

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



**MAPEAMENTO MOLECULAR DE GENES DE
RESISTÊNCIA DE CACAU À MURCHA-DE-
CERATOCYSTIS**

SAMUEL MARTINS DE JESUS BRANCO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2011

SAMUEL MARTINS DE JESUS BRANCO

**MAPEAMENTO MOLECULAR DE GENES
DERESISTÊNCIA DE CACAU À MURCHA-DE-
CERATOCYSTIS**

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 – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2011

SAMUEL MARTINS DE JESUS BRANCO

MAPEAMENTO MOLECULAR DE GENES DE
RESISTÊNCIA DE CACAU À MURCHA-DE-
CERATOCYSTIS

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

Aprovada: 25 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza
(UNICAMP)

Dr. Jean-Philippe Marelli
(MARS)

Dra. Stela Dalva Vieira Midlej Silva
(CEPLAC)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC - Orientador)

A todos e todas que ao longo da minha vida compartilham comigo as minhas vitórias e os leitos de agonia, em especial a minha família, meus amigos e ao meu tudo Daniela Viana, por terem apostado em mim.

DEDICO

Aos que com muita dedicação não permitiram que eu desistisse no meio do caminho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS que rege a minha vida como um grande maestro e por todas as bênçãos recebidas em toda minha vida.

A minha família que se dedicou 48 horas por dia para que eu chegasse até aqui.

A minha companheira, amiga, e futura esposa DANIELA, tantos anos de carinho e amor.

A todos os amigos e pessoas de grande importância na construção do meu caráter.

Ao Dr. RONAN XAVIER CORRÊA, por toda orientação, atenção, supervisão e tempo dedicados a mim, que ao longo desses cinco anos de convivência aumentaram ainda mais o respeito pelo seu trabalho.

Ao Dr. CARLOS IVAN AGUILAR-VILDOSO, por toda atenção, auxílio, puxões de orelha e tapas dados nas costas, cada tapa vinha acompanhado de uma boa lição e as vezes era só tapa mesmo.

À Dra. IONÁ SANTOS ARAÚJO, pelo auxílio e orientação que acarretaram no aumento da minha habilidade profissional.

À Dra. STELA DALVA, por todo o apoio demonstrado e pela adição de conhecimentos.

Aos funcionários da MARS – Center of Cocoa Science (MCCS), pela dedicação dada a mim em especial aos trabalhadores do campo que tanto contribuíram na montagem do experimento.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia e Genética, pelas horas de convivência e compartilhamento de experiências.

A todos os funcionários da MARS, pelo auxílio e atenção demonstrados na etapa da coleta de dados fenotípicos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela infraestrutura cedida e pelo laboratório de Genética Molecular Aplicada utilizado nas etapas de análises moleculares.

Ao PPGGBM, pelo excelente corpo docente do programa.

ÍNDICE

EXTRATO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. A espécie <i>Theobroma cacao</i> L.	5
2.1.1. Importância Econômica	5
2.1.2. Fatores que influenciam a cultura cacaueteira	6
2.1.3. Melhoramento genético do cacaueteiro	6
2.2. Murcha-de-ceratocystis	7
2.3. Marcadores Moleculares	9
2.4. Mapas genéticos	11
2.5. Mapeamento de locos de características quantitativas (QTL).....	13
3. MATERIAL E MÉTODO.....	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Preparo do inóculo	16
3.3. Inoculação.....	17
3.4. Avaliações.....	17
3.5. Obtenção de dados moleculares	18
3.5.1. Extração de DNA dos genitores e progênes F ₁	18
3.5.2. Marcadores microssatélites EST	19
3.5.3. Marcadores SSR	20

3.5.4. Mapeamento genético	21
3.6. Detecção de QTLs	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Caracterização da população quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis. 23	
4.1.1. Elaboração da escala descritiva	23
4.1.2. Análise das avaliações de resistência	24
4.2. Herança da resistência	30
4.3. Análise molecular	31
4.3.1 Extração de DNA	31
4.3.2. <i>Seleção</i> dos microssatélites EST	32
4.4. Análise de grupos segregantes com iniciadores ESTs	33
4.5. Mapeamento da população oriunda do cruzamento TSH1188 com CCN51	34
4.5.1 Genotipagem utilizando iniciadores EST's	34
4.5.2. Genotipagem com marcadores SSR.....	35
4.6. Análise dos grupos de ligação.....	36
4.7 Análise de loco de características quantitativas.....	37
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

EXTRATO

BRANCO, Samuel Martins Jesus. M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. **Mapeamento molecular de genes de resistência de cacau à murcha-de-ceratocystis**. Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa Co-orientadores: Dr. Carlos Ivan Aguilar-Vildoso e Dra. Ioná Santos Araújo.

A murcha-de-ceratocystis é uma doença altamente danosa para a cultura cacaueteira. O patógeno causador dessa doença foi identificado em 1918 no Equador como *Ceratocystis fimbriata* e, mais tarde, reclassificado como *C. cacaofunesta*. A disseminação do patógeno entre as plantas ocorre principalmente no manejo da cultura (podas), podendo levar à morte das plantas. Esta doença está amplamente disseminada na região cacaueteira da Bahia, chegando a uma incidência de 30% nos cultivos com a variedade Theobahia, clone comercializado como resistente à vassoura-de-bruxa. Visando entender a herança da resistência de cacau à murcha-do-ceratocystis, uma amostra da progênie F₁ (TSH1188 x CCN51) foi inoculada com 30 µL de uma suspensão de 5x10⁴ conídios/mL, e foi avaliada quanto aos sintomas dessa doença, sendo os genitores dessa progênie contrastantes para resistência à murcha-do-Ceratocystis (TSH1188 é resistente e CCN51 é suscetível). Dentre as 282 progênies avaliadas, apenas 71 apresentaram pelo menos três repetições por clones e foram considerados nessa análise de

resistência. A doença foi quantificada por meio de uma análise quantitativa (utilizando-se uma escala descritiva elaborada para a análise do experimento) e uma análise qualitativa (sobre o número de plantas mortas), visando detectar estratégias de avaliação adequadas à verificação de possível segregação da resistência nessa população. Noventa e três marcadores microssatélites SSR e dois marcadores SRR/EST's tiveram sua segregação avaliada nos 71 indivíduos F_1 , com auxílio do software MapMaker/Exp. As análises de associação por regressão múltipla a partir de marca simples e mapeamento por intervalo simples e composto foram utilizadas, visando mapear possíveis regiões genômicas associadas à resistência a essa doença, utilizando o software QTMol. As análises de QTL foram conduzidas por grupo de ligação separadamente e direcionadas as características avaliadas. A escala descritiva de sintomas de doença elaborada no presente trabalho mostrou-se eficaz para a análise do patossistema em estudo, podendo ser utilizada em estudos sobre esse patossistema. A avaliação fenotípica do presente estudo evidenciou uma proporção 3:1 de resistentes e susceptíveis nas análises qualitativas e 1:2:1 nas análises quantitativas, podendo ser explicado pela presença de dois genes dominantes independentes para a resistência à doença da murcha-de-ceratocystis. Isso nos permite inferir que TSH1188 é um duplo heterozigoto e CCN51, um duplo recessivo. Dos 95 marcadores analisados, 55 foram agrupados em sete diferentes grupos de ligação, o tamanho do mapa formado por eles foi de 545,6 cM, uma média de 9.92 cM entre os marcadores. As análises de QTLs associados à resistência à murcha-de-ceratocystis não foram significativas, contudo é possível afirmar o potencial para mapeamento de QTLs dessa população pelo considerável número de associações detectadas entre marcadores estudados, podendo ser detectados ao serem inseridos novos marcadores.

PALAVRAS-CHAVE: *Theobroma cacao*, herança genética, escala de avaliação

ABSTRACT

BRANCO, Samuel Martins Jesus M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2011. Molecular mapping of genes conferring resistance to cocoa wilt *Ceratocystis*. Advisor: Dr. Ronan Xavier Corrêa Co-Advisors: Dr. Carlos Ivan Aguilar-Vildoso and Dra. Iona Araújo Santos.

The *Ceratocystis* wilt is a highly damaging to cocoa cultivation. The pathogen that causes this disease was identified in 1918 in Ecuador as *Ceratocystis fimbriata* and later reclassified as *C. cacaofunesta*. The spread of the pathogen between plants occurs mainly in crop management (pruning) and may lead to plant death. This disease is widespread in the cocoa region of Bahia, reaching an incidence of 30% in cultures with a variety Theobahia, marketed as a clone resistant to witches' witch. Aiming to understand the inheritance of resistance against *Ceratocystis* wilt of cocoa, a sample of the F1 progeny (TSH1188xCCN51) was inoculated with 30 mL of a suspension of 5×10^4 conidia / ml, and was evaluated for the symptoms of this disease, the parents of contrasting progeny for resistance to the *Ceratocystis* wilt (TSH1188 is resistance and CCN51 is susceptible). Among the 282 progenies, only 71 had at least three replicates per clone and were considered in this analysis of resistance. The disease was measured using a quantitative analysis (using a descriptive scale developed for the analysis of the experiment) and a qualitative analysis (on the number of dead plants), to detect assessment strategies appropriate to verify a possible segregation of resistance this population. Ninety-three microsatellite markers and two SSR markers SRR / EST 's had

their segregation evaluated in 71 F1 individuals, using the software MapMaker/Exp. The association analysis by multiple regression from simple tag and simple interval mapping and composite were used to map out possible genomic regions associated with resistance to this disease using the software GQMol. The QTL analysis was conducted separately in each linkage group and directed the characteristics evaluated. A descriptive scale of symptoms of disease developed in this study proved effective for the analysis of the pathosystem under review and may be used in studies of this pathosystem. The phenotypic analysis of this study showed a 3:1 ratio of resistant and susceptible in qualitative analysis and quantitative analysis in 1:2:1, and may be explained by the presence of two independent dominant genes for resistance to disease Ceratocystis wilt . This allows us to infer that TSH1188 is a double heterozygote and CCN51, a double recessive. Of the 95 markers analyzed, 55 were grouped into seven different linkage groups, the size of the statement made by them was 545.6 cM, an average of 9.92 cM between markers. Analyses of QTL associated with resistance to Ceratocystis wilt were not significant, but it is possible to affirm the potential for mapping QTL's that population by a considerable number of associations detected between markers, can be detected when inserted new markers.

KEYWORDS: *Theobroma cacao*, heredity, assessment scale

1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é um arbusto de sub-bosque de tronco liso, podendo atingir dez metros de altura, suas flores são hermafroditas, surgem em almofadas florais no tronco e ramos lenhosos. O fruto é uma baga indeiscente com sementes recobertas por uma polpa mucilagínosa de coloração branca, doce e ácida (BARTLEY, 2005). O *Theobroma cacao* é uma das espécies mais importantes do gênero *Theobroma* responsável pela matéria prima do chocolate, é utilizado para a fabricação de sucos, doces, geleias, sorvete, produtos farmacológicos e cosméticos (BARTLEY, 2005).

O cacauzeiro é alvo de várias doenças de grande importância econômica. Na Bahia, a principal doença é a vassoura-de-bruxa, a qual foi detectada no final da década de 80, sendo causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. Essa doença provocou perdas de até 90% em algumas fazendas na região cacauzeira da Bahia, causando em curto espaço de tempo problemas sociais profundos e um colapso na economia regional (DIAS, 2001). Visando a recuperação de áreas dizimadas, novas áreas foram replantadas e adensadas com materiais genéticos resistentes à vassoura-de-bruxa. No entanto, outra doença também importante, a murcha-de-ceratocystis, favorecida pela prática da enxertia adotada na propagação vegetativa e das frequentes podas de formação do material genético, começou a se manifestar. Tal fato ocorreu principalmente com a variedade Theobahia o que acarretou em preocupações adicionais aos cacauicultores (OLIVEIRA, 2004).

A murcha-de-ceratocystis é causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. & T.C. Harr (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005) conhecida popularmente como mal-do-facão. Trata-se de uma doença altamente danosa a cacauicultura podendo provocar a morte das plantas por ela infectada. Esta patologia foi constatada pela primeira vez em 1918, no Equador, cujo patógeno foi identificado inicialmente como *Ceratocystis fimbriata* por Ellis e Halst. A murcha-do-ceratocystis provocou a morte de milhões de plantas, sendo por isso considerada de importância econômica nas décadas de 1950 e 60 (DELGADO & SUÁREZ, 2003 citado por SILVA, 2007). No Brasil, a doença foi inicialmente relatada em Rondônia em 1978 (BASTOS, 1978) e 20 anos mais tarde em enxertos realizados em viveiros e em plantas adultas na Bahia (BEZERRA *et al.*, 1998). A murcha-de-ceratocystis provoca perdas significativas nas plantações, o que agrava ainda mais a situação da atividade agrícola da região cacauieira do sudeste da Bahia, já comprometida pela doença vassoura-de-bruxa (PEREIRA *et al.*, 1989).

O *C. cacaofunesta* penetra no cacauieiro por ferimentos e, devido ao curto espaço de tempo entre a evidência dos sintomas da doença e a morte da planta, torna difícil fazer algum tipo de controle. As medidas profiláticas mais eficientes, econômica e ecologicamente corretas, são tratamento preventivo e uso de cultivares resistentes para o manejo da doença.

