tabela 5:** Marcadores microssatélites utilizados na matriz de genotipagem para mapeamento com as frequências dos alelos. Os 16 marcadores destacados foram posicionados nos grupos de ligação.

Nr	Locus	Segregação	ll	lm	nn	np	--	X2	Df	Signif.	Classificação
1	mTcCIR2	<nnxnp>	0	0	41	59	39	3.24	1	*	[nn:np]
2	<b>mTcCIR33</b>	<lmxll>	53	53	0	0	33	0.00	1	-	[ll:lm]
3	mTcCIR7	<lmxll>	66	42	0	0	31	5.33	1	**	[ll:lm]
4	mTcCIR22	<nnxnp>	0	0	43	59	37	2.51	1	-	[nn:np]
5	mTcCIR9	<lmxll>	60	49	0	0	30	1.11	1	-	[ll:lm]
6	mTcCIR11	<lmxll>	61	71	0	0	7	0.76	1	-	[ll:lm]
7	<b>mTcCIR16</b>	<lmxll>	43	34	0	0	62	1.05	1	-	[ll:lm]
8	<b>mTcCIR17</b>	<lmxll>	39	39	0	0	61	0.00	1	-	[ll:lm]
9	<b>mTcCIR40</b>	<lmxll>	70	56	0	0	13	1.56	1	-	[ll:lm]
10	<b>mTcCIR43</b>	<lmxll>	70	56	0	0	13	1.56	1	-	[ll:lm]
11	<b>mTcCIR54</b>	<lmxll>	59	61	0	0	19	0.03	1	-	[ll:lm]
12	<b>mTcCIR32</b>	<lmxll>	71	59	0	0	9	1.11	1	-	[ll:lm]
13	<b>mTcCIR109</b>	<lmxll>	67	57	0	0	15	0.81	1	-	[ll:lm]
14	mTcCIR119	<lmxll>	69	54	0	0	16	1.83	1	-	[ll:lm]
15	mTcCIR10	<nnxnp>	0	0	58	76	5	2.42	1	-	[nn:np]
16	<b>mTcCIR235</b>	<lmxll>	73	63	0	0	3	0.74	1	-	[ll:lm]
17	<b>mTcCIR168</b>	<lmxll>	68	67	0	0	4	0.01	1	-	[ll:lm]
18	mTcCIR81	<lmxll>	66	67	0	0	6	0.01	1	-	[ll:lm]
19	mTcCIR184	<lmxll>	60	69	0	0	10	0.63	1	-	[ll:lm]
20	<b>mTcCIR141</b>	<lmxll>	62	73	0	0	4	0.90	1	-	[ll:lm]
21	mTcCIR189	<lmxll>	64	64	0	0	11	0.00	1	-	[ll:lm]
22	<b>mTcCIR190</b>	<lmxll>	58	80	0	0	1	3.51	1	*	[ll:lm]
23	mTcCIR126	<lmxll>	65	69	0	0	5	0.12	1	-	[ll:lm]
24	<b>mTcCIR204</b>	<lmxll>	76	55	0	0	8	3.37	1	*	[ll:lm]
25	mTcCIR218	<lmxll>	65	72	0	0	2	0.36	1	-	[ll:lm]
26	<b>mTcCIR272</b>	<lmxll>	66	66	0	0	7	0.00	1	-	[ll:lm]
27	mTcCIR264	<lmxll>	58	80	0	0	1	3.51	1	*	[ll:lm]
28	<b>mTcCIR127</b>	<lmxll>	65	74	0	0	0	0.58	1	-	[ll:lm]
29	mTcCIR245	<lmxll>	52	69	0	0	18	2.39	1	-	[ll:lm]
30	<b>mTcCIR274</b>	<lmxll>	60	49	0	0	30	1.11	1	-	[ll:lm]

O mapa elaborado nesse trabalho apresenta uma distribuição de 16 marcadores ordenados em 6 grupos de ligação (Figura 5). A cobertura total do mapa foi de 152,3 cM, sendo que a média de distância entre os marcadores foi de 9,51 cM. O tamanho dos grupos de ligação oscilaram entre 7,1 cM e 65,9 cM.



**Figura 5.** Mapeamento genético parcial do cruzamento CCN51 x SIC864, evidenciando marcadores em 6 dos 10 grupos de ligação do *Theobroma cacao*.

#### 4.6. Associação Marca-Fenótipo

Embora os resultados da genotipagem e do mapeamento genético parcial não sejam suficientes para o mapeamento de QTLs, é possível analisar individualmente a associação de cada marcador com a variação fenotípica das plantas avaliadas em campo durante os cinco anos de estudo. Informações do fenótipo referentes às vassouras vegetativas e de almofada floral, produtividade e sintomas das doenças vassoura-de-bruxa e podridão parda nos frutos puderam ser analisados e possivelmente associados com alguns dos marcadores utilizados neste trabalho. Com esses dados foi possível analisar e associar algumas marcas com possíveis regiões que respondem pela variação fenotípica das características de vassouras no presente estudo. As informações resultantes do agrupamento de marcadores no JoinMap4.1, somadas aos dados moleculares dos locos genotipados e aos valores médios das variáveis dos indivíduos da progênie fenotipados, foram utilizadas para as análises com MapQTL 6.0, análise não paramétrica de Kruskal-Wallis (K) baseada em um teste de rank. Além disso, as associações marcadores-fenótipos foram realizadas com um teste de comparação independente de duas amostras (t-Student). Os resultados obtidos com as duas abordagens revelaram valores de significância na variação fenotípica para alguns marcadores.

#### 4.6.1. Vassouras vegetativas (VV) e vassouras de almofada floral (VA)

A formação de brotamentos foliares nos hospedeiros caracteriza o mais comum sintoma da doença vassoura-de-bruxa do cacauieiro. No entanto, as manifestações desses brotamentos podem se dar em diferentes pontos da planta e em diferentes intensidades, ocorrendo preferencialmente na parte aérea, especialmente nos tecidos meristemáticos (OLIVEIRA & LUZ, 2012).

Conforme mostrado na tabela 6, dentre os marcadores analisados, podemos destacar os marcadores mTcCIR127, mTcCIR109, mTcCIR274, todos pertencentes ao grupo de ligação 5 e localizam-se em regiões muito próximas de acordo com o mapa consenso de Allègre et al. (2012), e o marcador mTcCIR126, que embora não tenha apresentado valor de probabilidade significativa no teste t-Student, apresentou-se significativa na análise de Kruskal-Wallis para os sintomas de vassouras. Vale ressaltar que o grupo de ligação 9 apresenta alguns QTLs de resistência não somente para vassoura-de-bruxa, mas também para podridão parda, conforme mostra a meta análise de Lanaud et al. (2009), que utilizou 16 mapeamentos realizados em diferentes locais e utilizando diferentes cruzamentos. Embora os resultados da meta análise não apresentem o mTcCIR126 associado com alguma região de QTL, ele está relativamente próximo às regiões associadas à QTLs desse grupo. Portanto, ele também deve estar associado a um QTL de resistência à vassoura-de-bruxa, visto que dentre os cruzamento inclusos na meta análise, o CCN-51 não foi utilizado, fortalecendo a ideia de que ele é um bom candidato a resistência à vassoura-de-bruxa.

