

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



MAPEAMENTO DE NOVOS GENES DE RESISTÊNCIA DO
CACAUEIRO À VASSOURA-DE-BRUXA E À PODRIDÃO PARDA:
CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO
SEGREGANTE E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

ALFREDO DANTAS NETO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

ALFREDO DANTAS NETO

**MAPEAMENTO DE NOVOS GENES DE RESISTÊNCIA DO CACAUEIRO À
VASSOURA-DE-BRUXA E À PODRIDÃO PARDA: CARACTERIZAÇÃO
QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO SEGREGANTE E IDENTIFICAÇÃO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

ALFREDO DANTAS NETO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

ALFREDO DANTAS NETO

MAPEAMENTO DE NOVOS GENES DE RESISTÊNCIA DO CACAUEIRO À
VASSOURA-DE-BRUXA E À PODRIDÃO PARDA: CARACTERIZAÇÃO
QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO SEGREGANTE E IDENTIFICAÇÃO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES

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

APROVADA: 31 de agosto de 2004

Dr. Fábio Gelape Faleiro
EMBRAPA/CPAC

Dr. Wilson Reis Monteiro
CEPLAC/CEPEC

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carlos Braitt Carmo (*in memoriam*) e Célia Dantas Carmo, pelo amor, carinho e exemplos de vida, dedico.

À minha esposa Adriana e aos meus filhos, André e Rafael, ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos deu força, otimismo, serenidade e determinação para perseverar diante das dificuldades e para cumprir esta jornada.

Ao Prof^o Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela orientação, amizade, companheirismo, e constante disponibilidade, presteza e boa vontade.

Ao *Common Fund of Commodities (CFC)*, *International Cocoa Organization (ICCO)* e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) – CFC/ICCO/CEPLAC – *Biomol Project*, pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Drs. Uilson Vanderlei Lopes e João Louis Marcelino Pereira, coordenadores técnico e geral, respectivamente, do projeto CFC/ICCO/BIOMOL, pelo incentivo e apoio.

À Prof^a Dr^a Mônica Rosa Bertão, pela competência, presteza e dinamismo enquanto coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, e pela sincera amizade.

Aos Prof^o Dr. Marco Antônio Costa, coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo apoio, tolerância e compreensão.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, pelos primeiros passos na área de Biologia Molecular, e pelo apoio, incentivo e sincera amizade.

Aos professores doutores Leandro Lopes Loguércio, Edna Dora Martins Newman Luz, José Luiz Bezerra e José Luís Pires, pela dedicação e competência no exercício da docência.

Aos professores doutores Wilson Reis Monteiro e Fernanda Amato Gaiotto, pelo apoio e orientações.

Ao Técnico Agrícola Henrique Andrade Pedreira e ao Auxiliar de Laboratório Reinaldo Figueiredo Santos, pelo auxílio inestimável nas atividades de campo e laboratório, respectivamente.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da CEPLAC/CEPEC, pelo apoio e companheirismo.

Aos colegas de turma Adriana, Jeiza, Cristiane, Ronaldo, Geruza, Livia, Bianca, Joci e Patrícia, pelo convívio e pela amizade.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| EXTRATO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. O cacaueteiro..... | 3 |
| 2.1. Principais doenças do cacaueteiro..... | 5 |
| 2.3. Identificação de novas fontes de resistência..... | 7 |
| 2.4. Marcadores moleculares e mapeamento genético..... | 8 |
| 3. CAPÍTULO 1 | 12 |
| CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DE UMA POPULAÇÃO PARA MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA DO CACAUEIRO À VASSOURA- DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA. | 12 |
| RESUMO | 13 |
| ABSTRACT | 14 |
| 3.1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 16 |
| 3. 2.1. Material genético..... | 16 |
| 3. 2.2. Avaliações fenotípicas | 17 |
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 17 |
| 3.4. AGRADECIMENTOS | 20 |
| 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 22 |
| 4. CAPÍTULO 2 | 24 |

| | |
|---|----|
| IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES POTENCIALMENTE LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA..... | 24 |
| RESUMO..... | 25 |
| ABSTRACT | 26 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 27 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 4.2.1. Obtenção e caracterização fenotípica da população segregante | 28 |
| 4.2.2. Extração e amplificação do DNA | 29 |
| 4.2.3. Seleção dos <i>primers</i> microsatélites polimórficos..... | 30 |
| 4.2.4. Formação dos <i>bulks</i> de DNA | 30 |
| 4.2.5. Avaliação da funcionalidade dos <i>primers</i> para microsatélites | 33 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.3.1. Avaliação fenotípica, ampliação e clonagem da população..... | 33 |
| 4.3.2. Extração e amplificação do DNA | 35 |
| 4.3.3. Seleção dos <i>primers</i> microsatélites polimórficos..... | 36 |
| 4.3.3. Identificação dos candidatos a marcadores genéticos..... | 38 |
| 4.4. PERSPECTIVAS..... | 39 |
| 4.5. AGRADECIMENTOS | 40 |
| 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS..... | 42 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES | 43 |

EXTRATO

DANTAS NETO, Alfredo, M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Mapeamento de novos genes de resistência do cacau à vassoura-de-bruxa e à podridão parda: caracterização quantitativa da população segregante e identificação de marcadores microssatélites.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Colaborador: Wilson Reis Monteiro.

Considerando que a vassoura-de-bruxa e a podridão parda são as doenças que mais causam prejuízos à cultura do cacau (*Theobroma cacao* L.) na região cacauera do sul da Bahia e a eminente necessidade de identificação de novas fontes de resistência, estudou-se uma progênie de 67 plantas F1, oriundas do cruzamento entre os clones SIC-864 e CCN-51. Caracterizou-se fenotipicamente essa população a partir dos dados obtidos em quatro anos (2000 a 2003) de avaliações fenotípicas em campo, comprovando-se o seu caráter segregante para diversas características, inclusive para resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda, mostrando-se útil para a construção de um mapa genético localizado, com base em marcadores microssatélites. Amostras de DNA genômico de cada planta F1 e dos genitores foram extraídas de folhas em estágio intermediário de maturação. O DNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e a sua qualidade e integridade foram comprovadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Utilizaram-se os DNAs dos genitores para a seleção dos *primers* microssatélites, sendo que dos 49 *primers* testados 32 foram selecionados e marcados com

fluorescências amarela (NED), verde (VIC) e azul (FAM). A seleção dos *primers* foi baseada nos produtos da amplificação aplicados em gel de poliacrilamida desnaturado e corado com prata. Amostras de DNA genômico das cinco plantas mais resistentes e das cinco plantas mais suscetíveis à vassoura-de-bruxa e à podridão parda foram misturados, compondo quatro diferentes *bulks*. Avaliou-se a funcionalidade dos *primers* selecionados utilizando-se amostras de DNA dos *bulks* e dos genitores. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose a 3% que, posteriormente, foi corado com brometo de etídio e fotografado na presença de luz ultravioleta. Os produtos de amplificação das amostras de DNA dos *bulks* e dos genitores também foram aplicados em gel de poliacrilamida a 6%, onde se procedeu a separação eletroforética dos fragmentos de DNA. A detecção dos marcadores microssatélites ocorreu de acordo com a marcação das diferentes fluorescências, sendo que essa detecção foi obtida em seqüenciador automático de DNA ABI 377, utilizando o software GeneScan onde, também, através do marcador GeneScan 500 (ROX 500) foi calculado o peso molecular de cada marcador em pares de bases. Os resultados obtidos lançaram a base para a construção de um mapa genético de ligação localizado, utilizando-se marcadores microssatélites. Tal mapa genético, devidamente saturado, vai permitir a identificação não só de novos genes de resistência, mas também a identificação de QTLs para outras características agronômicas de interesse, contribuindo para os programas de melhoramento genético do cacauero.

