

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



**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CACAUEIRO E**  
**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA**  
**RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA**

**RONALDO CARVALHO SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2004**

RONALDO CARVALHO SANTOS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CACAUEIRO E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

**RONALDO CARVALHO SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CACAUEIRO E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-  
BRUXA**

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

Aprovada, 30 de Agosto de 2004

---

Fábio Gelape Faleiro  
CPAC/EMBRAPA

---

Ronan Xavier Corrêa  
Co-Orientador

---

Dário Ahnert  
Orientador

## **DEDICATÓRIA**

Especialmente à minha mãe (*in memoriam*), incansável lutadora pela minha educação, à minha família pela paciência e compreensão pela minha ausência em tantos momentos e a todos aqueles que como eu acreditam que com perseverança, capacidade e dedicação é possível chegar lá.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, pela oportunidade de realização não só do mestrado mas também da minha graduação. Ao projeto CFC/ICCO/BIOMOL através de seus coordenadores, pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de estudos concedida.

Ao professor Dário Ahnert, meu orientador pela disposição em aceitar esta empreitada e pela nossa longa convivência desde os tempos da Transamazônica e a toda minha comissão de orientação.

Às professoras Mônica Rosa Bertão, pela condução firme e dedicada na coordenação do curso, e Fernanda Amatto Gaiotto pela inestimável ajuda com os microssatélites em um momento tão delicado.

Aos meus colegas de turma e de pioneirismo Geruja, Joci, Livia, Dra. Adriana “ninguém merece um espendorf” desses, Patnay, Jeiza, Bianca Caimbí e ao Alfredo, todos amigos eternos.

Aos Drs. Uilson Vanderlei Lopes, José Luís Pires e à Dra. Karina Gramacho pela enorme ajuda nas análises dos dados.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, pessoa da mais elevada estima e consideração, pela prontidão, sempre, acima de tudo por acreditar em meu potencial.

À galera do laboratório do BIOMOL, em especial ao meu amigo-irmão et al. Rei, pela valorosa ajuda de todos, sem a qual seria impossível realizar este trabalho,

Muito obrigado.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
EXTRATO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	07
2.1 <i>THEOBROMA CACAO</i> L.: DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA E MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA.....	07
2.1.1 A doença.....	07
2.1.2 Os impactos da doença.....	09
2.1.3 Melhoramento para resistência à VB.....	10
2.1.4 Marcadores moleculares.....	12
2.1.4.1 Marcadores microssatélites.....	14
2.1.4.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	18
2.1.5 Seleção assistida por marcadores.....	20
3. CAPÍTULO 1: GENETIC DIVERSITY OF COCOA ACCESSIONS RESISTANT TO WITCHES' BROOM BASED ON RAPD AND PEDIGREE DATA.....	23
Abstract .....	23
Resumo.....	23

1. Introduction .....	24
2. Material and Methods .....	25
2.1 Plant material.....	27
2.2 DNA extraction and RAPD reactions .....	28
2.3 Data collection and analysis .....	29
3. Results.....	29
4. Discussion.....	33
5. Conclusions... ..	35
5. References.....	36
4. CAPÍTULO 2: VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A QTL PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	39
Resumo .....	39
4.1. Introdução .....	41
4.2. Materiais e Métodos.....	42
4.2.1 Coleta de material vegetal e Extração de DNA .....	42
4.2.2 Reações de RAPD.....	43
4.2.3 Reações de microssatélites.....	43
4.2.4 Avaliação fenotípica.....	44
4.3. Resultados e Discussão .....	47
4.3.1 Variabilidade fenotípica.....	47
4.3.2 Marcador RAPD AV-14 <sub>940</sub> .....	49
4.3.3 Marcadores microssatélites .....	53
5. Referências Bibliográficas.....	58
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	63
8. APÊNDICE.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Página

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Detalhes dos principais sintomas da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro: 1A, almofadas florais infectadas; 1B, formação de vassouras vegetativas em ramos apicais; 1C, basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa*; 1D, frutos infectados em diversos estágios.....7

### 3. CAPÍTULO 1.

Figure 1. Distribution of similarity values obtained from COP (1A) and RAPD (1B) data pairwise comparisons among 30 cocoa clones .....30

Figure 2. Graphic clones dispersion obtained by MDS-SAS function along first three dimensions axes based on similarities data from RAPD data. ....31

### 4. CAPÍTULO 2.

Figura 1. Freqüências de distribuição das variáveis vassouras vegetativas (1A), vassouras de almofadas (1B), percentual de frutos com vassoura (1C) e número médio de vassouras totais.....46

Figura 2. Gel de agarose mostrando a amplificação do *primer* AV-14 no grupo de 30

clones da série CEPEC. As setas indicam a região onde deveria ocorrer o marcador AV-14<sub>940</sub> e o M representa o marcador de peso molecular de 123 pb. ....50

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacilamida, utilizando-se os marcadores mapeados mTcCIR30 e mTcCIR35 analisados através do programa GENESCAN no seqüenciador automático ABI 377. As canaletas 1 a 30 correspondem às amostras analisadas (clones da Série CEPEC), a canaleta 31 contém um controle positivo e a 32 um controle negativo. As bandas em vermelho representam o padrão de peso molecular (Genescan ROX – 500) .....54

## 7. APÊNDICE

Figura. 1. Percentage of coefficient of variation accord to band number based on RAPD band number.....71

Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA para 30 clones da série CEPEC a partir das distâncias genéticas calculadas com base no método de Jaccard. ....72

Figura 3. Análise de componentes principais, baseada em dados de RAPD. ....72

## LISTA DE TABELAS

Página

### 3. CAPÍTULO 1.

Table 1. Designation, parents and origin of the accessions genotyped with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers.....27

Table 2. Polymorphism among mapped and unmapped *primers*.....29

### 4. CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Relação dos marcadores utilizados, tipo, localização, efeito do marcador sobre as médias corrigidas e seqüência dos *primers*.....44

Tabela 2. Médias corrigidas e transformadas dos clones para as variáveis : número total de vassouras (NVT), número de vassouras vegetativas (NVV), número de vassouras de almofada floral (NVA) com os respectivos grupos de variâncias residuais (GR) e médias corrigidas para a proporção de frutos perdidos por vassoura (NFV, em %)...45

Tabela 3. Médias, amplitudes e coeficiente de variação (CV) para as variáveis vassoura total (NVT), vassouras vegetativas (NVV), vassouras de almofada (NVA) e percentual de frutos com vassoura (PFV, em %)...47

Tabela 4. Correlações parciais de Pearson entre as variáveis vassoura total (NVT), vassouras vegetativas (NVV), vassouras de almofada (NVA) e percentual de frutos com vassoura (PFV).....	48
Tabela 5. Relação dos tamanhos de fragmentos detectados por amplificação do <i>primer AV14<sub>940</sub></i> nos genótipos da série CEPEC.....	49

## 7. APÊNDICE

Tabela 1. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro dos grupos, baseada nos dados de RAPD.....	73
Tabela 2. Diversidade média de marcadores RAPD entre todos os clones, calculada de acordo com as freqüências da presença e da ausência dos marcadores.....	73
Tabela 3. Diversidade média de marcadores RAPD entre os clones descendentes (DS), calculada de acordo com as freqüências da presença e da ausência dos marcadores.....	74
Tabela 4. Médias dos clones da série CEPEC de acordo com a condição genética para os marcadores microssatélites.....	74
Tabela 5. Estatística Descritiva dos heterozigotos (mTcCIR24).....	75
Tabela 6. .Estatística Descritiva dos homozigotos (mTcCIR24) TOTAL.....	75
Tabela 7. Estatística Descritiva dos clones homozigotos (M1M1-186pb) mTcCIR24 .....	75
Tabela 8. Estatística Descritiva dos clones homozigotos (m1m1-194pb) mTcCIR24 .....	75
Tabela 9. . Estatística Descritiva dos heterozigotos (mTcCIR30).....	75
Tabela 10. Estatística Descritiva dos homozigotos (mTcCIR30) TOTAL.....	76
Tabela 11. Estatística Descritiva dos clones homozigotos (M2M2-234pb) mTcCIR 30.....	76
Tabela 12 Estatística Descritiva dos clones homozigotos (m2m2-240pb) mTcCIR	

30.....	76
Tabela 13 Estatística Descritiva dos heterozigotos (mTcCIR35).....	76
Tabela 14. Estatística Descritiva dos homozigotos (mTcCIR35) TOTAL.....	76
Tabela15 Estatística Descritiva dos clones homozigotos (M3M3-174) mTcCIR35.....	77
Tabela16. Estatística Descritiva dos clones homozigotos (m3m3 -184) mTcCIR 35.....	77

## EXTRATO

SANTOS, Ronaldo Carvalho, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Agosto de 2004. **Diversidade genética e validação de marcadores moleculares associados à resistência à vassoura-de-bruxa no cacauero.** Orientador: Dário Ahnert Co-orientador: Ronan Xavier Corrêa. Colaborador: José Luís Pires.

Foi estudado um grupo de trinta clones da série CEPEC, dos quais vinte descendentes do clone Scavina-6 (DS) e dez provenientes de outros cruzamentos (ND). Foram utilizados marcadores moleculares RAPD e dados de pedigree, objetivando-se conhecer a variabilidade genética entre e dentro dos grupos. Os resultados indicam que a diversidade entre todos os materiais foi relativamente baixa, assim como a correlação entre os dados moleculares e de pedigree e que os clones provenientes de Scavina apresentaram maior variabilidade que os não descendentes. Numa segunda parte foram utilizados marcadores moleculares RAPD e microssatélites mapeados, associados à resistência à vassoura-de-bruxa, com o objetivo de validar estes marcadores em materiais resultantes de diferentes cruzamentos da população de mapeamento. Não foi detectada a presença do fragmento do RAPD (AV-14<sub>940</sub>) em nenhum dos clones utilizados, indicando uma baixa transferência entre populações e que esta não seja uma marca específica de Scavina. Os marcadores microssatélites apresentaram comportamento diverso, com o marcador mTcCIR24 estando presente em doze dos treze clones resistentes, amplificando também em vários não descendentes susceptíveis. O marcador

mTcCIR30 amplificou em 19 dos trinta clones, sendo 12 do grupo DS e 7 do grupo ND. O mTcCIR35 amplificou em apenas 12 dos trinta clones e destes 8 do grupo DS e 4 do grupo ND. Em geral as médias fenotípicas dos homozigotos foram inferiores às dos heterozigotos. Pode-se concluir que os marcadores não foram adequados para distinguir indivíduos resistentes de susceptíveis de acordo com a ascendência do clone, sendo necessário novas validações dos marcadores em outras populações para a inclusão ou exclusão definitiva do programa de melhoramento.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., Diversidade genética, RAPD, microssatélites, validação, seleção assistida.

## ABSTRACT

SANTOS, Ronaldo Carvalho, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Agosto de 2004. **Genetic diversity and validation of molecular markers associated to witches' broom resistance in cocoa crop.** Adviser: Dário Ahnert. Adviser Comitee Members: Ronan Xavier Corrêa and José Luís Pires.

The genetic diversity of a group composed of 30 clones from CEPEC series, with 20 having Scavina-6, the main source of resistance to witches' broom disease, one of the most damaging disease for cocoa crop and introduced in Bahia state in 1989, as ascendant (DS group), and 10 coming from different crosses (ND group) was studied. RAPD markers and pedigree data were employed aiming to know genetic variability between and among groups. Results indicated that diversity was low among all clones, as well as correlation between pedigree and molecular data and that clones from DS group showed more variability than ND ones. Starting from second part a RAPD marker (AV-14<sub>940</sub>) and three microsatellite mapped associated for resistance to witches' broom disease were applied to same population aiming to validate the markers in different genetic backgrounds. The RAPD marker was not detected in any analyzed clone, characterizing a low transfer rate between different populations and that it is not a specific marker for Scavina. Amplification of microsatellite markers was very different in a such way that mTcCIR24 was present in 12 in 13 DS resistant clones and in several susceptible ND clones. mTcCIR30

marker amplified in 19 clones, being 12 from DS group and seven from ND group. mTcCIR35 amplified in only 12 clones being eight from DS and four from ND group.

In general phenotypic means of the homozygous were inferior to heterozygous ones. It can be concluded that the markers were not appropriate to distinguish resistant individuals of susceptible one in agreement with the origin of the clone, being necessary new validations of the markers in another populations for the inclusion or definitive exclusion of the improvement program.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., Genetic diversity RAPD, microsatellites, validation, marker-assisted.

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta perene, arbórea e tropical. Sua origem geográfica seria o Alto Amazonas, na confluência dos rios Solimões, Putumayo e Caquetá (PURSEGLOVE, 1968) como proposto por Cheesman (1944), baseando-se na grande diversidade morfológica encontrada por Pound (1938) naquela área. O habitat original do cacauzeiro é a floresta densa, o qual o tornou adaptado ao cultivo e produção sob condições de sombra. O cacauzeiro foi originalmente classificado como uma dicotiledônea pertencente à família Sterculiaceae e ao gênero *Theobroma*. Este gênero inclui outras 21 espécies (CUATRECASAS, 1964), das quais apenas o cacauzeiro e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) são explorados comercialmente. Mais recentemente foi sugerida a reclassificação do cacauzeiro como pertencente à família Malvaceae (ALVERSON et al. 1999), muito embora não venha sendo adotada essa nova classificação botânica na maioria dos trabalhos científicos mais recentes.

O cacauzeiro é uma planta que pode ser encontrada vegetando espontaneamente desde as florestas ao sul do México até às margens externas da Floresta Amazônica. Em condições espontâneas, o cacauzeiro é encontrado no estrato inferior das florestas, onde predominam condições de temperatura e umidades elevadas, sendo o seu cultivo limitado aos ambientes ecológicos dos trópicos úmidos, sob níveis de precipitação na ordem de 1.400 a 2.500 mm bem distribuídos durante o ano e temperaturas médias de 22,4 a 26,7°C. A cultura do

cacau é adequada para adoção de sistemas de consórcio com espécies como a pupunheira, açaizeiro, seringueira entre outras, como forma de diversificar e incrementar a produção e a renda da cacauicultura (SILVA, 2000). O cacau é uma espécie diplóide, apresentando um genoma haplóide com 10 pares de cromossomos e tamanho reduzido, em torno de 0,43 pg (FIGUEIRA et al. 1992), quando comparado a outras espécies tropicais como o milho (*Zea mays*), uma monocotiledônea com 2,66 pg de genoma haplóide ou da fava (*Vicia faba*), uma dicotiledônea com 12,79 pg (VILHAR et al., 2001). *T. cacao* L. é uma espécie monóica, cauliflora, com inflorescências formadas no tronco, denominadas almofadas florais, compostas de flores hermafroditas e pentâmeras, apresentando pétalas, sépalas, estames e estaminóides. Os órgãos reprodutivos encontram-se isolados apenas pelos estaminóides, o que favorece a polinização cruzada, mesmo em plantas autocompatíveis (SOUZA & DIAS, 2001).

O cacauero é uma planta que vem sendo provavelmente cultivada há mais de 2.000 anos, sendo considerada a mais importante cultura da era pré-colombiana na América do Sul (CHEESMAN, 1944). O chocolate obtido do cacau era considerado a bebida dos deuses pelo povo Maia, que utilizavam suas sementes como moeda, servindo inclusive para compra de escravos e pagamento de tributos, de onde vem o nome do gênero adotado por Lineu.

O cacauero pode ser separado botanicamente em três grandes grupos, (i) o grupo dos Forasteiros, sub-dividido em baixo e alto amazônicos de acordo com a origem do material, que apresenta sementes intensamente pigmentadas e frutos de coloração verde quando imaturos; (ii) o grupo dos Crioulos, originalmente cultivados na América Central, que apresenta sementes grandes, arredondadas e de cotilédones brancos ou violeta claro e frutos verdes ou vermelhos quando imaturos, passando a roxos ou amarelos quando maduros. O isolamento reprodutivo e os prováveis processos de seleção, anteriores aos grandes plantios comerciais mais recentes, teriam definido características do tipo Crioulo (PIRES, 2003), que embora pouco produtivos apresenta uma grande importância econômica devido às suas grandes qualidades para produção de chocolate (MOTAMAYOR, 2001). O grupo dos Trinitários (iii) é constituído de híbridos entre Forasteiros e Crioulos, apresentando ampla variação de características morfológicas (DIAS, 2001). Esta é

uma classificação universalmente consagrada e aceita, a despeito de certa dubiedade e consistência. Marcadores moleculares e caracteres morfológicos têm sido utilizados para distinguir os tipos Crioulos, Trinitários e Forasteiros (N'GORAN et al., 1994; RUSSELL et al., 1993; BEKELE & BEKELE, 1996; LERCETEAU et al., 1997; RONNING & SCHENELL, 1994) na tentativa de se obter uma maior acurácia na definição destes grupos. Motamayor (2001), analisando genótipos Crioulos coletados em várias regiões, encontrou variabilidade e heterozigose muito reduzida, quando comparados a materiais de coleções de germoplasma tidos, tradicionalmente, como Crioulos, o que sugere que estes últimos, em grande parte, não são verdadeiros Crioulos. Usando descritores morfológicos, Engels (1986) encontrou uma grande diversidade em indivíduos no grupo Forasteiro assim como no grupo Crioulo, não sendo possível distinguir estes de indivíduos Trinitários. Atualmente, os Forasteiros respondem por mais de 80% da produção mundial de cacau (DIAS et al., 2003).

Embora todas as espécies do gênero *Theobroma* produzam frutos cujas sementes podem ser aproveitadas comercialmente, o cacau é a única espécie explorada comercialmente em larga escala para obtenção de amêndoas. As amêndoas, após serem fermentadas e secas, são moídas e transformadas em uma série de produtos e subprodutos que são utilizados, principalmente, pela indústria chocolateira, além de outros ramos de indústria, como a de cosméticos. Além das amêndoas, a polpa do fruto do cacaueiro também tem sido utilizada para a produção de sucos, assim como do cupuaçu (*T. grandiflorum*), cujo aumento da procura tem resultado na expansão da área cultivada, principalmente na região Norte, já tendo despertado o interesse de outros países consumidores, sendo alvo, inclusive, de tentativas de patenteamento da marca por empresas sem nenhuma relação com pesquisa, cultivo ou mesmo exploração comercial. Embora o interesse pelo cupuaçu tenha crescido, o cacau continua sendo responsável por toda a produção utilizada pela indústria chocolateira no mundo.

*T. cacao* é uma espécie atacada por inúmeros patógenos causadores de doenças em plantas como *Phytophthora* spp. causadoras de podridão-parda, *Moniliophthora roreri* causadora da monilíase, *Ceratocystis fimbriata* causador do mal-de-ceratocystis ou mal-do-facão e, principalmente, o *Crinipellis perniciosus*

causador da vassoura-de-bruxa (VB), a mais disseminada das doenças do cacau, entre os países produtores. Endêmica na região Amazônica, centro de origem do cacau, a doença foi inicialmente detectada em 1895 no Suriname, sendo detectado novos focos em outras regiões produtoras ao longo do tempo. Confinada à região Amazônica, a doença foi detectada na Bahia em 1989 em dois diferentes focos, de onde se espalhou vertiginosamente, apesar dos esforços de erradicação e controle. Como conseqüências da introdução da doença na Bahia destacam-se: a queda acentuada da produção, o abandono de propriedades rurais, o desemprego generalizado na área rural e ameaças aos remanescentes de Mata Atlântica, pelos produtores que passaram a retirar a madeira, que até então servia como sombra ao cacau. As pesquisas visando identificar materiais resistentes à doença iniciaram-se na década de 30, quando Pound (1938) coletou plantas resistentes no Peru, as quais denominou Scavina, e as introduziu em Trinidad onde foram avaliadas e passaram a constituir a principal fonte de resistência à VB.

De acordo com Bennet (2003), apesar da importância do cacau para a humanidade, tanto como alimento quanto pelo seu potencial medicinal, relativamente pouco tem sido feito para o avanço da espécie enquanto cultura de importância econômica, afora esforços dos próprios países produtores. Segundo Eskes (2001), apenas 30% de todo o cacau cultivado é composto de variedades selecionadas, sendo os 70% restantes formados por plantas oriundas de populações tradicionais, a despeito do grande número de acessos depositados em bancos de germoplasma e da grande variabilidade genética apresentada pela espécie.

A caracterização molecular da diversidade depositada em germoplasmas está fornecendo as bases para a ampliação da base genética em populações de melhoramento (BENNET, 2003). O uso de técnicas moleculares na caracterização de acessos de germoplasma, além de orientar a escolha de parentais adequados a um programa de melhoramento, pode proporcionar uso racional das coleções existentes, permitindo a obtenção de core collections através das quais aproximadamente 80% da variação genética de uma coleção podem ser representados por apenas 10% dos acessos (BROWN, 1989).

Os marcadores moleculares RAPD têm sido bastante utilizados em estudos envolvendo acessos mantidos em germoplasmas e populações de melhoramento,

visando caracterizar a variabilidade genética (WILDE et al., 1992; FIGUEIRA et al., 1992; LECERTEAU et al., 1993; RUSSEL et al., 1993; FIGUEIRA et al., 1994; N'GORAN et al., 1994; de la CRUZ et al., 1995; LECERTEAU et al., 1997; WHITKUS et al., 1998; MARITA et al., 2001).