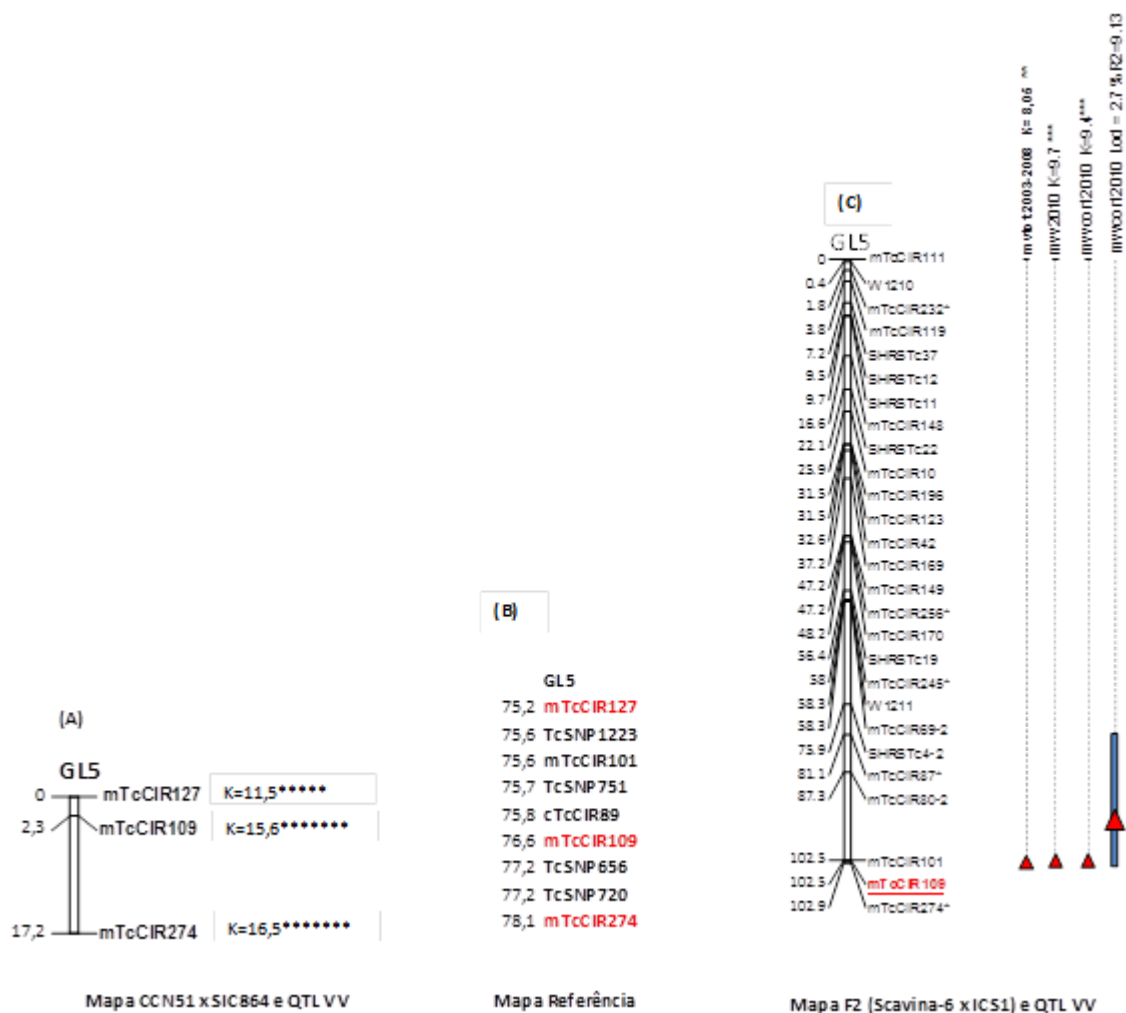
De acordo com Pires, (2003), é interessante que nos programas de melhoramento, covariáveis como, por exemplo, porte da planta, seja utilizada para ajustar as variáveis a fim de se evitar uma avaliação errônea das progênie, levando em consideração que plantas de maior porte, teoricamente apresentam copas mais amplas, e conseqüentemente, apresentam maior área de superfície para pontos de infecção. Portanto, estariam propícias a apresentar mais vassouras do que plantas de menor porte, que oferecem menos pontos de infecção, e de certa forma, estariam favorecendo a seleção de candidatos falso-positivos para caracteres de resistência. Para evitar erros desse tipo, as médias de VV e VA foram ajustadas realizando a análise de variância (ANCOVA) considerando o diâmetro do tronco das plantas como covariável. O uso de uma covariável de vigor também foi utilizada nas análises de QTL como no caso da F2 (Faleiro et al. 2006 e Santos et al. 2014), no qual o diâmetro do tronco a uma altura de 50 cm do solo foi mensurado em todas as plantas, visando a correção do número de vassouras vegetativas pelo número de potenciais pontos de infecção.

**Tabela 6.** SSR: Marcadores microssatélites associados às características quantitativas. GL: grupo de ligação. Ref: Posição do marcador em centimorgans no mapa de referência Allègre et al. (2012). Médias t-Student para os genótipos: aa (homozigoto SIC-864), ab (heterozigoto) e bb (homozigoto CCN-51). p-value: valor de probabilidade para a comparação das médias. K: coeficiente das análises de Kruskal-Wallis, cujos níveis de significância são: \*(0,1), \*(0,05), \*(0,01), \*(0,005), \*(0,001), \*(0,0005) e \*(0,0001). VV: vassouras vegetativas. VA: vassouras de almofada floral.

SSR	GL	Ref	VV					VA				
			Médias			p-value	K	Médias			p-value	K
			aa	ab	bb			aa	ab	bb		
mTcCIR40	3	17,1 cM	12,363	11,649		0,587	0,986	4,552	3,523		0,103	2,569
mTcCIR204	3	20,5 cM	12,091	12,251		0,901	0,184	4,543	3,934		0,350	0,442
mTcCIR272	1	34,7 cM	12,377	11,638		0,560	0,005	4,684	3,714		0,122	1,658
mTcCIR54	1	38,0 cM	11,670	12,851		0,378	0,339	4,095	4,502		0,532	0,460
mTcCIR16	6	8,6 cM	13,686	11,318		0,196	0,527	4,750	3,816		0,313	0,011
mTcCIR235	6	29,0 cM	12,862	11,387		0,230	0,001	4,420	4,098		0,606	0,827
mTcCIR141	7	8,1 cM	11,601	12,335		0,556	1,238	4,175	4,157		0,977	1,012
mTcCIR190	7	8,2 cM	11,187	12,543		0,267	1,755	4,207	4,242		0,956	1,054
mTcCIR168	4	0,7 cM	12,833	11,215		0,193	2,757*	4,057	4,348		0,637	0,029
mTcCIR17	4	22,5 cM	12,067	13,143		0,554	0,561	3,958	4,654		0,450	0,743
mTcCIR43	4	33,4 cM	12,097	11,865		0,860	0,004	4,082	4,242		0,803	0,381
mTcCIR32	4	40,9 cM	11,946	12,157		0,869	1,110	4,215	4,273		0,926	0,986
mTcCIR33	4	45,1 cM	10,651	12,211		0,211	0,949	3,914	4,064		0,831	0,120
mTcCIR127	5	75,2 cM	9,998	13,839		0,001	12,098*****	3,534	4,841		0,031	4,094**
mTcCIR109	5	76,6 cM	14,071	9,400		0,000	13,544*****	4,790	3,487		0,042	3,257**
mTcCIR274	5	78,1 cM	14,197	9,362		0,000	16,671*****	5,058	3,649		0,055	5,580**
mTcCIR2	5	27,0 cM		12,176	10,867	0,316	0,258		4,111	3,838	0,721	0,001
mTcCIR7	7	27,4 cM	11,442	12,451		0,456	0,106	3,715	4,249		0,366	0,197
mTcCIR22	1	86,5 cM		12,963	10,915	0,140	2,640		4,632	3,879	0,229	1,506
mTcCIR9	6	60,2 cM	11,313	13,609		0,107	0,382	3,715	4,956		0,074	2,937*
mTcCIR11	2	89,4 cM	10,589	13,019		0,051	2,556	4,292	4,095		0,757	0,218
mTcCIR119	5	7,2 cM	12,519	11,657		0,514	1,090	3,768	4,661		0,167	3,178*
mTcCIR10	5	24,5 cM		13,366	10,757	0,034	5,346**		4,443	4,068	0,545	0,025
mTcCIR81	3	76,9 cM	13,268	10,605		0,030	5,766**	5,023	3,420		0,010	3,739*
mTcCIR184	1	2,0 cM	11,221	12,458		0,330	0,863	4,441	4,189		0,696	0,086
mTcCIR189	8	46,1 cM	12,284	11,963		0,803	0,935	4,027	4,323		0,637	0,000
mTcCIR126	9	9,7 cM	10,610	13,325		0,029	11,034*****	4,322	4,171		0,811	1,822
mTcCIR218	8	37,2 cM	11,433	12,768		0,276	0,763	4,262	4,251		0,985	0,045
mTcCIR264	1	84,1 cM	12,638	11,739		0,467	1,990	3,862	4,492		0,312	0,273
mTcCIR245	5	40,0 cM	13,024	11,293		0,198	1,156	4,396	3,995		0,504	0,383