A forma de avaliação dos sintomas do mal-de-ceratocystis mais utilizada consiste em determinar a porcentagem de plantas mortas após inoculação, uma estratégia essencialmente qualitativa. Essa metodologia tem permitido distinguir clones de cacau contrastantes para resistência a essa doença (SANCHES, 2008; SILVA, 2004). No entanto, para melhor compreender a herança dessa resistência e descrever o seu caráter segregante em uma população de cruzamentos controlados, é importante fazer também uma avaliação quantitativa, desenvolvendo uma escala descritiva da doença, que seja adequada para avaliar os sintomas da doença e descrever o seu desenvolvimento ao longo do tempo. Portanto, é necessário o estabelecimento de uma metodologia criteriosa e sistemática que permita não só a resposta de estabelecimento ou não da doença, mas sim uma análise quantitativa do processo epidemiológico.

A busca por fontes de resistência à doença é imprescindível para que não se torne um problema ainda mais grave na cacauicultura. Uma alternativa para a obtenção de uma resistência mais efetiva e que limite o desenvolvimento do fungo, seria a seleção de variedades de cacauzeiros que tenham um número considerável de genes relacionados à resistência (Pinto *et al.* 1998). Novas fontes de resistência e uma maior diversidade genética nos cacauzeiros é a principal questão que envolve os programas de melhoramento. Como o cacau é uma cultura perene, é muito importante a presença de vários genes de resistência e defesa da planta, supostamente importantes na durabilidade da resistência (ZADOKS, 1999). Em plantas que possuem cultura perene a presença de vários genes de resistência aumenta a dificuldade do patógeno em transpor a defesa da planta (DIAS *et al.* 2001).

No melhoramento de plantas, o desenvolvimento de mapas genéticos é visto como uma das aplicações dos marcadores moleculares que possibilitam a análise genética das espécies. Além disso, tal estudo proporciona análises completas do genoma, a localização de regiões que controlam caracteres importantes, e a decomposição de características genéticas em seus componentes mendelianos. Além disso, os mapas genéticos são classicamente apresentados como referenciais genéticos do genoma, contribuindo para o conhecimento básico da organização e evolução do genoma. Esse conhecimento possibilita a realização de estudos de mapeamento comparativo e localização de regiões caracteres quantitativos (QTL) tanto de herança simples quanto complexa (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; PATERSON 1995).

A metodologia de construção de um mapa integra uma série de procedimentos, dentre eles podemos mencionar a verificação da segregação individual dos locos e a análise do conjunto de dados gerados para a verificação de ligação, a estimativa da distância e a ordenação dos marcadores nos grupos de ligação (TANKSLEY, 1993).

Embora o máximo de informação genética seja alcançado quando se usa uma população F_2 genotipada com marcadores codominantes (TANKSLEY, 1993), os mapas genéticos do cacauzeiro vêm sendo gerados a partir de progênies F_1 derivadas de cruzamentos entre genitores heterozigotos por se

tratarem de plantas alogámas e com 95% fecundação cruzada (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1988).

Uma progênie oriunda do cruzamento interclonal entre TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), foi inoculada com *C. cacaofunesta* visando avaliar a segregação da resistência à murcha-do-ceratocystis, elucidar a herança da resistência a esta doença, desenvolver uma escala de notas para avaliar os sintomas e identificar regiões genômicas contendo locos controladores de características quantitativas para resistência a essa doença com base em marcadores microssatélites. Espera-se que esses resultados sejam úteis para melhor compreender aspectos genéticos e fitopatológicos desse patossistema, de modo a contribuir futuramente no melhoramento do cacauero visando resistência à murcha-de-ceratocystis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espécie *Theobroma cacao* L.

2.1.1. Importância Econômica

Dentro da família Malvaceae, o gênero *Theobroma* é o de maior importância devido à relevância econômica do cacauzeiro (*Theobroma cacao*), que é uma espécie perene, arbórea, alógama, que vive no estrato inferior da mata. O gênero *Theobroma* possui seis sessões e 22 espécies, distribuídas no continente americano. Todas as espécies são diplóides com $2n = 20$ cromossomos (CARLETO *et al.*, 1946; CALVACANTE, 1988).

A cultura do cacau é uma atividade agrícola relevante para muitos países em desenvolvimento situados ao longo do Equador. Grande parte do cacau produzido nessa região, é consumido nos países de renda média e alta do mundo como a União Europeia, Estados Unidos da América, Japão, Canadá, Rússia, Europa Oriental e Austrália (MENEZES & CARMO-NETO, 1993).

A importância econômica de *T. cacao* é traduzida pelo consumo de chocolate e confeitos sob as mais variadas formas, por todo o mundo, e também pela utilização da manteiga de cacau nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Possui também polpa muito apreciada, que vem conquistando mercados, inclusive internacionais. O mel de cacau, extraído da polpa de suas

sementes, pode ser utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias de boa qualidade (MENEZES & CARMO-NETO, 1993).

Na Bahia, a cacauicultura possui relevante destaque social e ecológico visto que a cultura é responsável por aproximadamente 300 mil empregos diretos, e cerca de três milhões de empregos indiretos, além disso, cerca 100 municípios da Bahia têm suas economias baseadas no cacau, sendo cultivado em área superior a 700 mil ha (DIAS, 2001).

2.1.2. Fatores que influenciam a cultura cacauera

No final da década de 1980, com o advento da vassoura-de-bruxa, o Brasil que o ocupava o 2º lugar em produção de amêndoas caiu para o 5º lugar, a produção que era de mais de 400.000 t/ano caiu para pouco mais de 150.000 t/ano, transformando o Brasil de exportador de amêndoas em importador (DIAS, 2001).

As consequências logo foram sentidas na região sul da Bahia, responsável até então por cerca de 90% da produção nacional, com o empobrecimento da região muitos trabalhadores rurais foram demitidos, vários produtores abriram falência e outros se viram obrigados a diversificar a cultura.

Essa diversificação gerou grandes problemas ambientais, pois a região sul da Bahia é cercada por uma faixa da Mata Atlântica, e o cacau nessa região é plantada em sub-bosque, em um sistema conhecido como cabruca, ao diversificar a cultura, exploração descontrolada de espécies arbóreas e investimentos em criação de animais, grandes lareiras foram abertas nessa faixa de Mata Atlântica a qual é considerada como um dos 25 locais de maior diversidade do mundo com urgência na sua preservação (SILVA, 1997; MYERS *et al.*, 2000).

2.1.3. Melhoramento genético do cacauero

Segundo Dias (2001), a prática do melhoramento do cacauero de uma forma organizada e sistematizada foi implementada em Trinidad, no início da

década de 30, uma vez que as bases para um programa efetivo já tinham sido lançadas. Nessa ocasião, foram realizados os primeiros estudos sobre frutificação, propagação vegetativa e herança dos componentes de produção. Também foi detectada a presença da auto-incompatibilidade em cacauzeiros do alto Amazonas e definidos os primeiros critérios de seleção de cacauzeiros superiores (MOTAMAYOR *et al.*, 2002).

Dentre os primeiros trabalhos de melhoramento do cacauzeiro realizados com base em fontes de resistência, principalmente de coleções do exterior (como os ICS – “Imperial College Selection”, os SCA – Scavina, os TSH – “Trinidad Selected Híbridos”, etc.), o cruzamento do clone Scavina 6 com o clone ICS-1 originou o Theobahia, híbrido de alta produtividade quando comparado com variedades comuns, e de elevada resistência à vassoura-de-bruxa na região. Este foi então recomendado pela CEPEC – Centro de Pesquisas do Cacau para retirada de propágulos visando à expansão da área enxertada, sendo assim utilizado em grande escala por produtores. (SOUZA & DIAS, 2001).

Contudo um dos genitores o ICS-1 é altamente suscetível a *C. cacaofunesta*, fungo responsável pela doença da murcha-do-ceratocystis, popularmente conhecido como “mal do facão” doença altamente danosa, já que pode levar a mortalidade do hospedeiro, o que ocasionou cerca de 80% de morte em algumas áreas (SILVA & LUZ, 2000).

2.2. Murcha-de-ceratocystis

A murcha-de-ceratocystis é uma enfermidade que pode levar a letalidade ao cacauzeiro (ALARCON, 1994 citado por SANCHES 2008) tendo causado danos econômicos na cacauicultura do Brasil desde 1978 (BASTOS 1978).

Doença ocasionada pelo fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta*, antes descrito como *Ceratocystis fimbriata*, foi descrito pela primeira vez em 1918 no Equador por Rorer (DELGADO & SUÁREZ, 2003 citado por SILVA, 2007), e reclassificado como *C. cacaofunesta* por Engelbrecht & Harrington (2005) por meio de técnicas de biologia molecular, e observação de diferenças morfológicas.

Sua primeira ocorrência registrada na Bahia ocorreu em 1997 em mudas propagadas para enxertia (BEZERRA, 1997) e em 1998 em plantas adultas (BEZERRA *et al.*, 1998). Sua infecção é possível em cortes na planta hospedeira o que é muito comum em cacaueteiro devido as praticas de manejo da como a “*desbrota*” e a poda. Outra forma de penetração no hospedeiro se dá através de perfurações ocasionadas por coleobrocas *Xyleborus* sp. (BAKER e HARRINGTON, 2003; MARIN *et al.*, 2003). Há também registros de infecção de plantas pelo contato de raízes em batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), plátano (*Platanus* sp.), e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (BAKER & HARRINGTON, 2003), não sendo relatado nada similar em cacaueteiro.

Nos países onde a murcha-do-ceratocystis ocorre Equador (DELGADO e ECHONDI, 1965 citado por SANCHES, 2008), Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Haiti, México, Peru, República Dominicana, Trinidad, Venezuela, (Thorold, 1975), Brasil (BASTOS & EVANS, 1978), perdas significativas foram registradas.

Embora o *C. cacaofunesta* tenha sido registrado no Brasil em 1978, só apresentou importância econômica no início da década de 1990, com o plantio de alguns novos materiais genéticos originados do cruzamento entre os genótipos Scavina-6, oriundo de coleções do exterior o qual apresentou boa resistência à vassoura-de-bruxa e o ICS-1 (*Imperial College Selection* – Trinidad), dando origem a um cacau Trinitário, de porte médio, que proporcionou um maior número de plantas por área e produtividade mais alta denominado de Theobahia (DIAS, 2001).

O Theobahia apresentava relativa resistência à vassoura-de-bruxa e foi indicado aos produtores para expansão da área enxertada (SOUZA & DIAS, 2001), contudo este genótipo apresentou alta suscetibilidade a murcha-do-ceratocystis, dizimando fazendas inteiras no sul da Bahia.

Os sintomas externos da murcha-de-ceratocystis são clorose e murcha das folhas que secam e morrem, permanecendo aderidas à planta. Na parte externa e interna do tronco ocorre o escurecimento do caule ou ramo, tomando uma coloração marrom acastanhada (SILVA *et al.*, 2004).

O avanço da lesão interna se deve ao fato do patógeno atacar principalmente a medula, o que o conduz com mais eficiência para cima, ocorrendo também uma colonização quase uniforme também no sentido horizontal (FERREIRA, 2005).

A permanência das folhas secas nos ramos e a uniformidade de colonização no sentido horizontal são os principais diferenciais visuais entre a murcha-de-ceratocystis e a murcha-de-verticillium, a qual apresenta queda das folhas e ramos finos após cerca de um mês, e tem lesões internas mais pontuais relacionadas à colonização maior na medula desde as raízes até as folhas (FERREIRA, 2005).

Como controle cultural da doença, recomenda-se a eliminação mediante queima das plantas já mortas. Para as que apresentam os sintomas iniciais recomenda-se a retirada, com instrumento desinfectado, de toda parte afetada no tronco ou caule. No local se forma um cancro cicatrizado e a planta continua viva e produzindo (ALARCON, 1994 citado por SANCHES, 2008).

Avaliação de resistência à murcha-de-ceratocystis vem sendo realizada visto que o controle genético com a utilização de genótipos resistentes é o mais eficiente (SILVA *et al.* 2004)

2.3. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares representam uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético clássico e molecular, sendo utilizado em análises de divergência genética (CATTANEO, 2001); identificação de cultivares (EUJAYL *et al.*, 2000), filogenia (GEHRIG *et al.*, 1997); melhoramento genético visando resistência a doenças (BROWN, 2005).