ABSTRACT

DANTAS NETO, Alfredo, M. Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Mapping of new resistant genes to witches' broom and Phytophthora pod rot diseases of cocoa: quantitative characterization of a segregating population and identification of microsatellite markers.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Advisor Committee Members: Fernanda Amato Gaiotto and Wilson Reis Monteiro.

Considering the witches' broom and Phytophthora pod rot diseases that cause more damages to cocoa (*Theobroma cacao* L.) on the cocoa region of Bahia, Brazil, and the need of identification of new resistance sources, 67 F1 plants originated from a cross between the clones SIC-864 and CCN-51 were studied. This population was characterized quantitatively through data obtained during four years (2000 to 2003). The phenotypic evaluations in the field showed a segregant population for several traits, besides witches' broom and Phytophthora pod rot resistance, being useful for the construction of a located genetic linkage map based on microsatellite markers. Genomic DNA was extracted from leaves in intermediate stage of maturation of all F1 plants and of the genitors. DNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm its integrity and purity were checked through the separation by electrophoresis in 0,8% agarose gel. DNA from the genitors was used for the selection of the microsatellite primers. From 49 tested primers 32 were selected and marked with yellow (NED), green (VIC) and blue (FAM) fluorescences. The primers selection was based on the amplification products applied in denaturated polyacrylamide gel and stained with

silver. Genomic DNA samples of the five more resistant plants and of the five more susceptible plants to witches' broom and *Phytophthora* pod rot were mixed in four different bulks. The effectiveness of the selected primers was evaluated by using samples of DNA from the bulks and genitors. The amplification products were applied to 3% agarose gel and then stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. The amplification products of the DNA samples from the bulks and from the genitors were also applied to 6% polyacrylamide gel, and then submitted to the electrophoretic separation of the DNA fragments. The microsatellite markers were detected with different fluorescences. This detection was made by automatic sequencer ABI 377, using the software GeneScan. The marker GeneScan 500 (ROX 500) was used to calculate the molecular weight in pairs of bases of each marker. The obtained results are the base to the construction of a genetic map of localized links, using microsatellite markers. This map saturated with other molecular markers will allow the identification not only of new resistance genes but also the identification of QTLs for other important agronomic traits, contributing to cocoa breeding programs.

1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro ($2n = 20$) é uma espécie neotropical, cujas amêndoas constituem-se na principal matéria prima para a indústria do chocolate. Essa espécie (*Theobroma cacao* L.) pertencente à ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma*, é susceptível a diversas doenças em todas as partes do mundo onde é cultivado, sendo que a podridão parda, causada por *Phytophthora* spp. é a mais importante delas. No Brasil, notadamente na região sul da Bahia essa enfermidade, juntamente com a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, constituem-se nos principais problemas fitopatológicos do cacauzeiro. As perdas de produção decorrentes da podridão parda são variáveis ano a ano; entretanto, a vassoura-de-bruxa, a partir do seu surgimento nessa região, causou perdas de até 100% da produção, em algumas propriedades rurais.

O desenvolvimento de variedades resistentes e de alta produtividade tem sido um objetivo estratégico da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, visando o controle da vassoura-de-bruxa. Entretanto, como as variedades disponíveis até o presente descendem de uma única fonte de resistência, o clone Scavina-6, torna-se necessária a identificação de novas fontes de resistência, visando ampliar a base genética da resistência do cacauzeiro à vassoura-de-bruxa, bem como a identificação de novas fontes de resistência à podridão parda.

Nesta perspectiva, desenvolveu-se este trabalho utilizando-se uma progênie de 67 plantas F1, oriunda do cruzamento entre SIC-864 (Catongo) e CCN-51. Trata-se de uma progênie que segrega para diversas características, dentre elas a resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda. Essa progênie foi analisada com base em quatro anos de avaliações fenotípicas no campo. Tal avaliação foi

utilizada para subsidiar a escolha desta população para a construção de um mapa genético localizado, com base em marcadores microssatélites. Com base nesta população e no mapa genético a ser construído, espera-se identificar não só novos genes de resistência à podridão parda, mas também de QTLs para outras características agronômicas de interesse.

No capítulo 1 é apresentada a caracterização quantitativa da progênie, evidenciando os dados fenotípicos das avaliações e o caráter segregante da progênie para a resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda, bem como a grande amplitude de variação de outras características de interesse. No capítulo 2 realizou-se um estudo molecular, empregando-se *bulks* das plantas resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa e à podridão parda, e também os genitores. Essa técnica, conhecida como *Bulked Segregant Analysis* (BSA), tem sido bastante eficiente para a identificação de marcadores ligados a genes específicos ou a uma determinada região do genoma, e também na construção de mapas genéticos localizados (MICHELMORE et al., 1991). Nessa estratégia de mapeamento localizado, as análises dos *bulks* de DNA podem ser utilizadas no preenchimento dos *gaps*, que são regiões pouco saturadas, e na localização de marcadores moleculares adicionais (CAMPINHOS, 1996). Amostras de DNA dos *bulks* e dos genitores foram amplificadas via PCR (*Polimerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers* microssatélites selecionados e os fragmentos foram posteriormente detectados por separação eletroforética em seqüenciador automático de DNA, visando lançar as bases para a identificação de alelos polimórficos associados à resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O cacauero

O cacauero é uma planta neotropical inicialmente descrita como *Cacao fructus* por Charles de L'Écluse. Em 1737, foi descrito por Linneu como *Theobroma fructus*, sendo que essa classificação permaneceu até 1753, quando foi definitivamente designado como *Theobroma cacao* L.. Pertence à ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma* (ALVERSON et. al, 1999; APG II, 2003); é uma planta perene, alógama, arbórea e dicotiledônea, nativa das florestas tropicais úmidas das Américas Central e do Sul, sendo que o seu centro de origem provavelmente situa-se nas nascentes dos rios Amazonas e Orinoco (GRAMACHO et al., 1992).