Os altos valores de significância para K, referentes aos marcadores do grupo de ligação cinco, que apresentam uma distância entre eles de aproximadamente 3cM conforme mapa referência, juntamente com os valores significantes dos testes-t para comparação de médias dos mesmos marcadores para vassouras vegetativas, reforçam a ideia de que esta região possivelmente apresente um QTL que está fortemente associado com a resistência à vassoura-de-bruxa. Ainda mais levando em consideração que a um QTL putativo (dados não publicados), mapeado numa progênie F2 resultante da autofecundação do clone TSH516, híbrido dos clones Sca-6 x ICS-1, foi encontrado na mesma região do grupo 5, porém, apresentou um valor de LOD-score considerado baixo (2,7%) na referida progênie (Figura 6). Isso não apenas nos leva a especular que um QTL importante associado à resistência esteja localizado nesta região, como também nos fornece a ideia de que seja uma nova fonte de resistência, provavelmente derivada do genitor CCN-51, que na maioria dos locos utilizados neste trabalho, foi heterozigoto, sempre apresentando um alelo exclusivo.

Além disso, as plantas que apresentaram uma combinação alélica heterozigota para esses locos apresentaram a médias mais baixas para o número de vassouras vegetativas, ao passo que, plantas de combinação alélica homozigota apresentaram maiores médias de vassouras vegetativas. Nos casos em que os locos eram homozigotos para o genitor CCN-51 e heterozigoto para genitor SIC-864 (mTcCIR2, mTcCIR10 e mTcCIR22), ou seja, quando o alelo exclusivo estava presente no genitor SIC-864, as médias de vassouras vegetativas entre os dois tipos de combinações alélicas não foram estatisticamente significantes, contudo, os valores dessas médias tanto de VV quanto de VA mostraram-se sempre menores para as combinações alélicas homozigotas, onde não ocorria a presença do alelo exclusivo do SIC-864, dando ênfase à ideia de que os genitores utilizados neste cruzamento são contrastantes para a caracteres de resistência.



**Figura 6:** Mapeamento de 3 marcadores SSRs (mTcCIR127, 109 e 274) no grupo de ligação 5 do cruzamento CCN51 x SIC864 (A), que representam um intervalo de 2.9 cM no GL5 do mapa de referência (B) e que estão significativamente associados a média do número de vassoura vegetativa obtida com 3 repetições entre 2009 e 2013 para 139 indivíduos da progênie. (C) representa o grupo de ligação 5 do cruzamento F2 (Scavina-6 x ICS1) onde foram também detectados QTL (putativos) de VV.



#### 4.6.2. Caracteres de produção da progênie

A alta produtividade de uma planta é uma característica muito importante nas mais diversas espécies cultivadas. Na cacauicultura não é diferente, pois, a produtividade alta das plantas reflete diretamente nos ganhos econômicos. Vários fatores são determinantes na alta produtividade de amêndoas do cacau, entre eles podemos citar: as condições climáticas, o manejo aplicado na cultura, o tipo de solo onde são feitos os plantios, e não menos importante, a herança genética dos genitores. Sendo assim, a busca por genes que proporcionem características favoráveis de produção também são alvo de interesse nos programas de melhoramento genético. No presente trabalho, foi verificado um alto nível de significância para as variáveis NFC e NFS, e uma alta herdabilidade para essas duas características (Tabela 3). Esses resultados indicam que essas características tiveram pouca influência do ambiente. Portanto, uma porção razoável da variação nestas características é de cunho genético.

Observando os dados da tabela 7, podemos notar que o marcador microsatélite mTcCIR32 destacou-se dos demais marcadores em relação aos níveis de significância para os testes t-Student e análises de Kruskal-Wallis, em relação ao número de frutos colhidos (NFC), número de frutos sadios (NFS) e também ao peso de sementes úmidas (PSU). Indicando uma forte relação entre a região desse marcador e a alta produtividade dessas plantas. Embora o marcador mTcCIR218 não tenha apresentado resultados estatisticamente significativos pelo teste t, ele apresenta significância de 0,005 para K em relação às variáveis NFC e NFS. É notável que esses dois marcadores destacaram-se dos outros, entretanto, é importante ressaltar que o marcador mTcCIR32 apresentou as maiores médias para NFC, NFS e PSU nas combinações alélicas heterozigotas, ao passo que o marcador mTcCIR218 apresentou as maiores médias para as mesmas variáveis nas combinações alélicas homozigotas. Essas diferenças podem nos fornecer a ideia de que o alelo que está condicionando a alta produtividade na região do marcador mTcCIR32, provavelmente seja proveniente do CCN-51, enquanto que a produtividade causada pela homozigose do loco mTcCIR218, possa ser proveniente principalmente do alelo herdado do SIC-864.

Segundo Pires, (2003), a produtividade de progênies de cacau pode ser também influenciada pela idade da progênie. Plantas em estágio pré-climax (do 4º ao 6º ano) apresentaram coeficientes de repetibilidade muito altos neste período, no entanto, quando foram avaliados o período todo (do 4º ao 9º ano), os coeficientes de repetibilidade mostraram-se reduzidos, indicando que no período de pós-climax (a partir do 7º ano), as características de

produtividade dessas plantas apresentaram-se em proporções reduzidas. Caracterizando uma situação em que genótipos de cacau apresentam uma instabilidade gênica alta no quesito produção, ou provavelmente ocorre a ação de um conjunto de diferentes genes atuando em diferentes níveis conforme as plantas se desenvolvem.

Os valores de herdabilidade mostrados na tabela 1 mostram que as variáveis de produtividade NFC, NFS e PSU encontrados neste estudo, apresentaram coeficientes altos, indicando uma progênie bastante produtiva. Embora os genitores escolhidos para este cruzamento sejam genótipos comprovadamente produtivos, essa progênie foi implantada na área em 2007, portanto, até o ano de 2013 aproximadamente, elas estariam num provável estágio de pré-climax, refletindo também uma elevada taxa de produção de frutos. Desta forma, seria interessante continuar a realização dos trabalhos de avaliação de campo, visando a obtenção de dados mais precisos sobre a capacidade e estabilidade da produção dessas plantas ao longo do tempo.

A presença de regiões genômicas no grupo de ligação 4 associadas a produção de frutos foi citada anteriormente por Marcano et al. (2008), que relataram os marcadores microsatélites mTcCIR115 e mTcCIR57 associados ao número e peso seco de sementes por fruto. É importante ressaltar que o mTcCIR57 localiza-se a uma distância genética de 12,7 cM do marcador mTcCIR32, usando o mapa consenso de Allegre et al. (2012) como referência, reforçando indícios de que algum QTL possa existir nessa região. Outro fato interessante é que a associação da produção de frutos da progênie estudada mostrou-se altamente significativa com o marcador mTcCIR32, tanto nas análises de teste t de Student, como nas análises de Kruskal-Wallis (tabela 7), corroborando com os resultados apresentados por Marcano et al. (2008), que relataram o mTcCIR32 respondendo 6,8% e 5,0% da variação fenotípica nas características comprimento e largura das amêndoas, respectivamente. Clément et al. (2003a, b), também relataram o mTcCIR32 associado a um QTL relacionado ao comprimento de semente.