Na construção de mapas de ligação normalmente são empregados grande número de marcadores moleculares, sejam eles loco-específicos dominantes (como RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso; AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) ou loco codominante (como microssatélites; RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos obtidos por cortes da fita dupla de DNA). As características desejáveis para os marcadores moleculares são: que sejam altamente

polimórficos cubram todo o genoma; sejam seletivamente neutros, no sentido de não afetarem o caráter em questão nem as características reprodutivas do indivíduo, e que sejam codominantes para que todos os possíveis genótipos possam ser identificados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dessa forma os marcadores mais utilizados para mapeamento são os marcadores moleculares do tipo microssatélites (*Simple Sequence Repeats* - SSR) consistem de seqüências curtas de 2-5 nucleotídeos repetidas em tandem, flanqueadas por seqüências únicas não repetidas, sendo os elementos repetidos mais comuns os dinucleotídeos AT e CA. A variação alélica em locos de microssatélites pode ser facilmente detectada por PCR usando marcadores flanqueadores específicos. O polimorfismo baseado na variação do número de seqüências repetidas dos microssatélites é provavelmente ocasionado por falhas da DNA polimerase na replicação do DNA ou por troca de partes desigual entre os cromossomos (GOLDSTEIN, 2000; PONCET *et al.*, 2004). Codominantes, de fácil utilização e baixo custo, os marcadores SSR têm sido úteis para integração de mapas genéticos e mapas físicos e tem provido os melhoristas e geneticistas com uma ferramenta eficiente para associar variação genética e fenotípica (GUPTA, 2000).

Os polimorfismos encontrados nos SSRs podem ser decorrentes de erros da DNA polimerase durante a replicação ou devido à recombinação, durante a meiose (YU *et al.*, 1999), os polimórficos possibilitam a detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie, ou até mesmo entre indivíduos numa população (YU *et al.*, 1999).

Grande parte dos microssatélites está contida em regiões expressas do genoma o que permitiu o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir da análise de seqüências depositadas nos bancos de dados. Estas seqüências, em sua grande maioria são seqüências expressas (ESTs) e podem ser analisadas usando programas computacionais específicos para identifica-los. Os marcadores microssatélites ESTs (SSR-EST) são desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma, podendo ser parte do próprio gene (THIEL *et al.*, 2003). Além disso, as seqüências gênicas são mais conservadas se comparadas às seqüências anônimas (THIEL *et al.*, 2003). O uso de SSR derivados de c-DNA ou EST tem sido relatado em diferentes

trabalhos com a espécie *Theobroma cacao* L. devido a sua colocação próximo a QTLs associados a características fenotípicas de importância econômica. Além disso, por serem derivados de regiões transcritas, mais conservadas, têm aplicabilidade para mapeamento comparativo.

2.4. Mapas genéticos

A partir da década de 1980, com o surgimento dos marcadores moleculares, o mapeamento genético tornou-se possível a todas as espécies vegetais e animais. Ele consiste na construção de mapa de ligação, que por sua vez é a representação linear da posição dos genes ou marcadores dentro dos grupos de ligação que compõem o complemento haplóide de uma espécie. (LIU, 1998).

Os mapas genéticos fornecem referenciais genéticos ao longo do genoma contribuindo assim para o conhecimento básico da organização e evolução do genoma. Permite também estudos de mapeamento comparativo e localização de regiões de caracteres quantitativos (QTLs), tanto de herança simples quanto complexa (PATERSON, 1995).

A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador, a finalidade do mapa a ser construído e as características da espécie, como tipo de reprodução e duração do ciclo de vida. Uma vez tendo os dados de genotipagem dos locos marcadores na progênie segregante e respectivos progenitores, seguem-se, então, as análises estatísticas que são realizadas com o auxílio de programas computacionais como: MapMaker/Exp. 3.0(LANDER, E. *et al.*, 1987), Crimap (GREEN, 1990), JoinMap (OOIJEN, 2001), Outmap (BUTCHER *et al.* 2002).

Para com construção do mapa de ligação são necessários três procedimentos estatísticos: (i) verificação do padrão Mendeliano de segregação de cada loco marcador; (ii) análise da ligação entre todos os pares de marcadores para a formação dos grupos de ligação; e (iii) estimativa da ordem e distância dos locos marcadores dentro dos grupos de ligação. Com

relação a este último, a ordenação dos locos marcadores é um processo que visa a minimizar o número de *crossing-overs* (CARNEIRO, 2002).

Diversos métodos estatísticos são utilizados para a ordenação dos locos, sendo o método da verossimilhança um dos mais utilizados. Algoritmos baseados no método da verossimilhança foram implementados em vários programas de mapeamento genético, por exemplo, MapMaker/Exp. 3.0, Crimap e Multimap.

E por fim, as freqüências de recombinação são transformadas em distância genética de mapa por meio de funções de mapeamento, para que haja aditividade entre as distâncias dos marcadores no mapa. Uma unidade de medida de distância de mapa é definida como a distância entre dois locos em que se espera a ocorrência de uma permuta por gameta, por geração (WEIR, 1996). Denominada Morgan e expressa em centiMorgans (cM), ela é uma função da fração de recombinação e possui caráter aditivo. Assim, as funções de mapeamento transformam as freqüências de recombinação em distâncias aditivas (LYNCH, 1998).

O primeiro mapa de ligação do cacaueteiro foi desenvolvido para a população F_1 de 100 indivíduos do cruzamento entre os clones do Forasteiro UPA 402 e do Trinitário UF 676 (LANAUD *et al.*, 1995). Foram formados dez grupos de ligação, cobrindo 759 cM e contendo 193 locos, incluindo cinco de isoenzimas, 160 de RFLPs sendo 101 de cDNA, 55 de sondas genômicas e quatro de genes de funções conhecidas e 28 locos de RAPD. Este mapa foi posteriormente saturado com marcadores adicionais, tendo sido incluídos mais 18 locos de RFLP (três sondas de cDNA, dez genômicos, dois genes de funções conhecidas, e três sondas teloméricas); dois locos de RAPD; 191 locos de AFLP e 20 de microssatélites, totalizando 424 marcadores, cobrindo 885,4 cM do genoma e com espaçamento médio entre marcadores de 2,1 cM (RISTERUCCI *et al.*, 2000). PUGH *et al.*, (2004) realizaram a mais recente saturação do mapa consensual do cacaueteiro acrescentando mais 35 indivíduos à população F_1 originalmente utilizada por LANAUD *et al.*, (1995). A versão mais atualizada do mapa consensual do cacaueteiro conta com dez grupos de ligação, cobrindo 782,8 cM e contendo 465 locos, dos quais 268 são de

microssatélites, 176 de RFLPs, cinco de isoenzimas e 16 de Rgenes-RFLP. A média de distância entre cada marcador é de 1,7 cM.

2.5. Mapeamento de locos de características quantitativas (QTL)

A maioria das características de importância econômica, alvo do melhoramento, tem herança quantitativa, o que torna o mapeamento de locos de características quantitativas (QTL), uma grande ferramenta para os programas de melhoramento (GRATTAPAGLIA, 2004). O mapeamento de QTLs é determinado pela associação entre genótipos por meio de marcas moleculares e fenótipos quantitativos em uma população segregante. Desse modo, torna-se possível estimar o número mínimo de locos envolvidos no controle dos caracteres, a localização genômica desses locos, e o efeito desses locos na variação fenotípica para diferentes ambientes e genótipos (NEALE & SAVOLAINEN, 2004).

Mapeamento de QTLs pode ser realizado por meio de duas abordagens: (i) mapeamento de QTLs por intervalo (LANDER & BOTSTEIN, 1989; HALEY e KNOTT, 1992), nas quais os genótipos de marcadores que determinam um intervalo são tomados simultaneamente aumentando a precisão da informação dos QTLs; (ii) mapeamento de QTL por intervalo composto (JANSEN et al., 1993; ZENG et al., 1994), em que marcadores ligados a QTLs são incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, diminuindo a variância e aumentando o poder de detecção de novos QTLs.

A literatura descreve diversos trabalhos realizados em mapeamento de QTLs em cacaueteiro, associados a diversas características de interesse: resistência a doenças (DAHER et. al., 2003; CLÉMENT, 2003; FALEIRO, *et al.*, 2006; BROWN et al., 2007), qualidade da manteiga (ARAÚJO, 2002; ARAÚJO et al., 2009), número de óvulos (CLÉMENT, 2003). Atualmente há 76 QTLs mapeados sendo que o número por característica vem sendo considerado baixo, em média quatro (LANAUD *et al.*, 2009), mas não há para murcha-de-ceratocystis.

Outra importante aplicação do mapeamento de QTLs é a seleção assistida por marcadores (SAM), promovendo uma diminuição do tempo e

custo necessários para a seleção de plantas superiores. A informação de QTLs gerada para um determinado par de genitores pela análise de co-segregação entre marcadores e fenótipos nos seus descendentes é considerada, em princípio, plenamente aplicável para a seleção dentro da mesma população na qual os QTLs foram originalmente mapeados. Este fato é possível, pois forte desequilíbrio de ligação é gerado entre alelos a marcadores, e alelos a QTLs dentro desta população. Uma vez determinados os marcadores que co-segrem com alelos favoráveis, estes podem ser utilizados para a seleção de descendentes superiores dentro da população que consolidem um grande número de alelos favoráveis para diversas características. (GRATTAPAGLIA & KIRST, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Material vegetal

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de uma progênie de 282 plantas de origem interclonal oriunda do cruzamento de TSH1188 x CCN51. As plantas encontram-se na Fazenda Almirante Cacau, localizada no município de Barro Preto, BA, plantadas no ano de 2002. Essa população é de grande interesse para o melhoramento devido à natureza dos genitores que apresentam diversos caracteres agronômicos contrastantes, entre eles a resistência à murcha-de-ceratocystis, onde o clone TSH1188 ("*Trinidad Selected Hybrids*") apresenta resistência enquanto CCN51 ("*Colección Castro Naranja*") é suscetível.

Para avaliação da resistência à doença, foram preparadas 2820 mudas, consistindo de 10 clones de cada genótipo pertencentes à população, pelo método de enxertia por garfagem, e teve como porta-enxerto seminal a variedade VB1159 com sete meses de propagado (Figura 1 A).

As plantas foram organizadas de maneira inteiramente casualizada em três canteiros cada uma contendo aproximadamente 300 plantas, permitindo a movimentação por entre as plantas para a manutenção e coleta de dados. (Figura 1B). Para minimizar o efeito de escape foram utilizadas apenas progênies com número de repetições igual ou maior a três clones.

Para montagem do experimento foi utilizada uma casa de vegetação, protegida com lona plástica no teto e nas laterais (Figura 1B). O acesso de

funcionários à área do experimento foi restrito, bem como as ferramentas e outros utensílios foram desinfestados após utilização. As plantas mortas foram incineradas e o substrato utilizado na formação das mudas passou por um processo de calagem após o experimento, antes de ser descartado.



Figura 1: Aspecto geral das fases da produção de mudas por enxertia tipo garfagem, das progênes do cruzamento entre TSH1188 e CCN51, em porta enxerto VB1159. A – As mudas de VB1159 (canteiros laterais) são cortadas e adicionadas de ramos das progênes, permanecendo cobertas com plástico por 24 horas (canteiro central). B - Clones com sete meses prontos para a inoculação. Detalhe para o isolamento na casa de vegetação feito com lona plástica.

3.2. Preparo do inóculo

O isolado utilizado para a avaliação foi o Cf 20 de *C. cacaofunesta* pertencente à Micoteca da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau, que teve sua virulência comprovada em trabalhos anteriores (SILVA *et al.* 2004).

O inóculo foi preparado por técnicos do laboratório de fitopatologia da CEPLAC em meio BDA e mantido em câmara com temperatura de 25°, por quatro dias. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de água destilada estéril sobre as colônias e realizadas raspagens superficiais com uma alça de Drigalsky. Posteriormente, essa suspensão foi filtrada com gaze estéril e quantificada em câmara de Neubauer e ajustando-se a concentração final para $5,0 \times 10^4$ esporos /mL.

3.3. Inoculação

A inoculação foi realizada no caule (acima do porta enxerto), em cortes verticais com pequena inclinação com o uso de uma lâmina, com aproximadamente 3 cm de altura. Após o corte foi inserido com o auxílio de uma micropipeta, 30 μ L da suspensão do inóculo e feita uma câmara úmida com água e algodão estéril e isolado com uma fita vedante de politetrafluoretileno (Figura 2).



Figura 2: Aspecto visual da região da inoculação com suspensão de esporos de *Ceratocystis cacaofunesta* acima da região da garfagem das mudas de da progênie TSH1188 x CCN51, coberto com algodão umedecido e com filme de politetrafluoretileno.

3.4. Avaliações

As duas formas de avaliação utilizadas foram as seguintes: (i) uma avaliação qualitativa com base no número de plantas mortas; (ii) uma avaliação quantitativa a partir dos valores atribuídos por uma escala descritiva. A análise qualitativa foi realizada de acordo com metodologia previamente padronizada (Sanches, 2008), que consiste na análise do número de plantas mortas.

Para avaliar quantitativamente o patossistema *C. cacaofunesta* – *T. cacao* foi elaborada uma escala descritiva para mensurar a severidade do patossistema. Seguindo este raciocínio para análise da severidade, uma escala descritiva de oito notas foi criada com os seguintes valores: 0 - aspecto normal

sem sintomas de doença aparente; 1 – perda de turgidez da folha, ou amarelecimento de apenas uma folha; 2 – amarelecimento de duas ou mais folhas; 3 – aproximadamente metade do número total de folhas com amarelecimento; 4 – metade das folhas com amarelecimento; 5 – aproximadamente todas as folhas com sintomas; 6 – todas as folhas com sintomas, com o ramo vivo; 7 – morte da planta.