É cultivada nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia, e as suas amêndoas constituem a principal matéria prima para a indústria de chocolate. A região sul da Bahia é a principal produtora de cacau do Brasil, onde o cacauero foi introduzido em 1746 pelo colono francês Luiz Frederico Warneaux, através de sementes da variedade comum trazidas do Pará que foram plantadas na fazenda Cubículo, localizada à margem direita do Rio Pardo, município de Canavieiras (VELLO; GARCIA, 1971). Com a sua expansão, essa lavoura chegou a ser cultivada em 29 mil propriedades rurais, em uma área superior a 700 mil hectares, distribuídos em 106 municípios (SOUZA; DIAS, 2001). Sob o ponto de vista econômico, é considerada uma das principais culturas neotropicais em todo o mundo, estimando-se que o valor total da sua produção atinja cerca de três bilhões de dólares anuais (CHARTERS; WILKINSON, 2000). Atualmente, cerca de 70% da produção mundial

provém dos cinco maiores países produtores de cacau: Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Brasil e Malásia. No Brasil, o cacau é importante fonte de divisas agrícolas nos estados de Rondônia, Amazonas, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, sendo esse último o responsável pela maior produção do país.

De acordo com a localização geográfica e as características morfológicas, *T. cacao* é dividido em três principais grupos: Criollo, Forastero e Trinitário. O grupo Criollo se disseminou em direção à América Central e sul do México, sendo considerado o primeiro cacau domesticado; produz frutos grandes, com casca enrugada e suas sementes possuem o interior branco ou violeta pálido sendo que produzem o chocolate de melhor qualidade. O grupo Forastero se disseminou abaixo da bacia amazônica e também em direção às Guianas, subdividindo-se em Forasteros do Baixo e Alto Amazonas. É considerado o verdadeiro cacau brasileiro e caracteriza-se por possuir frutos ovóides, com casca lisa e sementes com o seu interior violeta escuro (ROSÁRIO et al., 1978). Nesse grupo encontram-se as mutações da variedade comum, o Catongo e o Almeida, e é considerado o grupo que apresenta maior diversidade genética e melhor desempenho agrônômico (BARTLEY, 1967; LOCKWOOD, 1976; MARITA, et al. 2001). O grupo Trinitário é representado por variedades obtidas de cruzamentos entre indivíduos dos grupos Criollo e Forastero, com características bastante distintas entre os seus principais representantes. Suas sementes apresentam coloração interna que varia do amarelo pálido até o roxo escuro e o seu produto final é de qualidade intermediária. Esse grupo foi introduzido na região cacauzeira baiana pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, para utilização em programas de melhoramento genético.

Durante várias décadas, o cacau manteve-se como a principal fonte de receitas públicas, renda e emprego na região cacauzeira baiana, chegando a representar 40 a 50% do total das exportações do estado da Bahia. Adicionalmente, o Brasil chegou a ser o segundo maior produtor mundial de cacau, chegando a produzir 380 mil toneladas/ano.

No ano de 1989, a vassoura-de-bruxa foi detectada pela primeira vez na região cacauzeira baiana (PEREIRA et al., 1991). Os danos severos causados pela doença aliados aos baixos preços do cacau no mercado internacional, à baixa produtividade das lavouras e aos fatores climáticos adversos, desencadeou um processo de empobrecimento da região, provocado pela redução de até 100% na

produção de cacau em diversas propriedades rurais. Esse fato resultou na falência de inúmeros produtores, no desemprego de milhares de trabalhadores rurais que migraram para outras regiões, na erradicação de lavouras em declínio para substituição por pastagens e café, na depreciação da infra-estrutura e desvalorização das propriedades rurais e, ainda mais, na exploração descontrolada de espécies arbóreas de valor ecológico e econômico como alternativa de complementação da renda dos produtores descapitalizados pela crise.

2.1. Principais doenças do cacauero

Em todos os países onde é cultivado, o cacauero é alvo de diversas doenças de grande importância econômica. A podridão-parda dos frutos do cacauero ou podridão-de-phytophthora provocada por *Phytophthora capsici*, *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora palmivora* é considerada a sua principal doença, pois ocorre em todas as regiões produtoras de cacau no mundo. Outras doenças de importância que afetam a cultura são a vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*), a monilíase ou podridão-de-moniliophthora (*Moniliophthora roreri*) e a murcha vascular-estriada ou vascular-streak-diedack (*Oncobasidium theobromae*) que, apesar de causarem perdas maiores que a podridão parda, são restritas a determinadas regiões do mundo, ao contrário dessa enfermidade que é mais bem distribuída em termos globais (LUZ; SILVA, 2001).

Atualmente, no Brasil, a podridão parda e, principalmente, a vassoura-de-bruxa tem sido as doenças que mais têm provocado prejuízos à cultura do cacau. A podridão parda infecta frutos em quaisquer estágios de desenvolvimento onde, inicialmente, surgem pequenas manchas cloróticas na casca, evoluindo para lesões de cor achocolatada que, após 10 a 14 dias da inoculação do patógeno, podem tomar totalmente a superfície do fruto. Em condições de alta umidade podem surgir, a partir do centro das lesões, uma cobertura rala, pulverulenta e esbranquiçada decorrente da formação do micélio e esporângios do fungo. Além dos frutos, essa doença pode infectar outras partes da planta, tais como almofadas florais, folhas, chupões, ramos, caule e raízes, em condições de campo. Em viveiros, pode infectar plântulas em pré e pós-emergência, radículas, cotilédones e hipocótilo (LUZ; SILVA, 2001).

A vassoura-de-bruxa, inicialmente teve o seu agente etiológico descrito por Stahel, em 1915, como *Marasmius perniciosus*. Mais tarde, no ano de 1942, Singer classificou esse patógeno como pertencente ao gênero *Crinipellis*, sendo que, por ocasião da revisão da sua sistemática, esse fungo passou a ser identificado como *Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer. Esse fungo é um basidiomiceto, hemibiotrófico, da ordem Agaricales e família Tricholomataceae. Essa doença, conforme a região, é conhecida por diversas denominações, quais sejam: *krulloten*, que foi utilizada pela primeira vez por Stahel, no Suriname, em 1895; *balai de sorcière*, na França; *escoba de bruxa*, nos países de língua espanhola; *witches' broom*, nos países de língua inglesa; “lagartão”, em determinadas partes da Amazônia brasileira e “vassoura-de-bruxa” nas demais localidades do Brasil (SILVA et al., 2002).

O fungo *Crinipellis perniciosus* infecta os lançamentos foliares novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, podendo até provocar a morte da planta quando afetada por sucessivos ciclos do patógeno associados a fatores abióticos (ANDEBRHAN, 1984; QUEIROZ et al., 2003).

Uma das alternativas encontradas para conter o avanço da vassoura-de-bruxa é o emprego de variedades resistentes e de alta produtividade desenvolvidas no programa de melhoramento genético do cacaueteiro. Essa medida de controle se justificou pelo fato de que os controles químico e cultural mostraram-se onerosos e ineficazes quando não executados rigorosamente de acordo com as recomendações técnicas da pesquisa, e antieconômicos em se tratando de lavouras formadas por variedades de alta susceptibilidade e de baixa produtividade (PINTO; PIRES, 1998).