O mapeamento genético do cacaueteiro teve início em 1995 (LANAUD et al., 1995) e, mais recentemente, muitos mapas genéticos foram desenvolvidos para o cacaueteiro levando à detecção de vários QTLs associados a características como a resistência à podridão-parda, para a qual, em um mapa inicial envolvendo duas populações, foi identificado um QTL responsável por 47% da variação fenotípica para resistência, e em um mapa posterior foram identificados cinco novos QTLs (CROUZILLAT, et al., 2000; FLAMENT, et al., 2001; RISTERUCCI, et al., 2000). Com relação à vassoura-de-bruxa, Queiróz et al (2003) identificou um QTL responsável por 35% da variação fenotípica para a resistência, utilizando marcadores RAPD e AFLP. Este mapa foi saturado por Faleiro et al. (2004b) com novos marcadores RAPD e microssatélites, identificando novos marcadores associados à resistência, os quais foram analisados neste trabalho. Além de mapas desenvolvidos para identificação de QTLs associados à resistência a doenças, foram construídos mapas para outras características qualitativas como o teor da manteiga (ARAÚJO, 2002) para a mesma população F<sub>2</sub> utilizada por Faleiro et al. (2004). Recentemente foi construído um mapa altamente saturado, contendo 424 marcadores microssatélites em dez grupos de ligação com uma distância média de apenas 2,1 centimorgans (cM) entre os marcadores (PUGH et al, 2004), usando uma outra população. O desenvolvimento de mapas genéticos saturados, é uma grande contribuição para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento baseadas em genômica, como o uso de marcadores mapeados para a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) e estudos de diversidade genética visando a conservação e utilização racional dos recursos genéticos depositados em banco de germoplasma.

O grande desafio para o melhoramento genético do cacaueteiro está em desenvolver variedades, híbridos ou selecionar clones que apresentam características desejáveis como precocidade, produtividade elevada, estabilidade e que sejam dotadas de resistência a pragas e doenças (ARAÚJO, 2002), com genes provenientes de diferentes fontes para que a base genética seja ampliada,

buscando-se a durabilidade da resistência e a longevidade dos materiais genéticos selecionados pelos programas de melhoramento.

Considerando as implicações da VB para a cacauicultura, a utilidade dos marcadores moleculares em estudos genéticos e a disponibilidade de marcadores associados à resistência à doença, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Determinar a diversidade genética de 30 clones de cacau, do banco de germoplasma do CEPEC, com base em informações de pedigree de marcadores moleculares;
- b) Avaliar a utilidade de marcas associadas à resistência à vassoura-de-bruxa na seleção assistida por marcadores moleculares em diferentes acessos de cacauzeiros;
- c) Validar marcas associadas a um QTL de efeito maior para resistência à vassoura-de-bruxa em diferentes *backgrounds* genéticos

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *THEOBROMA CACAO* L.: DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA E MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA

#### 2.1.1 A DOENÇA

As regiões tropicais, onde a cultura do cacau tem condições ideais de desenvolvimento, são também ideais para o desenvolvimento de uma série de fungos fitopatogênicos como os dos gêneros *Phytophthora*, *Verticillium*, *Monillioptora* e *Crinipellis*. As perdas mundiais na produção de cacau ocasionadas por doenças fúngicas chegam a atingir 720 mil toneladas anuais, aproximadamente um quarto da produção mundial (NOJOSA, 1999).

A doença vassoura-de-bruxa (VB) é causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, um basidiomiceto, hemibiotrófico, pertencente à ordem Agaricales, família Tricholomataceae. Os basidiósporos do *C. perniciosa* infecta todos os tecidos em crescimento da planta: ramos, almofadas florais e frutos, resultando em hipertrofia e outras anormalidades, que variam de acordo com a cultivar, o tipo de tecido infectado e do seu estágio de desenvolvimento (SILVA et al., 2002). A partir da infecção em ramos apicais e gemas axilares desenvolve-se um grande número de ramos, dando a aparência de uma vassoura (Figura 1B), resultado da perda de dominância apical dos ramos infectados (GRIFFITH et al, 2003). Cancros são formados a partir da infecção em folhas, pulvinos e pecíolos. As vassouras de

almofadas e frutos tipo morango (Figura 1A) são formadas a partir do ataque do fungo às almofadas florais.



Figura 1. Detalhes dos principais sintomas da vassoura de bruxa no cacauero: **1A**, almofadas florais infectadas; **1B**, formação de vassouras vegetativas em ramos apicais; **1C**, basidiocarpos de *Crinipellis perniciosus*. **1D**, frutos infectados em diversos estágios.

A infecção em estágios iniciais de crescimento do fruto causa a partenocarpia, devido à destruição das amêndoas em formação. Infecções tardias causam a adesão e endurecimento das sementes. Após 5 a 6 semanas de infecção,

as partes atacadas tornam-se necróticas e o fungo passa para o estágio dicariótico. É nesta fase que se formam os basidiomas (Fig 1C), estrutura reprodutiva do fungo, onde se formam os basidiósporos que, dispersados pelo vento irão dar continuidade ao ciclo de infestação. Os frutos infectados apresentam manchas escuras, endurecidas (Figura 1D) e sementes aderidas, inaproveitáveis. A infecção é causada apenas pelos basidiósporos, cuja viabilidade não passa de seis horas, com a hifa crescendo apenas nos tecidos meristemáticos. O fungo também pode infectar sementes, dando origem a plântulas infectadas. A doença está restrita às Américas, não ocorrendo em áreas produtoras da África e da Ásia.

### **2.1.2 OS IMPACTOS DA DOENÇA**

A presença e os prejuízos causados à agricultura por pragas e doenças são tão antigos quanto a própria atividade. Vários casos de epidemias catastróficas na agricultura têm sido relatados ao longo dos tempos, como por exemplo, o aparecimento da requeima da batata no século XIX, causada pelo fungo *Phytophthora infestans*, que dizimou as plantações na Europa e levou milhões de pessoas à morte por fome na Irlanda (RUSSEL, 1978), a destruição dos arrozais de Bengala, causada pelo fungo *Helminthosporium oryzae*, com a morte de milhões de bengaleses. Outras epidemias podem ser encontradas na literatura relatando os prejuízos causados por patógenos, ao longo dos tempos, sendo que a maioria destas refere-se mais, entretanto, a prejuízos econômicos. De acordo com Agrios (1978), as perdas calculadas, chegavam ao montante de 70 bilhões de dólares na época, apenas referentes aos prejuízos causados por doenças na agricultura.

Em relação à V.B., as perdas de produção são muito mais dramáticas que os números gerais e também de difícil mensuração, visto que o patógeno não apenas reduz diretamente a formação e o aproveitamento dos frutos, mas também contribui indiretamente através da debilitação da planta, afetando o seu desenvolvimento. De acordo com Buggenhout (1994), em 1992 mais de 1% das árvores amostradas, em estudos de prospecção, estavam infectadas. A infestação atingiu 10% em 1993 e chegou a aproximadamente 40% em 1994. Ainda segundo esse autor, se as amostragens se limitassem a zonas infestadas, os números seriam bem maiores, o

que seria uma das explicações para as diferenças de percentuais descritas por outros autores.

Perdas de produção por V.B. são normalmente calculadas como uma percentagem dos frutos doentes em relação aos frutos totais. Segundo Rudgard, (1986) o percentual de perda de frutos é uma estimativa realística da perda de produção de sementes fermentáveis, quando se considera um período relativamente longo. Evans (1981) relatou infecções em frutos acima de 90% do total, no Estado de Rondônia.

Segundo Trevizan (1996), os impactos negativos do aparecimento da V.B. na região produtora de cacau da Bahia, podem ser detectados não apenas do ponto de vista econômico, através da redução da produção, comercialização e exportação do produto, mas também do ponto de vista social, com redução da densidade demográfica em muitos municípios e do aumento do número de desempregados, e do ponto de vista da estrutura fundiária, com uma tendência clara do aumento da concentração de terras e introdução de novos cultivos como o café e novas áreas de pastagens, em áreas antes ocupadas pelo cacauero.

### **2.1.3 MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA À VB**

De acordo com Purdy & Schimidt (1996), já em 1902 estabeleceu-se uma proposta de introduzir uma coleção de acessos de cacauero para avaliação da resposta à VB no Suriname, a qual não foi adiante por considerar-se impossível encontrar variedades imunes entre as disponíveis. A variação das características morfo-agronômicas em cacau silvestre e a necessidade de plantas resistentes a doenças motivaram a realização de expedições botânicas à região da Bacia Amazônica.

A busca por fontes de resistência à VB começou na década de 30 através de diversas expedições à Bacia Amazônica, durante as quais foram coletados frutos de cacaueros silvestres aparentemente livres da doença e introduzidos em vários países, principalmente em Trinidad (FONSECA, 1988).

Da grande quantidade de material coletado por Pound (1938, 1940) no Peru, os clones Scavina 6 e Scavina 12, presumivelmente oriundos do mesmo fruto, foram

considerados imunes à VB, pois não apresentavam sintomas no Peru e durante as avaliações em Trinidad. Estes clones, entretanto, tem apresentado comportamento variável em diferentes regiões, indicando que não há uma estabilidade espacial dos QTLs associados à resistência à VB, identificados nestes clones.

De acordo com Bolaños & Vargas (1955), citados por Mora (1982), para ser considerado resistente, um clone deve manter um baixo nível de infecção, durante um longo período de tempo, sob uma alta pressão de inóculo. Segundo Bartley (1958), os fatores que controlam a resistência nos clones Scavina são dominantes como a maioria dos genes de resistência, e sua ação não é simples.

Para Müntzig (1958), a resistência do fruto é independente da resistência em almofadas florais e ramos vegetativos. Baker & Holliday (1975) porém, sugerem que a base da resistência é fisiológica e não devido a diferenças morfológicas, em virtude de haverem encontrado em muitos clones uma correlação positiva entre o grau de infecção em ramos e em frutos, havendo porém uma pequena proporção de clones anômalos, que produzem grande número de vassouras de todas as classes.

A busca por variedades resistentes no Brasil, começou na Amazônia por meio da coleta de material silvestre e da seleção de plantas em populações cultivadas altamente infestadas pelo patógeno. O cacau nativo da Amazônia tem sido considerado de especial interesse pelos melhoristas como fonte de variabilidade genética em geral, especialmente como fonte de resistência à VB, com um volume de mais de 20.000 acessos depositados em bancos de germoplasma (FONSECA, 1990; ANDEBRHAN et al., 1998). Convém registrar que o programa de melhoramento de cacau conduzido pela CEPLAC na Amazônia selecionou uma série de combinações híbridas com média a alta resistência à vassoura-de-bruxa. Essas combinações híbridas são produzidas nos campos de produção da CEPLAC e distribuídas aos agricultores para plantio.

A introdução da doença na Bahia em 1989 desencadeou uma série de iniciativas visando encontrar, avaliar, multiplicar e distribuir aos produtores variedades ou clones que apresentassem resistência à doença. Estas iniciativas resultaram no lançamento de duas séries de clones, selecionados no banco de germoplasma do CEPEC e em plantações comerciais onde os produtores, que passaram a fazer suas próprias seleções, em um processo inédito de melhoramento

participativo na história da cacauicultura no Brasil.

#### **2.1.4 MARCADORES MOLECULARES**

Ao longo do tempo, a seleção de genótipos favoráveis tem sido baseada em marcadores morfológicos e características qualitativas condicionadas, em geral, por um ou poucos genes. Sax (1923) foi o primeiro a apresentar evidências de ligação entre genes controlando características qualitativas (cor da semente) e uma característica quantitativa (peso da semente), além de propor um método para localizar e enumerar QTLs (Quantitative Trait Loci) em um mapa genético de ligação. Thoday (1961) sugeriu que características quantitativas fossem estudadas através da aplicação de modelos biométricos, tendo em vista que as variações contínuas e descontínuas têm em comum as propriedades de segregação, dominância, interação e ligação gênica.

A despeito do sucesso dos programas de melhoramento genético entre as espécies cultivadas, com marcante crescimento da produção e produtividade, os trabalhos de seleção têm sido realizados sem que conhecimentos básicos da biologia vegetal sejam utilizados, embora a maioria dos fenômenos biológicos importantes, utilizados por melhoristas, como heterose, epistasia, interação planta-patógeno, etc., já tenham sido estudados e descritos (LEE, 1995).

No melhoramento, uma prática importante é a seleção acurada de genótipos superiores, indivíduos ou famílias (MARTINS et al., 2001). Qualquer processo seletivo demanda tempo e recursos e por esta razão deve ser o mais eficiente possível. Em se tratando de plantas perenes, como o cacaueteiro, o número de anos necessários para se completar um ciclo de seleção é o principal entrave dos programas de melhoramento (PEREIRA et al., 1997).

A seleção baseada apenas em caracteres morfológicos, buscando-se a máxima produtividade com qualidade aceitável e uniformidade, tem implicado na redução da diversidade e estreitamento da base genética das espécies cultivadas, o que tem favorecido o surgimento de epidemias ao longo da história, com graves conseqüências para a humanidade (LEE, 1995).

Embora venham sendo utilizados desde os estudos pioneiros de Mendel, que

lançou as bases fundamentais da genética moderna, os marcadores morfológicos apresentam uma série de limitações como a influência do ambiente, o pequeno número de marcadores disponíveis e o pouco ou nenhum polimorfismo na maioria dos organismos, o que reduz a probabilidade de se estabelecer associações significativas entre estes marcadores e genes de importância, limitando sua utilização em programas de melhoramento (BENCHIMOL, 2002).

Na tentativa de sobrepor estas limitações, vários marcadores bioquímicos e moleculares vêm sendo desenvolvidos. Sendo unidades herdáveis simples, estes marcadores genéticos quando associados a características de interesse, podem aumentar a eficiência de seleção ao identificar diferenças herdáveis.

As isoenzimas são marcadores bioquímicos que, a despeito de suas limitações, tem sido bastante utilizados para identificar QTLs em milho, tomate, aveia selvagem e soja (DUDLEY, 1993.; FREI et al., 1986) e para predição da performance produtiva de híbridos simples de milho. Em cacau, as isoenzimas têm sido utilizadas em estudos de compatibilidade, sistemas de cruzamento, análise de paternidade e variabilidade genética (YAMADA et al., 1991, 1998, 1999, 2001).

O advento dos marcadores moleculares baseados no DNA, fenotípica e ambientalmente neutros e em número ilimitado no genoma (OBERHAGEMANN et al., 1999) tem ampliado significativamente o número de estudos de diversidade genética, análise de características poligênicas, identificação, classificação e manejo de germoplasmas, seleção de genitores, relações genéticas entre espécies autoincompatíveis, etc., em espécies cultivadas e populações naturais.

Em cacau, os marcadores moleculares têm sido utilizados principalmente para estudar a diversidade genética dentro da espécie (FALEIRO et al., 2002b; 2003; 2004a; MARITA et al., 2001; WHITKUS, 1998), classificação de genótipos entre os três principais grupos raciais (LAURENT et al., 1993a; N'GORAN et al., 1994), mapeamento genético de marcadores associados à resistência a doenças (FALEIRO et al., 2004b; QUEIRÓZ et al., 2003; RISTERUCCI et al., 2000) e caracterização de germoplasma (FALEIRO et al., 2002; BEKELE; BEKELE., 1996; MARITA, 1998).

Embora existam inúmeros marcadores moleculares disponíveis, os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990), AFLPs (*Amplified fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995) e SSRs (*Single Sequence*

*Repeats* ou microssatélites) (Jeffreys et al., 1985), são os mais populares e tem sido os mais utilizados, sendo escolhidos de acordo com a capacidade técnica e econômica de quem utiliza e o tipo de estudo e objetivos envolvidos.

De acordo com Wilde et al. (1992), os recursos genéticos do cacaueteiro tem sido caracterizados, principalmente, através de marcadores morfológicos e agrônômicos, cuja acurácia têm sido questionada. O advento dos marcadores moleculares permitiu a introdução de novas classes de marcadores e o aumento da acurácia exigida nos estudos da diversidade dos recursos genéticos. A diversidade genética do cacaueteiro tem sido estudada através de várias metodologias que incluem o uso de sondas de cDNA (LAURENT et al., 1994) e marcadores moleculares genômicos como RAPD (WILDE et al., 1992; FALEIRO et al., 2004a), AFLP (FALEIRO et al., 2002b), microssatélites (FALEIRO et al., 2002b; YAMADA et al., 2003) e isoenzimas (YAMADA et al., 2001).

### **2.1.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Os marcadores microssatélites são obtidos utilizando-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SAIKI et al., 1985), assim como os marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (VOS et al., 1995) e uma série de outros tipos de marcadores moleculares.

Particularmente os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados, em vários tipos de estudos genéticos. A ampla distribuição destes marcadores em todos os genomas eucariotos e alguns procariotos, sua natureza mutável e sua característica de co-dominância tem feito deste, o marcador preferido em estudos genéticos e populacionais (GARNER et al., 2002).

Conceitualmente, os microssatélites são definidos como seqüências repetidas de DNA, denominadas *motifs*, com repetições (*repeats*) de 2 a 6 pares de nucleotídeos de extensão, organizados em *tandem*. Este DNA repetitivo consiste de um tipo único de nucleotídeo [poli(N)] ou de *repeats* multiméricos longos ou curtos, formados por unidades homogêneas (*repeats* homogêneos), unidades mistas (*repeats* heterogêneos) ou *motifs* degenerados que apresentam substituições em uma ou mais bases em alguns *repeats* (van BELKUM, 1998).

Os microssatélites foram inicialmente identificados no genoma humano através de experimentos de cinética de reassociação (BRITTEN & KOHNE, 1968) e utilização de técnicas de hibridização. Em células eucarióticas, os SSRs estão associados a funções regulatórias e alguns *triplets* parecem estar envolvidos na ocorrência de algumas doenças degenerativas humanas como a Doença de Huntington. Entretanto, a abundância dos SSRs em genomas eucariotos ainda não foi convenientemente explicada.

Explicações para o surgimento e variação encontrada no número de repeats em um *motif* é controversa, embora se acredite que esteja envolvida a ocorrência de crossing-overs desiguais ou de erros durante a replicação do DNA, processo descrito como *slipagge* (deslizamento), seguido de falhas no sistema de reparo que restaura a seqüência original (BENCHIMOL, 2002). Entretanto, a comprovação de que o *slipagge* é mais comum em loci com repeats longos (BRINKMANN et al., 1998), entre outras evidências sugerem que a ocorrência de outros processos como substituições, inserções e/ou deleções possam influir no surgimento de *loci* microssatélites (ZHU et al., 2000). Experimentos *in vitro* e com microssatélites clonados demonstraram que não são requeridas enzimas durante o *slipagge*, indicando uma estabilidade intrínseca do DNA microssatélite (BACHTROG et al., 1999).

Embora venham sendo amplamente utilizados, pouco se sabe sobre a rede de organização cromossômica e localização física de *motifs* microssatélites em genomas de plantas. Schimidt & Heslop-Harrison (1996) verificaram que seqüências microssatélites apresentam amplificação cromossomo-específica em plantas e sugerem que o conhecimento da distribuição física dos microssatélites no genoma é, provavelmente, uma informação valiosa para a escolha de *repeats* como marcadores genéticos em plantas.

A freqüência de microssatélites em um genoma apresenta correlação positiva com o tamanho do mesmo, mas a freqüência de diferentes tipos de SSRs tem grande variação entre táxons e tipos cromossômicos (PRIMMER et al., 1997). Varshney et al. (2002), utilizaram a detecção "*in silico*" de SSRs em ESTs (*Expressed Sequence Tags*), encontraram freqüências significativas deste marcador em regiões expressas de vários tipos de cereais como cevada, milho, arroz, centeio,

sorgo e trigo, sendo os *repeats* triméricos (CCG) os mais abundantes nestas espécies. Embora os SSRs derivados de ESTs sejam considerados menos polimórficos que os genômicos, aqueles apresentam taxas mais elevadas de transferência entre espécies afins, em razão de estarem localizados em regiões mais conservadas do genoma. Isto tem sido demonstrado entre espécies de diferentes gêneros como cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), e sorgo (*Sorghum* spp) (CORDEIRO et al., 2001).

Os SSRs são obtidos por meio de vários métodos, sendo que o princípio básico de todos eles é o conhecimento das seqüências que flanqueiam as regiões repetitivas do DNA. Em geral, são construídas bibliotecas genômicas com DNA isolado da espécie-alvo, das quais os clones positivos são identificados através de sondas marcadas, isolados e seqüenciados. Uma vez identificadas regiões repetitivas, seqüências flanqueadoras são obtidas e utilizadas para o desenho de iniciadores (*primers*), através de softwares apropriados e adotando-se alguns parâmetros para a seleção dos mesmos. Os *primers* selecionados são testados para amplificação e polimorfismo (GARNER et al., 2002) e utilizados para a extensão da dupla-fita de DNA, sendo necessários um *primer* de um lado (verso ou forward) e do outro (reverso ou reverse) (CROUCH et al., 1998) da seqüência repetitiva do DNA. A obtenção dos *primers* para SSR, pode requerer altos investimentos em infraestrutura e mão-de-obra especializada, o que pode ser limitante para muitas instituições de pesquisa (BENCHIMOL, 2002). Outros métodos incluem a utilização de seqüências de DNA genômico ou de ESTs depositadas em bancos de dados para a detecção de locos microssatélites e construção de *primers*, utilizando-se programas de bioinformática (VARSHNEY et al., 2002). Outros métodos para isolamento de SSRs têm sido desenvolvidos, como os métodos híbridos simples de captura (KANDPAL et al., 1994; PROCHAZKA, 1996; MORAGA AMADOR et al., 1998), os quais utilizam uma sonda  $(CA)_n$  biotilada para capturar seqüências repetitivas e imobilizá-las em *beads* magnéticas de estreptavidina. Após várias lavagens, o DNA capturado é eluído, amplificado e clonado para produzir uma biblioteca enriquecida com a seqüência-alvo (CARLETON et al., 2001).