O sequenciamento do genoma do cacau (ARGOUT et al. 2010) ainda não apresenta uma cobertura completa do genoma, portanto, algumas regiões permanecem não sequenciadas. Coincidentemente, a região física no cromossomo 4 onde se localiza o marcador mTcCIR32 está inclusa em uma dessas regiões. Portanto, é provável que algum possível gene ligado à produção esteja localizado nessa região e ainda permaneça desconhecido. Comprovando a importância do marcador mTcCIR32 como um bom candidato nos programas de melhoramento genético.

**Tabela 7.** SSR: Marcadores microssatélites associados às características quantitativas. GL: grupo de ligação. Ref: Posição do marcador em centimorgans no mapa de referência Allègre et al. (2012). Médias t-Student para os genótipos: aa (homozigoto SIC-864), ab (heterozigoto) e bb (homozigoto CCN-51). p-value: valor de probabilidade para a comparação das médias. K: coeficiente das análises de Kruskal-Wallis, cujos níveis de significância são: \*(0,1), \*(0,05), \*(0,01), \*(0,005), \*(0,001), \*(0,0005) e \*(0,0001). NFC: número de frutos coletas. NFS: número de frutos sadios. PSU: peso das sementes úmidas.

SSR	GL	Ref	NFC					NFS					PSU				
			Médias			p-value	K	Médias			p-value	K	Médias			p-value	K
aa	ab	bb	aa	ab	bb			aa	ab	bb			aa	ab	bb		
mTcCIR40	3	17,1 cM	41,090	34,988		0,213	1.553	26,080	21,411		0,160	2.485	2,550	2,055		0,106	2.917*
mTcCIR204	3	20,5 cM	40,007	39,512		0,919	0.013	25,667	24,131		0,647	0.077	2,522	2,308		0,485	0.040
mTcCIR272	1	34,7 cM	37,351	42,190		0,316	0.418	23,760	26,041		0,488	0.137	2,297	2,538		0,427	0.046
mTcCIR54	1	38,0 cM	39,609	38,954		0,892	0.002	24,555	24,618		0,985	0.020	2,361	2,430		0,816	0.142
mTcCIR16	6	8,6 cM	33,921	44,221		0,096	1.309	20,992	28,191		0,087	0.924	2,153	2,736		0,152	1.113
mTcCIR235	6	29,0 cM	34,079	45,566		0,016	5.271**	21,561	28,307		0,037	3.564*	2,217	2,581		0,225	1.340
mTcCIR141	7	8,1 cM	35,956	42,089		0,202	1.243	22,167	26,569		0,175	1.697	2,160	2,571		0,172	1.288
mTcCIR190	7	8,2 cM	36,094	41,475		0,260	0.682	22,423	26,116		0,255	0.678	2,225	2,483		0,388	0.462
mTcCIR168	4	0,7 cM	38,150	41,472		0,489	1.057	24,329	25,607		0,695	0.874	2,345	2,474		0,669	0.715
mTcCIR17	4	22,5 cM	41,820	31,838		0,093	3.383*	26,097	20,073		0,133	2.642	2,472	2,110		0,347	1.782
mTcCIR43	4	33,4 cM	32,917	45,203		0,012	5.808**	19,976	28,928		0,007	7.016***	2,038	2,661		0,042	4.406**
mTcCIR32	4	40,9 cM	31,944	48,405		0,001	12.326*****	19,122	31,081		0,000	14.277*****	1,934	2,906		0,001	11.157*****
mTcCIR33	4	45,1 cM	34,267	45,180		0,045	4.890	21,164	28,984		0,033	5.192**	2,150	2,687		0,120	2.692
mTcCIR127	5	75,2 cM	40,456	38,268		0,643	0.000	25,133	24,129		0,753	0.108	2,456	2,315		0,632	0.153
mTcCIR109	5	76,6 cM	39,831	42,122		0,657	0.001	25,180	26,238		0,762	0.161	2,418	2,557		0,665	0.207
mTcCIR274	5	78,1 cM	39,336	37,071		0,671	1.282	25,478	22,592		0,428	2.777*	2,415	2,215		0,555	2.041
mTcCIR2	5	27,0 cM		41,716	38,423	0,571	0.147		26,816	23,797	0,443	0.244		2,587	2,291	0,420	0.697
mTcCIR7	7	27,4 cM	40,510	37,695		0,616	0.054	25,047	23,945		0,771	0.001	2,372	2,388		0,965	0.010
mTcCIR22	1	86,5 cM		37,365	40,105	0,631	0.027		23,253	24,764	0,695	0.058		2,253	2,255	0,997	0.164
mTcCIR9	6	60,2 cM	39,989	42,044		0,703	0.314	24,356	27,068		0,453	0.676	2,444	2,564		0,724	0.356
mTcCIR11	2	89,4 cM	36,569	42,012		0,271	1.169	22,692	26,470		0,260	1.038	2,148	2,582		0,160	1.733
mTcCIR119	5	7,2 cM	39,086	41,608		0,620	0.659	24,348	26,775		0,485	0.919	2,338	2,613		0,388	1.550
mTcCIR10	5	24,5 cM		44,318	34,988	0,051	3.557*		27,691	22,072	0,084	3.073*		2,687	2,141	0,070	2.066
mTcCIR81	3	76,9 cM	39,056	38,601		0,925	0.077	24,248	24,301		0,987	0.077	2,421	2,269		0,613	0.291
mTcCIR184	1	2,0 cM	44,950	32,140		0,008	5.712**	27,620	20,125		0,021	4.598**	2,561	2,026		0,074	2.156
mTcCIR189	8	46,1 cM	39,278	40,227		0,848	0.134	23,950	25,566		0,629	0.199	2,458	2,325		0,663	0.109
mTcCIR126	9	9,7 cM	37,188	41,329		0,385	0.361	24,120	25,276		0,724	0.079	2,354	2,435		0,786	0.162
mTcCIR218	8	37,2 cM	46,241	32,709		0,004	8.156****	29,203	20,357		0,006	8.008****	2,713	2,076		0,032	6.243**
mTcCIR264	1	84,1 cM	44,117	36,211		0,097	2.653	27,591	22,698		0,130	2.115	2,679	2,197		0,105	2.343
mTcCIR245	5	40,0 cM	44,909	34,993		0,055	2.273	28,249	21,706		0,064	1.995	2,624	2,106		0,095	1.524

### 4.6.3. Sintomas de doença nos frutos

Na década de 80, a podridão parda do cacaueteiro era considerada a doença mais importante da cultura, e era responsável por aproximadamente 30% das perdas na produção anual. Contudo, o aparecimento da vassoura-de-bruxa na região no final dos anos 80, causando perdas muito mais expressivas na produção de frutos, fez com que a podridão parda fosse considerada como uma doença de importância secundária. Entretanto, com os avanços dos programas de melhoramento genético nos anos subsequentes, novos genótipos resistentes à vassoura-de-bruxa passaram a ser utilizados, porém, a podridão parda começa a reaparecer, trazendo novas preocupações à lavoura cacaueteira (OLIVEIRA & LUZ, 2012).

Tanto a podridão parda como a vassoura-de-bruxa causam sintomas característicos em várias regiões do hospedeiro, contudo, a expressividade dos sintomas são mais preocupantes quando ocorrem nos frutos, pois, reflete diretamente nas perdas de produção da matéria prima mais importante da cultura, as amêndoas.

A maioria dos trabalhos de mapeamento de QTLs e/ou associação de marcas a fenótipos de resistência a essas doenças está associada com vassouras vegetativas e vassouras nas almofadas florais (SANTOS et al., 2007a, b; ALBUQUERQUE, 2006; FALEIRO et al. 2006; SILVA, 2011 SANTOS e al. 2014). Os mecanismos genéticos da resistência a essas doenças no fruto ainda permanecem pouco explorados e na sua grande parte, desconhecidos. O estudo das interações gênicas e da expressividade dessas doenças nos frutos poderia nos dar informações a cerca de possíveis regiões genômicas específicas na resistência dos frutos. Embora o objetivo tenha sido avaliar a resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda no fruto, os percentuais de infecção causados pela inoculação natural em campo foram avaliados e analisados nos teste de associação com marcas de resistência.