Após 15 anos de convivência com a vassoura-de-bruxa, a lavoura cacaueteira começa a dar sinais de recuperação devido à utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a grande maioria delas, tanto as seminais quanto as clonais, descende de uma única fonte de resistência que é herdada do clone Scavina-6. Por isso, é necessário identificar novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa, obter marcadores moleculares associados a novos QTLs (*Quantitative trait loci*) que estejam associados à resistência, objetivando a ampliação da base genética da resistência do cacaueteiro à vassoura-de-bruxa. A diversificação varietal é uma estratégia de controle da doença que tem sido defendida pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueteira – CEPLAC, por diminuir a pressão de seleção do patógeno, permitindo aumentar a estabilidade da resistência. O desenvolvimento ou seleção de variedades que comportam um número maior de genes ligados à

resistência também é uma estratégia interessante para uma resistência mais estável e durável, dificultando a evolução do fungo sobre tais materiais (PINTO; PIRES, 1998).

2.3. Identificação de novas fontes de resistência

Para a identificação de novas fontes de resistência e a identificação dos genes de interesse, é necessário selecionar genótipos resistentes e avaliar progênies que sejam contrastantes para a resistência e outras características agrônômicas. Os materiais genéticos empregados neste estudo foram os clones Catongo (SIC-864) e CCN-51, de onde se obteve uma progênie F1 de 67 plantas.

O Catongo trata-se de uma mutação para o albinismo do cacauero da variedade comum, recebendo esse nome por ter sido identificado na fazenda Catongo, na antiga localidade de Pirangi, hoje município de Itajuípe (BA), na segunda metade dos anos 30. Possui frutos branco-esverdeados quando imaturos, e amarelos quando maduros, sendo que a casca é quase lisa. Sua principal característica, sob o ponto de vista morfológico, é a despigmentação no interior das sementes e também das folhas tenras e, em proporção muito menor, ocorrem frutos que apresentam sementes ocre (BONDAR, 1958). Quanto à resistência a enfermidades, é altamente susceptível à vassoura-de-bruxa (GRAMACHO et al., 1992) e resistente à podridão parda (MEDEIROS, 1965).

O CCN-51, cuja sigla significa *Colección Castro Naranja*, é originário de uma planta F1 do cruzamento entre ICS-95 X IMC-67 cruzada com um clone oriundo do oriente equatoriano denominado Canelos. Esse trabalho foi desenvolvido pelo pesquisador equatoriano Homero Castro Zurita, que buscava desenvolver variedades de cacau resistente a enfermidades e com alta produtividade. O CCN-51, quando comparado com outras variedades locais do Equador, tem demonstrado ser mais resistente à vassoura-de-bruxa e sua susceptibilidade à podridão parda é menor quando comparada à outra enfermidade comum no Equador, a monilíase (CAMPO; ANDÍA, 1997). Os frutos do CCN-51 são vermelho-arroxeados quando imaturos, passando a amarelo alaranjado forte, quando maduros.

Os clones SIC-864 e CCN-51 são contrastantes para vários caracteres, inclusive para resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda. Uma população de

67 plantas F1 oriundas do cruzamento entre esses clones, com quatro anos de avaliações fenotípicas em campo, foi o material genético desta investigação científica visando lançar as bases para o desenvolvimento de um mapa genético com perspectivas para a identificação de novos genes de resistência associados às enfermidades mencionadas, bem como de QTLs para produção e outras características agronômicas. Sendo assim, objetivou-se neste trabalho a caracterização quantitativa dessa população, visando a construção de um mapa genético localizado, com o emprego de marcadores microssatélites para identificação de novos genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda, dissimilares daquelas encontradas na literatura, notadamente da tradicional fonte de resistência, o clone Scavina-6.

2.4. Marcadores moleculares e mapeamento genético

Marcadores moleculares baseados no reconhecimento de polimorfismos por enzimas de restrição como RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), bem como em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e SSR (*Simple sequence repeats*) ou microssatélites são bastante úteis em estudos genéticos. Marcadores microssatélites ou SSR consistem de pequenas seqüências (*sequence motif*) de um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São marcadores muito utilizados para estudar polimorfismos entre seqüências de DNA e baseiam-se no uso de dois pares de *primers* (*forward and reverse*) e da reação de PCR para detectar variações em locos de seqüências repetitivas. O advento desses marcadores e o avanço das técnicas de biologia molecular têm permitido a construção de mapas genéticos para diversas culturas agrícolas anuais e perenes, tais como soja (CORRÊA, 1995), café (PEARL et al., 2004), cevada (HORI et al., 2003), milho (BRUNELLI et al., 2002), eucalipto (THAMARUS et al., 2002; GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994), *Acacia mangium* (BUTCHER; MORAN, 2000), sorgo (BHATTRAMAKKI et al., 2000; HAUSSMANN et al., 2002), trigo (GUPTA et al., 2002), arroz (TEMNYKH et al. 2000; McCOUCH et al., 2002), pêssego (DETTORI et al., 2001), amêndoa (JOUBEUR et al., 2000), feijão (FALEIRO et al., 2003; BROMMONSHENKEL et al., 2003) e maçã (LIEBHARD et

al., 2002), além do cacauero (FALEIRO et al., 2004; PUGH et al., 2004). A construção de mapas genéticos tem diversas aplicações, dentre as quais destacam-se: a cobertura e análise de genomas, a localização de genes que controlam caracteres de interesse agrônomico e econômico, qualitativos e quantitativos, o conhecimento do efeito de diferentes locos na expressão fenotípica de um determinado caráter, o desenvolvimento de estratégias de seleção assistida por marcadores moleculares (*Marker Assisted Selection*), a clonagem de genes e estudos de sintenia.

Quando comparado com outras culturas de importância agrícola, o cacauero ainda é pouco estudado com o emprego dessas técnicas; entretanto, nos últimos anos, alguns mapas genéticos foram construídos, dentre os quais alguns são comentados abaixo.

O primeiro mapa genético do cacauero foi construído por Lanaud et al. (1995), utilizando uma progênie de UPA-402 X UF-676, sendo que um total de 193 locos foram mapeados em 10 grupos de ligação, sendo 5 marcadores isoenzimáticos, 156 RFLPs, 04 genes de função conhecida e 28 RAPDs. A progênie avaliada foi oriunda de genitores de diferentes origens genéticas e também mostrou variação em um grande número de características, tais como, qualidade das amêndoas, características das flores e resistência a *Phytophthora*. No entanto, esta progênie foi dividida em duas populações de 55 e 45 plantas, onde a análise de QTLs mostrou apenas resultados indicativos para o mais importante QTL em cada uma delas.

Objetivando o mapeamento de QTLs no cacauero para resistência a *Phytophthora palmivora*, Lanaud et al. (1996) construíram outro mapa genético de ligação utilizando uma população de 144 indivíduos, obtida do cruzamento entre UPA-402 X UF-676, utilizando marcadores AFLP, RAPD, RFLP, microssatélites e isoenzimáticos. Esse estudo revelou que várias regiões do genoma do cacauero estão envolvidas na resistência dessa cultura à *P. palmivora*, sendo que 46% da variação fenotípica da taxa de podridão é explicada por duas regiões do genoma, provavelmente comuns aos genitores que apresentaram características de resistência.