Cada planta foi avaliada 16 vezes. Em cada avaliação, uma nota individual foi dada para cada planta, variando de não incidência da doença em que foi atribuída a nota 0 (zero) à morte da planta onde foi atribuída a nota 7 (sete).

3.5. Obtenção de dados moleculares

3.5.1. Extração de DNA dos genitores e progênies F₁.

Amostras de DNA de CCN51 e TSH1188, que foram utilizados nos cruzamentos, e de 282 plantas da F₁ foram extraídas pelo método de CTAB modificado (DOYLE & DOYLE, 1990).

Amostras de tecido de folha de cada indivíduo foram maceradas em presença de nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP), sendo posteriormente transferidas para tubos Ependorff® de 2 mL, adicionando-se aos mesmos 800 µL de tampão (tris-HCl 100 mol.L⁻¹, pH 8,0; EDTA 20 mol.L⁻¹, pH 8,0; NaCl 1,4 M; 0,2% (v/v) β- mercaptoetanol, 2% CTAB, e 0,1 mg de proteinase K). Após 60 min em banho-maria a 65 °C, os tubos foram centrifugados a 14.000 g por sete min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos.

Aos sobrenadantes adicionaram-se 800 µL de 24:1 clorofórmio: álcool isoamílico, agitando por cinco min, seguindo de centrifugação a 14.000 g por sete min. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Os sobrenadantes transferidos para novos tubos receberam isopropanol gelado, na proporção de 1:1 (isopropanol:sobrenadante), e foram centrifugados a 14.000 g por cinco min.

Descartaram-se os sobrenadantes e os precipitados foram lavados com 1 mL de solução 70% de etanol por 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos ao ar por 12 h e ressuspensos em solução de TE (Tris-HCl 10 mol.L⁻¹, EDTA 1 mol.L⁻¹, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 40 µg/µL e incubados em banho-maria a 37° C por 60 min.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 3 µL de cada amostra, adicionada de 3 µL do corante tipo IV (azul de bromofenol a 0,25%, sacarose 40%) foi aplicada em gel de agarose a 0,8%, utilizando como tampão de corrida o TBE (EDTA 2 mol.L⁻¹; Tris-borato 9 mol.L⁻¹).

A corrida eletroforética foi realizada a 80 V, durante 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹ e fotodocumentados sob luz ultra violeta (UV). A concentração do DNA de cada amostra foi estimada pelo espectrofotômetro GE Healthcare RNA/DNA Calculator Spectrophotometer Model Gene Quant Pro e, em seguida diluída para 10 ng/µL.

A qualidade do DNA foi avaliada tanto por gel de agarose 1% como por espectrofotometria a 260 nm.

3.5.2. Marcadores microssatélites EST

As amostras de DNA de cada planta foram amplificadas pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando 24 marcadores microssatélites EST (SSR–EST) (BORRONE et. al., 2007). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 20 µL contendo 10 ng de DNA genômico por amostra, cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) a 2,5 mmol.L⁻¹, tampão para PCR (Tris-HCl a 10 mmol.L⁻¹, KCl a 50 mmol.L⁻¹, MgCl₂ a 1,5 mmol.L⁻¹, pH 8,3), 2,5 µL de DNA, cada par de primers (forward e reverse) a 0,2 µmol.L⁻¹ e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas).

O programa de amplificação utilizado foi 94 °C por 5 min + 40 ciclos de 94°C a 30 s, a temperatura de anelamento de cada primer por 40 s, e extensão a 72 °C por 1 min + 72 °C por 7 min e redução da temperatura para 15 °C até a realização da eletroforese ou armazenamento.

Os padrões de amplificação foram evidenciados com alíquotas de 10 µL de reação com 2 µL de corante tipo IV aplicadas em géis de agarose a 2%, submetidos a eletroforese por 40 min a 90 Volts. Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio 10 mg.mL⁻¹ e fotografados sob luz ultravioleta (UV). Posteriormente, alíquotas de 2 µL das reações de amplificação foram aplicadas em géis de acrilamida 4%. Nestas amostras foram adicionados 2 µL do corante de tampão de carregamento (azul de bromofenol a 0,05%, xileno cyanol a 0,05%, formamida a 95% e NaOH a 10 mmol.L⁻¹). A solução de acrilamida 4% foi preparada nas seguintes condições: 100 mL de solução acrilamida-bis-acrilamida (19:1) a 40%, 420g de ureia, 50 mL de TBE 10X e 533,2 mL de água destilada. Para cada gel, foram utilizados 70 mL da solução de acrilamida 4%, acrescidos de 45 µL de TEMED 99% e 450 µL APS (persulfato de amônio) a 10%, imediatamente antes da montagem do gel.

A detecção dos marcadores foi feita a partir da coloração com nitrato de prata de acordo com Bassam *et al.* (1991). O peso molecular das amostras foi estimado pelo marcador DNA Ladder 100 pb (Fermentas).

Os seguintes primers, previamente desenvolvidos por Borrone *et al.* (2007) foram utilizados: SHRSTc047, SHRSTc053, SHRSTc064 e SHRSTc070 à temperatura de anelamento de 56 °C; SHRSTc048, SHRSTc049, SHRSTc050, SHRSTc051, SHRSTc052, SHRSTc054, SHRSTc055, SHRSTc056, SHRSTc057, SHRSTc058, SHRSTc059, SHRSTc060, SHRSTc061, SHRSTc062, SHRSTc063, SHRSTc065, SHRSTc066, SHRSTc067, SHRSTc068, SHRSTc069 à temperatura de anelamento de 60 °C.

3.5.3. Marcadores SSR

Os noventa e três marcadores microssatélites utilizados para amplificar o DNA das 72 progênes e dos dois genitores foram previamente desenvolvidos (Lanaud *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 2004). Uma alíquota dos produtos PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose para confirmar as amplificações e as reações confirmadas foram submetidas a separação dos fragmentos em

géis de poliacrilamida, utilizando o sequenciador automático ABI 3730. Após a eletroforese, os dados foram avaliados utilizando-se o programa GENEMAPPER[®]. Realizou-se a análise de dados, extraindo os eletroferogramas dos géis e determinando o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, utilizando-se padrão de peso molecular ROX400. Essa genotipagem foi realizada em laboratórios do USDA, Miami, por Ioná Santos Araújo e, por motivo de sigilo provisório até a publicação dos resultados, os primers serão recodificados nesta dissertação.

3.5.4. Mapeamento genético

As marcas utilizadas na construção do mapa de ligação foram identificadas quanto à presença ou ausência nos genitores. Contudo, foi realizado o artifício de duplicar o marcador e inverter a denominação, a fim de identificar a origem das bandas, como proposto por AL-JANABI et al. (1993). Dessa forma, os fragmentos presentes nos genitores TSH1188 e CCN51 tiveram suas origens determinadas e também puderam ser utilizados nas análises subsequentes. Dentre as 282 progênies genotipadas foram utilizadas apenas 71 que possuíam dados fenotípicos analisados. Cada alelo SSR exclusivo de TSH1188 foi analisado quanto à segregação na proporção 1:1 pelo teste qui-quadrado; o procedimento idêntico foi realizado com os alelos exclusivos de CCN51. A codificação dos dados foi realizada de acordo com Lander *et al.* (1987). Portanto, a matriz com a presença de alelos foi transformada em uma matriz de A e H e os genótipos nos locos contendo alelos exclusivos para pelo menos um dos genitores foram padronizados. As características qualitativas morte (suscetível) e não morte (resistente) foram padronizadas com H para suscetível e A para resistente. O seu espelho foi padronizado como H para resistente e A como suscetível. A análise pelo teste de multipontos, empregando-se LOD = 3.0, foi feita pelos comandos "group", "Compare" e "Map" do programa MAPMAKER/EXP 3.0(LANDER et al., 1987). Além do comando básico de mapeamento pelo teste de multipontos, testes de ligação adicionais foram utilizados para quantificar os valores de LOD e

distância genética, relativos a hipóteses de ligação de genes codificadores das características com o conjunto de marcadores, utilizando-se o comando "Try" do MapMaker.

3.6. Detecção de QTLs

Após a construção do mapa, os marcadores foram submetidos à análise de mapeamento por regressão múltipla por marcas simples para identificação de marcadores associados à resistência a murcha do *ceratocystis*, com auxílio do programa Gqmol (CRUZ & SCHUSTER, 2004). Este método consiste em localizar os QTLs nos mapas de ligação com marcadores moleculares. Essa metodologia estima o valor mais provável do efeito de um possível QTL (pelo método da razão de verossimilhança) e do escore LOD (\log_{10} da razão, chance ou probabilidade).

A razão da verossimilhança (*oddsratio*) é obtida pela proporção entre a probabilidade de que os dados sejam decorrentes da ligação entre um QTL e um loco marcador e a probabilidade de que os dados observados não sejam decorrentes da ligação genética entre um QTL e um loco marcador. Normalmente, a ligação entre um QTL e um loco marcador é declarada quando a razão de probabilidade alcança 1000:1, favorecendo a ligação sobre a ausência de ligação (BEARZOTI, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da população quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis.

4.1.1. Elaboração da escala descritiva

Para a realização das análises quantitativas proposta neste trabalho foi elaborada uma escala descritiva com oito notas (Figura 3). Com o uso da escala foi possível analisar a severidade dos sintomas em cada genótipo individualmente, e verificar a segregação da resistência à murcha-de-ceratocystis na população estudada. Desta forma, a escala descritiva mostrou-se eficaz para discriminar os diferentes níveis de sintomas das plantas incluídas neste trabalho e poderá ser utilizado para outros estudos que venham a ser feitos com esse patossistema.

Essa escala torna-se relevante visto a ausência de metodologias para análise para a quantificação da severidade da doença em cacauero. O único parâmetro até então utilizado para a avaliação da resistência a murcha-de-ceratocystis em cacauero é o índice de plantas mortas (%PM) após a inoculação de *C. cacaofunesta* (SANCHES, 2008). Desta forma, foi necessário desenvolver essa metodologia de análise quantitativa do processo epidemiológico. Segundo KRANZ (1988) a medida da intensidade de doenças tem a mesma importância que a diagnose dentro da fitopatologia.



Figura 3: Escala descritiva do aspecto das mudas inoculadas com *Ceratocystis cacaofunesta*. 0 = aspecto normal sem sintomas de doença; 1 – perda de turgidez da folha, ou amarelecimento de apenas uma folha; 2 – amarelecimento de duas ou mais folhas; 3 – aproximadamente metade das folhas com amarelecimento; 4 – metade das folhas com amarelecimento; 5 – presença de folhas sem sintomas; 6 – Todas as folhas com sintomas, com o ramo vivo; 7 – Morte da planta.

4.1.2. Análise das avaliações de resistência

O nível de pegamento da enxertia foi baixo (31,7%), resultando após sete meses, 895 plantas em condições de serem inoculadas. Contudo apenas 71 genótipos possuíam mais de três repetições, o que levou a uma diminuição do número de plantas analisadas, no intuito de diminuir a possibilidade de erro nas análises, dessa forma foram analisadas apenas 244 plantas.

A avaliação quantitativa, realizada seguindo a escala descritiva desenvolvida no item anterior, revelou uma variação desde 0 (zero) até 5,98 (Tabela 1). A média aritmética da avaliação foi 1,42, com um desvio padrão de 1,19 e variância de 1,41, tendo o coeficiente de variação igual a 58,86%. Três

genótipos foram avaliados com a nota 0 (14/36, 15/07 e 24/17) e um genótipo com o valor 5,98 (1/10).

A análise de severidade da murcha-de-ceratocystis em cacauero possibilitou expressar a curva de desenvolvimento da doença (Figura 4). A evolução da doença foi de 0,0937 por dia ou 10,62 dias para uma alteração de uma unidade do índice de doença. A fase lag durou 12,8 dias, o período da fase log teve início 12,8 dias após a inoculação e término 29,8 dias em um total de 17 dias, alcançando assim a fase estacionária. Esses dados permitem afirmar que a primeira avaliação possa ser realizada 12 dias após a inoculação, já que durante esse período o fungo está se adaptando, o número mínimo de dias para avaliação do patossistema *C. cacaofunesta* – *T. cacao* é de 30 dias, já que após esse período ocorre uma estabilização dos sintomas, ocorrendo também a reabilitação de algumas plantas.

O valor um da escala descritiva pode não estar associado a sintomas do fungo, mas sim, a respostas da planta ao dano causado no caule para a introdução dos inóculos, uma evidência para isso é fato que a fase log inicia-se com o valor das médias das notas acima da nota um (Figura 4).

Tabela 1. Progênies do cruzamento entre os clones TSH1188 com o CCN51, número de clones por progênie inoculados com *C. cacaofunesta* e médias das avaliações de acordo com a escala descritiva.