Os dados referentes aos testes t-Student e as análises de Kruskal-Wallis para a associação de marcas possivelmente associadas aos sintomas das doenças nos frutos (%FVB e %FPP), mostrados na tabela 8, indicam que não existem diferenças estatísticas significativas para os sintomas de vassoura-de-bruxa nos frutos (%FVB) quando comparamos as médias do teste t, revelando que as diferentes combinações alélicas entre os locos homozigotos de SIC-864, locos homozigotos de CCN-51 e também entre as

combinações alélicas dos locos heterozigotos, não variaram muito as características nos fenótipos. Entretanto, o valor de K para o marcador mTcCIR184 foi altamente significativo para os sintomas de podridão parda nos frutos (%FPP), indicando um forte relação desse marcador com a variação de sintomas de podridão nos frutos avaliados. É importante ressaltar que as combinações alélicas envolvendo o alelo exclusivo do CCN-51 foram as que apresentaram as menores médias de %FPP nas avaliações, favorecendo a aptidão desse genótipo na resistência a podridão parda. Embora ele não tenha sido ordenado no mapa parcial apresentado neste trabalho, dados do mapa consenso de Allegre, et al. (2012), mostram o posicionamento desse marcador no grupo de ligação 1.

**Tabela 8.** SSR: Marcadores microssatélites associados às características quantitativas. GL: grupo de ligação. Ref: Posição do marcador em centimorgans no mapa de referência Allègre et al. (2012). Médias t-Student para os genótipos: aa (homozigoto SIC-864), ab (heterozigoto) e bb (homozigoto CCN-51). p-value: valor de probabilidade para a comparação das médias. K: coeficiente das análises de Kruskal-Wallis, cujos níveis de significância são: \*(0,1), \*(0,05), \*(0,01), \*(0,005), \*(0,001), \*(0,0005) e \*(0,0001). %FVB: porcentagem de frutos com vassoura-de-bruxa. %FPP: porcentagem de frutos com podridão parda.

SSR	GL	Ref	%FVB					%FPP				
			Médias			p-value	K	Médias			p-value	K
aa	ab	bb	aa	ab	bb							
mTcCIR40	3	17,1 cM	21,789	23,445		0,320	0,410	2,208	3,496		0,196	2,183
mTcCIR204	3	20,5 cM	22,501	23,132		0,710	0,015	2,130	3,608		0,124	3,898**
mTcCIR272	1	34,7 cM	22,084	23,198		0,504	0,259	1,720	3,864		0,022	8,287****
mTcCIR54	1	38,0 cM	23,826	22,311		0,381	0,725	3,773	1,961		0,080	2,090
mTcCIR16	6	8,6 cM	22,577	20,813		0,416	0,885	2,200	2,415		0,712	0,273
mTcCIR235	6	29,0 cM	22,722	22,655		0,968	0,108	2,799	2,619		0,846	0,850
mTcCIR141	7	8,1 cM	23,055	22,385		0,687	0,234	3,511	2,143		0,144	0,208
mTcCIR190	7	8,2 cM	22,626	22,794		0,918	0,000	3,659	2,111		0,093	0,368
mTcCIR168	4	0,7 cM	21,956	22,956		0,541	0,331	2,479	3,059		0,533	5,520**
mTcCIR17	4	22,5 cM	21,986	22,016		0,989	0,018	2,733	2,031		0,240	2,502
mTcCIR43	4	33,4 cM	23,629	21,604		0,225	2,068	2,341	3,354		0,311	2,065
mTcCIR32	4	40,9 cM	24,587	20,896		0,028	5,206**	2,390	3,216		0,394	1,744
mTcCIR33	4	45,1 cM	23,652	21,995		0,365	0,877	2,377	2,638		0,696	1,963
mTcCIR127	5	75,2 cM	22,327	22,888		0,729	0,289	2,982	2,564		0,646	0,547
mTcCIR109	5	76,6 cM	21,969	22,350		0,821	0,004	2,334	2,089		0,578	1,084
mTcCIR274	5	78,1 cM	21,908	23,502		0,372	0,684	2,459	3,346		0,434	0,085
mTcCIR2	5	27,0 cM		22,548	22,443	0,954	0,026		3,786	2,496	0,299	0,147
mTcCIR7	7	27,4 cM	22,687	21,629		0,571	0,324	3,407	2,337		0,361	0,001
mTcCIR22	1	86,5 cM		23,094	21,575	0,418	0,388		3,204	2,210	0,155	0,763
mTcCIR9	6	60,2 cM	21,856	22,843		0,577	0,031	3,599	1,974		0,148	1,691
mTcCIR11	2	89,4 cM	22,326	23,153		0,617	0,026	2,220	3,323		0,246	4,747**
mTcCIR119	5	7,2 cM	22,647	21,910		0,663	0,242	2,292	3,138		0,407	2,037
mTcCIR10	5	24,5 cM		21,252	23,506	0,169	1,290		3,152	2,341	0,389	0,934
mTcCIR81	3	76,9 cM	23,839	21,738		0,205	1,370	3,544	2,062		0,116	1,271
mTcCIR184	1	2,0 cM	22,375	23,529		0,497	0,066	3,748	1,991		0,071	13,454*****
mTcCIR189	8	46,1 cM	22,632	23,110		0,780	0,040	3,400	2,243		0,235	0,036
mTcCIR126	9	9,7 cM	22,254	23,153		0,587	0,809	3,539	1,959		0,090	0,484
mTcCIR218	8	37,2 cM	21,894	23,155		0,440	0,737	2,304	3,171		0,346	0,625
mTcCIR264	1	84,1 cM	23,859	21,885		0,225	0,678	3,386	2,321		0,248	2,062
mTcCIR245	5	40,0 cM	20,676	24,323		0,042	3,837*	3,229	2,535		0,508	0,400

Uma meta análise de QTLs feita por Lanaud et al. (2009), apresentou 16 QTLs fortemente relacionados com os sintomas de podridão parda no grupo de ligação 1, não apenas nos frutos, mas também em folhas. Embora a posição do mTcCIR184 não seja nas regiões desses QTLs, a distância genética entre eles não é muito expressiva. Recentemente, Barreto (2014), mapeando uma progênie descendente do cruzamento entre CCN-51 e TSH-1188, detectou dez QTLs associados a resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda. Dentre eles, um QTL com LOD de 3,45 foi identificado na região do mTcCIR161, grupo de ligação 1, corroborando com resultados encontrados também por Risterucci et al. (2003). O mTcCIR161 está posicionado relativamente próximo ao marcador mTcCIR184, fortalecendo a ideia de que exista realmente uma forte associação do mTcCIR184 na resistência à podridão parda.

Resultados assim, com poucos marcadores, indicam que é necessário analisar mais estas regiões do genoma que estão relacionadas com a expressão da resistência de vassoura-de-bruxa e podridão parda e também aos componentes de produção.

## 5. CONCLUSÕES

O mapeamento genético apresentou um resultado parcial. Não foram mapeados os 10 grupos de ligação já conhecidos na espécie *Theobroma cacao* L., somente 6 grupos de ligação apresentaram os marcadores posicionados no genoma.

As análises estatísticas mostraram que a população de estudo mostrou-se contrastante para as características avaliadas, portanto, ela é ideal para estudos de mapeamento genético. Foi observada também uma variabilidade fenotípica considerável e a avaliação da herdabilidade das características indicou que as influências ambientais afetam mais aos caracteres de resistência do que aos componentes de produção.