No mesmo ano, Crouzillat et al. (1996) construíram outro mapa utilizando uma população de 131 plantas retrocruzadas obtidas do cruzamento entre uma única variedade de Catongo e uma F1 do cruzamento entre Catongo e Pound-12. Estes

autores mapearam 138 marcadores, sendo 104 RAPDs e 32 RFLPs. Dez grupos de ligação foram obtidos, cobrindo um total de 1068 cM; vários QTLs foram identificados, sendo quatro QTLs associados à precocidade da floração, dois ao diâmetro do tronco, altura da forquilha e número de óvulos, e um ao diâmetro do tronco e altura da forquilha. Dos QTLs identificados, seis foram favoráveis para o loco em heterozigotidade e quatro para o loco de homozigotidade para o alelo favorável.

No ano de 2000, mais três mapas foram publicados: o primeiro deles com a identificação de QTLs para herança poligênica da resistência do cacaueteiro à *P. palmivora* (CROUZILLAT et al., 2000) em duas populações, empregando-se marcadores RFLP, RAPD e AFLP. A primeira população foi uma F1 obtida do cruzamento entre Catongo X Pound 12 e a segunda, plantas obtidas de um retrocruzamento envolvendo a variedade Catongo, nas quais foram mapeados 162 e 140 locos, respectivamente. Seis diferentes QTLs foram detectados nas duas populações, entretanto um QTL encontrado em ambas populações aparentou ser o principal componente da resistência à doença, explicando aproximadamente 48% da variação fenotípica na F1. No segundo mapa, Motilal et al. (2000) utilizaram uma progênie de 155 plantas F1 obtidas do cruzamento entre IMC 57 X Catongo e mapearam QTLs para resistência a *P. palmivora*, empregando 235 marcadores, sendo 206 AFLPs, 8 RAPDs, 18 microssatélites e três isoenzimáticos. Três QTLs para resistência a *P. palmivora* foram detectados a um LOD score de 3 nos grupos de ligação 1 e 9. Com base nos marcadores co-dominantes foi verificado que o nível de heterozigotidade foi de 78,6% e 5,3% para os genitores IMC-57 e Catongo, respectivamente. Finalmente, Risterucci et al. (2000) construíram um terceiro mapa de alta densidade utilizando uma progênie de 181 plantas resultante do cruzamento entre UPA-402 X UF-676. Foram obtidos 424 locos polimórficos, sendo cinco isoenzimáticos, seis locos para genes de função conhecida, 169 RFLPs, três sondas teloméricas, 30 RAPDs, 191 AFLPs e 20 microssatélites. Esses locos foram distribuídos em dez grupos de ligação obtidos, os quais provavelmente correspondem aos dez cromossomos gaméticos do cacaueteiro.

Queiroz et al. (2003) construíram o primeiro mapa visando identificar QTLs associados à resistência à doença vassoura-de-bruxa. A população utilizada foi uma F2 de 82 plantas obtida do cruzamento entre Scavina-6 X ICS-1 e os marcadores utilizados foram 124 RAPDs e 69 AFLPs. Um QTL principal, com a presença do

marcador AV14.940 no grupo de ligação 11, explicou 35% da variância fenotípica da resistência à vassoura-de-bruxa. Utilizando essa mesma população, Faleiro et al. (2002) saturaram esse mapa inserindo novos marcadores RAPD e microssatélites, sendo identificados três marcadores microssatélites associados à resistência e com elevado percentual de explicação da variância fenotípica.

Finalmente, Pugh et al. (2004) construíram um mapa baseado em marcadores co-dominantes, obtidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida por (GA)_n e (CA)_n. Foram mapeados 201 novos marcadores microssatélites em uma população de 135 indivíduos anteriormente mapeada por Risterucci et al. (2000), resultantes do cruzamento entre os clones UPA-402 e UF-676. Esse mapa é composto por 465 marcadores moleculares – 268 microssatélites, 176 RFLPs, cinco isoenzimas e 16 genes R – RFLP, agrupados em dez grupos de ligação, com comprimento de 768,8 cM e distância de intervalo médio entre os marcadores de 1,7 cM. Os novos microssatélites foram distribuídos em todos os grupos de ligação, sendo que o comprimento do mapa estabelecido apenas com esses marcadores foi de 769,6 cM, o que corresponde a 94,8% do comprimento total do mapa. Adicionalmente, Lanaud et al. (2004) isolaram seqüências de genes análogos de defesa e resistência utilizando primers construídos a partir de domínios conservados de genes de defesa e resistência de plantas como o NBS, presente em tabaco, e domínios de duas famílias de genes de defesa. O mapa genético construído com marcadores microssatélites permitiu identificar diversas co-localizações de genes análogos de defesa e resistência, e QTLs para resistência à *Phytophthora* detectados em diversas progênies.

3. CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DE UMA POPULAÇÃO PARA MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA DO CACAUEIRO À VASSOURA- DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA*.

**ALFREDO DANTAS NETO¹, RONAN X. CORRÊA², WILSON R. MONTEIRO¹,
EDNA D. M. N. LUZ³, KARINA P. GRAMACHO³ & UILSON V. LOPES¹.**

¹Seção de Genética; ³Seção de Fitopatologia, Centro de Pesquisas do Cacau, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA; ²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45.650-000, Ilhéus, BA. e-mail: alfredo@cepec.gov.br

Artigo submetido à Fitopatologia Brasileira em 22/06/2004.

Autor para correspondência: Alfredo Dantas Neto.

DANTAS NETO, A., CORRÊA, R. X., MONTEIRO, W. R., LUZ, E. D. M. N., GRAMACHO, K. P. & LOPES, U. V. Caracterização Quantitativa de uma População para Mapeamento de Genes de Resistência do Cacaueiro à Vassoura-de-bruxa e Podridão Parda.

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Estadual de Santa Cruz (2004).

RESUMO

O cacauero é uma espécie neotropical cultivado nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia. É alvo de diversas enfermidades em todas as regiões onde é cultivado destacando-se a podridão-parda, causada por *Phytophthora* spp. e a vassoura-de-bruxa, causada por *Crinipellis perniciosa*. Na região cacauera da Bahia, ocorreram sérios prejuízos econômicos, sociais e ambientais, a partir de 1989 ocasionados pela vassoura-de-bruxa. A busca de fontes de resistência às doenças é a etapa básica para os programas de melhoramento genético e nesse sentido, objetivou-se caracterizar quantitativamente uma progênie oriunda do cruzamento entre os clones SIC-864 e CCN-51, dois genótipos contrastantes para diversas características, inclusive para resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda. Foram avaliados em condições de campo os dados referentes a número de frutos sadios, número de frutos com vassoura-de-bruxa, número de frutos com podridão parda, número de vassouras vegetativas, número de vassouras de almofada floral e número médio de frutos/planta/ano por um período de quatro anos. Os dados demonstraram a segregação dessa progênie para a resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda e outras características, evidenciando a sua utilidade para estudos de mapeamento genético utilizando marcadores moleculares, visando identificar genes de resistência e QTLs dissimilares dos encontrados no clone Scavina-6, de grande utilidade em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora* spp., *Theobroma cacao*, melhoramento genético.

ABSTRACT

Quantitative Characterization of a Population for Mapping of Genes of Resistance in Cocoa to Witches' Broom and Phytophthora Pod Rot.