De acordo com Liu et al. (2000) sistemas de detecção de marcadores de DNA para genotipagem de germoplasma devem apresentar acurácia, serem altamente

informativos, passíveis de automação e de custos reduzidos. A obtenção de marcadores SSRs utilizando-se *primers* marcados com fluorescência pode suprir estes requerimentos (MITCHELL et al.,1997). Os tamanhos dos produtos de amplificação de PCR devem ser suficientemente dissimilares para que seja possível a distinção de diferentes alelos (PONCE et al. 1999). Três métodos são rotineiramente empregados para detecção de fragmentos gerados por PCR: (i) a coloração por brometo de etídio, mais simples e menos sensível, utilizados geralmente para géis de agarose, (ii) cloração com prata ou radioatividade em géis denaturantes de poliacrilamida e, mais recentemente, (iii) detecção por fluorescência em géis de poliacrilamida ou via eletroforese capilar. A detecção dos fragmentos por radioatividade é feita pela exposição dos elementos radioativos a filmes autoradiográficos os quais detectam os produtos marcados com fósforo ou fluor radioativo. A detecção por fluorescência é feita por meio de indução por laser em unidades semi-automatizadas eletroforese, caso dos sistemas ABI para produtos fluorescentes (HARKER, 2001).

Como em qualquer método científico, a acurácia e reprodutibilidade são fundamentais. As características dos microssatélites, juntamente com a variedade de sistemas disponíveis para detecção e análise, sugerem uma série de questões relevantes na identificação e divulgação de dados de microssatélites (HARKER, 2001). Em relação à reprodutibilidade, Jones et al.(1997) testaram esta característica de marcadores RAPD, AFLP e microssatélites entre uma rede de laboratórios europeus e verificaram que no caso de SSR ocorreu alguma dificuldade com sistema de coloração em prata, mas os alelos originais foram reproduzidos por todos os grupos, confirmando os resultados obtidos em outros experimentos desta natureza (KORETH et al.,1996; SCHWENGEL et al., 1994).

A despeito da eficiência e vantagens da automação que sistemas modernos de eletroforese oferecem têm sido documentada na literatura a ocorrência de vários exemplos de discrepâncias, na correta determinação do tamanho de alelos entre eletroforese capilar e outros métodos, o que pode influenciar significativamente a interpretação dos resultados (BRULAND et al., 1999; WILLIAMS et al., 1999). Várias teorias têm sido propostas para explicar estas discrepâncias entre os diferentes sistemas de eletroforese, como mobilidade anormal relacionada à seqüência (WENZ

et al., 1998), desnaturação incompleta e diferentes qualidades da matriz de separação que influenciam a migração dos alelos (ROSENBLUM et al., 1997), entre outros.

A utilização de marcadores microssatélites em estudos genéticos em plantas é relativamente recente. A necessidade de conhecimento das seqüências flanqueadoras dos loci microssatélites faz com que apenas espécies de grande interesse econômico, alimentar ou científico já disponham de *primers* desenvolvidos e mapeados como milho (MATSUOKA et al., 2002), algodão (KARACA et al., 2002), banana (CROUCH et al., 1998), soja (CREGAN et al., 1994) e organismos experimentais como drosófila (SCHUG et al., 1998) e *Arabidopsis* (BELL & ECKER, 1994), entre inúmeras outras espécies. Quatro características principais fazem dos SSRs marcadores altamente utilizados: (a) a ampla distribuição no genoma, o que o credencia como um excelente marcador para o mapeamento genético; (b) podem ser obtidos de modo semi-automático, o que facilita a identificação dos alelos; (c) são codominantes, ao contrário da maioria dos marcadores, o que permite a diferenciação de indivíduos homocigotos e heterocigotos, e (d) são marcadores altamente polimórficos, o que permite a distinção de indivíduos geneticamente próximos (KUBIK et al., 1999). Em cacau, poucos trabalhos têm sido realizados com a aplicação dos marcadores microssatélites, embora a espécie apresente um bom potencial para a sua utilização (CHARTERS et al., 1999). Os poucos trabalhos disponíveis tratam do isolamento (LANAUD et al., 1999) e aplicação em estudos de diversidade genética (FALEIRO et al., 2002b; 2004a; YAMMADA et al., 2003), mapeamento genético (FALEIRO et al., 2004b). Saunders et al., (2003) selecionou uma *core collection* de microssatélites para serem utilizados como padrão em estudos de *fingerprinting* em *T. cacao*.

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas e sugeridas dos marcadores microssatélites em relação a outros marcadores genéticos moleculares, estes apresentam, a exemplo de qualquer tecnologia, uma série de limitações quanto à sua aplicação em laboratório. Considera-se inicialmente que a sua obtenção é muito mais complexa que a maioria dos marcadores disponíveis, quando o organismo para o qual estão sendo desenvolvidos não dispõe de seqüências de DNA genômico ou de ESTs depositadas em um banco de dados público ou, não tenham sido

desenvolvidos por outros pesquisadores. Além disto, quando estão disponíveis, muitos não podem ser utilizados, devido a baixos padrões de amplificação e polimorfismo (SIBOV et al., 2002). Outras limitações como desvio de segregação, ausência de alelos em genitores utilizados em programas de melhoramento, baixa resolução em agarose e ausência de ligação dos marcadores a grupos de ligação em mapas genéticos, são citadas por Mangolim et al. (2002).

#### **2.1.6 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)**

Os marcadores RAPD constituem-se na mais popular e utilizada técnica de detecção de polimorfismo através da amplificação de regiões aleatórias do genoma. Um fragmento de DNA gerado pela técnica de RAPD é identificado pelo seu tamanho, que é determinado pela distância entre repetições invertidas curtas. Estes fragmentos são, em geral, entre 200 e 2000 pares de base (bp), com alguns fragmentos raramente atingindo tamanhos maiores. Este marcador identifica polimorfismos que são herdados como marcadores Mendelianos dominantes, ao contrário de outros marcadores moleculares como os microssatélites, de natureza codominante. Presume-se que a presença de uma banda deve-se à existência de dois sítios adjacentes com uma repetição invertida contendo a seqüência-alvo complementar ao oligonucleotídeo iniciador específico. Caso um ou ambos os sítios estejam ausentes, um fenótipo nulo é indicado pela ausência da banda (GRATTAPAGLIA et al., 1992). De acordo com Wedden et al. (1992), reações de RAPD apresentam, tipicamente mais de um fragmento amplificado e a intensidade destes fragmentos diferem muito entre si. Em populações segregantes, todos os tipos de fragmentos amplificados, desde os mais intensos até os mais fracos, podem apresentar presença ou ausência de polimorfismos.

Inúmeras vantagens têm sido atribuídas ao uso de marcadores RAPD para estudos genéticos como a rapidez do processo, o requerimento de pequenas quantidades de DNA, não requerimento do uso de fluorescências ou radioatividade para detecção dos fragmentos e o uso de *primers* degenerados que permite o acesso a regiões do genoma antes inacessíveis à análise sem o prévio conhecimento da seqüência (MICHELMORE et al., 1991), o que torna o método mais seguro, barato e de uso universal quando comparado a outros marcadores. A

despeito de todas estas vantagens, o uso intensivo deste marcador tem sido questionado devido ao fato deste ser muito afetado pôr mudanças nas condições de reação e à baixa repetibilidade entre laboratórios, como demonstrado por Gilmour (1994).

Em plantas cultivadas os marcadores RAPD têm sido utilizados em inúmeras aplicações como a análise das distâncias genéticas entre genótipos de soja (CORRÊA et al., 1999), a identificação e mapeamento de genes de resistência à ferrugem em feijão-comum (FALEIRO et al., 2003), identificação de genótipos de incompatibilidade em avelã (POMPER et al., 1998), caracterização e análise de transgenes em girassol (BINSFELD et al., 2000), entre outras. As principais aplicações destes marcadores têm sido nos estudos de diversidade genética e no mapeamento de genético de características de interesse agrônômico.

Estudos têm mostrado que os marcadores RAPD podem ser utilizados para estudos taxonômicos de acessos de espécies cultivadas ou silvestres. Autores como RUSSEL et al. (1997) identificaram marcadores em espécies cultivadas que têm sido utilizados para esclarecimento de nomenclatura, identificação de acessos em herbários ou elucidação de relações genéticas. Outros pesquisadores têm estudado espécies silvestres para determinar a diversidade genética em grupos separados e para examinar o grau de hibridização em populações mistas (RIAN, 2003).

Em *T. cacao*, a exemplo de outras espécies, os marcadores moleculares tem sido bastante utilizados para diversos tipos de estudos genéticos, como a determinação da diversidade genética entre e dentro de algumas populações (MARITA et al., 2001; LERCETEAU et al. 1997a; 1997b; FALEIRO et al., 2004a), caracterização de germoplasma (CHARTERS & WILKINSON, 2000, FALEIRO et al., 2002c), identificação de marcadores e QTLs associados a resistência e susceptibilidade a doenças (CROUZILLAT, 2000; CASCARDO et al., 1994, QUEIRÓZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2004b) mapeamento genético (CROUZILLAT et al., 1994, CROUZILLAT et al., 1996), estudo da herança destes marcadores (RONNING & SCHNELL, 1995), entre outras aplicações.

### 2.1.7 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

O uso de marcadores genéticos para seleção indireta foi inicialmente idealizado, com a descoberta de variação estrutural de herança simples, presente em isoenzimas e proteínas de armazenamento da semente de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), denominadas faseolinas (KELLY & MIKLAS, 1998). Alguns autores apontam que em muitos casos de caracteres importantes, que são difíceis de acessar, como a resistência a patógenos, insetos e nematóides, tolerância a estresse abiótico, parâmetros qualitativos e caracteres quantitativos, a SAM tem, claramente, o potencial de ser uma ferramenta poderosa para o melhorista (MARTINEZ, 2001). O valor dos marcadores moleculares aplicados ao melhoramento aumenta quando desejamos combinar várias características ou vários genes para um mesmo caráter em um genótipo, sinalizando muito eficientemente para a produção de linhagens avançadas, em uma estratégia denominada piramidação de genes (JONES et al. 1997). O desenvolvimento de novas tecnologias tem permitido a simplificação do processo de seleção a um nível onde as mais modernas técnicas de biologia molecular podem ser usadas rotineiramente pelos melhoristas. No caso de genes de resistência é possível o desenvolvimento de *primers* para reações de PCR que amplificarão o fragmento de interesse que co-segrega com o gene de resistência (JONES et al. 1997). A situação ideal no melhoramento de plantas seria que a seleção de genótipos superiores pudesse ser feita sem a influência do ambiente ou da interação genótipo X ambiente, ou seja, através do fenótipo seria possível selecionar o genótipo superior com 100% de acurácia, o que é possível apenas para características qualitativas, governadas aditivamente com 100% de penetrância e expressividade.

Para ampliar a utilização dos marcadores moleculares associados a características de interesse no melhoramento de plantas, é importante que os mesmos sejam validados em diferentes populações com diferentes *backgrounds* genéticos. Esta validação é feita examinando-se a co-segregação do(s) marcador(es) e a característica de interesse pode fornecer informações seguras a respeito da utilização futura do(s) marcador(es) na seleção indireta. Vários fatores podem afetar a eficiência e o custo da seleção, considerando-se os tipos e números

de marcadores utilizados e as distâncias genéticas entre marcadores e QTLs (ZHOU et al. 2003). Mesmo quando experimentos bem conduzidos indicam a presença de um QTL promissor em uma determinada população, há muito mais que precisa ser feito para ampliar o uso dos marcadores associados ao referido QTL em outras populações de melhoramento. Repetição por vários anos, ambientes e em grandes populações, em populações relacionadas e não relacionadas e análises detalhadas em NIL's (Near Isogeneic Lines), geradas através de marcadores e que isolam o efeito de QTLs individuais, são apenas alguns dos passos adicionais a serem considerados (YOUNG, 1999).

O uso de marcadores baseados em PCR, como microssatélites, aliado a instrumentos de genotipagem de alto rendimento (termocicladores e pipetadores robotizados e seqüenciadores de DNA) tem aumentado a eficiência de coleta de dados ao mesmo tempo em que reduz-se o custo por cada ponto de dado, comparado a marcadores baseados em hibridização, como os RFLPs. Outras tecnologias como o uso de seqüenciadores capilares, espectrometria de massa e novos marcadores, como os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) parecem ser a nova geração de tecnologia e marcadores que irão facilitar a SAM em espécies cultivadas. Independentemente do tipo de marcador utilizado para seleção, marcadores fortemente ligados a genes de resistência podem auxiliar enormemente programas de melhoramento para resistência ao permitir que o gene ou QTL sob seleção seja monitorado através de gerações, ao invés de esperar pela expressão fenotípica do caráter.

O desenvolvimento de populações de mapeamento é um dos pré-requisitos para a identificação de marcadores úteis em estratégias de SAM, na combinação de alelos favoráveis para resistência a patógenos e/ou na seleção contra alelos para susceptibilidade (OBERHAGEMANN et al. 1999). Em particular, o mapeamento de genes de resistência tem aumentado a eficiência do melhoramento de plantas e ampliado o entendimento das bases moleculares da resistência. A parte mais trabalhosa da SAM é a busca por marcadores associados ao caráter, o que requer longo tempo e muitos recursos. De fato, a busca não é tão direta quanto parece. Com base na literatura disponível sobre o assunto, muitas dificuldades podem ser encontradas quando técnicas são transferidas entre laboratórios ou mesmo quando

são apenas repetidas (BARONE, 2003).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados, em programas de melhoramento genético, não apenas para seleção indireta de genótipos superiores, mas também para inúmeras outras aplicações como a caracterização, conservação e utilização racional dos recursos genéticos. Estudos direcionados para a identificação de germoplasma redundante e erros de duplicatas bem como o estabelecimento de *core collections*, geralmente combinam análises morfológicas com caracterização molecular (ZEVEN et al., 1998; FALEIRO et al., 2002c; van TREUREN et al., 2001).

As limitações que podem afetar a aplicação da SAMM em programas de melhoramento incluem (i) o nível de desequilíbrio de ligação (LD) nas populações, que afeta o número de loci marcadores necessários, (ii) o tamanho da amostra e número de repetições experimentais necessárias para detectar QTLs associados a características de baixa herdabilidade e, (iii) erros de amostragem na estimação dos pesos relativos nos índices de seleção. Como apontaram Tanksley & Nelson (1996), o impacto da análise de QTL baseada em marcadores no desenvolvimento de novas linhagens ou variedades com características melhoradas tem sido menor que o esperado. Em teoria propõe-se que SAMM seja mais eficiente que seleção fenotípica quando a herdabilidade de um caráter é baixa, quando há forte ligação entre um QTL e marcadores moleculares (DUDLEY, 1993; KNAPP, 1998), quando o caráter de interesse é de difícil avaliação e quando permite seleção em gerações iniciais, antes que ocorra erosão recombinacional da associação entre marcadores e QTL. Associações estatísticas entre alelos para um dado marcador e alelos e um QTL podem ser usadas para selecionar indiretamente, com alta acurácia potencial para alelos favoráveis, aumentando efetivamente a herdabilidade do caráter (YOUSEF & JUVIK, 2001) e assim a eficiência da seleção.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **GENETIC DIVERSITY OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) ACCESSIONS RESISTANT TO WITCHES' BROOM BASED ON RAPD AND PEDIGREE DATA <sup>1</sup>**

SANTOS, R.C.<sup>(1,2)</sup>; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.<sup>(2)</sup>; GRAMACHO, K.P.G.<sup>(2)</sup>; FLORES, A.B.<sup>(2)</sup>; BAHIA, R.C.S.<sup>(2)</sup>; RAMOS, H.C.C.<sup>(2)</sup>; CORRÊA, R.X.C.<sup>(1)</sup>; AHNERT, D.<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA. E-mail: [darioa@uesc.br](mailto:darioa@uesc.br). <sup>2</sup>Seção de Genética, Centro De Pesquisas do Cacau, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA.

(Artigo submetido à Bragantia, Campinas, SP, em xx/08/2004)

#### **ABSTRACT**

The study of genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.), based on molecular markers have been developed for germplasm management and breeding purposes. Pedigree

---

<sup>1</sup> Extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2004).

data is available in cocoa, but has not been used for assessment of genetic relatedness. Herein, we studied the genetic diversity of 30 cocoa accessions from the series CEPEC, based on RAPDs data and pedigree information. These 30 accessions are segregating for resistance to witches' broom disease and are important for breeding purposes. Twenty of these accessions descend from TSA-644 clone, originated from a cross between the Upper Amazon germplasm called Scavina-6, the main source of resistance to witches' broom disease, and IMC-67. The ten remaining are from different sources including Amazonian and Trinitarios germplasm. RAPDs data were collected using 16 *primers* and pedigree information was obtained at the International Cocoa Germplasm Database. Genetic similarities, genetic distances and coefficient of parentage were calculated using available softwares. Relatively low genetic diversity was obtained for this germplasm set, probably because of their relatedness and low representation of germplasm available. The TSA-644 descendent accessions were more diverse than the non-descent accessions, what could be due to the origin of the clone TSA, that was derived from highly divergent genotypes. Association between genetic similarities based on RAPDs data and coefficient of parentage, based on pedigree data were very low, probably due to the heterogeneity of the breeding stocks and poor pedigree information. These findings may be helpful for cocoa breeders to guide crosses for development of hybrid and clonal cultivars.

**Key words:** *Theobroma cacao* L. - *Crinipellis pernicioso* –RAPD markers – genetic diversity.

## RESUMO

Análises da diversidade genética em cacau (*Theobroma cacao* L.), baseada em marcadores moleculares têm sido desenvolvidas com fins de manejo de germoplasma e uso no melhoramento genético. Dados de pedigree de cacau, embora disponíveis, não tem sido utilizados em estudos de diversidade genética. Neste trabalho, foi analisada a diversidade genética em uma amostra de 30 genótipos da série CEPEC, baseado em marcadores RAPD e informações de pedigree. Vinte destes genótipos são descendentes de TSA-644, germoplasma Alto amazônico, e os dez restantes, derivados de outros cruzamentos envolvendo genótipos Amazônicos e Trinitários. Para obtenção dos marcadores RAPD, foram utilizados 16 *primers* e as informações de pedigree obtidas no “International Cocoa Genetic Database” (ICGD). A diversidade genética encontrada foi relativamente baixa, devido ao grande relacionamento genético entre a maioria dos materiais estudados. Os accessions descendentes de TSA-644 apresentaram maior diversidade que os não descendentes, o que pode ser atribuído à origem deste parental, derivado de um cruzamento entre accessions altamente divergentes. Associações entre similaridades genéticas e coeficientes de paternidade (COP), foi muito baixa, provavelmente devido à alta heterogeneidade dos materiais estudados. Os resultados obtidos neste trabalho, podem auxiliar na definição de novos cruzamentos para o desenvolvimento de híbridos ou variedades clonais.

**Palavras-chaves:** *Theobroma cacao* L. - *Crinipellis perniciosa* – marcadores RAPD – diversidade genética.

## INTRODUCTION

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes resistant to witches' broom disease have been identified in many producing countries in South and Central America, where the fungus *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of the disease is threatening cocoa plantations

(LAKER et al., 1988; PIRES, et al., 1999). The Scavina accessions, collected in the Upper Amazon in the 1930's, are the main source of resistance (SORIA, 1977; KENNEDY et al., 1987). These accessions, especially Scavina-6 and Scavina-12, besides resistance transmit to their descendants high hybrid vigor and good yielding performance, for these reasons are widely used in producing countries affected by the disease. Many other resistant accessions were identified in Brazil, at the Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC – state of Bahia, and Estação de Recursos Genéticos José Haroldo –ERJOH – state of Pará, after field evaluation of a germplasm collection of more than 1000 accessions in each location (MARITA et al., 2001; FALEIRO et al., 2004c, PIRES, 2003). The Scavina-6 and Scavina-12, the main sources of resistance and the accessions identified in Brazil as resistant are being crossed in different breeding schemes to combine alleles from different resistant accession to develop new resistant clonal and hybrids varieties.

Accurate estimates of genetic variability levels among germplasm accessions may increase efficiency for crop species breeding (BARRET et al. 1998). Measures of genetic variability among and within cocoa populations have been obtained based on phenotypic and molecular data (BEKELE AND BEKELE, 1996; MARITA et al 2000; FALEIRO et al., 2004a). Phenotypic data has been useful for the classification of the major germplasm groups in cocoa, but are less efficient to separate accessions within groups (CHARTERS & WILKINSON, 2000). Pedigree data is used to calculate coefficient of parentage (KEMPTHORNE, 1969), an indirect measure of genetic diversity among accessions that estimates the probability that alleles of two individuals at a locus are identical by descent (BARRET et al. 1998). Pedigree data is available for some cocoa germplasm and cultivars but has not been commonly used for genetic diversity estimates.

Molecular markers like *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), which are

more accessible to the producing countries, and more recently microsatellites, are currently the most used markers for accessing genetic diversity in cocoa (MARITA, 2001; FALEIRO et al., 2002b; FALEIRO et al., 2004a; FALEIRO et al., 2004b). MARITA et al. (2001) using RAPDs studied the genetic diversity of a representative sample composed by 280 accessions, providing an over-all portrait of the relatedness of the major cocoa germplasm groups available in the world. RAPDs have also been used for the study of more specific genetic diversity (FALEIRO et al., 2004a), for the identification of mislabeling and accession duplication (FALEIRO et al. 2002c) and development of genetic linkage maps (FALEIRO et al. 2004; QUEIRÓZ et al. 2003).

The objectives of this study were: (i) estimate the genetic similarity (GS) of 30 cocoa accessions of the CEPEC series based on RAPD markers; ii) estimate the coefficient of parentage (COP) of these accessions (iii) examine the agreement between the RAPD-based GS and COP; and (iv) compare the genetic similarities in accessions derived and not derived from the TSA-644 accessions.