Progênie	Nº de clones	Média	Progênie	Nº de clones	Média	Progênie	Nº de clones	Média
01//04	3	0,96	06//10	4	1,48	13//01	3	2,88
01//10	3	5,98	06//14	4	3,45	13//03	4	2,89
01//13	3	1,94	06//41	3	4,88	13//12	3	1,63
01//25	3	2,52	06//42	4	1,36	13//15	3	2,25
02//08	3	1,48	06//46	3	4,13	13//16	4	2,64
02//09	3	2,00	07//13	4	2,56	13//28	3	1,35
02//11	4	1,66	07//15	4	0,98	14//02	3	1,50
02//13	3	0,90	07//18	3	3,06	14//12	3	2,63
02//20	4	2,31	07//43	4	0,50	14//24	4	0,69
02//22	3	2,13	07//46	3	1,83	14//27	4	0,63
03//02	4	2,89	08//25	3	2,00	14//28	4	0,98
03//05	3	2,06	08//37	3	2,13	14//31	3	2,00
03//11	5	1,21	08//42	4	1,67	14//35	3	3,50
04//10	3	1,13	08//45	3	0,19	14//36	3	0,00
04//14	3	4,60	09//31	3	1,23	14//37	3	1,67
04//21	4	1,55	09//40	4	1,16	15//03	5	2,71
04//23	3	2,83	09//42	3	2,67	15//04	4	1,50
04//27	3	3,42	10//04	3	2,40	15//05	3	2,27
05//06	3	3,90	10//07	3	1,54	15//07	4	0,00
05//09	3	1,85	10//18	3	1,29	15//12	4	1,08
05//16	4	2,09	12//02	4	0,53	24//17	3	0,00
05//18	4	0,50	12//04	4	2,25			
05//22	4	1,84	12//33	4	3,94			
06//01	3	2,77	12//35	4	3,38			
06//03	3	0,48	12//42	3	3,25			

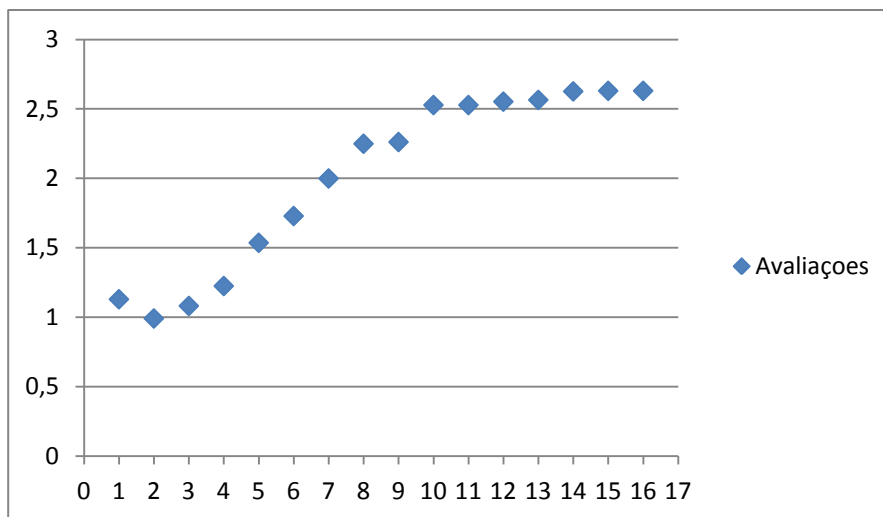


Figura 4. Evolução da severidade da murcha-de-ceratocystis em cacaueiro (*Theobroma cacao*) causada por *Ceratocystis cacaofunesta*, cada ponto representa uma avaliação, em y valores atribuídos aos genótipos em x número da avaliação, lag=12,8 e log=29,8.

Nas 16 avaliações fenotípicas realizadas, o primeiro registro de plantas mortas (três plantas mortas, equivalente a 10% do total de PM) ocorreu na quarta avaliação, realizada aos 12 dias após a inoculação (Figura 5). A avaliação posterior apresentou um alto número de mortes 15 (50 % do total de PM). A última morte foi registrada na 14ª avaliação, totalizando 30 plantas mortas.

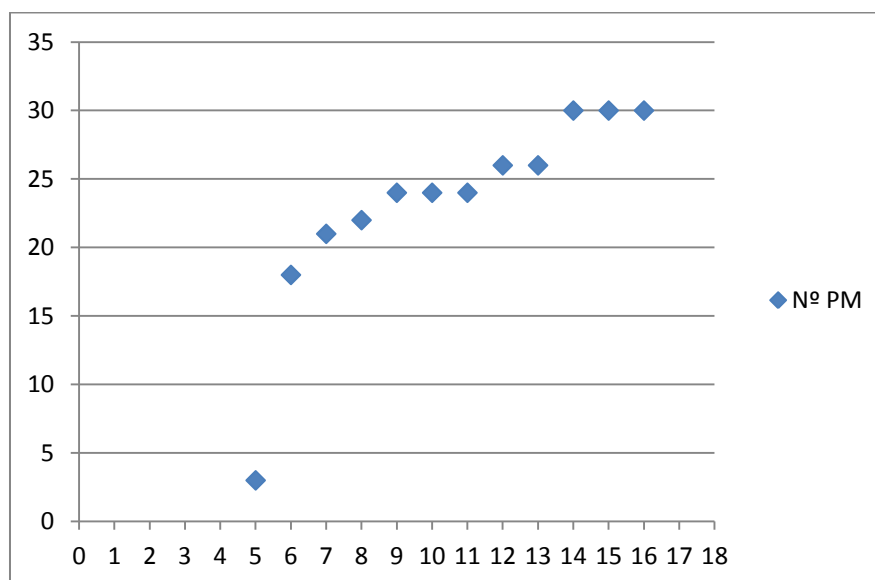


Figura 5. Plantas mortas pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* causador da doença murcha-de-ceratocystis em cacaueiro (*Theobroma cacao*). Cada ponto representa uma avaliação (eixo X) pelo o número de plantas mortas até aquela avaliação (eixo Y). lag=12,8 e log=29,8.

A distribuição das classes encontradas na avaliação qualitativa teve os seguintes resultados: 22 progênies foram suscetíveis ao inóculo e 49 progênies apresentaram resistência (Figura 6). Pela hipótese de segregação 3:1, o valor de χ^2 calculado foi 1,356, com GL=1, tendo uma probabilidade associada de 24,1% de que desvios da magnitude dos observados aqui em relação ao esperado ocorram como sendo ao acaso. Portanto, aceita-se a hipótese de uma segregação 3:1 para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis, a partir dos dados de fenotipagem qualitativa.

Na avaliação quantitativa, foram observados os seguintes resultados: 14 progênies apresentaram a média da nota abaixo de 1, caracterizando-se como sem sintomas aparentes ou sintomas não associados ao fungo em estudo; 45 progênies apresentaram a média das notas entre acima 1 e menor que 3, caracterizando-se o início dos sintomas ocasionados pelo fungo até a 50% da planta com sintomas do fungo; e 12 progênies apresentaram médias acima de 3 e todas essas 12 progênies dessa classe tiveram pelo menos um clone com nota 7, ou seja, todos tiveram pelo menos uma planta morta durante as análises (Figura 7). Os valores de $\chi^2= 5,19$ com GL=2, correspondentes a uma probabilidade de 7,44 %. Portanto, o erro não é significativo, aceitando-se a hipótese de uma segregação 1:2:1 quanto à característica resistência à murcha-de-ceratocystis, a partir dos dados obtidos na avaliação quantitativa. Essas três classes fenotípicas podem ser descritas como (1) resistente : (2) mediantemente resistente : (1) suscetível, para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis.

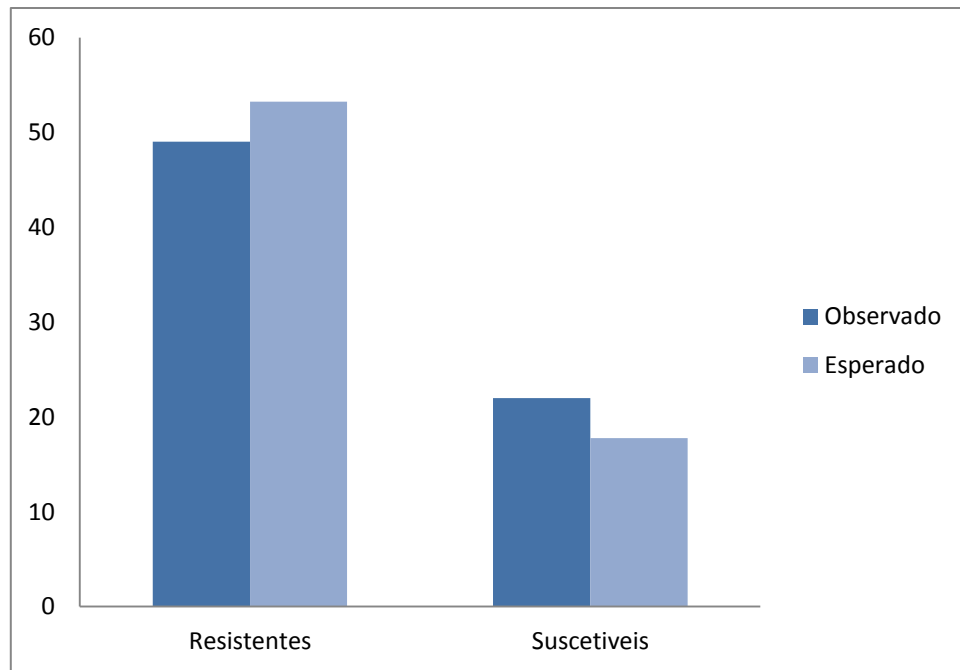


Figura 6. Distribuição das classes fenotípicas encontradas nas avaliações qualitativas, $\chi^2 = 1,356$ com grau de liberdade 1, sendo o erro não significativo, aceitando-se assim a hipótese de segregação 3:1 para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis.

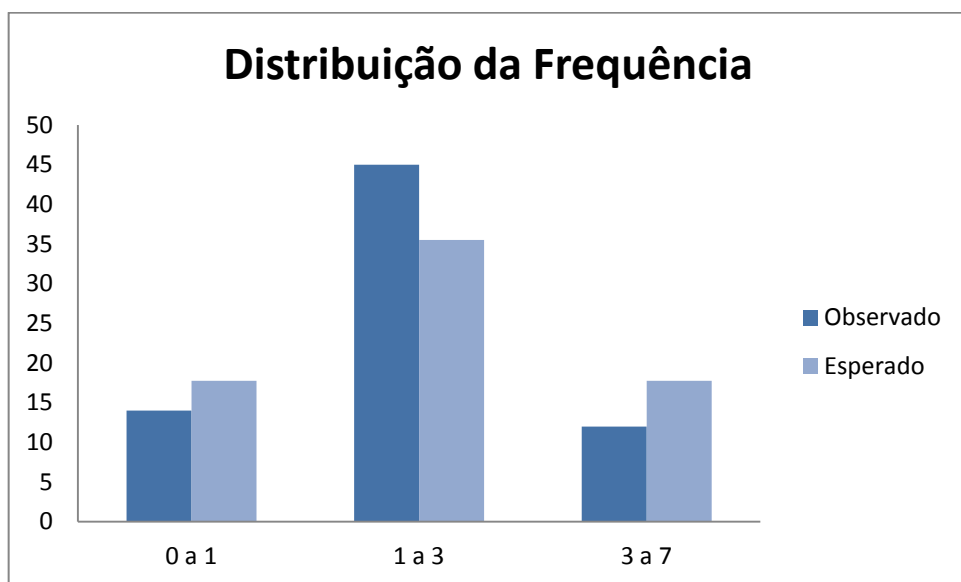


Figura 7. Distribuição das classes fenotípicas encontradas nas avaliações qualitativas, $\chi^2 = 5,19$ com grau de liberdade 2, sendo o erro não significativo, aceitando-se assim a hipótese de segregação 1:2:1 para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis.

4.2. Herança da resistência

Nas avaliações qualitativas realizadas no experimento, comprovou-se a hipótese de uma segregação mendeliana 3:1 (resistência: suscetibilidade) (Tabela 2), ao passo que na avaliação quantitativa, comprovou-se a hipótese de distinção entre genótipos na proporção de 1:2:1 (resistência : resistência intermediária : suscetibilidade) (Tabela 3). Os testes χ^2 foram realizados, seus resultados não significativos indicam a aceitação da hipótese de segregação 3:1 (resistente: suscetível) nas duas formas de avaliações realizadas. Além disso, a confiabilidade desses resultados pode ser constatada pelo teste de heterogeneidade não significativo $P = 23,53\%$, indicando que não há diferença entre as hipóteses de segregação testadas nas duas avaliações testadas.

A segregação mendeliana 3:1 é típica do cruzamento entre genitores heterozigotos. Contudo como já afirmado anteriormente os genitores dessa população possuem características contrastantes para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis, THS 1188 (resistente) e CCN 51 (suscetível) (SILVA, 2006). Desta forma, presume que esses dois genitores não possuam o mesmo genótipo. Outra hipótese é a ação de dois locos, onde o TSH1188 possui dois genes heterozigotos dominantes enquanto o CCN51 possui dois genes recessivos, resultando em quatro genótipos diferentes 1:2:1.