Cocoa is a Neotropical species cultivated in South, Central and Caribbean Americas and in Africa and Asia. It constitutes an important source of income to all the producing countries. This species is target to several diseases in all areas where it is cropped, being Phytophthora pod rot, caused by *Phytophthora* spp, the main disease. In the cocoa region of Bahia, Brazil, occurred serious economic, social and environmental damages with the appearance in the decade of 1980 of witches' broom, caused by *Crinipellis perniciosa*. However, in the decade of 1990, cocoa resistant varieties were deployed as part of Cocoa Research Center cropping renovation program. Considering, however, resistance descend from Scavina-6, it became necessary the identification of new resistance genes to amplify the genetic base of cocoa for this trait. Thus, the objective of the present study was to do a quantitative characterization of a progeny originated from the cross between SIC-864 and CCN-51, with different background of Scavina-6. Therefore, witches' broom and pod-rot symptoms as well as yield data were evaluated for four years. The data demonstrated the segregant character of the progeny, allowing its utilizations for genetic mapping, by using molecular markers, in order to identify distinct sources of resistance from the Scavina-6 clone.

Key words: *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora* spp., *Theobroma cacao*, genetic breeding.

3.1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L. ($2n = 20$) é uma espécie neotropical da ordem Malvales família Malvaceae e do gênero *Theobroma*, (Alverson et al., 1999; APG II, 2003), perene, alógama, arbórea e dicotiledônea, cultivada nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia, sendo que suas amêndoas constituem a principal matéria prima para a indústria do chocolate. A região do sul da Bahia é a principal produtora de cacau do Brasil, onde chegou a ser cultivado em 29 mil propriedades rurais, envolvendo uma área superior a 700 mil hectares (Souza & Dias, 2001).

A partir de 1989, com a introdução do fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa, iniciou-se um processo de empobrecimento da região cacauzeira baiana, provocado pela redução de até 100% na produção de cacau em diversas propriedades rurais. Esse fato resultou na falência de inúmeros produtores, desemprego na região e, ainda mais, na exploração descontrolada de espécies arbóreas de valor ecológico e econômico como alternativa de complementação da renda dos produtores descapitalizados pela crise. O fungo *Crinipellis perniciosa* infecta os lançamentos foliares novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais podendo, até, provocar a morte da planta quando afetada por sucessivos ciclos do patógeno associados a fatores abióticos (Andebrhan, 1984; Queiroz et al. 2003).

Uma das alternativas encontradas para conter o avanço da vassoura-de-bruxa foi o emprego de variedades resistentes e de alta produtividade desenvolvidas em programa de melhoramento genético do cacauzeiro. Essa medida de controle é fundamental pelo fato de que os controles químico e cultural mostraram-se onerosos e ineficazes quando não executados rigorosamente de acordo com as recomendações técnicas da pesquisa, e antieconômicos em se tratando de lavouras formadas por variedades de alta susceptibilidade e de baixa produtividade (Pinto & Pires, 1998). Nessa perspectiva, técnicas de biologia molecular, como os marcadores moleculares do DNA, vêm sendo bastante utilizadas como ferramentas úteis no mapeamento de novos genes de resistência em cacauzeiros, através do uso de marcadores do DNA.

Após 15 anos de convivência com a vassoura-de-bruxa, a lavoura cacauzeira começa a dar sinais de recuperação devido à utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a grande maioria das variedades resistentes, tanto as seminais quanto

as clonais descendem de uma única fonte de resistência que é herdada do clone Scavina-6. Por isso, é necessário identificar novas fontes de resistência e obter marcadores moleculares ligados a novos QTLs (*Quantitative trait loci*), que estejam associados à resistência, objetivando a ampliação da base genética da resistência do cacauero à vassoura-de-bruxa. Para isso, a avaliação acurada da população de mapeamento para a resistência é fundamental. A diversificação varietal é uma estratégia de controle da doença que tem sido defendida pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, por permitir manter a estabilidade da resistência. O desenvolvimento ou seleção de variedades que comportam um número maior de genes ligados à resistência certamente terá uma resistência mais estável e durável dificultando a evolução do fungo sobre tais materiais (Pinto & Pires, 1998). Dentro desta filosofia, desde 1996, a CEPLAC tem procurado formar populações de cacau, buscando combinar genótipos resistentes de origens distintas aproveitando, estrategicamente, a infra-estrutura botânica já existente e, paralelamente, introduzindo na coleção de germoplasma novos acessos resistentes.

Neste trabalho objetivou-se realizar a caracterização fenotípica da progênie F1 oriunda do cruzamento entre os clones SIC-864 e CCN-51. O SIC-864 é uma mutação para o albinismo da variedade comum do cacauero, altamente susceptível à vassoura-de-bruxa e resistente à podridão parda. Já o CCN-51 é originário de uma F1 do cruzamento entre ICS-95 e IMC-67, que foi cruzada com um clone originário do oriente do Equador, denominado Canelos, tendo demonstrado ser mais resistente à vassoura-de-bruxa do que outras variedades locais. A caracterização fenotípica realizada baseou-se na avaliação de várias características agrônômicas de interesse como a resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda, visando verificar a utilidade desta progênie para estudos de mapeamento genético e a sua utilização em programas de melhoramento genético.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3. 2.1. Material genético

A população de *Theobroma cacao* L. utilizada nesse estudo foi uma progênie F1 de 67 plantas, implantada por mudas seminais no ano de 1996, na área

experimental do Centro de Pesquisas do Cacau da CEPLAC, Ilhéus, BA. Essa progênie é originária do cruzamento entre os clones SIC-864 e CCN-51, dois acessos contrastantes para a resistência à vassoura-de-bruxa, sendo o primeiro considerado como susceptível e o segundo resistente a essa enfermidade.

3. 2.2. Avaliações fenotípicas

Durante os últimos cinco anos vêm sendo feitas avaliações de dados fenotípicos da progênie. Até o presente, estão disponíveis os dados relativos aos anos de 2000 a 2003 sendo que as coletas dos dados variaram em número a cada ano, sendo seis coletas em 2000, onze coletas em 2001, dez coletas em 2002 e onze coletas em 2003. Neste estudo, foram analisados os dados referentes ao número de frutos sadios (FS), número de frutos com vassoura-de-bruxa (FVB), número de frutos com podridão parda (FPP), número de vassouras vegetativas (NVV), número de vassouras em almofada floral (NVA) e número médio de frutos/planta/ano (PROD.). Foram calculadas as estatísticas descritivas da produtividade e da resistência a doenças com base nos valores máximo, mínimo e médio, no desvio padrão e coeficiente de variação, e na distribuição da freqüência, obtidos com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2001).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está a estatística descritiva das variáveis analisadas, sendo que a produção média de frutos/planta/ano foi a que apresentou maior coeficiente de variação. Os coeficientes de variação foram bastante elevados em todas as variáveis. Em geral, a incidência de frutos doentes com vassoura-de-bruxa foi superior à incidência de frutos doentes com podridão parda. Verificou-se ainda que a porcentagem de frutos sadios e com vassoura-de-bruxa foram as variáveis que atingiram os percentuais máximos de incidência, mas com diferentes coeficientes de variação, que foi maior para a porcentagem de frutos com vassoura, o que mostra uma grande variabilidade do nível de resistência das plantas F1. Apesar de apresentar um coeficiente de variação menor que o da porcentagem de frutos com

vassoura-de-bruxa, a média de frutos com podridão parda foi próxima à de frutos com vassoura-de-bruxa, o que também ocorreu com o percentual mínimo de frutos com ambos os sintomas. Adicionalmente, de acordo com os percentuais máximos, percebeu-se que houve uma menor incidência de frutos com podridão parda do que com vassoura-de-bruxa, podendo-se supor que essa progênie é mais susceptível à vassoura-de-bruxa do que a podridão parda, em frutos.