## **Material and Methods**

### **Genetic material**

A subset of 30 cocoa accessions of the CEPEC series, that comprise more than one hundred accessions, was analysed because it segregate for witches' broom resistance and is important for CEPEC's breeding program (Table 1). The series is composed by accessions categorized under a single acronym. Twenty of these accessions have in their pedigree the progenitor TSA-644 (Trinidad Selection Amazon), originated from the cross between SCA-6 (Scavina) and IMC67 (Iquitos Mixed Calabacillo), both from the cocoa germplasm group from the Upper Amazon called Forastero. The ten remaining accessions are originated from different sources including: IMC and PA (Parinary) from the Upper Amazon, EEG (Estação Experimental de Goitacazes), SIC (Seleção Instituto do Cacau), SIAL (

Seleção Instituto Agrônomo do Leste), CAS (Campo Agrícola de Santarém) from the Brazilian Amazon River Basis; EET (Estación Experimental Tropical) from Ecuador, all of them belonging to the group Forastero; and UF (United Fruit), ICS (Imperial College Selection) from Central America, belonging to the cocoa group called Trinitario, that originated from crosses between Forastero and Criollos, originated in Central America. These 30 accessions are held at the CEPEC's germplasm collection, in ten replicates of each one, and were evaluated for resistance to witches' broom in the field for more than 10 years.

Table 1. Designation, parents and origin of the accessions genotyped with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers.

AAcc#	Clone name	Female	Male
1	CEPEC 20	UF 613	SIAL 169
2	CEPEC 21	ICS 8	EEG 48
3	CEPEC 23	SIAL 169	UF 168
4	CEPEC 32	SIC 19	IMC 67
5	CEPEC 33	SIAL 169	IMC 67
6	CEPEC 35	TSA-644	Unknown
7	CEPEC 36	TSA-644	Unknown
8	CEPEC 38	TSA-644	SIC 823
9	CEPEC 39	SIC 19	TSA-644
10	CEPEC 40	TSA-644	SIC 19
11	CEPEC 41	TSA-644	SIC 19
12	CEPEC 42	TSA-644	SIC 19
13	CEPEC 44	TSA-644	SIC 19
14	CEPEC 45	PA 121	UF 667
15	CEPEC 48	TSA-644	UF 667
16	CEPEC 50	SIC 431	ICS 6
17	CEPEC 60	IMC 67	CAS 1
18	CEPEC 61	EEG 25	CAS 1
19	CEPEC 74	TSA-644	Unknown
20	CEPEC 75	TSA-644	Unknown
21	CEPEC 76	TSA-644	Unknown
22	CEPEC 77	TSA-644	Unknown
23	CEPEC 78	TSA-644	Unknown
24	CEPEC 79	TSA-644	Unknown
25	CEPEC 81	SIC 19	TSA-644
26	CEPEC 82	SIC 19	TSA-644
27	CEPEC 83	SIC 19	TSA-644
28	CEPEC 84	TSA-644	SIC 19
29	CEPEC 85	TSA-644	SIC 19
30	CEPEC 1008	EET 392	EET 399

## **DNA extraction and RAPD reactions**

Young individual leaves of adult plants were collected in plastic bags, identified by tags and stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  for DNA extraction following a modified CTAB protocol (DOYLE & DOYLE, 1990) optimized by FALEIRO et al. (2002a). DNA quality and integrity was determined by running a small aliquot in a 0,8% agarose gel, staining with ethidium bromide and visualizing under ultraviolet light (UV). Each RAPD reaction was done using 30 ng of DNA in a final volume of  $25\mu\text{L}$ , according to Faleiro et al (2002b). According to VIRK et al. (2000), 30 primers that generate mapped marker in cacao and 29 that did not, were used in PCR reactions, carried out in a Primus 96 *plus* (MWG AG BIOTECH) thermocycler.

## **Data collection and analysis**

The RAPD markers generated by each primer over the 30 CEPEC accessions were scored using 1 to indicate presence and 0 for absence. Genetic distances were calculated for each pairwise combination in all 30 accessions using the RAPD markers and pedigree data excluding monomorphical bands of the analysis. The pedigree of each accession was traced back to its ancestors using cocoa breeders information and accessing the ICGD (International Cocoa Germplasm Database) database.

Coefficient of parentage (COP) was performed in SAS and genetic dissimilarities using RAPD data were performed using arithmetical complement of the similarity coefficient of Jaccard in Genes program (CRUZ, 1997). NTSYSpc software (ROHLF, 1993) was used to calculate correlations between distances matrices using MXCOMP function and significance of the correlation tested with a Mantel test of 1000 permutations, according to DeHAAN et al. (2003). A three dimensional MDS plot was constructed from the similarities estimates using

principal coordinates calculated with SAS program (SAS Institute, 1988). A frequency distribution of genetic diversity estimates based on RAPD markers and pedigree analysis and determination of the coefficient of variation for genetic similarities was performed and plotted against sample size to obtain the number of bands required for reliable and accurate analyses of the genetic diversity.

## RESULTS

From the 61 primers tested, 31 exhibited polymorphism and 16 produced clear and scorable fragments. These 16 *primers* resulted in 91 distinct fragments, with an average of 5,7 fragments per primer. Of the 91 fragments 88 (96,7%) were polymorphic and thus included in the analyses. The overall average of fragments per primer obtained in this study were higher than those reported by FIGUEIRA et al. (1994) and MARITA et al. (2001) but lower than those obtained by YAMADA et al. (2002), in another set accessions of the CEPEC series.

Primer	ML <sup>a</sup>	TF <sup>b</sup>	PF <sup>c</sup>	%PP
AV-14	7,9	10	10	100.00
J-18	2	2	2	100.00
M-2	8	7	7	100.00
T-1	3,1	3	3	100.00
T-8	2	1	1	100.00
T-12	1	2	2	100.00
Y-20	1,4,5	7	7	100.00
Mean	-	4.57	4.57	100.00
A-8	-	2	2	100.00
A-12	-	12	12	100.00
C-4	-	13	11	85.00
F-1	-	4	4	100.00
F-2	-	1	1	100.00
F-3	-	6	6	100.00
I-2	-	5	4	80.00
I-3	-	8	8	100.00
I-11	-	8	8	100,00
Mean	-	6.56	6.22	96.11

<sup>a</sup>Marker location at genetic map

<sup>b</sup>Total number of fragments generated per primer

<sup>c</sup>Total number of polymorphic fragments generated per primer

From the 31 used *primers*, 16 (51,61%) generated mapped markers and of these mapped only 7 (43,7%) produced reliable amplification pattern with a total of 32 (35,17%) fragments and an average of 4,57 fragments per primer. From the remaining 15 (48,39%) used primers, only nine (60,0 %) generated amplification with 59 (64,83%) fragments with an average of 6,5 fragments per primer (Table 3). These results are in agreement with VIRK et al (2000) findings that showed no advantage in using mapped RAPD markers for assessing genetic diversity.

Histograms of the genetic similarities estimates based on pedigree data (Fig. 1A) and the COP estimates based on RAPD (Fig. 1B), generated from the 435 pair-wise combinations of the 30 cacao accessions, revealed differences between RAPD and pedigree data. The genetic similarities estimates based on RAPD markers ranged from 0,18 to 0,76, with an average of 0,45, a standard deviation of 0,10 and a coefficient of variation of 0,22. The COP estimates ranged from 1,00 to 0,03, with an average 0,44, standard deviation of 0,41 and a coefficient of variation of 0,96.

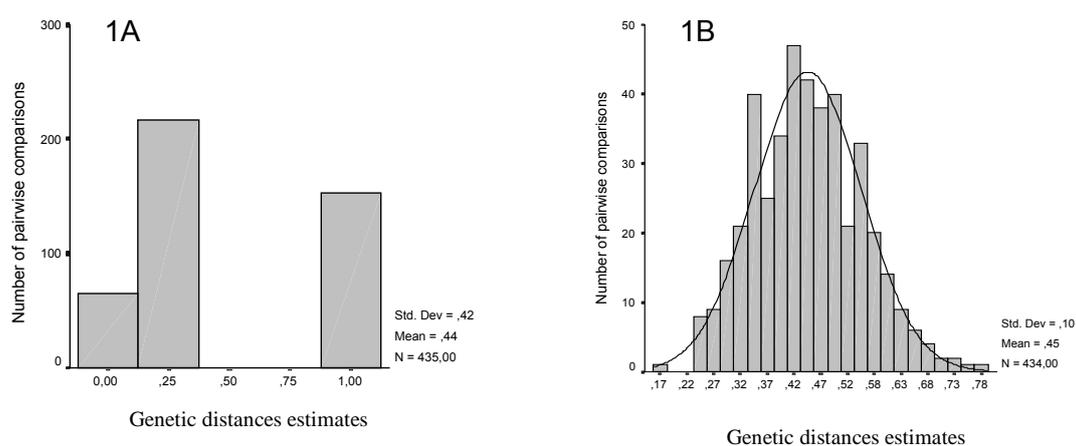


Figure 1. Distribution of similarity values obtained from COP (1A) and RAPD (1B) data pairwise comparisons among 30 cocoa clones

Results of the Spearman's correlation analysis showed a positive correlation between *GS* and *COP* estimates ( $r_s = 0,21$ ,  $P < 0.001$ ), indicating an association between these two coefficients of relatedness for this set of germplasm.

A separate analysis of Genetic Diversity (*GD*) was made for the 20 *TSA* descendants accessions and for the 10 non-descendant ones. For the *TSA* descendants *GD* ranged from 0,159 to 0,605 with an average of 0,384 and a coefficient of variation of 22,7%. For the non-descendant *GD* ranged from 0,050 to 0,533 with an average of 0,232 and a greater value for the coefficient of variation of 29,1%.

Associations among the 30 cocoa clonal accessions based on Multi Dimensional Scaling (*MDS*) are presented in Fig. 2. Multi Dimension-1 (*DIM1*), *DIM2* and *DIM3* presented Badness-of-fit-criterion of 0,1834, indicating that the original multidimensional data had a disturbance of 18% when plotted in three dimensions. *DIM1* separated all *TSA*-644 descendant clones, except one, from the non-descendant clones. The *TSA*-644 descendants were plotted on quadrants B and C and the non descent on quadrant A of the graphic. The *TSA* descendant clones are composed of crosses between the *TSA*-644 clone, originated from upper Amazon germplasm, with clones *SIC* and *SIAL*, from de Brazilian Basin Amazon, and with unknown parents. Upper and low Amazon germplasm are distinct in many traits, especially resistance to witches broom in which the upper Amazon used in this study showed resistance. The ten non-descendant clones originated from crosses between upper Amazon and low Amazon germplasm and crosses between upper Amazon and Trinitarios. *DIM2* scattered the clones within the *TSA* descendants and non- descendants, but there were not clear groupings based on pedigree or origin of germplasm. *DIM3* separated the non-descendant clones, favoring differentiation of upper versus low Amazon from

Trinitarios versus Amazon descendants. The upper Amazon EET399 x EET399 clone was plotted isolated in quadrant A3 and was clearly distinct from the remaining non-descendent clones. from the remaining non-descendent accessions.

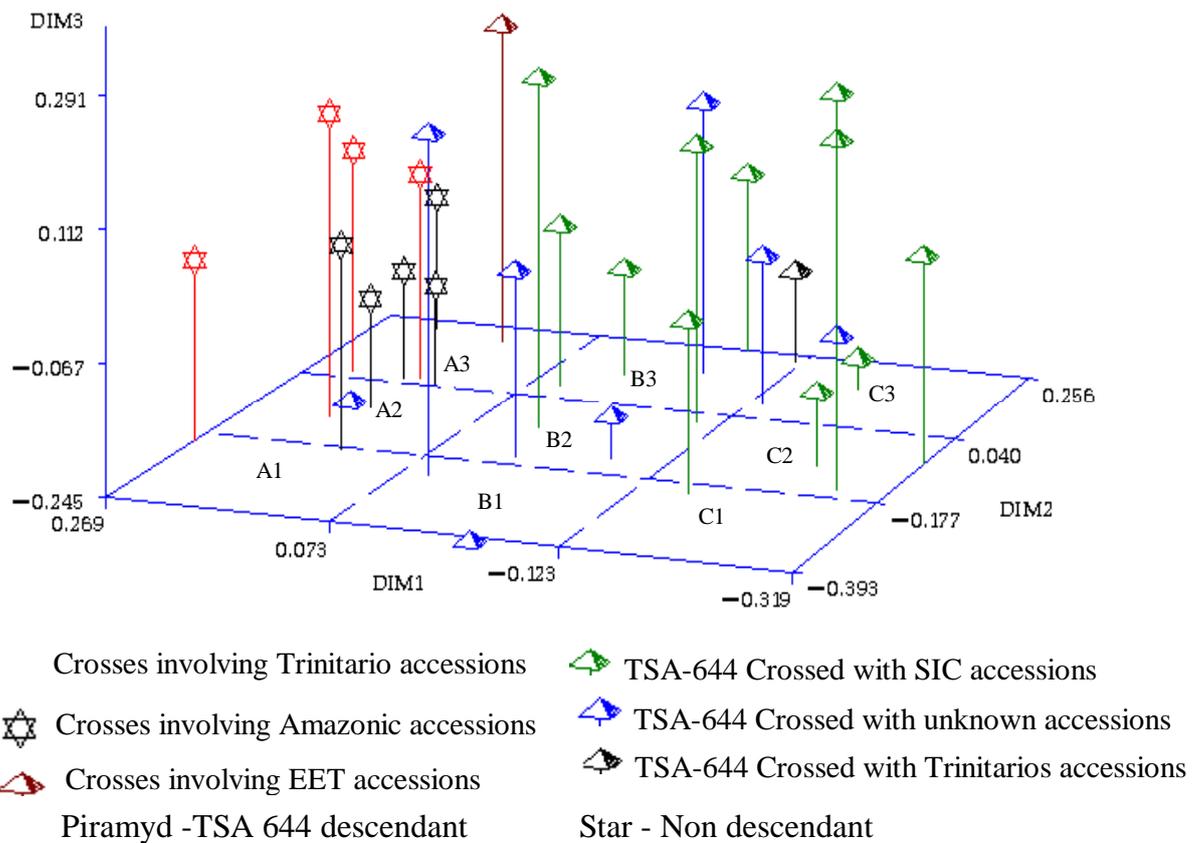


Figure 2. Graphical dispersion of the 30 clones obtained by MDS-SAS function along first three dimensions axes based on RAPD data

## DISCUSSION

Genetic diversity in cacao has been examined more frequently among the main germplasm groups, composed of Forasteros, Trinitarios and Criollos, and seldom within groups or germplasm series. In general, accessions from the Upper Amazon germplasm show

higher GD than those from other regions (MARITA et al, 2001; RONNING & SCHNELL, 1994; N'GORAN et al., 1994; LERCETEAU et al., 1997; WHITKUS et al., 1998;). The clone set studied here composed of Upper and low Amazon and Trinitario germplasm , including 20 TSA-644 descendants and 10 non-descendant, showed less GD than reported in these previous studies, probably because most of the accessions had in their pedigree TSA-644 (Upper Amazon) and SIC and SIAL (low Amazon) germplasm, not including Criollo types. Besides, the set had a relatively low number of accessions and some were genetically related. Previous studies showed low genetic diversity for the SIC and SIAL germplasm, that are originated from selections made in the 1950's and 60's in a landrace called "Cacau Comum da Bahia", very much adapted to South of Bahia, corroborating with our findings of low GD (CASCARDO et al., 1993).

When the TSA descendants and non-descendant were analyzed separately, the GD level was higher in the TSA descendants than in the non-descendants accessions, probably because of the genetic diversity of the others genitors involved and TSA origin from a cross of Upper Amazon accessions with high GD. The lower level of GD in the non-descendant accessions may be due to the lower number of genitors involved and the lower genetic diversity of Trinitario and the EET392 germplasm in this group.

These findings can be very helpful for breeders to direct their crosses. For example, the TSA descendants could be sub-divided in six sub-groups based on the accession present in the quadrants B1, B2, B3, C1, C2 and C3 of the graphic, according to their relatedness. In these sub-groups the agronomically superior genotypes (resistant to witches' broom and other important traits) and less related based on GD values could be selected for future crosses. The same procedure could be done with the non-descendant genotypes. This approach may help breeders to reduce the number of crosses to be tested, saving time and resources. By

indicating this selection procedure we are assuming that more related accessions, based on the RAPDs data, have common alleles for agronomic traits that when in crosses and reassociation of alleles would not generate the expected genetic gains as expected from crosses between less related cocoa germplasm, that usually show hybrid vigor and trait complementation.

In cocoa, breeders usually make pedigree records of the genetic material in use and the relatedness in the main breeding stocks are known. However, these breeding stocks and populations are very heterogeneous and almost no population breeding has been developed, making it difficult to measure relatedness based on COP. We believe that this is the main reason COP was a poor measure of genetic diversity for the clone set studied here. Coefficient of parentage values obtained do not appear to be enough reliable to indicate distinct genetic similarities among genotypes, in agreement with SOUZA et al.(1998) assumptions that COP calculation can induce wrong conclusions about genetic relationships among studied materials. We can conclude that molecular markers in cocoa are more reliable and, if collected appropriately, became very helpful for breeding and germplasm conservation.

The level of GD found in the TSA-644 descendants can be considered low when compared to previous studies in large sets of cocoa germplasm (FALEIRO et al., 2004a) and farmers' selections in southern of Bahia (YAMADA., 2001; FALEIRO et al.; 2004c; LEAL et al., 2004) however, reveals that Scavina-6 X IMC 67 descendants maintain certain level of diversity. There is a great concern among cocoa breeders regard the use of only one main source resistance, narrowing the genetic base, which is a problem considering the great variability of the pathogen and the great number of disease that threat cacao crop.

## **5. CONCLUSIONS**

1. The genetic diversity level was low among groups revealing the narrow genetic base for resistance to witches' broom disease.
2. Despite of expected genetic diversity was greater within DS group than in ND group.
3. COP was not a good measure of genetic diversity and there was a not great agreement between genetic distances matrices.
4. Mapped markers not showed advantages for unmapped markers for genetic analysis diversity.

## **6. REFERENCES**

- Barret, B.A.; Kidwell; K.K.; Fox. P.N. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science*. v.38, p.1271-1278, 1998.
- Bekele, F.;Bekele, I. A sampling of the Phenetic diversity of cacao in the International Cocoa Gene Bank of Trinidad. *Crop Science*, v.36, p. 57-64, 1996.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, U. F.V. 1997, 442p.
- DeHAAN, L.R.; EHLKE, N.J.; SHEAFFER,C.C.; MUEHLBAUER, G.J.; WYSE, D.L. Illinois bundleflower genetic diversity determined by AFLP analysis. *Crop Science*, v.43, p. 402-408, 2003.
- Doyle, J.C; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15. 1990.
- CASCARDO, J.C.M.; PIRES, J.L.; FIGUEIRA, A. Estimating genetic diversity of cacao in Southern Bahia using RAPDs. In: Brazilian Plant Biotechnology meeting, 1, Annals, REDBIO, Brasília, p.47, 1993.
- CHARTERS, Y.M.; WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as “in-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 100:160-166. 2000.
- FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.;

- AHNERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*. v.2, p. 31-34. 2002a.
- FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.G.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALLE, R.R. Caracterização molecular de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. *Agrotrópica*, v.13, p.79-86, 2002b.
- FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; PIRES J.L.; FALEIRO, A.S.G.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C.; SANTOS, R.C.; SANTOS, R.F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.2, p.439-444, 2002c.
- FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; PIRES J.L.; ROCHA, J.B.; BAHIA, R.C.S.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.12-17, 2004a.
- FALEIRO, F.G.; QUEIRÓZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G.A.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis Perniciosa*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*. Submitted. 2004b.
- FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S.; CORRÊA, R.X. Genetic diversity in cacao accessions selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2004c. (no prelo)
- FIGUEIRA, A. JANICK, J.; LEVY, M.; GOLDSBROUGH, P. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. *Journal of American Society for Horticultural Science*. v.119, p.1073-1082, 1994.
- KEMPTHORNE, O. An introduction to genetic statistics. Iowa State University Press. Ames. 1969.
- KENNEDY, A.J.; LOCKWOOD, G.; MOSSU, G.; SIMMONDS, N.W.; TAN, G.Y. Cocoa breeding: past, present and future. *Cocoa Growers' Bulletin*, v. 38, p.5-22, 1987.

LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; KUMAR, D.R. Present status of witches' broom disease on cocoa in Trinidad. *Tropical Pest Management*, v.34, p.318-323, 1988.

LEAL, J.B.; SANTOS, C.A.P.; SANTOS, L.M.; PIRES, J.L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Variabilidade genética de cacauzeiros resistentes à vassoura-de-bruxa selecionados em fazendas do sul da Bahia e de seus potenciais genitores utilizando marcadores RAPD. *Bragantia*. (submetido). 2004.

LECERTEAU, E., T. ROBERT, V. PÉTIARD; D. CROUZILLAT. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, v.95, p.10-19, 1997.

MARITA, J.M.; J.M. RODRÍGUEZ J. NIENHUIS. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genetic Research of Crop Evolution*, v.47, p.515-526, 2000.

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

N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* using RFLP and RAPD markers. *Heredity*. v.73, p.589-597, 1994.

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, Proceedings. Cocoa Producers' Alliance, Lagos. p.389-398. 1999.

PIRES, J.L. Avaliação Quantitativa e Molecular de Germoplasma para o Melhoramento do Cacauzeiro com Ênfase na Produtividade, Qualidade de Frutos e Resistência a Doenças. 2003. 226p Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - UFV. Viçosa..

QUEIRÓZ, 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*, v.122, p.268-272, 2003.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter software, Setauket, NY. 1993.

RONNING, C.M.; SCHNELL, R.J.; KUHN, D.N. Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. *Journal of American Society of*

Horticultural and Science, v.120, p.686-692, 1995.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. Release 6.03. CARY, NC: SAS INSTITUTE INC, 1988. 1028p.