A análise dos marcadores permitiu a identificação de microssatélites associados à QTLs. Os marcadores mTcCIR109, mTcCIR274, mTcCIR127 e mTcCIR126 mostraram potencial associação com a resistência a vassoura-de-bruxa. O marcador mTcCIR184 mostrou-se significativamente associado com a resistência à podridão parda no fruto e o marcador mTcCIR32 associado com a alta produtividade das plantas. Tais marcadores apresentaram significativa importância para estudos mais elaborados, a fim de se obter novos genes de resistência e de caracteres de produção no melhoramento genético do cacauero.

Visto que várias plantas analisadas neste estudo foram detectadas como não sendo descendentes dos genitores controlados (somente as 160 plantas do cruzamento CCN-51 x SIC-864), é recomendável que seja feita uma validação da paternidade de todas as plantas instaladas no campo representando os indivíduos dos dois cruzamentos envolvendo os pais CCN-51 e SIC-864, como as várias plantas repetidas dos 6 clones testemunhas, visando estudos futuros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5ªEd. San Diego, California. Academic Press. P. 922, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B.; BASTOS, C. N.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA S. D. V. M. Doenças do cacauzeiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v.2. São Paulo SP. Agronômica Ceres. pp. 151-164, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B. Mapas de ligação e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauzeiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira. **Dissertação** (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, USP, Brasil, p.134., 2006.

ALLEGRE, M.; ARGOUT, X.; BOCCARA, M.; FOUET, O.; ROGUET, Y.; BERARD, A.; THÉVENIN, J. M.; CHAUVEAU, A.; RIVALLAN, R.; CLEMENT, D.; COURTOIS, B.; GRAMACHO, K. P.; BAULAND-AUGE, A.; TAHI, M.; PATHMANATHAN, U.; BRUNEL, D.; LANAUD, C. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. **Dna Research** nº 19, p. 23–35, 2012.

ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1474-1486, 1999.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, p.1012-1022, 2005.

AMORES, F. M.; VASCO, S. A.; ESKES, A. B.; SUAREZ, C.; QUIROZ, J. G.; LOOR, R. G.; JIMENEZ, J. C. ZAMBRANO, J.; BOLAÑOS, M. J.; REYNEL, V. H.; TERAN, M. M.; QUIJANO, G. C. On-farm and on-station selection of new cocoa varieties in Ecuador, p. 59-72. In: Eskes, A.B. (ed.). Collaborative and participatory approaches to cocoa variety improvement. Final report of the CFC/ICCO/Biodiversity International project on cocoa productivity and quality improvement: A participatory approach (2004-2010). Common Fund for Commodities (CFC), Amsterdam, The Netherlands; Intl. Cocoa Organization (ICCO), London, UK; Biodiversity Intl.; Rome, Italy, 2011.

ANDEBRHAN, T. Studies on the Epidemiology and Control of Witches' Broom Disease of Cocoa in the Brazilian Amazon. **International Cocoa Research Conference**. Lome, Togo, 395—402, 1984.



ANDINO, J.; ESPINOSA, J.; MITE, F.; CEDEÑO-AMADOR, S.; BARRIGA, S. Manejo por sitio específico del cacao basado en sistemas de información geográfica. INIAP, Estación Experimental Pichilingue. Quevedo, Ecuador. 2005.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J. M.; GUILTINAN, M. J.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, S. N.; ABROUK, M.; MURAT, F.; FOUET, O.; POULAIN, J.; RUIZ, M.; ROGUET, Y.; RODIER-GOUD, M.; BARBOSA-NETO, J. F.; SABOT, F.; KUDRNA, D.; AMMIRAJU, J. S. S.; SCHUSTER, S. C.; CARLSON, J. E.; SALLET, E.; SCHIEX, T.; DIEVART, A.; KRAMER, M.; GELLEY, L.; SHI, Z.; BÉRARD, A.; VIOT, C.; BOCCARA, M.; RISTERUCCI, A. M.; GUIGNON, V.; SABAU, X.; AXTELL, M. J.; MA, Z.; ZHANG, Y.; BROWN, S.; BOURGE, M.; GOLSER, W.; SONG, X.; CLEMENT, D.; RIVALLAN, R.; TAHI, M.; AKAZA, J. M.; PITOLLAT, B.; GRAMACHO, K. P.; D'HONT, A.; BRUNEL, D.; INFANTE, D.; KEBE, I.; COSTET, P.; WING, R.; MCCOMBIE, W. R.; GUIDERDONI, E.; QUETIER, F.; PANAUD, O.; WINCKER, P.; BOCS, S. & LANAUD, C. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature genetics**, Vol. 43, nº2, p. 101-109, 2010.

BAHIA, R. C. S. Caracterização fenotípica da população F1 (TSH1188XCCN51) de cacauero quanto a resistência à podridão-parda e ao número de óvulos por ovário. Dissertação de Mestrado (Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, 2007.

BARRETO, M. A. Caracterização da resistência a *Phytophthora* e mapeamento de qtl para resistência à podridão parda e à vassoura-de-bruxa do cacauero. Tese de Doutorado (Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2014.

BARTLEY, B. G. D. Cocoa, *Theobroma cacao*. **FAO Plant Production and Protection Paper**, Rome, v. 70, p. 25-42, 1986.

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

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C.; SAMSON, R. A. A new hiperparasitic fungus, *Cladobryum amazonense*, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society** 77: 273-278, 1981.

BASTOS, C. N.; ANDERBRHAN, T. Urucu (*Bixa orellana*): novas espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia brasileira**, v.11, nº4, p.963-965, 1986.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Eds.) **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, p. 63-223, 2000.

BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, J. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, nº3, p. 513-520, 1997.

BOZA, E. J.; MOTAMAYOR, J. C.; AMORES, F. M.; CEDEÑO-AMADOR, S.; TONDO, C. L.; LIVINGSTONE, D. S.; SCHNELL, R. J.; GUTIÉRREZ, O. A. Genetic Characterization of the cacao cultivar CCN-51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 139, nº2, p. 219-229, 2014.

BRONDANI, C. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. Cláudio Brondani, Rosana Pereira Vianello Brondani, Paulo Hideo Nakano Rangel. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.33, 2003.

BROWN, S. J.; SCHENLL, R. J.; MOTAMAYOR, J. C.; LOPES, U. V.; KUHN, D. N.; BORRONE, J. W. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. **J. Americ. Soc. Hort. Sci.**, 130(3): 366-373, 2005.

BROWN, J. S.; PHILLIPS-MORA, W.; POWER, E. J.; KROL, C.; CERVANTES-MARTINEZ, C.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R. J. Mapping QTLs for Resistance to Frosty Pod and Black Pod Diseases and Horticultural Traits in *Theobroma cacao* L. **Crop Science**, v. 47, p. 1851-1858, 2007.

CASTRO, H. U. Posibilidad de creación de una nueva variedad de cacao de fruto hexalocular por cruzamiento entre flores mutantes hexameras. Arch. Victor Chacon Salinas, Jesus Maria, Quito, Ecuador, 1981.

CEAMA – Centro de apoio operacional do meio ambiente e Urbanismo (Bahia). Em: [http://www.ceama.mpba.mp.br/boletim-informativo/doc\\_view/3019-decreto-florestal-do-estado-da-bahia.html](http://www.ceama.mpba.mp.br/boletim-informativo/doc_view/3019-decreto-florestal-do-estado-da-bahia.html). Acesso em: 25 de outubro de 2014.

CHAVES, G.M. Melhoramento do cafeeiro visando a obtenção de cultivares resistentes a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. **Revista Ceres** 23: 321-332, 1976.

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

CLEMENT, D.; RISTERUCCI, A. M.; MOTAMAYOR, J. C.; N'GORAN, J.; LANAUD, C. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. **Genome**, v. 46, p. 204-212, 2003a.

CLÉMENT D.; RISTERUCCI A. M.; MOTAMAYOR J. C.; N'GORAN J.; LANAUD C. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. **Genome** 46:103–111, 2003b.