As variáveis número de vassouras vegetativas e de vassouras de almofada floral apresentaram coeficientes de variação muito próximos, entretanto a ocorrência de vassouras vegetativas foi mais comum, com maior média e maior valor mínimo (Tabela 1). Apesar do número médio e máximo de vassouras vegetativas ter sido superior ao de vassouras de almofada floral, constatou-se o mesmo valor mínimo para ambas características (Tabela 1). Isso permitiu sugerir que, na média, a progênie em estudo é mais susceptível à incidência de vassouras vegetativas do que de vassouras de almofada floral.

Na distribuição de freqüência observou-se que as maiores produções concentraram-se em um menor número de plantas (Figura 1A), evidenciando que a característica de produtividade de ambos os genitores foi transferida para poucos indivíduos da progênie. Convém ressaltar, que a progênie está plantada com espaçamento 3,0 m X 1,5 m, diferente do espaçamento tradicional utilizado para a cultura do cacau, que é de 3,0 m X 3,0 m, o que certamente contribuiu para uma produtividade menor.

Os maiores percentuais de frutos sadios ocorreram predominantemente em poucas plantas (Figura 1B), podendo-se atribuir isso à elevada incidência de vassoura-de-bruxa e da podridão parda, o que contribuiu para aumentar a quantidade de inóculo no campo e assim propiciar uma boa avaliação da progênie. Plantas combinando resistência a ambas doenças e produtividade, características do SIC-864 e do CCN-51, mostram a importância desta progênie para o mapeamento de QTLs associados à resistência e para o programa de melhoramento genético do cacauero. O CCN-51 tem demonstrado ser resistente à vassoura-de-bruxa e menos susceptível à podridão parda quando comparado com outra enfermidade comum no Equador, a monilíase (Campo & Andía, 1977). O CCN-51 parece apresentar os locos em heterozigose (aqueles que conferem resistência à vassoura-de-bruxa). Isto é perfeitamente observado quando se analisa o comportamento de uma progênie de auto-fecundação desse acesso. Muitas plantas da progênie mostraram-se

susceptíveis a ambas as doenças, principalmente devido às características do SIC-864; este clone é altamente susceptível à vassoura-de-bruxa (Gramacho et al., 1992), embora apresente certa resistência à podridão parda (Medeiros, 1965).

TABELA 1 – Estatísticas descritivas da produtividade e da resistência a doenças de 67 plantas F1 do cruzamento SIC-864 X CCN-51, com base na avaliação durante 4 anos (2000 a 2003)

| | PROD. | %FS | %FVB | %FPP | NVV | NVA |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Máximo | 19,50 | 100 | 100 | 65 | 7,5 | 5,3 |
| Mínimo | 0,25 | 14 | 4 | 3 | 0,3 | 0,3 |
| Média | 6,41 | 52,52 | 27,06 | 29,03 | 2,09 | 1,72 |
| Desvio padrão | 4,55 | 17,16 | 20,75 | 12,36 | 1,46 | 1,20 |
| CV% | 71,02 | 32,67 | 76,67 | 42,59 | 70,13 | 69,65 |

PROD. – Número médio de frutos produzidos por planta por ano

%FS – Porcentagem de frutos sadios

%FVB – Porcentagem de frutos com vassoura-de-bruxa

%FPP – Porcentagem de frutos com podridão parda

NVV – Número de vassouras vegetativas por planta por ano

NVA – Número de vassouras tipo almofada por planta por ano

Quando se comparou a incidência de frutos por planta com vassoura-de-bruxa e podridão parda, pode-se constatar que somente no caso da vassoura-de-bruxa houve casos de incidência em 100% dos frutos (Figura 1C). Pode-se observar também que os maiores percentuais de incidência da vassoura-de-bruxa ocorreram em um menor número de frutos. No caso da podridão parda, os maiores percentuais de incidência ocorreram predominantemente em um número de frutos superior aos infectados com vassoura-de-bruxa, apesar de que essa incidência não ultrapassou 65% dos frutos avaliados. Outra observação interessante é que a distribuição de freqüência da porcentagem de frutos com podridão parda foi próxima de uma distribuição normal (Figura 1D), ao contrário da porcentagem de frutos com vassoura-de-bruxa (Figura 1C), o que permite inferir sobre a existência de um maior número de genes de resistência à podridão parda quando comparado à resistência à vassoura-de-bruxa. Distribuição aproximadamente normal para valores genéticos estimados, foram observadas por Lopes et al. (2003) em outras populações para as variáveis número de vassouras vegetativas e de almofada floral, e para a distribuição da freqüência de frutos infectados com vassoura-de-bruxa, indicando que um sistema poligênico deve estar envolvido no controle destes caracteres. Não

obstante, deve-se considerar, também, que a incidência de podridão parda em bilros não foi registrada.

Adicionalmente ao fato do número médio de vassouras vegetativas e de vassouras de almofada floral terem apresentado coeficientes de variação muito próximos (Tabela 1), observou-se uma distribuição de freqüência também muito semelhante entre estas duas características (Figura 1 E e 1F), embora o número de plantas com menor número médio de vassouras vegetativas tenha sido maior, podendo-se inferir que há um maior nível de resistência da progênie para a incidência de vassouras vegetativas.

Conforme se pode observar, a progênie estudada segrega para várias características, inclusive para resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda. Há grande amplitude de variação de todas as características, mostrando a importância desta progênie para a realização de estudos de mapeamento genético em nível molecular na cultura do cacaueteiro, visando a identificação de novos genes de resistência e de QTL's para características agrônômicas de importância, bem como para o programa de melhoramento genético do cacaueteiro.

3.4. AGRADECIMENTOS

Ao *Common Fund of Commodities* (CFC), à *International Cocoa Organization* (ICCO) e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) – CFC/ICCO/CEPLAC – *Biomol Project*, pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos para o curso de Mestrado do primeiro autor.

Ao Dr. Raul René Melendez Valle, pelas correções no *abstract*.