SORIA, J. The genetic and breeding of cacao. In: International Cocoa Research Conference, 5, Proceedings. Cocoa Research Institute of Nigeria, Ibadan. p.18-24. 1977.

SOUZA, E.; FOX, P.N.; SKOVMAND, B. Parentage analysis of international spring wheat yield nurseries 17 to 27. *Crop Science*, v.38, p.337-341, 1998.

VIRK, P.S.; NEWBURY, H.J.; JACKSON, M.T. AND FORD-LLOYD, B.V. Are mapped markers more useful for assessing genetic diversity? *Theoretical and Applied Genetics*, v.100, p.607-613, 2000.

WHITKUS, R.; de la CRUZ, M.; MOTA-BRAVO, L.; GÓMEZ-POMPA. A. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, v.96, p.621-627, 1998.

YAMADA, M.M.;FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.S.; PIRES, J.L.; GOMES, L.M.C.; MELO, G.R.P. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, using isozymes and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.1, p.377-384, 2001.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; NETO , A.D.; PIRES, J.L.; FLORES, A.B.; FALEIRO,A.S.G.; BAHIA, R.C.S. Diversidade genética de acessos de cacauzeiros da série CEPEC por meio de marcadores moleculares. *Agrotrópica*. v.14, p.137-140, 2002.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; FLORES, A.B.; FALEIRO,A.S.G. Genetic variability and heterozygosity of cacao accessions of Parinari (Pa) population, based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v.3, p.289-296,2003.

## 4. CAPÍTULO 2

### ESTUDOS PRELIMINARES PARA A VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A QTL PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)<sup>2</sup>

SANTOS, R.C.<sup>(1,2)</sup>; PIRES, J.L.<sup>(1)</sup>; LOPES, U.V.<sup>(1)</sup>; SANTOS, R.F.<sup>(1)</sup>; GAIOTTO, F.A.<sup>(1)</sup>; CORRÊA, R.X.<sup>(1)</sup>; AHNERT, D.<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA. E-mail: [darioa@uesc.br](mailto:darioa@uesc.br). <sup>2</sup>Seção de Genética, Centro De Pesquisas do Cacau, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA.

(Artigo a ser submetido)

#### RESUMO

A partir de um mapa genético construído e saturado utilizando-se uma população F<sub>2</sub> (TSH 516) composta de 82 indivíduos, foram identificados um QTL de efeito maior e quatro marcadores, um RAPD (AV-14<sub>940</sub>) e três microssatélites (mTcCIR24, mTcCIR30 e mTcCIR35), associados à resistência à vassoura-de-bruxa (VB), principal doença do cacau no Brasil. Estes marcadores antes de serem

---

<sup>2</sup> Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2004).

incorporados ao programa de melhoramento genético do cacaueteiro precisam ser testados em novos indivíduos e, ou populações para que sejam confirmados seus efeitos e origem. Assim, objetivou-se neste trabalho validar os marcadores mapeados e associados à resistência à VB em um grupo de 30 acessos da série CEPEC, no qual foram incluídos 20 materiais descendentes de Scavina-6 (SCA-6), a principal fonte resistência à doença, e 10 acessos provenientes de cruzamentos que não envolviam SCA-6, verificando-se a presença ou ausência destes marcadores nos acessos e relacionando ao comportamento destes em relação à doença. Verificou-se que o marcador RAPD não amplificou o fragmento correspondente àquele detectado no mapa, em nenhum dos acessos avaliados. Com relação aos microssatélites, não foi confirmada a associação encontrada entre os marcadores e a resistência à VB. Pode-se concluir que estes marcadores não foram adequados à seleção de materiais resistentes no grupo de acessos analisados e que novas validações devem ser feitas em populações resultantes do cruzamento envolvendo o parental resistente do cruzamento original (SCA-6) e indivíduos F1, para que seja confirmada especificidade e aplicabilidade dos marcadores.

Palavras-chave: RAPD, microssatélites, genes de resistência, validação de marcadores, seleção assistida.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Objetivando associar marcadores moleculares a QTL (Quantitative Trait Loci) para resistência à vassoura-de-bruxa (VB), dois mapas genéticos moleculares foram desenvolvidos tendo como base uma população  $F_2$  do clone TSH 516. Esse clone foi derivado do cruzamento entre SCA-6 X ICS-1, sendo o primeiro parental reconhecido como a principal fonte de resistência à doença VB, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* e que tem causado imensos prejuízos à região cacaueira da Bahia desde que foi introduzida em 1989. O parental ICS-1 é de alta produtividade mas muito susceptível à VB. O primeiro mapa foi desenvolvido por Queiróz et al. (2003) que utilizou marcadores RAPD e AFLP visando a identificação de QTLs associados à resistência à VB. Neste mapa foi identificado um QTL de efeito maior flanqueado por um marcador RAPD (AV-14<sub>940</sub>) fortemente associado à resistência à doença, responsável por 35,5% da variância fenotípica. Um segundo mapa foi desenvolvido utilizando-se a mesma população, no qual foram inseridos novos marcadores RAPD e marcadores microssatélites (FALEIRO et al, 2004), num processo denominado saturação, que visa preencher lacunas e reduzir as distâncias entre os marcadores, evitando-se a perda de marcadores por recombinação. Neste mapa saturado foram identificados mais três marcadores microssatélites associados à resistência e com elevado percentual de explicação da variância fenotípica para a característica (FALEIRO et al., 2004).

Nos mapas genéticos recentemente desenvolvidos para o cacauero (*Theobroma cacao* L.), os marcadores microssatélites têm sido os mais utilizados (FALEIRO et al., 2004; PUGH et al, 2004) por se tratarem de marcadores co-dominantes, podendo-se distinguir homozigotos de heterozigotos, baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), por estarem presentes na maioria dos genomas eucariotos e apresentarem maior estabilidade na transferência entre laboratórios (PUGH et al., 2004). Estes marcadores apresentam limitações, destacando-se a necessidade do desenvolvimento de bibliotecas genômicas, como as bibliotecas de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), que constituem-se em uma eficiente estratégia para o estudos de isolamento e estruturais de genes e para detecção de novos marcadores (CLÉMENT et al, 2004).

Muito embora muitos marcadores tenham sido alocados em mapas genéticos,

poucos destes marcadores foram eficientemente associados a características agronômicas importantes, seja por falta de estratégias estatísticas confiáveis ou, simplesmente, pela falta de uma adequada caracterização fenotípica do material genético mapeado. Muitos avanços na área da genômica têm fornecido um grande número de marcadores moleculares em várias espécies cultivadas e também uma grande variedade de técnicas de detecção, o que tem tornado possível a aplicação da Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAMM) em programas de melhoramento (CHEN et al., 2001). Para que marcadores moleculares possam ser utilizados no melhoramento de plantas, estes devem ser validados examinando-se a co-segregação com QTLs associados ao caráter de interesse, em diferentes populações com diferentes *backgrounds* genéticos (ZHOU et al., 2003; LANGRIDGE & CHALMERS, 1998). Esta validação pode fornecer informações seguras a respeito da utilização futura de marcadores. De acordo com Davis & DeNise (1998) a implementação de um programa de SAMM passa por três fases distintas, (i) a fase de detecção, na qual polimorfismos de DNA são utilizados para a detecção de ligação entre marcadores moleculares e QTLs associados à característica de interesse; (ii) a fase de validação, na qual marcadores e QTLs identificados são testados em novas populações para verificar sua reprodutibilidade e segregação em outros *backgrounds* genéticos e, (iii) a fase de implementação, onde os marcadores que se mostraram preditivos são utilizados diretamente no programa de melhoramento.

Os objetivos deste trabalho foram (i) testar a reprodutibilidade de marcadores moleculares microssatélites e RAPD associados à resistência à VB; (ii) validar marcadores associados a um QTL de efeito maior associado a resistência à VB, em diferentes materiais genéticos e (iii) verificar a aplicabilidade de marcadores mapeados no programa de melhoramento genético do cacauero.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Material genético e avaliação fenotípica**

Entre os muitos grupos de acessos pertencentes ao banco de germoplasma de cacau do CEPEC, estudados por Pires (2003), para várias características, entre

estas a resistência a doenças como a podridão-parda e a vassoura-de-bruxa, estão os acessos da série CEPEC. Desta série foram escolhidos 30 acessos divididos em dois grupos: um grupo composto de 20 acessos descendentes de TSA-644, sendo,

Tabela 1. Médias corrigidas e transformadas dos acessos para as variáveis: número total de vassouras (NVT), número de vassouras vegetativas (NVV), número de vassouras de almofada floral (NVA) com os respectivos grupos de variâncias residuais (GR) e médias corrigidas para a proporção de frutos perdidos por vassoura (NFV, em %)

Acessos	NVT	RG	NVV	RG	NVA	RG	NFV
1.CEPEC 20	3,66	3	2,28	3	2,49	3	54,44
2.CEPEC 21	2,34	3	1,85	3	0,76	2	51,48
3.CEPEC 23	3,70	3	2,29	3	2,51	3	47,07
4.CEPEC 32	3,29	3	2,60	3	1,76	3	38,97
5.CEPEC 33	2,92	3	2,35	3	1,44	3	34,04
6.CEPEC 35	4,92	3	2,17	3	4,17	3	40,97
7.CEPEC 36	4,56	3	3,09	3	2,88	3	51,47
8.CEPEC 38	0,49	1	0,41	1	0,26	2	23,54
9.CEPEC 39	2,23	3	1,79	3	1,08	3	38,81
10.CEPEC 40	3,06	3	2,09	3	1,97	3	39,09
11.CEPEC 41	1,69	3	1,14	3	0,97	2	41,45
12.CEPEC 42	0,12	1	0,10	1	0,00	1	15,53
13.CEPEC 44	2,45	3	1,60	3	1,68	3	49,89
14.CEPEC 45	3,23	3	1,90	3	2,22	3	33,51
15.CEPEC 48	3,09	3	1,89	3	2,36	3	47,49
16.CEPEC 50	3,47	3	2,95	3	1,29	3	48,04
17.CEPEC 60	4,02	3	1,89	3	2,56	3	39,80
18.CEPEC 61	3,77	3	2,51	3	2,26	3	66,40
19.CEPEC 74	0,73	2	0,38	2	0,51	2	32,96
20.CEPEC 75	4,52	3	2,98	3	3,02	3	55,92
21.CEPEC 76	4,41	3	2,51	3	3,37	3	42,92
22.CEPEC 77	4,38	3	2,46	3	3,37	3	49,09
23.CEPEC 78	4,27	3	2,87	3	2,79	3	50,57
24.CEPEC 79	1,43	3	0,73	3	0,98	3	39,04
25.CEPEC 81	2,12	3	1,37	3	0,88	2	38,88
26.CEPEC 82	2,08	3	1,74	3	0,88	2	27,14
27.CEPEC 83	3,84	3	2,81	3	2,02	3	47,25
28.CEPEC 84	2,08	3	1,39	3	1,00	3	38,36
29.CEPEC 85	4,73	3	2,72	3	3,54	3	38,99
30.CEPEC 1008	0,53	1	0,46	1	0,11	2	18,86

Fonte: Pires, 2003.

portanto, descendentes do clone Scavina-6 (SCA-6), a principal fonte de resistência a VB e que foi denominado grupo DS; e um segundo grupo, composto de 10 genótipos, em cujo pedigree não consta a participação de SCA-6 ou são muito distantes molecularmente dos DS, denominado ND.

#### **4.2.2 Coleta de material e extração de DNA**

Foram coletadas folhas jovens de uma planta de cada um dos acessos, no Banco de Germoplasma do CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau). Cada amostra foliar foi acondicionada individualmente em saco plástico e devidamente identificada com etiqueta. As amostras foram coletadas preferencialmente no dia da extração de DNA ou no dia anterior à tarde e conservadas em geladeira até o momento da extração. Pedaçõs de folhas foram cortados, colocados em cadinhos gelados e macerados com pistilo em presença de nitrogênio líquido até ficarem na condição de um pó homogêneo. O DNA genômico total foi extraído através do protocolo do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) desenvolvido por Doyle & Doyle (1991) e otimizado por Faleiro et al. (2002) para uso em cacau. Uma pequena parte do macerado foi colocada em tubos eppendorf de 2,0 ml, correspondendo a cerca de um terço deste, à qual foi adicionado 800µL de tampão de extração aquecido em banho-maria a 65°C, fazendo-se inversões vigorosas até a completa homogeneização do mistura com o macerado, seguido da adição de 5 µL de proteinase K. As amostras foram incubadas àquela temperatura por uma hora, com agitações manuais a cada dez minutos, para a lise completa da parede celular. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm para separação do tecido foliar do sobrenadante contendo o DNA. Este sobrenadante foi coletado utilizando-se ponteiras com a ponta cortada, a fim de reduzir a força do fluxo e evitar a sua contaminação, e transferido para novos tubos devidamente identificados. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 50 µL de CTAB, agitado manualmente por cinco minutos seguido da adição de 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CAI), e nova agitação por mais 10 minutos e posterior centrifugação como descrito anteriormente. Após este passo foi efetuada nova coleta de sobrenadante seguido de nova adição de 700 µL CAI, agitação e centrifugação. Ao sobrenadante coletado

foram adicionados 700  $\mu$ L de isopropanol, previamente gelado, e incubado até o dia seguinte a  $-25^{\circ}\text{C}$ , com o objetivo de precipitar o DNA e favorecer a formação do *pellet*. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm, podendo-se então observar o pellet formado. Este *pellet* foi lavado com Etanol a 70%, os tubos colocados sobre papel a temperatura ambiente por 30 minutos para remoção do excesso de etanol e colocado no concentrador por três minutos para a secagem completa. O pellet foi ressuspendido em um mix contendo 147  $\mu$ L de água ultrapura e três microlitros de RNASE por amostra, para remover RNAs contaminantes, incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria até a sua completa dissolução e armazenado em freezer a  $-25^{\circ}\text{C}$ . A qualidade do DNA extraído foi determinada através da eletroforese de 10  $\mu$ L de DNA concentrado, em gel de agarose a 0,8% e quantificação realizada em espectrofotômetro Cary Winv 50, utilizando-se o software RNA&DNA, a qual foi utilizada nos cálculos de diluição.

#### 4.2.2 Reações de RAPD

As ampliações do DNA genômico dos 30 acessos por RAPD-PCR (Williams et. al., 1990) foram feitas de acordo com o protocolo otimizado por Faleiro et al. (2002). O *primer* decâmero RAPD AV-14 foi utilizado a 0,4  $\mu\text{M}$  em uma reação de amplificação constituída de 30 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM e uma unidade de *Taq* DNA polimerase, com um volume final de 25  $\mu\text{l}$ . As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador *Primus* 96 plus (MWG AG BIOTECH) programado para 40 ciclos, com uma etapa de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde, a  $35^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e uma etapa de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , por um minuto e meio. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , por 7 minutos, seguido da redução da temperatura para  $4^{\circ}\text{C}$ . Aos produtos da amplificação foram adicionados 3  $\mu\text{l}$  de tampão de corrida (0,25% azul de Bromofenol, 60% de glicerol e 39,75% de água ultrapura) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, contendo 10  $\mu\text{g/ml}$  de brometo de etídio. A eletroforese foi feita em tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM) e durou

aproximadamente 4 horas a 90 volts. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat.

#### 4.2.3 Reações de microssatélites

O DNA genômico dos 30 acessos, pertencentes à Série CEPEC, foi amplificado utilizando-se 3 pares *primers* para microssatélites denominados mTcCIR 24, mTcCIR 30 e mTcCIR 35 (Tabela 2), desenvolvidos pelo CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) e mapeados por Faleiro et al. (2004). Estes *primers* geraram marcadores que estavam associados à resistência à VB e explicavam 26,1, 32,1 e 35,5% da variância fenotípica na população mapeada, respectivamente, detectada por meio de regressão simples (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos marcadores utilizados, tipo, localização, efeito do marcador sobre as médias corrigidas do número de vassouras vegetativas e seqüência dos *primers*

Marcador	Tipo	G L	Efeito ±σ	R <sup>2</sup> (%)	Seqüência dos <i>Primers</i>	
					5'-Forward-3'	5'-Reverse-3'
AV14.940 <sup>1</sup>	RAPD	7	-2,14 ±0,38	32,0	CTC CGG ATC A	-
mTcCIR24 <sup>2</sup>	SSR	7	-2,15 ±0,37	32,1	VIC <sup>a</sup> TTTGGGGTGATTTCT TCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGG TGA
mTcCIR30 <sup>2</sup>	SSR	7	-2,11 ±0,43	26,1	NEDTGAAGATCCTACTGT TGAG	TGATAATAACTGCTTAG TGG
mTcCIR35 <sup>2</sup>	SSR	7	-2,42 ±0,38	35,5	6FAMTTTCCTTGTATTGA CCTA	ATATAACACACTTCAG AGAT

<sup>1</sup>Queiróz et al. (2003); <sup>2</sup>Faleiro et al. (2004).

<sup>a</sup>Cor de cada uma das fluorescências: vic (verde); Ned (amarelo); 6-fam (azul).

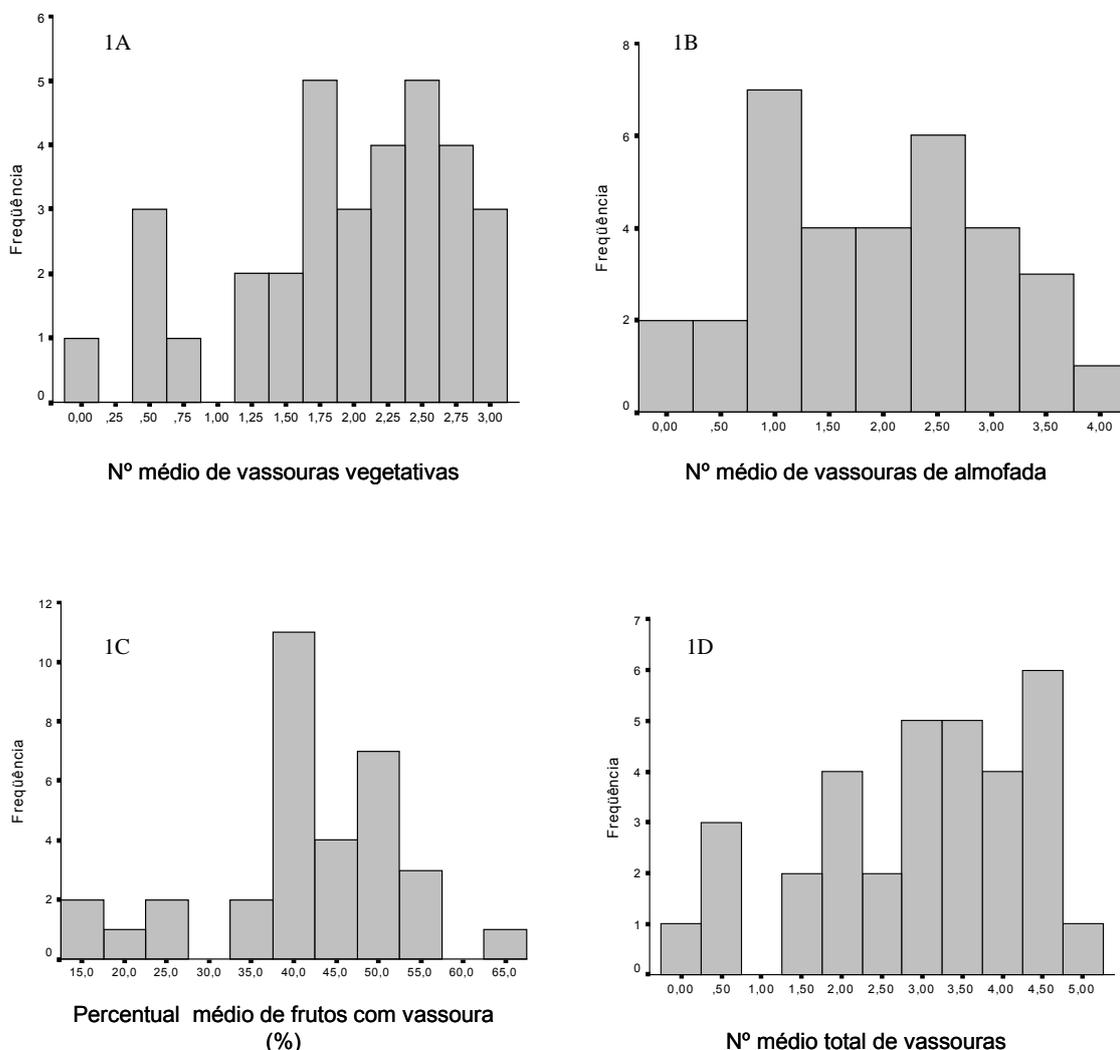
As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15µl contendo cada uma 30 ng de DNA, 0,15 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); KCl 50 mM; 3 pM de cada um dos pares de *primers* (Forward e Reverse) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (CENBIOT). Para separação dos fragmentos foram realizadas eletroforeses em gel de agarose a 3% e em gel de poliacrilamida a 4,75% e detecção dos fragmentos através da coloração com Brometo de Etídio e automática por fluorescências em Seqüenciador automático 377 (Applied Biosystems),

respectivamente. Após um passo inicial de desnaturação de 4 minutos a 94°C foi iniciada uma reação “touchdown”, que incluiu um passo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 60°C -1°C a cada ciclo e 90 segundos a 72°C, mais 30 ciclos com 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 48°C mais 90 segundos a 72°C, por ciclo e mais um passo final de extensão por 7 minutos a 72°C. Ao final da amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a o momento da eletroforese.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Variabilidade fenotípica

Os dados analisados, referentes à avaliação em campo para resistência à VB por 4 anos (Pires, 2003), revelaram a existência de variabilidade entre os 30 acessos estudados. As médias entre as variáveis numéricas apresentaram valores de 1,84 para o número de vassouras de almofada (NVA), 1,91 para o número de vassouras vegetativas (NVT), 2,94 para o número de vassouras totais (NVT) e uma perda média de 41,40 dos frutos por vassoura-de-bruxa. Em geral, os acessos apresentaram valores baixos para todas as variáveis, embora existam genótipos



**Figura 1.** Frequências de distribuição das variáveis vassouras vegetativas (1A), vassouras de almofadas (1B), percentual de frutos com vassoura (1C) e número total de vassouras (1D).

resultantes do cruzamento entre materiais suscetíveis, como o clone CEPEC-20 (UF-613 x SIAL-169), a exemplo da maioria dos acessos do grupo dos não-descendentes. Entre as razões dos baixos valores das médias encontradas podemos destacar as correções feitas através do diâmetro do tronco e remoção do efeito dos blocos bem como as transformações das médias pela obtenção de suas raízes quadradas, de modo tornar a distribuição dos erros experimentais mais próxima da normal. Entre todos os acessos estudados destaca-se o clone CEPEC-42, que apresenta as menores médias entre todos os acessos para todas as variáveis analisadas. Também se destaca positivamente o CEPEC 1008, que embora apresente uma distante ascendência do clone SCA-6, o que foi confirmado pelas análises moleculares que revelaram estar mais próximo do grupo

Tabela 3. Médias, amplitudes e coeficiente de variação (CV) das variáveis números de vassoura total (NVT), vassouras vegetativas (NVV), vassouras de almofada (NVA) e percentual de frutos com vassoura (PFV)

	Mínimo	Máximo	Média	CV (%)
NVT	0,12	4,92	2,94	63,67
NVV	0,10	3,09	1,91	37,43
NVA	0,00	4,17	1,84	66,20
PFV	15,53	66,40	41,40	292,27

dos não-descendentes (capítulo 1). O acesso CEPEC-1008 apresentou médias inferiores aos dos demais acessos de ambos os grupos, à exceção do CEPEC-42 para todas as variáveis e do CEPEC-38 para a variável NVV. Os valores para NVV variaram entre 0 e 4,17, com um coeficiente de variação de 66,20% entre todos os acessos. Entre os grupos os valores apresentaram a mesma variação para o grupo DS e entre 0,11 e 2,56 no grupo ND. As demais variáveis apresentaram o mesmo comportamento em ambos os grupos de acessos, sendo que as médias destas apresentaram ligeira variação, sendo pouco inferiores no grupo DS, que no total dos acessos, com exceção da variável NVA, cuja média foi um pouco maior no DS.