Tabela 2. Cálculo do χ^2 nas análises das classes fenotípicas encontradas nas análises qualitativas para uma H_0 segregação 3:1 para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis

Fenótipos	Observado	Esperado	DF esperada
RESISTENTE	49	53,25	3
SUSCETIVEL	22	17,75	1
	GL	Qui-quadrado	Probabilidade (%)
	1	1.35	24,40

Tabela 3. Cálculo do χ^2 nas análises das classes fenotípicas encontradas nas análises quantitativas para uma H_0 segregação 1:2:1 para a característica resistência à murcha-de-ceratocystis

Fenótipos	Observado	Esperado	DF esperada
AB	14	17,75	1
Ab	23	17,75	1
aB	22	17,75	1
Ab	12	17,75	1
FV	GL	Qui-quadrado	Probabilidade (%)
Total	3	5.22	15.60
Segregação A/a	1	1,27	72.18
Segregação B/b	1	0.014085	90.55

4.3. Análise molecular

4.3.1 Extração de DNA

As amostras de DNA dos genitores bem como das 282 progênes foram quantificadas em espectrofotômetro GeneQuant™ Pro RNA/DNA calculator GE Healthcare Biosciences, a concentração variou de 144,0 a 578,0 ng/μL. O DNA extraído apresentou-se íntegro ou com baixa proporção de fragmentação, em todas as amostras foi observada a formação de uma banda nítida de DNA sendo suficientes para a realização de todas as reações necessárias para a análise. As amostras que não apresentaram concentração suficiente para as ampliações foram novamente extraídas. Géis de agarose a 0,8% foram utilizados para verificar a integridade do DNA (Figura 8). Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng/μL.

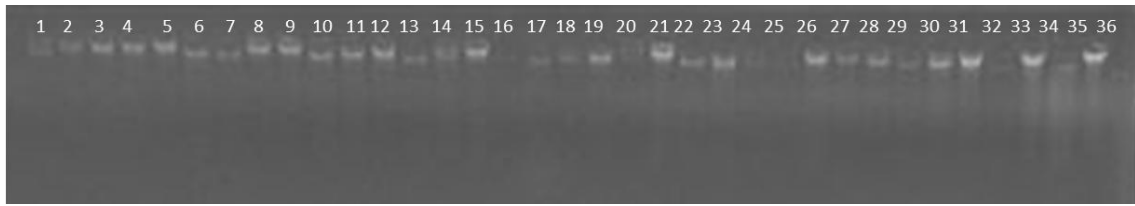


Figura 8: Recorte de gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹ após eletroforese em cuba horizontal Applied Biosystems a 80 volts por 40 minutos. Nas canaletas de 01 e 02 estão as amostras de DNA extraído dos genitores (TSH1188 e CCN51), e nas canaletas de 03 a 36 estão algumas amostras dos DNAs da progênie.

4.3.2. Seleção dos microssatélites EST

Dos vinte e quatro microssatélites EST utilizados, oito mostraram-se polimórficos entre os genitores da população: (SHRSTc047, SHRSTc048, SHRSTc056, SHRSTc059, SHRSTc062, SHRSTc067, SHRSTc068, SHRSTc069). Géis de agarose 2% e acrilamida 4% foram utilizados para confirmar as ampliações e os polimorfismos respectivamente (Figura 9A e B).

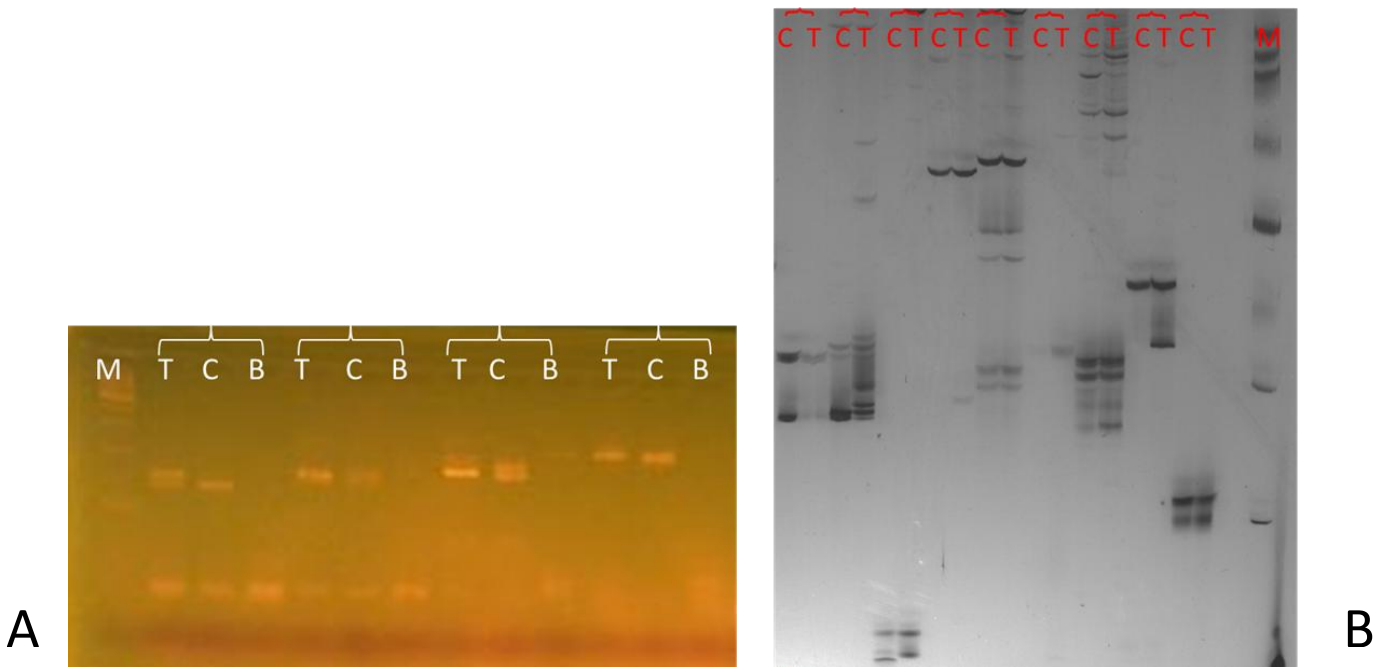


Figura 9: Em A recorte de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio a 10 mg/mL⁻¹ após eletroforese em cuba horizontal a 90 volts por 40 minutos. No primeiro poço está o marcador de 100pb, nos poços consecutivos estão o DNA TSH 1188 (T), CCN 51 (C) e o controle negativo (B), amplificados com 4 EST. Em B recorte de gel de acrilamida a 4% corado com nitrato de prata, da esquerda para a direita o primeiro poço possui um marcador de 100pb e em sequência as ampliações com o DNA TSH1188(T) e CCN51(C) amplificados com 9 EST.

4.4. Análise de grupos segregantes com iniciadores ESTs

Após a caracterização fenotípica da progênie, quatorze genótipos foram selecionados por apresentarem características extremas, sendo sete pertencentes ao grupo dos resistentes (apresentaram nota zero na média das análises quantitativas), e sete pertencentes ao grupo dos suscetíveis (apresentaram as maiores médias das análise quantitativas).

Amostras de DNA destes genótipos foram amplificadas utilizando os marcadores EST que se mostraram polimórficos entre os genitores (Figura 10). Dos oito marcadores utilizados dois apresentaram segregação (SHRSTc062 e SHRSTc067), contudo nenhum dos marcadores apresentou a segregação esperada para os grupos resistentes e suscetíveis da característica em estudo, o que indica a não associação desses marcadores com a resistência à murcha-de-ceratocystis.

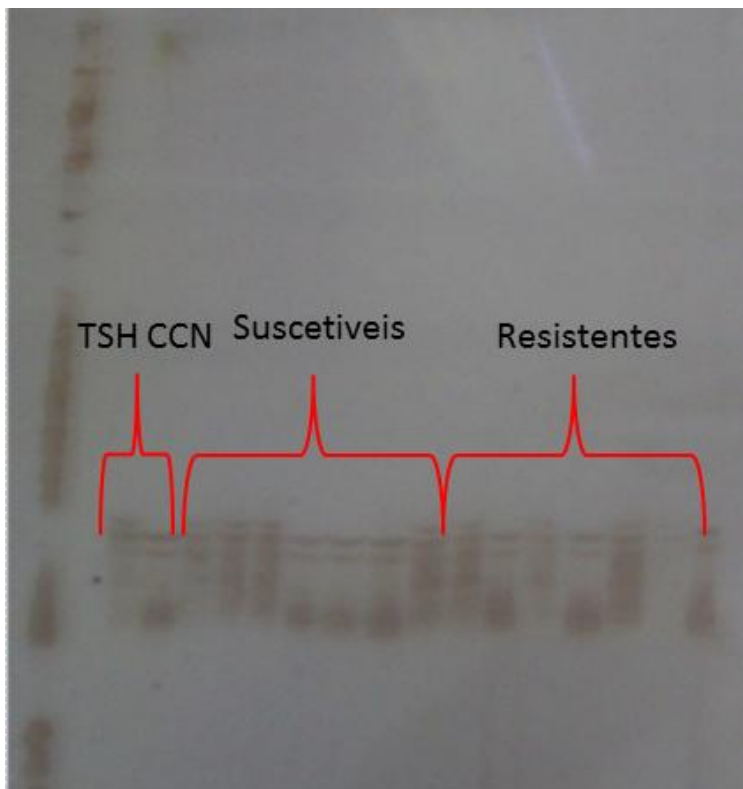


Figura 10: Recorte de gel de acrilamida a 4% corado com nitrato de prata. Da direita para a esquerda o primeiro poço possui um marcador de 100pb e em sequência as ampliações com o DNA TSH1188(T) e CCN51(C), 7 progênies suscetíveis e 7 progênies resistentes amplificadas com o ESTSHRSTc062.

4.5. Mapeamento da população oriunda do cruzamento TSH1188 com CCN51

4.5.1 Genotipagem utilizando iniciadores EST's

Os iniciadores SHRSTc062 e SHRSTc067 apesar de não terem segregado nos grupos extremos, foram utilizados para genotipar os 282 genótipos da população. Somente o SHRSTc062 segregou na população em uma proporção mendeliana 1:1 (Figura 7).

O SHRSTc067 apresentou desvios de segregação e foi descartado no presente estudo. Tal medida foi adotada pelo fato de que o mesmo poderia alterar a construção dos grupos de ligação, gerando grupos desuniformes. A utilização desses marcadores pode aumentar a chance de erro, ou seja, assumir como verdadeira uma associação entre dois locos não ligados (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

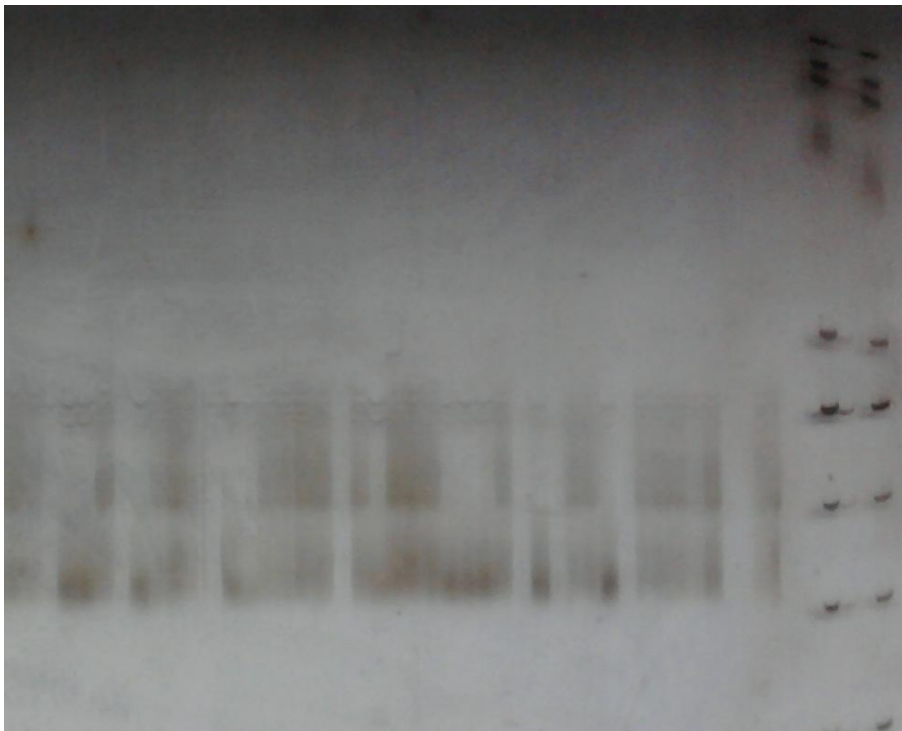


Figura 11. Recorte de gel de acrilamida a 4% corado com nitrato de prata, da esquerda para a direita o primeiro poço possui um marcador de 100pb e em sequencia ampliações de 45 genótipos da população com o marcador SSR/EST SHRSTc062.

4.5.2. Genotipagem com marcadores SSR

Dos 93 microssatélites utilizados apenas 55 segregaram na proporção mendeliana corretamente. Foram identificados 147 alelos nos 55 marcadores, o número de alelos por loco variou de 2 a 3 (média de 2,67 alelos por loco), o que está de acordo com o esperado para essa população, que envolve seis clones diferentes em sua genealogia (Tabela 4).