CLÉMENT, D.; PIRES, J. L.; GRAMACHO, K. P.; JUCÁ, F. F.; MELO, G. P.; LOPES, U.V. QTL evolution under natural infection using a F2 Scavina-6 x ICS1 population for witches' broom resistance in Bahia, Brazil. 17th International Cocoa Research Conference, Yaoundé, Cameroun, 2012.

COELHO, A. S. G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I.F. (Eds). Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, p. 1-36, 2000.

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

CROUZILLAT, D.; RIGOREAU, M.; CABIGLIERA, M.; ALAREZ, M.; BUCHELI, P.; PETIARD, V. QTL studies carried out for agronomic, technological and quality traits of cocoa in Ecuador. In: Kota Kinabalu, Proceedings International workshop on new technologies and cocoa breeding, Kota Kinabalu: **INGENIC**, p. 120-126., 2001.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, n. 6, v. 35, p. 379-614, 1964.

Engels J. M. M. Technical bulletin 7, tropical agriculture and research training center, Turrialba, Costa Rica. 191 p., 1981.

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

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. (Eds). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, APS Press, 562p., 1996.

FALEIRO, F. G.; QUEIROZ, V. T.; LOPES, U. V.; GUIMARAES, C. T.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; ARAUJO, I. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA FILHO, G. A.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v. 149, p. 227-235, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Documento. Embrapa – Cenargen, Brasília, n.20, 220p, 1998.

FIGUEIRA, A. V. O.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 4, p. 673-677, 1992.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296, 1971.

FOUET, O.; ALLEGRE, M.; ARGOUT, X. Structural characterization and mapping of functional EST-SSR markers in *Theobroma cacao*. **Tree genetics & genomes** 7: 799-817, 2011.

GRAMACHO, K. P.; MOREIRA, R. F. C.; LIMA, L. S.; LIMA, L. S.; CLÉMENT, D. Obtenção de marcadores microssatélites para genotipagem e análise genética de *Moniliophthora perniciosa* em gel corado com nitrato de prata. Boletim técnico nº198, CEPLAC, CEPEC, 2009.

GRAMACHO, K. P.; PIRES, J. L.; CLÉMENT, D.; JUCA, F. F.; MELO, G.; PATROCINIO, N. G. R. B.; RICARDO F.; ARAÚJO, L.; LOPES, U. V. Breakdown of Scavina Resistance in Bahia Caused by the Evolution of *Moniliophthora Perniciosa* 17th International Cocoa Research Conference, Yaoundé, Cameroun, 2012.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XL, No. 2, Cocoa year 2013/14*, publicado em Maio de 2014.

JACKSON, A. O.; TAYLORBI, C. Plant-Microbe interactions: Life and Death at the Interface. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1651-1668, 1996.

JUCÁ, F. F. Influência do local, do tipo de vassoura e de genótipos de cacauero na estrutura genética de *Moliophthora perniciosa* na Bahia. Dissertação de Mestrado (Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA. 86 p. 2009.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A. M.; N'GORAN, J. A. K.; CLEMENT, D.; FLAMENT, M. H.; LAURENT, V.; FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.91, n 6-7, p.987-993, 1995.

LANAUD, C.; MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M. Implications of new insight into the genetic structure of *Theobroma cacao* L. for breeding strategies. In: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, **Ingenic**, Malaysia, p. 93-111, 2000.

LANAUD, C.; FOUET, O.; CLÉMENT, D.; BOCCARA, M.; RISTERUCCI, A. M.; SURUJDEO-MAHARAJ, S.; LEGAVRE, T.; ARGOUT, X. A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. **Molecular Breeding**, 24 (4): 361-374, 2009.

LIMA, L.S.; GRAMACHO, K.P.; PIRES, J.L.; CLEMENT, D.; LOPES, U.V.; CARELS, N.; GESTEIRA, A.S.; GAIOTTO, F.A.; CASCARDO, J.C.M.; MICHELI, F. Development, characterization, validation, and mapping of SSRs derived from *Theobroma cacao* L.-*Moniliophthora perniciosa* interaction ESTs. **Tree Genetics & Genomes**, Ed. Springer-Verlag, 2010.

LIU, B.H. Statistical Genomics: linkage mapping and QTL analysis. **CRC Press**, p. 610, 1998.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLÉMENT, D.; YAMADA, M. M., GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil: strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S1 73-81, 2011.

LUZ, E. D. M. N. The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L. Tese de Doutorado. Universidade da Flórida, Estados Unidos, 184p., 1989.

LUZ, E. D. M. N e SILVA, S. D. V. M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauzeiro. In: Luz, E.D.M.N., Santos, A.F., Matsuoka, K. & Bezerra, J.L. (Eds.). **Doenças Causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Livraria Rural, Campinas, p.175-265, 2001.

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, p.279- 279, 1997.

MARCANO, M.; MORALES, S.; HOYER, M. T.; COURTOIS, B.; RISTERUCCI, A. M.; FOUET, O.; PUGH, T.; CROS, E.; GONZALEZ, V.; DAGERT, M.; LANAUD, C. A genomewide admixture mapping study for yield factors and morphological traits in a cultivated cocoa (*Theobroma cacao* L.) population. **Tree Genetics & Genomes**, Ed. Springer-Verlag, vol.5:329–337, 2008.

MARTINS, L. A. C. P. Thomas Hunt Morgan e a teoria cromossômica: de crítico a defensor. **Episteme**, v. 3, n. 6, p. 100-126, 1998.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J. e GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics** 157: 1819 – 1829, 2001.

MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; CLEMENT, D. Cacao breeding. In: Jain, Shri Mohan; Priyadarshan,P.M (Eds.). (Org.). **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**: p. 1-650, 2008.

MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Melhoramento genético do cacauzeiro. In Wilson Reis Monteiro e Dário Ahnert (orgs.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacauzeiro**, 2ª Edição, Brasília DF: Raúl René Valle, 11-29, 2012.

MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. S.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). **PLoS ONE** 3(10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311, 2008.

DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R. X.; MONTEIRO, W. R.; LUZ, E. D. M. N.; GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V. Caracterização de uma população de cacauzeiro para mapeamento de genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda. **Fitopatol. Bras.**, 30(4), p.380-386, 2005.

DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R.X.; MONTEIRO, W.R.; GAIOTTO, F.A.; LOPES, U.V. Identificação de marcadores microssatélites potencialmente associados à vassoura-de-bruxa e podridão-parda numa população de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Agrotropica**, 19: 57-62, 2007.

NYASSÉ, S.; EFOMBAGN M. I. B. e ESKES, A. B. Selection for resistance to black pod disease and yield gains prediction by use of selected cocoa varieties in Cameroon. **Plant Genetic Resources** 1: 157-160, 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.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Principais doenças do cacaueteiro e seu manejo. In Marival Lopes de Oliveira e Edna Dora Martins Newman Luz (orgs.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**, 2ª Edição, Brasília DF: Raúl René Valle, 187-275, 2012.

OLIVEIRA, R. P.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Skewed RAPD markers in linkage maps of Citrus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 437-441, 2004.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.7-15, 1997.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v. 1, p. 79-81, 1989.

PINTO, L. R. M e PIRES, J. L. Seleção de Plantas de Cacau Resistentes à Vassoura-de-bruxa. Ilhéus. CEPLAC/CEPEC. 1998.

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: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., Salvador. **Proceedings**. Salvador: [s.n.], p.389-397, 1999.

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. Tese de Doutorado (Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 342 p. 2003.

PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; DE MELO, G. P.; GRAMACHO, K. P.; PINTO, L. R. M. New genes of resistance to witches' broom identified by the behavior of different clones over time. 17th International Cocoa Research Conference, Yaoundé, Cameroun, 2012.

POUND, F. J. Cocoa and witches' broom disease: report on a recent visit to the Amazon territory of Peru. The archives of cocoa research, volume 1, H. Toxopeus ed. ACRI-IOCC, London, United Kingdom, 1943.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N. A.; DONNELLY, P. Association mapping in structured populations. **Am. J. Hum. Genet.** 67: 170 – 181, 2000.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A. M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J. A. K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 5, p. 1151-1161, 2004.

QUEIROZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R. T.; PEREIRA, M. G.; MIRANDA, V. R. M.; LOGUÉRCIO, 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**, Berlin, v.122, n.3, p.268-272, 2003.

QUINGAÍSA, E. Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen, “Estudio de caso: denominación de origen “cacao arriba.” Quito, Ecuador, 2007.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L.. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.100, n.6, p.948-955, 2000.

RISTERUCCI A. M.; PAULIN D.; DUCAMP M.; N'GORAN J.; LANAUD C. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(1), 168-174, 2003.

SANTOS, F. F. J.; LOPES, U.V; PIRES, J.L; MELO, G.R.P; GRAMACHO, K.P; CLÉMENT, D. QTLs detection under natural infection of *Moniliophthora perniciosa* in a cacao F2 progeny with Scavina-6 descendants. **Agrotrópica**, 26(1) : 65 – 72, 2014.

SANTOS, R. M. F. Caracterização da resistência à vassoura-de-bruxa, do vigor vegetativo e de polimorfismos em microssatélites na população de cacauzeiros derivada do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51. 63p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007a.

SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; BAHIA, R. C.; MACHADO, R. C. R.; AHNERT, D.; CÔRREA, R. X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1137-1142, 2007b.

SANTOS, J. C. Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51, Jama-Manabí. Tesis de grado presentado como

requisito para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas, Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador, 2012.

SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; CLEMENT, D.; PIRES, J. L.; MESSIAS, T. B.; GRAMACHO, K. P. A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, vol. 13(7), pp. 814-820, 12 February, 2014.

SILVA, D. V. Mapeamento genético da resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais de *Theobroma cacao* L. Dissertação de Mestrado (Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA. 72 p. 2011.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. Recursos genéticos e melhoramento. Fundação MT, p. 939-965, 2001.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. Spec. Bulletin Department van de Landbouw in Suriname, 33: 1-26, 1915.

STEINBERG, F. M., BEARDEN, M. M., and KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, Ed. Elsevier, v.103, p.215-223, 2003.

TAHI, G. M.; KEBE, B. I.; N'GORAN, J. A. K.; SANGARE, A.; MONDEIL, F.; CILAS, C. e ESKES, A. B. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. **Euphytica** 149:35-44, 2006.

TANKLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v.27, p. 205-233, 1993.

VAN OOIJEN, J. W. Multipoint maximum likelihood mapping in a full-sib family of an outbreeding species. **Genetics Research**, vol. 93, n°5, 343-349, 2011.

VAN DER PLANK, J. E. Disease Resistance in Plants. New York: Academic Press, p.206, 1968.

VIEIRA, D. R.; VALLE, R. R. Indução de resistência sistêmica em plantas contra fitopatógenos. In Deraldo Ramos Vieira e Raúl René Valle (orgs.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacauero**, 2ª Edição, Brasília DF: Raúl René Valle, 303-336, 2012.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome*, Ottawa, v. 42, n°4, p. 657 – 661, 1999.

ZEHNTNER, L. Le cacaoyer dans l'Etat de Bahia. Berlin, Verlag, 118p., 1914.  
ANEXOS



**ÁREA .PROGENIES CEPLAC - Q01**

**90m**

30	31	90	91	150	151	210	211	270	271	330	331	390	391	450	451	510	511	570	571	630	631	690	691	750	751	810	811	870	871
29	32	89	92	149	152	209	212	269	272	329	332	389	392	449	452	509	512	569	572	629	632	689	692	749	752	809	812	869	872
28	33	88	93	148	153	208	213	268	273	328	333	388	393	448	453	508	513	568	573	628	633	688	693	748	753	808	813	868	873
27	34	87	94	147	154	207	214	267	274	327	334	387	394	447	454	507	514	567	574	627	634	687	694	747	754	807	814	867	874
26	35	86	95	146	155	206	215	266	275	326	335	386	395	446	455	506	515	566	575	626	635	686	695	746	755	806	815	866	875
25	36	85	96	145	156	205	216	265	276	325	336	385	396	445	456	505	516	565	576	625	636	685	696	745	756	805	816	865	876
24	37	84	97	144	157	204	217	264	277	324	337	384	397	444	457	504	517	564	577	624	637	684	697	744	757	804	817	864	877
23	38	83	98	143	158	203	218	263	278	323	338	383	398	443	458	503	518	563	578	623	638	683	698	743	758	803	818	863	878
22	39	82	99	142	159	202	219	262	279	322	339	382	399	442	459	502	519	562	579	622	639	682	699	742	759	802	819	862	879
21	40	81	100	141	160	201	220	261	280	321	340	381	400	441	460	501	520	561	580	621	640	681	700	741	760	801	820	861	880

**BLOCO 03**

20	41	80	101	140	161	200	221	260	281	320	341	380	401	440	461	500	521	560	581	620	641	680	701	740	761	800	821	860	881
19	42	79	102	139	162	199	222	259	282	319	342	379	402	439	462	499	522	559	582	619	642	679	702	739	762	799	822	859	882
18	43	78	103	138	163	198	223	258	283	318	343	378	403	438	463	498	523	558	583	618	643	678	703	738	763	798	823	858	883
17	44	77	104	137	164	197	224	257	284	317	344	377	404	437	464	497	524	557	584	617	644	677	704	737	764	797	824	857	884
16	45	76	105	136	165	196	225	256	285	316	345	376	405	436	465	496	525	556	585	616	645	676	705	736	765	796	825	856	885
15	46	75	106	135	166	195	226	255	286	315	346	375	406	435	466	495	526	555	586	615	646	675	706	735	766	795	826	855	886
14	47	74	107	134	167	194	227	254	287	314	347	374	407	434	467	494	527	554	587	614	647	674	707	734	767	794	827	854	887
13	48	73	108	133	168	193	228	253	288	313	348	373	408	433	468	493	528	553	588	613	648	673	708	733	768	793	828	853	888
12	49	72	109	132	169	192	229	252	289	312	349	372	409	432	469	492	529	552	589	612	649	672	709	732	769	792	829	852	889
11	50	71	110	131	170	191	230	251	290	311	350	371	410	431	470	491	530	551	590	611	650	671	710	731	770	791	830	851	890

**BLOCO 02**

10	51	70	111	130	171	190	231	250	291	310	351	370	411	430	471	490	531	550	591	610	651	670	711	730	771	790	831	850	891
9	52	69	112	129	172	189	232	249	292	309	352	369	412	429	472	489	532	549	592	609	652	669	712	729	772	789	832	849	892
8	53	68	113	128	173	188	233	248	293	308	353	368	413	428	473	488	533	548	593	608	653	668	713	728	773	788	833	848	893
7	54	67	114	127	174	187	234	247	294	307	354	367	414	427	474	487	534	547	594	607	654	667	714	727	774	787	834	847	894
6	55	66	115	126	175	186	235	246	295	306	355	366	415	426	475	486	535	546	595	606	655	666	715	726	775	786	835	846	895
5	56	65	116	125	176	185	236	245	296	305	356	365	416	425	476	485	536	545	596	605	656	665	716	725	776	785	836	845	896
4	57	64	117	124	177	184	237	244	297	304	357	364	417	424	477	484	537	544	597	604	657	664	717	724	777	784	837	844	897
3	58	63	118	123	178	183	238	243	298	303	358	363	418	423	478	483	538	543	598	603	658	663	718	723	778	783	838	843	898
2	59	62	119	122	179	182	239	242	299	302	359	362	419	422	479	482	539	542	599	602	659	662	719	722	779	782	839	842	899
1	60	61	120	121	180	181	240	241	300	301	360	361	420	421	480	481	540	541	600	601	660	661	720	721	780	781	840	841	900

**BLOCO 01**

ESTRADA PARA BARRO PRETO-