Os valores encontrados nestes grupos estudados foram todos superiores aos da série Scavina, aos do grupo SD1, composto por genótipos descendentes de Scavina-6 pertencentes às séries TSA, TSH e EET com 14 acessos, obtidos por Pires (2003). As médias obtidas por Pires (2003) envolvendo um grupo maior de

acessos, são maiores que às deste estudo para as variáveis NVT (3,31 e 2,94), VV (2,23 e 1,91) e inferior para a variável NVA (1,57 e 1,84, respectivamente).

A análise das correlações parciais de Pearson entre as variáveis, mostrou a presença de correlações positivas e significativas para todas as características, não acontecendo correlações pouco significativas ou negativas entre as variáveis. Estes resultados indicam que o controle genético destas características parece ser exercido pelo mesmo grupo de genes, apenas variando o nível de controle entre os genes para as variáveis. Os valores das correlações encontrados entre as médias de todos os acessos foram superiores àqueles obtidos por Pires (2003). Não foi possível

Tabela 4. Correlações parciais de Pearson entre as variáveis vassoura total (NVT), vassouras vegetativas (NVV), vassouras de almofada (NVA) e percentual de frutos com vassoura (PFV)

	NVT	NVV	NVA	PFV
NVT	1,0000	0,9200	0,9415	0,6886
NVV		1,0000	0,7572	0,7136
NVA			1,0000	0,5786
PFV				1,0000

identificar nos dois grupos (DS e ND), algum acesso que apresentasse variação significativa entre as características de resistência, de modo que os mais resistentes apresentaram comportamento linear para todas as variáveis, o mesmo acontecendo com os mais susceptíveis. Esta observação reforça a hipótese de que o controle genético das características avaliadas é realizado pelo mesmo conjunto de genes.

#### 4.3.2 Marcador RAPD AV-14<sub>940</sub>

Este marcador foi identificado por Queiroz et al. (2003) associado a um QTL para resistência à vassoura-de-bruxa na população F<sub>2</sub> de TSH 516. Queiroz et al. (2003) utilizando a frequência do número médio de vassouras vegetativas como índice fenotípico para separar os indivíduos daquela população, verificou que os parentais ficaram em extremos opostos da distribuição de frequência, com o SCA-6

apresentando a média de 0,59 e o ICS-1 de 11,35 vassouras vegetativas durante o período avaliado.

O QTL detectado e mapeado por Queiróz et al. (2003) está flanqueado por dois marcadores, o RAPD AV-15<sub>940</sub> na parte distal do grupo de ligação 11 e por um marcador AFLP, o sacgat.78 na sua parte terminal, e cobre uma área de 5 centimorgans (cM) de mapa. No mapa construído por Faleiro et al (2004), usando a mesma população F2, com mais dois anos de avaliação fenotípica e incorporação de

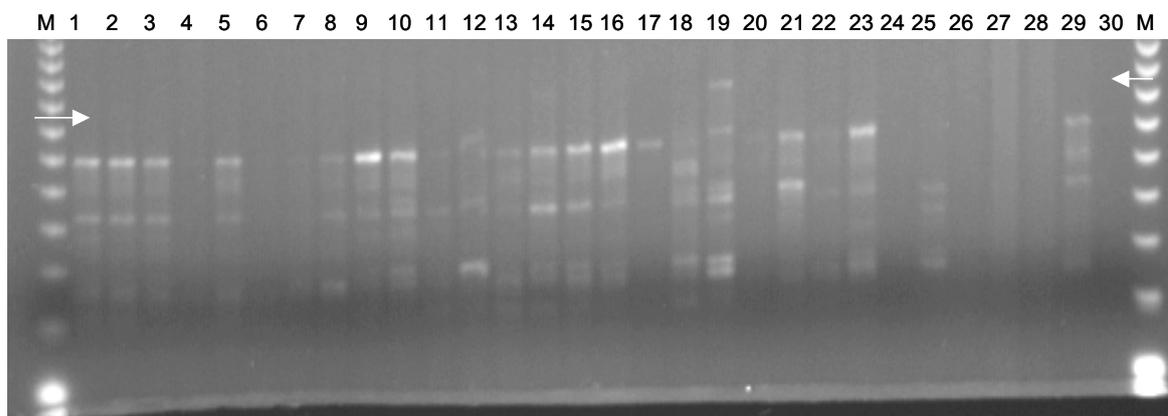


Figura 2. Gel de agarose mostrando a amplificação do primer AV-14 no grupo de 30 acessos da série CEPEC. As setas indicam a região onde deveria ocorrer o marcador AV-14940 e o M o marcador de peso molecular de 123 pb.

novos marcadores, o QTL identificado por Queiroz et al.(2003) foi novamente detectado, envolvendo vários marcadores moleculares e entre eles o AV-14<sub>940</sub>, sendo que um novo marcador RAPD (AZ-12<sub>845</sub>) foi mapeado entre aqueles que flanqueavam o QTL detectado por Queiróz et al. (2003), embora este marcador não tenha apresentado associação significativa com a resistência à VB. O acúmulo de dados fenotípicos para resistência à doença na população não implicou na redução do coeficiente de determinação dos marcadores AV-14<sub>940</sub> e sacgat.78 identificados por Queiróz et al. (2000), que explicavam 34,7 e 25,5% da variação fenotípica e após mais dois anos de avaliação em campo passaram a explicar 32,0 e 25,1% respectivamente, mostrando haver uma pequena variação temporal no efeito dos marcadores.

A amplificação do marcador AV-14<sub>940</sub> nos clones da série CEPEC utilizados neste trabalho resultou em uma grande diversidade de tamanho de fragmentos

(Tabela 5), que variaram entre 303 a 1109 pares de bases (pb), com cinco clones (CEPEC-42, 76, 83, 84 E 85) não apresentando qualquer fragmento amplificado, o que pode ser atribuído a uma série de fatores como manipulação indevida das amostras, contaminação ou erros de aplicação e menos provavelmente a causas genéticas, tendo em vista que neste grupo encontra-se o CEPEC-42, acesso descendente de TSA-644, com resultados fenotípicos (Tabela 2) que o situa como o clone com altos índices de resistência, fazendo parte da primeira série distribuída aos produtores. Os dados da tabela 5 mostram, entretanto, que em nenhum dos acessos estudados, que foram amplificados com o *primer* AV-14 foi identificado o fragmento de 940 pb, correspondente ao marcador AV-14<sub>940</sub>, associado à resistência à VB nos trabalhos de Queiróz et al. (2003) e Faleiro et al (2004). Assim, embora estes acessos apresentem variabilidade para resistência e a variação para vassouras vegetativas nos acessos tenha sido menor que aquela detectada na população de mapeamento (0,10 a 3,09), como era esperado, é surpreendente que nenhum dos acessos apresente o fragmento específico, como demonstrado na Figura 2, considerando-se que 20 acessos, entre os 30 utilizados, tenha TSA-644 como um dos genitores e sendo este um descendente direto de SCA-6. Este resultado impossibilitou a obtenção de correlações entre a variação fenotípica para resistência e os dados moleculares obtidos. Isto, entretanto, não anula a associação deste marcador com a resistência à VB na população original mapeada, mas, demonstra que este marcador ainda não deve ser utilizado como fator de seleção em outras populações, devendo ser testado em outras populações que tenham o clone TSH 516 como um dos genitores para que seja verificada a sua associação com a resistência neste e a sua eficiência em populações derivadas. Este resultado é similar àquele encontrado por Bahia et al. (2003), que utilizando este marcador para verificar sua aplicabilidade na seleção assistida, verificou que este marcador associado à resistência a VB, também era encontrado em materiais susceptíveis e estava ausente em alguns descendentes de SCA-6. Faleiro et al (2004) também verificaram a presença dos dois marcadores que flanqueiam o QTL detectado por Queiroz et al. (2003), em pelo menos uma das 10 plantas mais susceptíveis.

A explicação mais adequada para a não especificidade deste marcador parece estar no fato de que os QTLs detectados ocupam uma grande região do

genoma, da qual pouco se conhece. Diante dos resultados, pode-se inferir que estes marcadores, embora freqüentes em plantas resistentes na população mapeada, possam estar a uma grande distância do(s) gene(s) situados na região do QTL, o

Tabela 5. Relação dos tamanhos de fragmentos detectados por amplificação do *primer* AV14<sub>940</sub> nos genótipos da série CEPEC

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30
11	1.107	0.729	0.720	0.720	0.328	0.729	0.738	0.738	0.759	0.738	0.759	9	0.838	0.781	0.781	0.781	0.815	0.815	0.711	1.107	9	0.849	0.631	0.883	0.339	0.623	9	9	9	0.914
2	0.984	0.529	0.522	0.522		0.543	0.536	0.558	0.551	0.558	0.551	9	0.579	0.675	0.565	0.587	0.318		0.594	0.883	9	0.631		0.623	0.298	0.579	9	9	9	0.781
3	0.861	0.285	0.323	0.280			0.328	0.462	0.289	0.462	0.289	9	0.375	0.565	0.308	0.308			0.403	0.623	9	0.323		0.403		0.403	9	9	9	0.657
4	1.108							0.303		0.303		9		0.308					0.323	0.594	9						9	9	9	
5	0.738																			0.424	9						9	9	9	
6	0.615																			0.369	9						9	9	9	
7	1.109																				9						9	9	9	
8	0.492																				9						9	9	9	

que favoreceria a perda destes por recombinação, dificultando a sua detecção em outras populações e levando à perda de associação com a característica analisada. Entretanto, o fato de ter sido identificado em acessos que não apresentam qualquer relação com o SCA-6 em seus pedigrees, indica não ser esta uma marca específica desta fonte de resistência, sendo necessário novos estudos de herança desse marcador para confirmar verdadeiramente sua origem.

De acordo com Young (1999) a utilização de populações pequenas para mapeamento, como a utilizada por Queiróz et al. (2003) e Faleiro et al (2004) apresenta problemas como detecção de pequeno número de QTLs e superestimação dos efeitos dos marcadores na variância fenotípica. Mesmo em experimentos bem montados e conduzidos, há muito mais a ser feito para tornar os marcadores apropriados para SAMM, que a sua simples detecção, como a repetição dos experimentos por vários anos e locais, repetição em populações maiores, repetição em populações não relacionadas geneticamente e o desenvolvimento de populações nas quais se possa isolar o efeito dos QTLs detectados, visando aumentar a acurácia das avaliações fenotípicas e sua co-segregação com dados moleculares. Além destas considerações, Yu et al. (2000) afirmaram que mesmo utilizando-se a mesma fonte de resistência não há garantias de que, marcadores moleculares identificados em uma população, serão aplicáveis para SAM em populações diferentes, como foi detectado neste estudo. Kelly & Miklas (1998), analisando as limitações dos marcadores RAPD, consideram que mesmo a identificação e utilização de marcadores fortemente ligados a um gene de interesse, não asseguram a sua capacidade de predição e que esta característica deve ser examinada em grandes amostras de linhagens resistentes e susceptíveis, sendo verificado que a aplicação de marcadores dominantes para seleção indireta, como é o caso do AV-14<sub>940</sub>, tem se restringido a populações específicas.

#### **4.3.3 Marcadores microssatélites**

Foram utilizados os métodos de detecção dos marcadores microssatélites por coloração com brometo de etídio e por detecção semi-automática por fluorescência em seqüenciador 377. Para a primeira metodologia os marcadores

foram detectados apenas com a utilização dos *primers* mTcCIR30 e mTcCIR35, não ocorrendo amplificação com mTcCIR24, possivelmente devido à degradação deste *primer*, vez que várias reações de amplificação foram realizadas e em nenhuma delas foi detectado produto de amplificação. De acordo com Faleiro et al. (2004), os alelos gerados pelo mTcCIR24 foram denominados R2 e r2, R4 e r4 para os gerados pelo mTcCIR30 e R1 e r1 os gerados pelo mTcCIR35.

As correlações entre o número total de vassouras (NVT), vassouras vegetativas (NVV), o número de vassouras de almofada (NVA) e o número total de alelos (NTA) foram positivas, porém com valores muito baixos (0,057, 0,130 e 0,011, respectivamente). O valor percentual de frutos perdidos por vassouras (PFV) foi a variável que apresentou maior correlação com o número total de alelos. Estes dados demonstram que o acúmulo de alelos, provenientes destes marcadores não favoreceu um aumento no nível de resistência entre os acessos estudados, não sendo possível distinguir indivíduos mais ou menos resistentes de acordo com este critério.

Considerando suscetíveis os materiais cujas médias fenotípicas de pelo menos três das quatro variáveis estudadas para resistência foram superiores à da população estudada verifica-se que no grupo ND apenas os acessos CEPEC-21, 33 e 1008 poderiam ser classificados como resistentes, enquanto que entre os DS a metade dos acessos apresentou médias inferiores à geral, de acordo com o esperado. Relacionando estes resultados com a presença dos marcadores verifica-se que o mTcCIR24 esteve presente em doze dos treze acessos considerados resistentes de acordo com o critério acima, estando ausente apenas no clone CEPEC-74. Entretanto, este marcador esteve presente na maioria dos acessos susceptíveis, não sendo pois, adequado para distinguir acessos resistentes de susceptíveis entre estes materiais. Verificou-se que os acessos heterozigotos foram mais resistentes que os homozigotos e que entre estes os homozigotos para alelos do fragmento de 194pb foram mais resistentes para as variáveis NVT, NVV e NVA enquanto os que apresentaram alelos de 186pb foram superiores para a variável NFV. Apenas oito materiais não amplificaram nenhum dos fragmentos gerados pelo mTcCIR30, sendo que seis destes foram considerados susceptíveis e dois resistentes, inclusive o CEPEC-42 o clone com a melhor performance fenotípica

entre todos analisados. Entre os acessos amplificados, 15 foram homozigotos e sete heterozigotos, sendo que as médias das variáveis analisadas foram todas inferiores entre os acessos homozigotos, para qualquer um dos fragmentos gerados. Analisando os acessos verificamos que aqueles homozigotos para o fragmento de 234pb apresentaram médias inferiores àqueles homozigotos para o fragmento de 240pb, em todas as variáveis. Para o marcador mTcCIR35 apenas 16 genótipos foram amplificados, sendo que 12 destes foram homozigotos e apenas quatro foram heterozigotos. Analisando-se os dados fenotípicos verificou-se que as médias dos homozigotos foram novamente todas inferiores à dos materiais heterozigotos. Entre os homozigotos verificamos que os acessos com ambos os alelos para o fragmento de 174pb, apresentaram médias inferiores àqueles homozigotos para o fragmento de 184pb.

O marcador mTcCIR24 foi o mais presente entre todos os acessos, não amplificando em apenas 3 dos trinta materiais utilizados, apresentando uma heterozigosidade de 59,26% e gerando fragmentos em 9 dos dez acessos pertencentes ao grupo ND. O marcador mTcCIR35 foi o menos freqüente, não amplificando em 12 dos 30 acessos, sendo que destes, apenas 3 eram do grupo ND, sendo a grande maioria pertencente ao grupo dos descendentes de TSA-644.

Os efeitos do QTL, no qual os marcadores utilizados estão localizados, não foram os mesmos verificados na população de mapeamento, considerando-se que entre os acessos a variação das médias, para as variáveis associadas à resistência, não foi tão bem explicada, o que também têm sido demonstrado em outras espécies estudadas (MELCHINGER et al., 1998) razão pela qual têm sido sugeridas as validações dos QTLs identificados em novas populações antes de sua aplicação em programas de melhoramento (SPANNER et al., 1999).

Os materiais estudados não apresentaram uma segregação mendeliana para os marcadores por não se tratarem de progênies, mas de acessos, para qual cada um deve ser encarado como uma população independente. Porém esperava-se que os marcadores segregassem entre os acessos de acordo com a sua origem. Assim esperava-se uma freqüência maior dos marcadores associados à resistência entre os acessos pertencentes ao grupo dos descendentes (DS) o que também não aconteceu. Isto é um forte indício de que as marcas, embora associadas à

resistência na população mapeada, não seja uma marca específica do Scavina-6. Para que isto seja confirmado é necessário que todos os alelos associados a cada uma das marcas sejam identificados e validados nos materiais envolvidos no cruzamento original e na  $F_1$ .

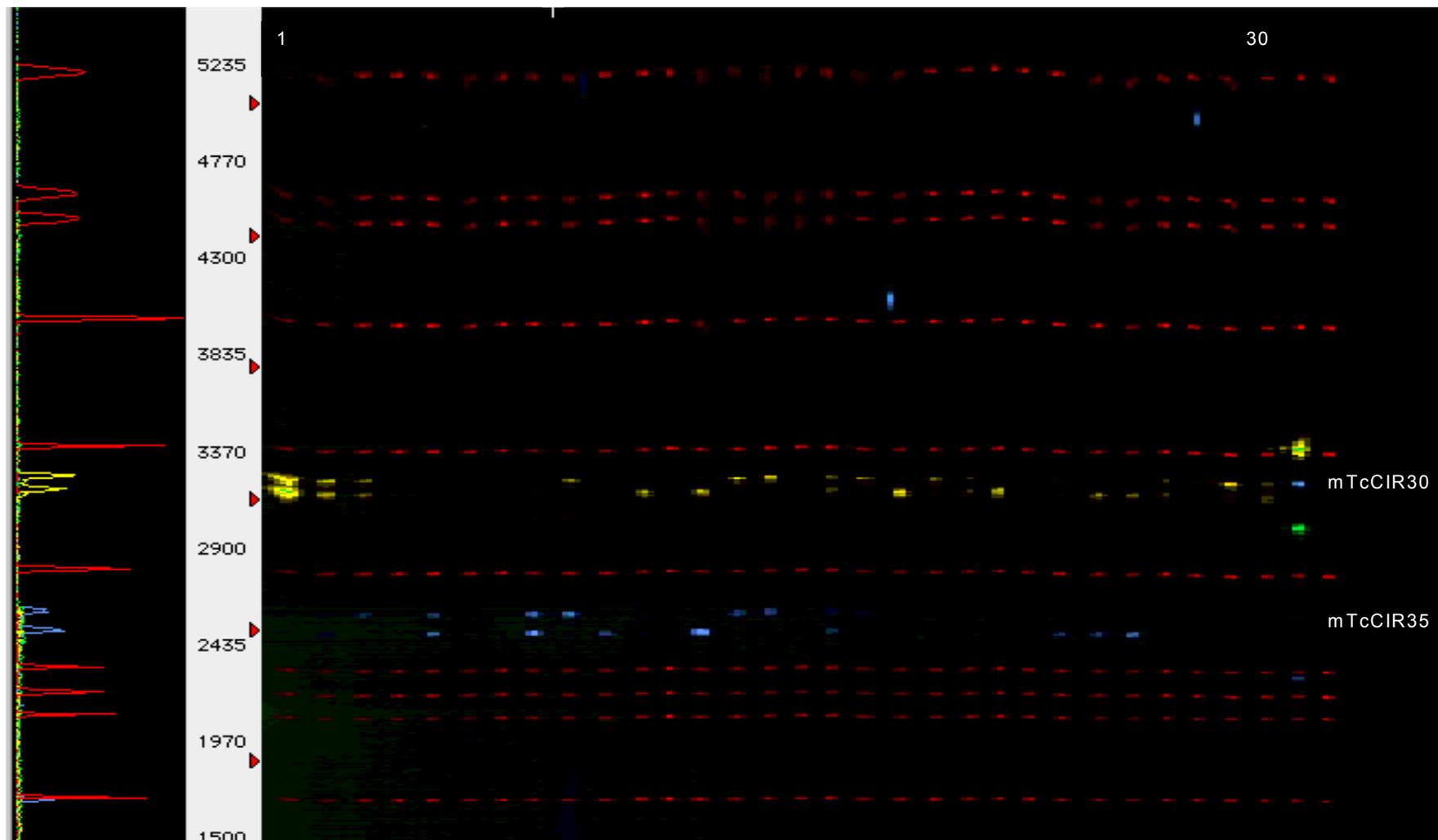


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacilamida, utilizando-se os marcadores mapeados mTcCIR30 e mTcCIR35 analisados através do programa GENESCAN no seqüenciador automático ABI 377. As canaletas 1 a 30 correspondem às amostras analisadas (acessos da Série CEPEC), a canaleta 31 contém um controle positivo e a 32 um controle negativo. As bandas em vermelho representam o padrão de peso molecular (Genescan ROX – 500)

Seis genes de resistência, identificados com base na homologia de seqüências (Resistance Gene Homologue – RGH), foram plotados em um mapa genético com dez grupos de ligação, considerando cada grupo como um cromossomo (KUHN et al., 2003). Três destes RGAs foram mapeados no grupo de ligação sete, o mesmo no qual estão os marcadores utilizados neste trabalho e em posição semelhante à dos marcadores microssatélites mapeados por Faleiro et al. (2004), sendo que dois destes, RGH4 e RGH5 se agruparam a menos de 4cM. Aparentemente esta região apresenta um grande potencial para a resistência à vassoura-de-bruxa, em genótipos derivados de SCA-6. Embora os resultados encontrados neste trabalho não confirmem a presença dos microssatélites apenas em genótipos resistentes, como esperado, devemos considerar que em nenhum dos acessos utilizados o TSH 516 foi utilizado como parental, o que explica em parte as contradições dos resultados obtidos.