Tabela 4. marcadores SSR genotipados, o tamanho em pares de bases (pb) dos alelos clonados e os alelos encontrados na genotipagem com os genitores da população.

Loco	Alelo clonado (pb)*	Alelos Observados (pb)				Nº de alelos
		TSH1188		CCN51		
P23	138	129	140	138	140	3
P08	139	116	130	116	141	3
P31	165	151	154	151	162	3
P41	258	253	259	245	259	3
P33	304	283	300	280	283	3
P19	298	289	316	304	316	3
P09	129	123	127	123	135	3
P40	316	309	311	295	309	3
P81	280	276	280	280	280	2
P32	166	140	172	166	172	3
P56	112	109	114	114	114	2
P28	244	235	243	241	243	3
P15	204	205	211	205	213	3
P49	98	88	97	91	97	3
P77	172	170	170	168	170	2
P76	131	128	128	128	130	2
P12	157	140	153	142	153	3
P47	187	186	188	186	192	3
P34	197	196	205	196	209	3
P30	216	204	214	204	212	3
P38	118	114	126	114	129	3
P39	228	207	229	229	238	3
P42	261	225	248	248	256	3
P26	273	267	273	273	275	3

P84	123	121	123	121	121	2
P70	109	98	105	105	105	2
P03	139	108	136	120	136	3
P27	349	344	349	349	351	3
P04	105	92	93	92	102	3
P35	132	141	143	127	143	3
P80	254	241	255	255	255	2
P43	246	236	238	236	246	3
P89	139	133	133	133	135	2
P11	288	281	283	283	291	3
P37	197	189	207	197	207	3
P01	202	184	202	192	202	3
P02	353	352	362	328	362	3
P79	131	132	132	128	132	2
P17	212	199	211	205	211	3
P73	130	127	127	125	127	2
P57	288	291	295	291	291	2
P25	138	129	138	122	129	3
P75	262	259	259	259	261	2
P20	198	196	209	205	209	3
P52	197	184	192	184	184	2
P18	141	131	137	131	141	3
P45	188	201	217	186	217	3
P21	192	175	190	190	196	3
P22	216	217	229	216	229	3
P53	183	171	180	180	180	2
P54	235	232	237	237	237	2
P68	108	102	104	104	104	2
P60	301	286	286	286	302	2
P46	291	282	291	282	298	3
P67	136	133	154	133	133	2

*Os alelos clonados referem-se a trabalhos de desenvolvimento dos primers, a partir de DNA do clone UPA 402 e UF 676 (PUGH *et al.*, 2004; LANAUD *et al* 1999).

4.6. Análise dos grupos de ligação

Os 55 marcadores SSR e um marcador EST SHRSTc062 possibilitaram a análise dos grupos de ligação com LOD 3.0 e $r = 0.5$ (Tabela 6). O tamanho do mapa formado foi de 545,6 cM o que representou 68,46% do mapa consensual (796,9 cM), e a distância média entre as marcas de 9.92 cM, superior à do mapa consensual, o que evidencia uma baixa saturação deste mapa, entre os marcadores, o tamanho dos

grupos de ligação variaram entre 15,8 cM e 137,7 cM, a maior distância encontrada entre dois marcadores foi de 37,5 cM. Destes apenas o EST SHRSTc062 não foi agrupado em nenhum dos 13 grupos de ligação formados, contendo marcas correspondente a 7 cromossomos do cacau segundo o mapa consenso de Pugh *et al.*(2004) (Tabela 5), ocorrendo em alguns casos mudanças na ordem das sequencias bem como mudanças de grupos de cromossomo, o que o pode ocorrer através das trocas por permuta. Problemas de distorções de segregações em locos de microssatélites de mapas ligação de cacau também foram relatados por Pugh *et al.* (2004) e Brown *et al.* (2005). Para Brown *et al.* (2005), o fato de estes mapas envolverem dois genitores e dos locos com distorção de segregação normalmente se apresentarem agrupados em regiões que são comuns aos diferentes mapas, sugerem que estas distorções sejam causadas por fatores genéticos ou cromossômicos.

Tabela 5. Marcadores SSR desenvolvidos por Pugh *et al.*, (2004) e Lanaud *et al* (199) associados em grupos de ligação (GL) pelo programa MapMaker/Exp. 3.0.

GL	Marcadores
1	P23, P08, P31, P41, P33
2	P19, P09, P40, P81, P32, P56, P28
3	P15, P49, P77, P76, P12, P47, P34, P30
4	P38, P39, P42, P26, P84, P70, P03, P27
5	P04, P35, P80, P43
7	P89, P11, P37, P01, P02
9	P79, P17, P73, P57, P25, P75, P20, P52, P18, P45, P21, P22, P53, P54, P68, P60, P46, P67,

4.7 Análise de loco de características quantitativas

Utilizando o programa GqMol foram realizadas análises de associação por meio de regressão simples pelo método de máxima verossimilhança para detectar QTLs entre os 55 iniciadores SSR e 1 EST . Foi encontrada uma baixa associação entre dois marcadores SSR (P11 e P12) e a característica fenotípica em estudo a 5% de probabilidade (Tabela 6).

Tabela 6. Associação entre marcadores SSR e o fenótipo em estudo. R^2 = coeficiente de determinação

GL	LOCO	PROBABILIDADE	R^2 (%)
7	P11	5%	5,524
3	P12	5%	7,843

Embora os QTL analisados não tenham apresentado significativos (Figura 12), eles representam um indício de que esses marcadores representem regiões genômicas contendo genes para resistência ao mal-de-ceratocystis. Como apenas 71 clones foram incluídos nessa análise, é provável que isso possa ter influenciado as análises de busca de QTL. Para investigar melhor essa associação, recomenda-se determinar os fenótipos de todos os indivíduos que foram genotipados com marcadores SSR e EST, de modo que as análises sejam mais robustas.

Os genomas estão sendo sequenciados rapidamente e a um custo cada vez menor (Rothber & Leamon, 2008), ao ponto de haver projetos de até mil indivíduos sendo já publicados (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). O genoma do cacau já aconteceu duas vezes, um deles já publicado (Argout et al., 2010) e traz um grande conhecimento dos genes presentes e aplicações múltiplas. Entretanto, a necessidade do peso dos efeitos dos genes e do ambiente só é possível pelas análises fenotípicas, assim os experimentos de mapeamento genético aumentam a sua importância pela determinação dos QTLs e seus efeitos relativos, aumentando a necessidade da continuação este trabalho para poder detectar os QTLs associados à resistência à murcha-de-ceratocystis, os quais ainda não foram detectados para o cacau e nós estamos vendo a possibilidade da sua associação com os grupos de ligação 3 e 7 (Tabela 6). No grupo de ligação 3 já vem sendo associados QTLs para podridão parda provocada por várias espécies de *Phytophthora* em avaliações em discos foliares, enquanto que no grupo de ligação 7 para monilíase e podridão parda em avaliações de frutos (Lanaud, et al. 2009).

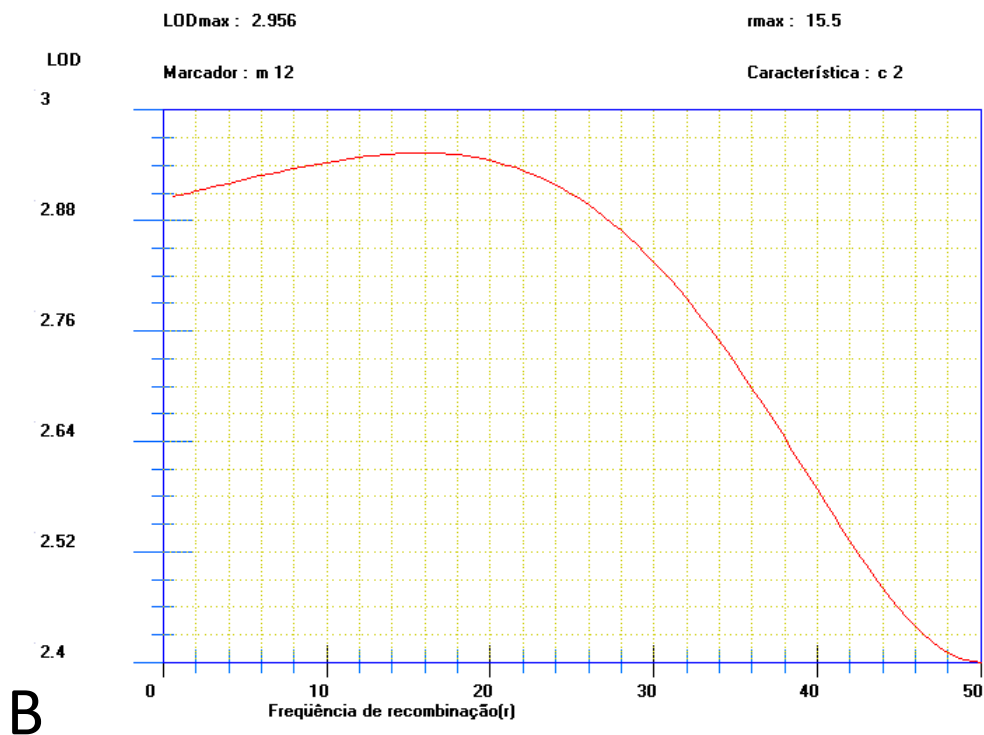
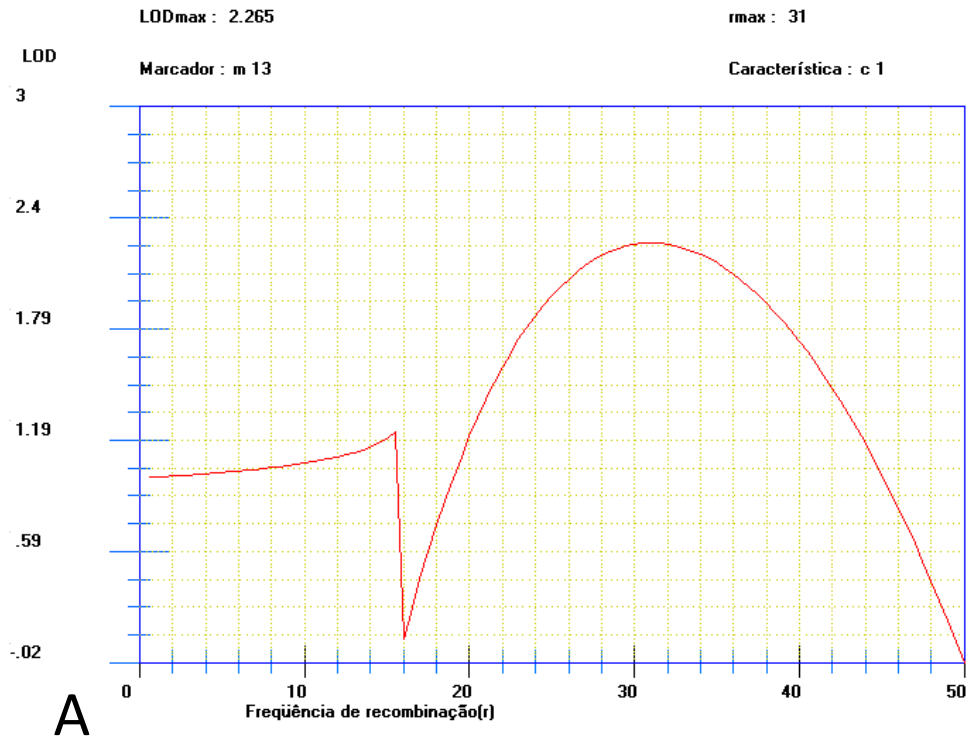


Figura 12. Valores de LOD score (eixo Y) para as diferentes frações de recombinação entre marcador e característica avaliada em 71 progênies derivadas do cruzamento entre TSH1188 e CCN51, pelo método de máxima verossimilhança. (A) pico corresponde à frequência de recombinação do marcador P11 ao fenótipo em estudo; (B) pico correspondente à frequência de recombinação do marcador P12 ao fenótipo em estudo.

A ocorrência dos genes de resistência em grupos de ligação diferentes dos grupos encontrados para a vassoura-de-bruxa aumenta a importância da detecção dos QTLs para a murcha-de-ceratocystis, sem os quais pode ocorrer a erosão genética destes genes, pela intensa seleção para variedades resistentes a *M. perniciosa*, selecionando os genes de resistência específicos e por ligação outros genes pertencentes aos mesmos grupos de ligação. Este problema é bem conhecido em programas de melhoramento, e pela posterior introdução de patógenos, detectada a perdas das fontes de resistência, pela seleção intensa para umas poucas características de interesse num momento do programa de melhoramento.