Estes resultados *per se* não excluem a aplicação destes marcadores moleculares identificados dentro do programa de melhoramento, indicando apenas uma tendência e não uma conclusão definitiva sobre o comportamento dos marcadores nos 30 acessos analisados. O cacauero é uma espécie altamente heterogênea, com populações de melhoramento apresentando moderada a alta variabilidade, além de populações com elevados níveis de auto-incompatibilidade que favorece o constante fluxo de material genético entre os acessos. Novas populações, derivadas de outros cruzamentos que incluam os genitores do TSH 516 (SCA-6 e ICS-1), devem ser testadas para a presença ou ausência dos marcadores, considerando-se a variação na resistência à VB. O uso dos marcadores moleculares dentro do programa de melhoramento do cacauero é uma condição irreversível e que deve ser ampliada, buscando-se novas alternativas que permitam uma genotipagem confiável e segura das populações-alvos, reduzindo o custo de seleção e o tempo de desenvolvimento ou validação de novos materiais genéticos, dotados de resistência elevada e duradoura contra os patógenos e alta produtividade.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

1. Verificou-se que os marcadores mapeados associados à resistência são reprodutíveis em outros materiais genéticos originários de diferentes cruzamentos.

2. Não foi possível associar os efeitos dos marcadores mapeados para resistência nesta população, tendo em vista que não houve co-segregação entre fenótipo e presença dos marcadores.
3. O marcador RAPD AV-14<sub>940</sub> não amplificou em nenhum dos acessos incluídos no estudo, embora o *primer* tenha gerado produtos de PCR na maioria destes.
4. Os marcadores microssatélites não apresentaram especificidade entre os grupos DS e ND.
5. Os marcadores mapeados precisam ser validados em novas populações antes de ser definitivamente incluídos ou excluídos do programa de melhoramento.

#### 4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAHIA, R.C.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; FLORES, A.B. Viabilidade do uso de marcador molecular RAPD AV-14 para seleção assistida. In: Anais do 49º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, 2003. CD-ROM.

CHEN, S.; XU, C.G.; LIN, X.H.; ZHANG, Q. Improving bacterial blight resistance of '6078', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Plant Breed.* 120: 133-137. 2001.

CLÉMENT, D.; LANAUD, C.; SABAN, X.; FOUET, O.; Le CUNFF, L.; RUIZ, E.; RISTERUCCI, A.M.; GLASZMAN, J.C. PIFFANELLI. Creation of BAC genomic resources for cocoa (*Theobroma cacao* L.) for physical mapping of RGA containing BAC acessos. 2004. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1627-1634. 2004.

DAVIS, G.P.; DeNISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. *Amer. Soc. Anim. Sci.* 76: 2331-2339. 1998

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

FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.; AHNERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*. v.2, p. 31-34. 2002.

FALEIRO, F.G.; QUEIRÓZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G.A.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapping QTLs for Witches' broom (*Crinipellis pernicios*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*. submitted. 2004.

KELLY, J.D. AND MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol. Breed.* 4: 1-11. 1998.

KUHN, D.N.; HEATH, M.; WISSER, R.J.; MEEROW, A.; BROWN, J.S.; LOPES, U.V.; SCHNELL, R. Resistance genes homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 107: 191-202. 2003.

LANGRIDGE, P.; CHALMERS, K. Techniques for marker development. In: SLINKARD, A.E. (ed.), *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium*, Saskatoon, Canada. p.107-117. 1998.

MELCHINGER, A.E. Advances in the analysis of data on quantitative trait loci. In: CHOPRA, V.L.; SINGH, R.B.; VARMA, A. (eds). *Crop productivity and sustainability shaping the future*. p. 773-791. Oxford and IBH Publ. New Delhi. 1998.

PIRES, J.L. Avaliação Quantitativa e Molecular de Germoplasma para o Melhoramento do Cacaueiro com Ênfase na Produtividade, Qualidade de Frutos e Resistência a Doenças. Tese de Doutorado. UFV. Viçosa. 226p. 2003.

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 microsatellites markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1151-1161. 2004.

QUEIRÓZ, 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*, v.122, p.268-272, 2003.

SPANNER, D.; ROSSNAGEL, B.G.; LEGGE, W.G.; SCOLES, G.J.; ECKSTEIN, P.E.; PENNER, G.A.; TINKER, N.A.; BRIGSS, K.G.; FALK, D.E.; AFELE, J.C.; HAYES, P.M.; MATHER, D.E. Verification of a quantitative trait locus affecting agronomic traits in two-row barley. *Crop Sci.* 39: 248-252. 1999.

YOUNG, N.D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 5: 505-510. 1999.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breed.* 119: 411-415. 2000.

ZHOU, W-C.; KOLB, F.L.; BHAI, G-H.; DOMIER, L.L.; BOZE, L.K.; SMITH, N.J. Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breed.* 122: 40-46. 2003.

## 5. PERSPECTIVAS

A aplicação de marcadores moleculares no cacauero é um evento relativamente recente, só em 1995 foi desenvolvido o primeiro mapa genético para a espécie. Desde então, o conhecimento de sua biologia molecular tem aumentado rapidamente, já tendo sido alcançado feitos importantes como o projeto de seqüenciamento do *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa, a mais importante doença do cacauero, e cujas informações tem servido de ponto de partida para importantes descobertas do processo de interação planta-patógeno. Novos mapas genéticos mais saturados têm sido desenvolvidos e novos marcadores incorporados a estes, culminando com a publicação em 2004 de um mapa bastante saturado, baseado apenas em marcadores microssatélites, cujo potencial de aplicação pode ser vislumbrado comparando-se o nível de conhecimento estabelecido para outros cultivos como o trigo e a batata.

Os desafios encontrados para o estabelecimento de novos paradigmas no melhoramento genético das espécies cultivadas, são enormes. Considerando ser o cacauero uma planta perene, alógama e com sementes recalcitrantes, estes desafios se multiplicam. Entretanto, o avanço a passos largos da biologia molecular tem disponibilizado uma série impressionante de ferramentas que permitem vislumbrar que o futuro do melhoramento genético, principalmente de espécies perenes, como o cacauero, cujo ciclo de produção demanda alguns anos e o tempo necessário para o desenvolvimento de uma nova variedade avança por mais de uma década, tende a ser necessariamente o melhoramento molecular, no qual as ferramentas disponíveis devem ser amplamente utilizadas visando o avanço dos programas de forma rápida e consistente, para que se possa oferecer ao produtor,

materiais genéticos com as características exigidas e necessárias para a manutenção da cultura nas regiões produtoras do Brasil, como resistência duradoura contra os patógenos e alta produtividade.

A Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAMM) desponta como uma estratégia que deve ser aplicada ao cacauzeiro, visando a aplicação de marcadores mapeados e associados a características agrônômicas importantes para a cultura, como a resistência a doenças como VB, podridão-parda e monília, produtividade e qualidade superior. Em se tratando de SAMM, este trabalho é apenas um passo inicial no sentido de se estabelecer um protocolo aplicável, visando a utilização prática de marcadores mapeados e que estejam associados a características importantes. Já existe uma série de mapas nos quais foram identificados marcadores associados à resistência à VB, à podridão-parda e para o teor de manteiga nas amêndoas. Entretanto uma série de trabalhos visando a aplicação destes marcadores no programa de melhoramento deve ser implementada, como o estabelecimento de delineamentos experimentais adequados com o objetivo de determinar quais marcadores e qual número deve ser utilizado para a seleção assistida de uma característica. O desenvolvimento de um protocolo aplicável de seleção assistida por marcadores não é uma tarefa fácil e rápida, se o fosse todas as culturas anuais importantes como o trigo, a soja, a batata, o tomate, entre outras, já teriam seus protocolos desenvolvidos e aplicados com grande intensidade, isto requer tempo e demanda muitos recursos físicos, financeiros e de pessoal habilitado para o manuseio das informações genéticas disponíveis, geradas no processo de pesquisa.

A área da genômica desponta com grandes promessas para o rápido avanço do conhecimento da biologia molecular do cacauzeiro e da interação cacau-crinipellis. O seqüenciamento do fungo causador da vassoura-de-bruxa é uma avenida pela qual, muitas informações irão transitar em grande velocidade e volume, gerando novos conhecimentos dos mecanismos de desenvolvimento e resistência à doença e possibilitando a adoção de novas alternativas de controle. Muitos trabalhos recentes, como o mapeamento de genes homólogos de resistência à VB, a descobertas de proteínas associadas à resistência ao fungo, a transformação genética do cacauzeiro, entre outras, permitem inferir que a adoção de novas tecnologias, considerando-se as já existentes, como técnicas de microarray, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) e o uso de marcadores mais específicos como CAPS (*Cleaved*

*Amplified Polymorphic Sequence*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) ou SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), permitirá acelerar os programas de melhoramento e o desenvolvimento de novas variedades clonais ou seminais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

AGRIOS, G.N. Plant pathology. Academic Press. New York. 703p. 1978. 2<sup>a</sup> Ed.

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

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

ARAÚJO, I.S. Mapeamento genético e identificação de QTLs associados ao teor de manteiga na amêndoa do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Dissertação de Mestrado. UENF. Campos dos Goytacazes. 52p. 2002.

BACHTROG, D.; WEISS, S.; ZANGERL, B.; BREM, G.; SCHLÖTTERER, C. Distribution of dinucleotide microsatellites in *Drosophila melanogaster* genome. Mol. Biol. Evol. 16: 602-610. 1999.

BAKER, R.E.D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological paper n. 2, 42p. 1975.

BARONE, A. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. In: Marker-assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session I: MAS in plants. pp. 29-34. internet.

BARTLEY, B.G.D. Observations on the reactions of young cacao seedlings to artificial inoculations by *Marasmius perniciosus* Stahel. In: Conferencia Interamericana de cacao, 7a, Palmira, Colômbia, p.104-115. 1958.

BELL, C.J.; ECKER, J.R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics. 19: 137-144. 1994.

BENCHIMOL, L.L. Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites em programas de retrocruzamento em milho (*Zea mays* L.). Tese de Doutorado. UNICAMP. 102p. 2002.

BENNETT, A. B. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. *TRENDS in Plant Sc.* 8: 961-963. 2003.

BINSFELD, P.C.; WENGENDER, R.; SCHNABL, H. Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 101:1250-1258. 2000.

BRINKMANN, B., M. KLINTSCHAR, F. NEUHUBER, J. HUHNE, and B. ROLF. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1408–1415.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. *Science.* 529-540. 1968.

BROWN, A.H.D.; BURTON, J.J.; JAROSZ, A.M. Isozyme analysis of plant mating systems. In: DOUGLAS, E.S.; SOLTIS, P.S. (ed.). *Isozyme in plant biology*, p. 73-86, Chapman and Hall, 1989.

BRULAND, O.; ALMQVIST, E.W.; GOLDBERG, Y.P.; BROMAN, H.; HAYDEN, M.R.; KNAPPSKOG, P.M. Accurate determination of the number of CAG repeats in the Huntington disease gene using a sequence-specific internal DNA standard. *Clin. Genet.* 55: 198-202. 1999.

BUGGENHOUT, F. Vassoura-de-Bruxa na Bahia. Fundação Cargill, Campinas, 13p. 1994.

CARLETON, K.L.; STREELMAN, J.T.; LEE, B.Y.; GRNHART, N.; KIDD, M.; KOCHER, T.D. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Anim. Genet.* 33: 140-144. 2001.

CASCARDO, J.C.M., LOPES, U.V.; FIGUEIRA, A. Identification of RAPD markers associated with *Verticillium dahliae* susceptibility in cacao. In: *Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies*. P.139-145. 1994.

CHARTERS, Y.M.; CULHAM, A.; END, M.; HADLEY, P.; WILKINSON, M.J. The potential of anchored microsatellite analysis for cocoa germplasm characterization. *Proc. 12<sup>th</sup>. Int. Cocoa Res. Conf.* 17-23. Salvador. 1999.

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

CORDEIRO, G.; CASU, R.; McINTIRE, C.; MANNERS, J.; HENRY, R.J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross-transferable to *erianthus* and sorghum. *Plant Sci.* 160: 1115-1123. 2001.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. *Bragantia* 58 (1): 15-22. 1999.

CREGAN .PB.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; RONGWEN, J. Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants, pp 47-56. In: P.M. Gresshoff (ed.), *Plant Genome Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1994.

CROUCH, K. H.; CROUCH, J.H.; JARRET, R. L.; CREGAN, P.B.; ORTIZ, R. Segregation of microsatellites loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Sci.* 38: 211-217. 1998.

CROUZILLAT, D., LECERTEAU, E.; PÉTIARD, .; MORERA, J.A.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; SCHNELL, R.; RONNING, C.; OSEI, J.K.; FRITZ, P.J. Marker-assisted genetic analysis of *Theobroma cacao* 3. A genetic linkage map. In: *Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies*. P.128-134. 1994.

CROUZILLAT, D., LECERTEAU, E.; PÉTIARD, .; MORERA, J.A.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; SCHNELL, R.; RONNING, C.; OSEI, J.K.; FRITZ, P.J. *Theobroma cacao* L.: A genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93:205-214. 1996.

CROUZILLAT, D.; PHILLIPS, FRITZ, P.J. W.; PÉTIARD, V. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular marker. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. *Euphytica.* 114:25-36. 2000.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies; a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contrib. U.S. Nat. Herb.* 35:379-614. 1964.

De La CRUZ, M. et al. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375: 542–543. 1995.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: novo cenário. In: *Melhoramento genético do cacauero*. Viçosa :FUNAPE. p. 81-127, 2001.

DIAS, L.A.S.; BARRIGA, J. P.; KAGEYAMA, P. Y.; ALMEIDA, C.M. V. C. Variation and its distribution in wild cacao populations from the brazilian amazon. *Braz. Arch. of Biol. and Tech.* 46: 507-514. 2003.

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci.* 33: 944-947 1993.

LANAUD, C. et al. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 91:987-993. 1995.

ENGELS, J.M.M. The identification of cacao cultivars. *Acta Horticulturae.* 182: 195-202, 1986.

ESKES, B. Introductory notes. Proceedings of the International Workshop on New Technologies for Cocoa Breeding, Kota Kinabalu, Malaysia, INGENIC, London, UK, p. 8–11, 2001

EVANS, H.C. Witches' broom disease: a case study. *Cocoa Growers' Bulletin*. 32: 5-19. 1981.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. *Fitopatologia brasileira*, 28 (1): 59-66. 2003.

FIGUEIRA, A. JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphisms in *Theobroma cacao* L.. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 673-677. 1992.

FLAMENT, M.H. et al. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome* 44: 79–85. 2001

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

FONSECA, S. E .A. Avaliação de resistência a *Crinipellis pernicioso* em novos acessos de *Theobroma cacao*. *Agrotrópica*. 2(3): 137-143. 1990.

FREI, O.M.; STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M. Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Sci*. 26: 37-42. 1986.

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

GILMOUR, M. The BCCCA ringtest on the RAPD analysis of cocoa. In: Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies. P.135-138. 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; McCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; McKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R. Mapping in woody plants with RAPD markers: application to breeding in forestry and horticulture. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. *Crop Sci. Soc. of Amer.* p.37-40. 1992.

GRIFFITH, G.W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R.N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zeal. Journ. Bot.* 41: 423-435. 2003.

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

JEFFREYS, A.J.; MAC LEOD, A.; TAMAKI, K.; NEIL, D.L.; MONCKTON, D.G. . Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*. 354: 204-209 1991.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellites" regions in human DNA. *Nature*. 314: 67-73. 1985.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFELD, M.O; SALA, F.; van de WEIL, C.; BREDMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed*. 3: 381-390. 1997.

JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol*. 137: 165-177. 1997.

KANDPAL, R.; KANDPAL, G.; WEISSMAN, S.M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping acessos, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 88-92. 1994.

KARACA, M.; SAHA, S.; JENKINS, J.N.; ZIPF, A.; KOHEL, R.; STELLY, D. M. Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Linked to the Ligon Lintless (Li1) Mutant in Cotton. *The Journal of Heredity*. 93: 221-224.2002.

KNAPP S.J. Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. *Crop Sci* 38:1164-1174.1998.

KORETH, J.; O'LEARY, J.J.; McGEE, J.O. Microsatellites and PCR genome analysis. *J. Path*. 178: 239-248. 1996.

KUBIK, C.; MEYER, W.A.; GAUT, B.S. Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. *Crop Sci*. 39: 1136-1141. 1999.

LANAUD C, RISTERUCCI AM, N'GORAN J, CLEMENT D, FLAMENT M, LAURENT V, FALQUE M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet* 9:987-993,1995.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol Ecol* 8:2142-2152. 1999.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C. Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. *Theor. Appl. Genet*. 88:193-198.1994.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*. 55: 265-344. 1995.

- LIU, S. CANTRELL, R.G.; McCARTY, J.C.; STEWART, J.M. Simple sequence repeat based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. *Crop Sci.* 40: 1459-1469. 2000.
- MANGOLIM, C.A. Mapeamento QTLs associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho. Tese de Doutorado, UNICAMP, IB. 2002.
- MARITA, J.M. Characterization of using RAPD- marker based estimates of genetic distance and recommendations for a core collection to maximize genetic diversity. MS Thesis, Univ. Wisconsin, Madison. WI. 1998
- MARTINEZ, C.P. Progress in the genetic improvement supported by molecular markers. In: REDBIO. 2001.
- MARTINS, I.S.; MARTINS, R.C.C.; CORREIA, H.S. Comparação entre seleção combinada e seleção direta em *Eucalyptus grandis*, sob diferentes intensidades de seleção. *Floresta e Ambiente.* 8: 36-43. 2001.
- MATSUOKA, Y.; MITHCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.; DOEBLEY, J. Microsatellites in Zea – variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104: 436-450, 2002.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:9828-9832. 1991.
- MITCHEL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; HERNANDEZ, C.J.; SZEWC-McFADDEN, A.K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semiautomated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Sci.* 37: 617-624. 1997.
- MORA, L.G.R. Mejoramiento en cacao para resistencia a escoba de bruja ( *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. Revisão Bibliográfica. CATIE, Turrialba, 17p. 1982.
- MORAGA AMADOR, D.; FARMERIC, B.; HOLLAND, K.; BLAKE, A.; BRAZEAU, D.; WHITTEN, M. Tools for developing molecular markers: Microsatellite libraries and AFLPs. Workshop Manual. University of Florida, Gainesville, Fl. 1998.
- MOTAMAYOR, J.C.; RISTERUCCI, A.M.; LOPEZ, A.P.; LANAUD, C. Domestication du cacaoyer par les Mayas. In: *Theor. Appl. Genet. Res. Conf.*, 13. Lagos, p. 54-68. 2001.
- MÜNTZIG, A. Resistencia del acessos de cacao a enfermedades en pruebas de campo de la hacienda Clementina, Ecuador. In: Conferencia Interamericana del Cacao, 7ª, Colombia. p. 183-186, 1958.
- NOJOSA, G.B.A. Participação de fenóis e enzimas oxidativas nos mecanismos bioquímicos de resistência constitutiva e induzida do cacauero (*Theobroma cacao*

L.) à *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. Tese de Mestrado. UnB. Brasília, 86p. 1999.

OBERHAGEMANN, P., CHATOT-BALANDRAS, C., BONNEL, E., SCHA» FER-PREGL, R., WEGENER, D., PALOMINO, C., SALAMINI, F. AND GEBHARDT, C. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker assisted selection. *Mol. Breed.* 5: 399-415. 1999.

PEREIRA, A.B.; MARQUES JR., O.G.; RAMALHO, M.A.P.; ALTHOFF, P. Eficiência da seleção precoce em famílias de meio irmãos de *Eucalyptus camadulensis* Dehnh., avaliadas na região noroeste do estado de Minas Gerais. *Cerne.* 3: 67-81. 1997

PONCE, M.R.; ROBLES, P.; MICOL., J.L.; High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 408-415. 1999.

POMPER, K.W.; AZARENKO, A.N.; BASSIL, N.; DAVIS, J.W.; MEHLENBACHER, S.A. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for self-incompatibility alleles in *Corylus avellana* L. *Theor. Appl. Genet.* 97:479-487. 1998.

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, April 1937-April 1938. *Port of Spain*, 58 p. 1938.

POUND, F. J. Witches' broom resistance in cacao. *Tropical agriculture*.(Trinidad). 7 :6-8. 1940.

PRIMMER, C.R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARRY, B.P.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellite in the avian genome. *Genome Res.* 7:471-482. 1997.

PROCHAZKA, M. Microsatellite hybrid capture technique for simultaneous isolation and of various STR markers. *Genome Res.* 6: 646-649. 1996.

PURDY, L.H.; SCHIMIDT. L.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annu. Rev. Phytop.* 34: 573-594. 1996.

PURSEGLOVE, J.W. *Tropical Crops. Dicotyledons 2.* John Wiley and Sons, INC. New York. 1968.

RIAN, A.B. Agronomic and molecular characterization of Louisiana native *Spartina Alterniflora* accessions. PhD Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 157p. 2003.

RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J.A.K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M.H.; ROSENBLUM, B.B.; OAKS, F; MENCHEN, S; JOHNSON, B. Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 25: 3925-3929. 1997.

- RISTERUCCI AM, GRIVET L, N'GORAN JAK, PIERETTI I, FLAMENT MH,LANAUD C A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor. Appl. Genet. 101:948–955. 2000.
- RUDGARD, S.A. Witches' broom disease in Rondonia, Brazil: pod losses. Trop. Pest Managm..32: 24-26.1986.
- RUSSEL, G.E. Studies in the agricultural and food sciences: Plant breeding for pest and disease resistance. Butterworths. London, 485p. 1978.
- RUSSELL, J.R., FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATZ, B.G.; JAHOR, A.; POWELL, W.; AND WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95:714-722. 1997.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350-1354. 1985.
- SAUNDERS, J.A. MISCHKE, S.; LEAMY, E.; HEMEIDA, A.A.; LANAUD, C. USDA DNA fingerprinting program for identification of *Theobroma cacao* accessions. Proceedings of the International Workshop on New Technologies for Cocoa Breeding, Kota Kinabalu, Malaysia, INGENIC, London, UK, pp. 108–114. 2001.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics. 8: 552-560. 1923.
- SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8761-8765. 1996.
- SCHUG, M.D.; WETTERSTRAND, K.A.; GAUDETTE, M.S.; LIM, R.H.; HUTTER, C.M.; ACQUADRO C.F. The distribution and frequency of microsatellites in the genome of *Drosophila melanogaster*. Mol. Ecol. 7: 57-69. 1998.
- SCHWENGEL, D.A.; JEDLICKA, A.E.; NANTHAKUMAR, E.J.; WEBER, J.L.; LEVITT, R.C. Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. Genomics. 22: 46-54. 1994.
- SILVA, I.C. Variabilidade agroecônômica do cultivo do cacauero (*Theobroma cacao* L.) com o açaizeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.) e a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) em sistema agroflorestal. Tese de Doutorado. UFPAR, Curitiba, 142p. 2000.
- SIBOV, S.T. Mapeamento de locos quantitativos (QTLs) associados à produção de milho tropical através de marcadores moleculares. Tese de Doutorado, UNICAMP, IB. 2002.
- SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, O.C.; GRAMACHO, K.P.G.; BEZERRA, J.L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacaueros. Agrotrópica. 14: 1-28. 2002.

SOUZA, C.A.S.; DIAS. L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS. L.A.S. (ed.). Melhoramento genético do cacau. p. 1-48. Viçosa. FUNAPE/UFG. 2001.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: A method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* 92:191-203 1996.

THODAY, J.M. Location of polygenes. *Nature*. 191: 368-370. 1961.

TREVIZAN, S.D.P. Mudanças no Sul da Bahia associadas à Vassoura-de-Bruxa do cacau. In: Anais da XII Conferência Internacional do Cacau. Salvador. p.17-23. 1996.

VILHAR, B. ; GREILHUBER, J.; KOCE, J.D.; TEMSCH, E.M.; DERMASTIA, M. Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. *Annals of Botany* 87: 719±728, 2001.

WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* using Randomly amplified Polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83:871-877.1992.

WEDDEN, N.F.; TIMMERMAM, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E.; LODHI, M.A. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. *Crop Sci. Soc. of Amer.* p.37-40. 1992.

WENZ, H.M., ROBERTSON, J.M., MENCHEN, S., OAKS, F., DEMOREST, D.M., SCHEIBLER, D., ROSENBLAUM, B.B., WIKE, C., GILBERT, D.A; EFCAVITCH, J.W. High-precision genotyping by denaturing polyacrylamide electrophoresis. *Genome Research* 8, 69–80. 1998.

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

van TREUREN, R.; van SOEST, L.J.M.; van HINTUM, T. J.L. Marker-assisted rationalization of genetic resource collections: a case study in flax using AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 103: 144-152. 2001.

VARSHNEY, K.R.; THIEL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. *in silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cel. & Mol. Biol. Lett.* 7: 537-546.2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414. 1995.

WEDDEN, N.F.; TIMMERMAM, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E.; LODHI, M.A. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. *Crop Sci. Soc. of Amer.* p.37-40. 1992.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535. 1990.

WILLIAMS, L.C.; HEDGE, M.R.; HERRERA, G.; STAPLETON, P.M.; LOVE, D.R. Comparative semi-automated analysis of (CAG) repeats in the Huntington disease gene: use of internal standards. *Mol. Cel. Probes.* 13: 283-289. 1999.

YAMADA, M.M. Genetic studies in cacao (*Theobroma cacao* L.). Thesis, Ph.D. Madison, university of Wisconsin. 179p. 1991.

YAMADA, M.M.; GURIES, R.P. mating system analysis in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agrotrópica.* 11: 83-88. 1999.

YAMADA, M.M.; LOPES, U.V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to Witches' broom in plantations of Bahia. *Agrotrópica.* 10: 165-176. 1998.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P. Genetic variability in cultivated cacao populations in bahia, brazil, using isozymes and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1:377-384. 2001.

YOUSEF, G.G.; JUVIK, J.A. comparison of phenotypic and marker-assisted selection for quantitative traits in sweet corn. *Crop. Sci.* 41: 645-655. 2001.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genet. Res.*76: 227-236. 2000.

## 7. APÊNDICE

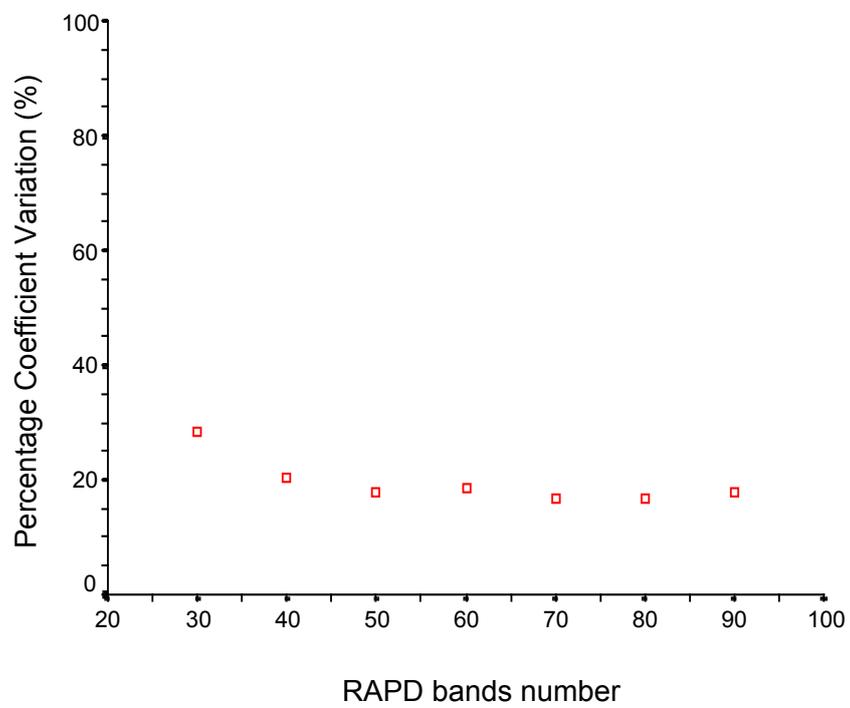


Fig. 1. Percentage of coefficient of variation accord to band number based on RAPD band number

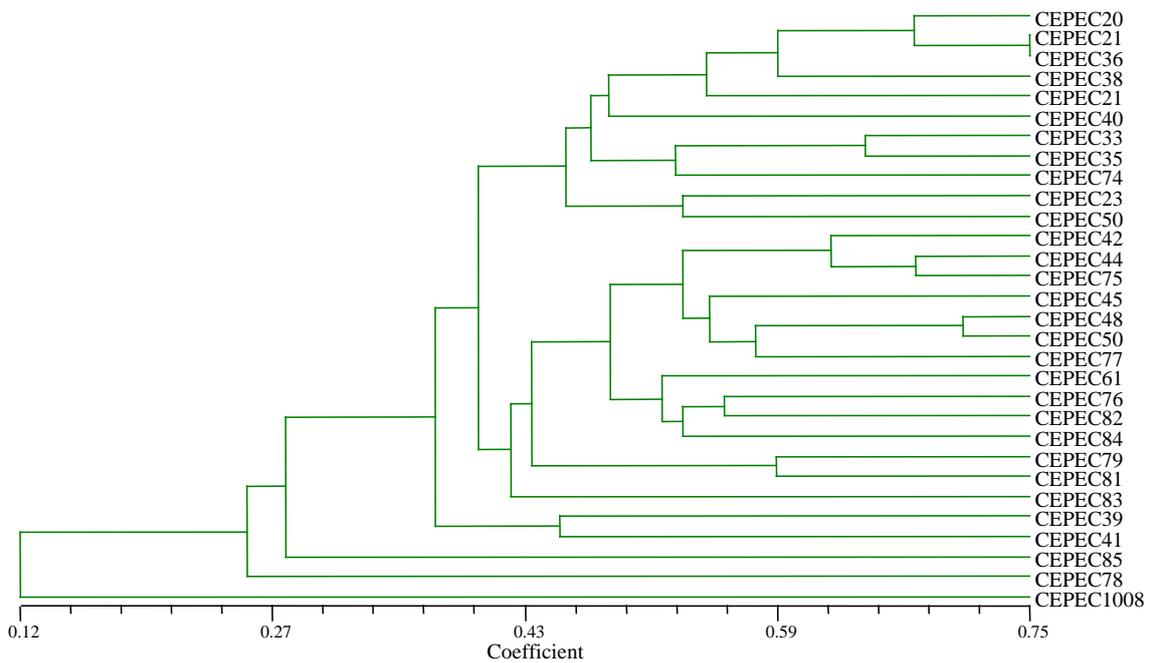


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA para 30 acessos da série CEPEC a partir das distâncias genéticas calculadas com base no método de Jaccard.

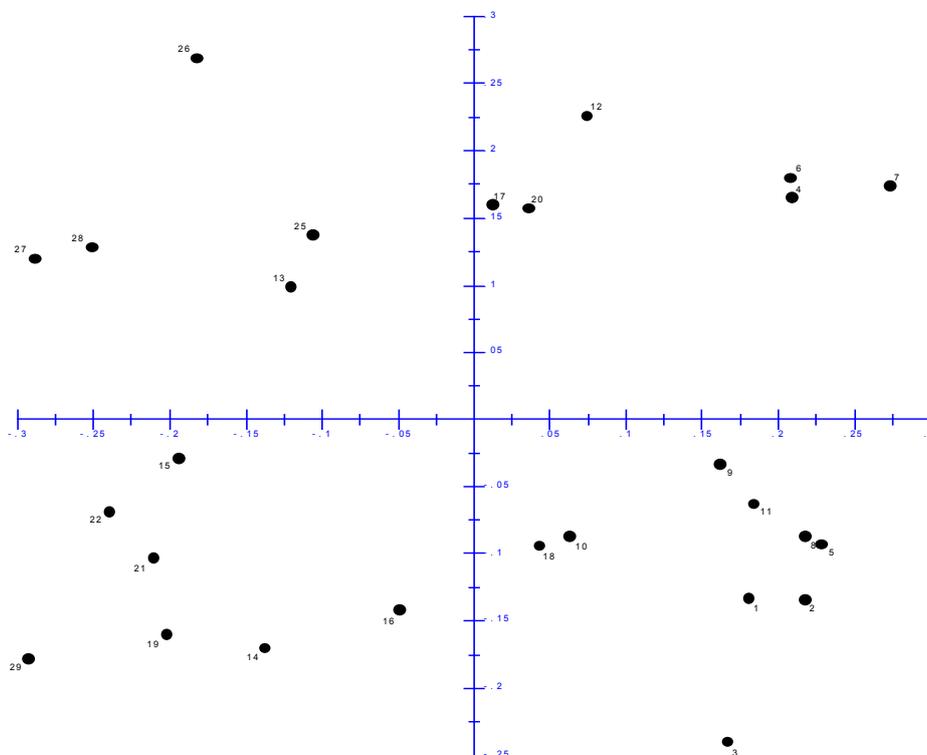


Figura 3. Análise de componentes principais, baseada em dados de RAPD.

Tabela 1. Análise de variância molecular(AMOVA) entre e dentro dos grupos, baseada nos dados de RAPD

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	1	26.867	0.91652Va	5.89***
Within populations	28	410.100	14.64643	94.11
Total	29	436.967	15.56295	

Tabela 2. Diversidade média de marcadores RAPD entre os acessos descendentes (DS), calculada de acordo com as frequências da presença e da ausência dos marcadores

i	p <sub>i</sub>	q <sub>i</sub>	n <sub>i</sub>	2*pi*q <sub>i</sub> *n <sub>i</sub>	n <sub>i</sub> - 1	A/B
1	0,187	0,813	1	0,303828	0	0,000
2	0,396	0,604	2	0,956406	1	0,956
3	0,429	0,571	3	1,469388	2	0,735
4	0,330	0,670	4	1,767902	3	0,589
5	0,484	0,516	5	2,497283	4	0,624
6	0,341	0,659	6	2,695327	5	0,539
7	0,275	0,725	7	2,789518	6	0,465
8	0,440	0,560	8	3,941553	7	0,563
9	0,429	0,571	9	4,408163	8	0,551
10	0,176	0,824	10	2,898201	9	0,322
11	0,154	0,846	11	2,863905	10	0,286
12	0,264	0,736	12	4,660307	11	0,424
13	0,275	0,725	13	5,180534	12	0,432
14	0,242	0,758	14	5,132713	13	0,395
15	0,231	0,769	15	5,325444	14	0,380
16	0,176	0,824	16	4,637121	15	0,309
17	0,253	0,747	17	6,421447	16	0,401
18	0,198	0,802	18	5,712354	17	0,336
19	0,154	0,846	19	4,946746	18	0,275
20	0,231	0,769	20	7,100592	19	0,374
21	0,220	0,780	21	7,202029	20	0,360
22	0,187	0,813	22	6,684217	21	0,318
23	0,187	0,813	23	6,988045	22	0,318
24	0,242	0,758	24	8,798937	23	0,383
25	0,209	0,791	25	8,259872	24	0,344
26	0,198	0,802	26	8,251177	25	0,330
27	0,220	0,780	27	9,259751	26	0,356
28	0,154	0,846	28	7,289941	27	0,270
29	0,132	0,868	29	6,639778	28	0,237
30	0,791	0,209	30	9,911846	29	0,342
S						11,63579
Xm						0,127866

Tabela 3. Diversidade média de marcadores RAPD entre todos os acessos, de acordo com as frequências da presença e da ausência dos marcadores

i	p <sub>i</sub>	q <sub>i</sub>	n <sub>i</sub>	2*pi*q <sub>i</sub> *n <sub>i</sub>	n <sub>i</sub> - 1	A/B
1	0,01	0,66	1	0,014491	0	0,000
2	0,02	0,73	2	0,06376	1	0,064
3	0,03	0,56	3	0,110856	2	0,055
4	0,04	0,57	4	0,200942	3	0,067
5	0,05	0,68	5	0,374351	4	0,094
6	0,07	0,69	6	0,54776	5	0,110
7	0,08	0,62	7	0,662722	6	0,110
8	0,09	0,47	8	0,664654	7	0,095
9	0,10	0,57	9	1,017268	8	0,127
10	0,11	0,54	10	1,183432	9	0,131
11	0,12	0,56	11	1,4904	10	0,149
12	0,13	0,51	12	1,599807	11	0,145
13	0,14	0,53	13	1,959184	12	0,163
14	0,15	0,45	14	1,940828	13	0,149
15	0,16	0,49	15	2,445357	14	0,175
16	0,18	0,60	16	3,400555	15	0,227
17	0,19	0,63	17	3,978505	16	0,249
18	0,20	0,58	18	4,147325	17	0,244
19	0,21	0,70	19	5,580002	18	0,310
20	0,22	0,64	20	5,603188	19	0,295
S						2,959295
Xm						0,03252

Tabela 4. Estatísticas descritivas dos heterozigotos (mTcCIR24)

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	15	4,44	,12	4,56	2,7093	1,3555	1,837
VV	15	2,99	,10	3,09	1,7573	,8476	,718
VA	15	3,37	,00	3,37	1,6313	1,0128	1,026
FV	15	50,87	15,53	66,40	42,8513	12,4050	153,885

Tabela 5. Estatísticas descritivas dos homozigotos (mTcCIR24)TOTAL

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	11	4,39	,53	4,92	3,2073	1,3796	1,903
VV	11	2,52	,46	2,98	2,1236	,7950	,632
VA	11	4,06	,11	4,17	2,0491	1,2472	1,555
FV	11	37,06	18,86	55,92	40,2327	10,6678	113,801

Tabela 6. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (M1M1-186pb)  
mTcCIR 24

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	4	1,81	2,92	4,73	3,5450	,8238	,679
VV	4	,86	2,09	2,95	2,5275	,3823	,146
VA	4	2,25	1,29	3,54	2,0600	1,0289	1,059
FV	4	14,00	34,04	48,04	40,0400	5,8311	34,002

Tabela 7. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (m1m1-194pb)  
mTcCIR 24

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	7	4,39	,53	4,92	3,0143	1,6472	2,713
VV	7	2,52	,46	2,98	1,8929	,8997	,809
VA	7	4,06	,11	4,17	2,0429	1,4363	2,063
FV	7	37,06	18,86	55,92	40,3429	13,1388	172,629

Tabela 8. Estatísticas descritivas dos heterozigotos (mTcCIR30)

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	7	4,20	,53	4,73	3,2600	1,3981	1,955
VV	7	2,35	,46	2,81	2,0429	,7885	,622
VA	7	3,43	,11	3,54	1,9986	1,1758	1,383
FV	7	35,58	18,86	54,44	42,5557	11,8679	140,848

Tabela 9. Estatísticas descritivas dos homozigotos (mTcCIR30) TOTAL

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	15	4,03	,49	4,52	2,7260	1,3494	1,821
VV	15	2,60	,38	2,98	1,7520	,8333	,694
VA	15	3,11	,26	3,37	1,7753	1,0594	1,122
FV	15	42,86	23,54	66,40	42,5073	11,1694	124,756

Tabela 10. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (M2M2-234pb)  
mTcCIR 30

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	5	3,78	,49	4,27	2,1960	1,3735	1,886
VV	5	2,46	,41	2,87	1,5520	,9012	,812
VA	5	2,53	,26	2,79	1,3160	,9657	,933
FV	5	27,03	23,54	50,57	38,5180	12,6191	159,242

Tabela 11. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (m2m2-240pb)  
mTcCIR 30

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	8	3,09	1,43	4,52	3,1000	1,1151	1,244
VV	8	2,25	,73	2,98	1,9600	,7115	,506
VA	8	2,49	,88	3,37	2,0213	,9487	,900
FV	8	32,89	33,51	66,40	45,3713	10,8887	118,563

Tabela 12. Estatísticas descritivas dos heterozigotos (mTcCIR35)

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	4	4,43	,49	4,92	2,3600	1,8708	3,500
VV	4	1,76	,41	2,17	1,3925	,7838	,614
VA	4	3,91	,26	4,17	1,5400	1,7784	3,163
FV	4	27,94	23,54	51,48	39,3600	11,6064	134,709

Tabela 13. Estatísticas descritivas dos homozigotos (mTcCIR35) TOTAL

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	12	3,09	1,43	4,52	2,8833	,8677	,753
VV	12	2,25	,73	2,98	1,9367	,5792	,336
VA	12	2,14	,88	3,02	1,7733	,7225	,522
FV	12	39,26	27,14	66,40	43,1067	10,8122	116,903

Tabela 14. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (M3M3-174)  
mTcCIR 35

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	7	3,09	1,43	4,52	2,6543	,9893	,979
VV	7	2,25	,73	2,98	1,8371	,7237	,524
VA	7	2,14	,88	3,02	1,5500	,7734	,598
FV	7	28,78	27,14	55,92	40,5714	9,5993	92,146

Tabela 15. Estatísticas descritivas dos acessos homozigotos (m3m3 -184)  
mTcCIR 35

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
VT	6	1,54	2,23	3,77	3,2183	,5541	,307
VV	6	,81	1,79	2,60	2,1633	,3494	,122
VA	6	1,43	1,08	2,51	2,0317	,5298	,281
FV	6	32,89	33,51	66,40	45,3750	11,6129	134,860