Esta busca por métodos de inoculação e de avaliação devem ser continuamente ser aprimorados, e saber que não existe um único teste de inoculação que consiga visualizar todos os mecanismos e genes associados à resistência de uma doença, como ocorre no caso de *Phytophthora*, onde se avalia a colonização de folhas e de lesões em frutos, para uma maior capacidade discriminatória para os programas de melhoramento de podridão parda (FLAMENT *et al.* 2001; RISTERUCCI *et al.*, 2003;) . O qual não deve ser diferente para a busca confiável de genes de resistência à murcha-de-ceratocystis, por marcadores no caso de *Ceratocystis platani* em *Platanus x acerifolia* (PILOTTI *et al.*, 2009); ou levando em consideração não somente a resistência do tecido, mas também da distribuição, tamanho e formato dos tecidos que compõem tanto os vasos como a medula no caule dos cacaueiros, como vem sendo observado para a resistência a *Ophiostoma novo-ulmi* no gênero *Ulmus* (MARTIN *et al.*, 2009).

5. CONCLUSÕES

A escala descritiva para análise da severidade do patossistema *C. cacaofunesta*-*T. cacao* é apropriada para analisar os indivíduos da população segregante quanto a sua resistência à murcha-de-ceratocystis.

As avaliações qualitativas e quantitativas aderem-se às segregações 3:1 e 1:2:1, respectivamente, com teste de heterogeneidade não significativo, e essas duas formas de análises podem ser utilizadas sem haver conflito de resultados.

A existência da segregação da característica resistência à murcha-de-ceratocystis possibilita que esta população seja utilizada em estudos de mapeamento genético para essas características.

As avaliações fenotípicas de plantas inoculadas com *C. cacaofunesta* necessitam abranger todos os indivíduos genotipados para uma avaliação mais completa dos indícios de QTL obtidos nesse trabalho para resistência ao mal-de-ceratocystis nessa população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI-JANABI, S.M.; HONEYCUT, R.J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics**, v. 134, n. 2, p. 1249-1260, 1993.

ARAÚJO, I. S. Mapeamento genético e identificação de QTLs associados ao teor de manteiga na amêndoa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense**, Campos dos Goytacazes, p. 52, 2002.

ARAÚJO, I. S. *et al.* Mapping of Quantitative Trait Loci for Butter Content and Hardness in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p. 177-183, 2009.

ARGOUT X. *et al.* The genome of *Theobroma cacao* **Nature Genetics** 2010.

BAKER C.J.; Harrington T.C.; Kraus U.; Alfenas A.C.; Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**. v. 93, p. 1274-1284. 2003.

BARTLEY, B. G. D. Cacao, *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.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Ann Biochem** v. 196, p. 80–83, 1991

BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Elli. & Halst. na Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica** v. 8, p. 543-544, 1978.

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

BEZERRA J.L.; ALMEIDA O.C.; LUZ E.D.M.N.; SILVA S.D.V.M. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira** v. 23, p. 228, 1998.

BORRONE J. W.; Brown J. S.; Kuhn D. N.; Motamayor J. C.; Schnell R. J. Microsatellite markers developed from *Theobroma cacao* L. expressed sequence tags. **Molecular Ecology**. n. 7, p. 236–239, 2007.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J.; MOTAMAYOR, J. C.; LOPES, U.; KUHN, D. N.; BORRONE, J. W. Resistance gene mapping for witches` broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F 2 population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 130, n. 3, p. 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, 2007.

BUTCHER, P. A.; WILLIAMS, E. R.; WHITAKER, D.; LING, S.; SPEED, T. P.; MORAN, G. F. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees: an example from

Acacia mangium. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 1185-1191, 2002.

CARLETO, G.M. O número de cromossomos em cacaueiros, **Boletim Técnico do Instituto de Cacau da Bahia**, Salvador, n. 6, p. 35-39, 1946.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 89-100, 2002.

CATTANEO, L. F. Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Tese (doutorado em produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF**, Campos dos Goytacazes, RJ. p. 94, 2001

CALVACANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. (4.Ed.). Belém: INPA, p. 166, 1988.

CLÉMENT, D.; RISTERUCCI, A. M.; MOTAMAYOR, J. C.; N'GORAN, J. A. K.; LANAUD, C. Mapping quantitative trait locos for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 1, p. 103-111, 2003a.

CLÉMENT, D.; RISTERUCCI, A. M.; MOTAMAYOR, J. C.; N'GORAN, J. A. K.; LANAUD, C. Mapping QTL for yield components, vigor and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 2, p. 204-212, 2003b.

COPE, F. W. In: Simmonds, N.W., ed. **Evolution of crop plants**, London, Longman, p. 285-289, 1976.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. GqMol: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. **UFV**, 2004.

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

DIAS, L. A. S.. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa-MG. FUNAPE, UFG. 2001.

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

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

EUJAYL, I.; SORRELLS, M. E.; BAUM, M.; WOLTERS, P.; POWELL, W. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. **Euphytica**, v.119, p.39-43, 2001.

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

FALK, C. T. A simple scheme for preliminary ordering of multiple loci: application 10 45 CF families. In: ELSTON, R. C.; A., S. M.; RODGE, S. E.; MCCLUE, J. W. Multipoint mapping and linkage based upon affected pedigree members. **New York: Alan R Liss**, p. 17-22, 1989.

FERREIRA A. F.; MAFFIA L. A.; FERREIRA E. A. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infestado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos **Fitopatologia brasileira**. v. 30 n. 5, 2005

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Documento Embrapa – Cenargen**, Brasília, n. 20, p. 220, 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**, St. Joseph, v. 117, n. 4, p. 673-677, 1992.

FLAMENT, M.H.; KEBE, I.; CLEMENT, D.; PIERETTI, I.; RISTERUCCI, A.M.; N'GORAN, J.A.K.; CILAS, C.; DESPREAUX, D.; LANAUD, C. Genetics mapping of resistance to *Phytophthora palmivora* in cocoa. **Genome**, v. 44, n. 1, p. 79-85, 2001.

FÓRUM NACIONAL DA AGRICULTURA. Grupo Temático Cacau. Proposta básica de políticas para a cadeia produtiva do cacau. **FNA**, p. 108, 1997.

GEHRIG, H. H.; ROSICKE, H.; KLUGE, M. Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoe* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and eco physiological photosynthetic behaviour of the species. **Plant Science**, v.125, p.41- 41, 1997.

GOITIA W.; Rosales C.J. Relacion entre la incidencia de escolitidos y lanecrosis del cacao en Aragua, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 62, p. 65-71. 2001.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites Evolution and applications** New York: Oxford University press. p. 1-9, 2000.

GRATTAPAGLIA D, KIRST M Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist** v. 179, p. 911-929, 2008.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. Documentation for CRI-MAP. Saint Louis: Washington University School of Medicine. 1990.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.

HALEY CS & Knott SA A simple regression method for mapping quantitative trait loci in the line crosses using flanking markers. **Heredity** v. 69, p. 315-324, 1992.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Inducible plant defense mechanisms and resistance gene function. **Plant Cell**, v. 8, p. 1773 -1791, 1996.

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

HENDERSON J. S.; Rosemary A. J.; Gretchen R. H., Jeffrey W. H. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 104 n. 48, 2007

JANSEN R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics** v. 135 p. 205-211, 1993

KRANZ, J.; ROTEM, J. Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology, , **Springer**, p. 35-50, 1988.

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

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A. M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, Bloomington, v. 8, n. 12, p. 2141-2152, 1999.

LANAUD, C.; FOUET, O.; CLEMENT, 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**, v. 24, p.361–374. 2009.

LANDER ES, GREEN P, ABRAHAMSON J, BARLOW A, DALY MJ, LINCOLN SE, NEWBURG L MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics** v.1, p. 174–181, 1987.

LANDER ES & Botstein D Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121:185-99. 1989.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. **Sunder land: Sinauer Associates**, p. 978, 1988.

MARIN M.; CASTRO B. GAITAN A.; PREISIG O.; WINGFIELD B.D.; WINGFIELD M.J. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based no molecular data and pathogenicity. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 395-405. 2003.

MARTÍN, J. A.; SOLLA, A.; ESTEBAN, L.G.; DE PALACIOS, P.; GIL, L. Bordered pit and ray morphology involvement in elm resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 39, n. 2, p. 420-429. 2009.

MENEZES, J. A.; CARMO-NETO, D. A modernização do *agrobusiness* cacau. **Fundação CARGIL**, p. 223, 1993.

MOLLINARI, M. Comparação de algoritmos usados na construção de mapas genéticos. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 73, 2007.

MOTAMAYOR J.C., RISTERUCCI A.M. , LOPEZ P.A. , ORTIZ C.F. , MORENO A.; LANAUD C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity** v. 89, p. 380–386, 2002.

MYERS N., MITTERMEIER R. A., MITTERMEIER C. G., FONSECA G. A. B. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v. 403, 2000.

OOIJEN, J. W. V.; VOORRIPS, R. E. JoinMap 3.0 Software for the calculations of genetic linkage maps. **Plant Research International**. p.98, 2001.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT. p. 132, 2004.

PATERSON, A. H. Molecular dissection of quantitative traits - Progress and prospects. **Genome Research**, Woodbury, v. 5, p. 321-333, 1995

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

PILOTTI, M.; BRUNETTI A.; TIZZANI, L.; MARANI, O. *Platanus x acerifolia* genotypes surviving to inoculation with *Ceratocystis platani* (the agent of canker stain): first screening and molecular characterization. **Euphytica**, v.169, p.1–17. 2009.

PINTO, L. R. M. ; SILVA, S. D. V. M. ; YAMADA, M. M. . Seleção de progenitores de híbridos de cacau resistentes a *Phytophthora* spp. **Agrotrópica**, Ilhéus - BA, v. 1, p. 104-107, 1989.

PONCET, V., HAMON, P., MINIER, J., CARASCO, C., HAMON, S., NOIROT, M. SSR cross amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, v. 47, p.1071-1081, 2004.

POUND, F. J. Cacao and witches' broom disease of South America, with notes on other species of *Theobroma*: report on a visit to Equator, the Amazon Valley

and Colombia. **Port of Spain**, p. 58, 1938.

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, Heidelberg**, v. 108, n. 5, p. 1151-1161, 2004.

RIOS-RUIZ, R.A. Melhoramento para resistência a doenças. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: FUNAPE, UFG, cap. 7, p. 290- 324. 2001.

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

RISTERUCCI A. M.; PAULIN D.; DUCAMP M.; N`GORAN J. A. K. ; LANAUD C. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora* **Theory Application Genetic** v. 108 p. 168–174, 2003

SANCHES C.L.G., PINTO L.R.M., POMELLA A.W.V., SILVA S.D.V.M., AND LOGUERCIO L.L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 517-528, 2008.

SANCHES C.L.G., PINTO L.R.M., POMELLA A.W.V., SILVA S.D.V.M., AND LOGUERCIO L.L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. In: ALARCON, C. R. M.. Determinacion de Resistencia de 250 Clones de Cacao de Origen Nacional al Ataque de Mal-de-Machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted). **Tesis de Grado. Universidad Agrária del Ecuador**. Guayaquil, Ecuador, 1994.

SANCHES C.L.G., PINTO L.R.M., POMELLA A.W.V., SILVA S.D.V.M., AND LOGUERCIO L.L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao

genotypes. In: DELGADO, A.J.; ECHANDI, E. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. **Turrialba** v.15 p. 286-289, 1965.

SANTOS, R.C.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; GRAMACHO, K.P.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S.; RAMOS, H.C.C.; CORRÊA, R.X.; AHNERT, D. Assessment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to witches` broom disease based on RAPD and pedigree data. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 361-368, 2005.

SILVA, S. D. V. M. Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacaueteiro a *Crinipellis perniciosa*. **Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, p. 93, 1997.

SILVA, S.D.V.M.; E.D.M.N LUZ. *Ceratocystis fimbriata* em cacaueteiros das variedades Theobahia cultivadas na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, (Suplemento), 424p. 2000.

SILVA,S.D.V.M. *et al.* Indicações de resistência à murcha-de-ceratocystis em genótipos de cacaueteiros no sul da Bahia, Brasil. 15a. **Conferência Internacional de Pesquisas em Cacao**. 2006.

SILVA S.D.V.M.; MANDARINO E.P.; DAMACENO V.O.; SANTOS L.P. Reação de genótipos de cacaueteiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. **Fitopatologia Brasileira** v. 32,p. 504-506, 2007.

SILVA S.D.V.M.; MANDARINO E.P.; DAMACENO V.O.; SANTOS L.P. Reação de genótipos de cacaueteiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta* In: DELGADO, R.; SUÁREZ, C. Diferencias em agressividad entre aislamentos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil em cacao. In: **XII Seminário Nacional de Sanidad Vegetal**,. Lacatunga, Ecuador. 2003.

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

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annu. Rev. Genet.**v. 27, p. 205-233, 1993.

The 1000 Genomes Project Consortium. **Nature**, v. 467, p. 1061-1073, 2010.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.411- 422, 2003.

YU, K., PARK, S. J., POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v.42, p.27-34, 1999.

WEEKS, D.; LANGE, K. Preliminary ranking procedure for multilocus ordering. **Genomics**, v. 1, p. 236-242, 1987.

WILSON, S. R. A major simplification in preliminary ordering of linked loci. **Genetic Epidemiology**, New York, v. 5, p. 75-80, 1988.

ZADOKS, J. C.. Reflections on space, time, and diversity. **Annual Review of Phytopathology** v. 37,p. 1–17. 1999

ZENG Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** v. 136, p. 1457-68, 1994