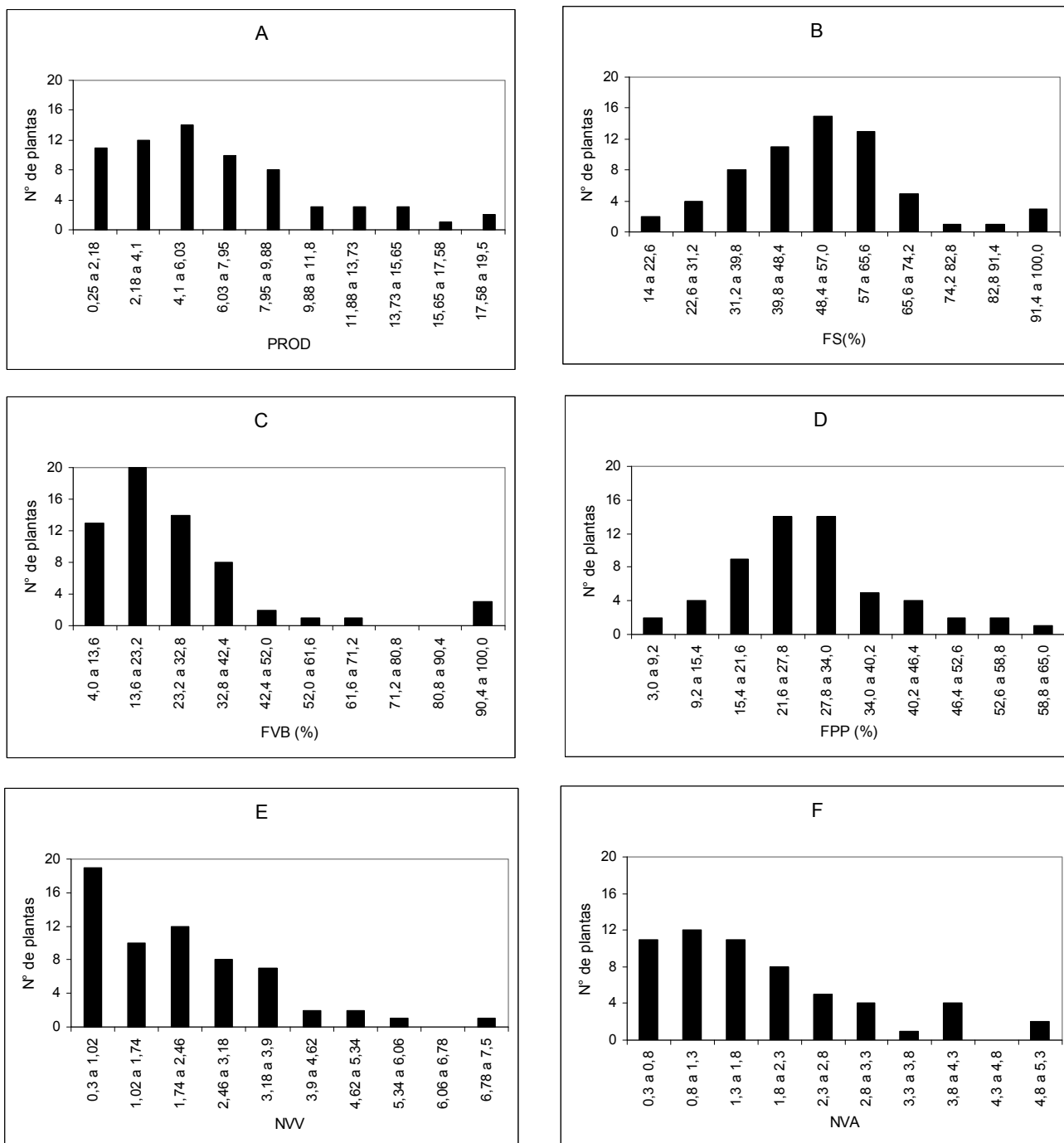


FIGURA 1 – Distribuição da freqüência de 67 plantas F1 do cruzamento SIC-864 X CCN-51, relativa ao número médio de frutos produzidos por planta (A), porcentagem de frutos sadios (B), porcentagem de frutos com vassoura-de-bruxa (C), porcentagem de frutos com podridão parda (D), número médio de vassouras vegetativas (E) e número médio de vassouras tipo almofada floral (F).

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

APG II 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The Linnean Society of London, **Botanical Journal of the Linnean Society**, 141:399 – 436. 2003.

CAMPO, E. C. & ANDÍA, F. C. **Cultivo y beneficio del cacao CCN-51**. El Conejo, Quito. 136p. 1997.

CRUZ, C. D. **Programa Genes – versão Windows**. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.

GRAMACHO, I. C. P., MAGNO, A. E. S., MANDARINO, E. P. & MATOS, A. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus: CEPLAC/CEDEX, 124 p. 1992.

LOPES, U. V., MONTEIRO, W. R., GRAMACHO, K. P. & PIRES, J. L. Herança da resistência do cacauero à vassoura-de-bruxa. In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, 2003. **Trabalhos apresentados**. CD-ROOM.

MEDEIROS, A. G. **Combate à podridão parda com o emprego do cacau Catongo**. CEPLAC/CEPEC. 6p. 1965.

PINTO, L. R. M & PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistente à vassoura-de-bruxa**. Boletim Técnico n° 181. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 34 p.1998.

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

SOUZA, C.A.S.& DIAS, L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacauero**. Editora Folha de Viçosa Ltda, Viçosa. 2001. pp. 1 – 47.

4. CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES POTENCIALMENTE LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA E PODRIDÃO PARDA.

**ALFREDO DANTAS NETO¹, RONAN X. CORRÊA², WILSON R. MONTEIRO¹,
FERNANDA A. GAIOTTO² & UILSON V. LOPES¹.**

¹Seção de Genética, Centro de Pesquisas do Cacau, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA; ²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45.650-000, Ilhéus, BA. e-mail: alfredo@cepec.gov.br

Artigo a ser submetido.

Autor para correspondência: Alfredo Dantas Neto.

DANTAS NETO, A., CORRÊA, R. X., MONTEIRO, W. R., GAIOTTO, F. A. & LOPES, U. V. Identificação de Marcadores Microssatélites Potencialmente Ligados a Genes de Resistência à Vassoura-de-Bruxa e Podridão Parda.

RESUMO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é alvo de diversas doenças, sendo a podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e a vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) as principais delas, no Brasil. Objetivando mapear novos genes de resistência a essas enfermidades, DNA genômico foi extraído de uma população segregante de 67 plantas F1, obtidas do cruzamento entre SIC-864 e CCN-51. *Bulks* de DNA das cinco plantas mais resistentes e das cinco plantas mais suscetíveis às enfermidades mencionadas foram obtidos. Para selecionar os *primers* para microssatélites a serem empregados nas ampliações, amostras de DNA dos genitores foram amplificadas com 49 *primers* para microssatélites. Destes, 32 foram utilizados na amplificação dos *bulks*. O padrão de bandas obtidos em gel de poliacrilamida evidenciou que os polimorfismos encontrados entre os *bulks* podem estar ligados a genes de resistência àquelas enfermidades. Para confirmar isto, amostras de DNA de todas as plantas serão amplificadas com os *primers* que geraram os polimorfismos. Para aumentar a precisão do mapa genético, a população foi ampliada para 237 indivíduos e obtidos seis clones de cada um, em casa de vegetação. Para cada indivíduo, foram extraídas amostras de DNA que serão amplificadas com os *primers* microssatélites, para a construção do mapa genético. Três dessas plantas serão inoculadas com os patógenos, e outras três serão plantadas em três ambientes distintos, para fenotipagens posteriores. Os resultados obtidos criam perspectivas para a construção de um mapa genético de ligação saturado, com base em marcadores microssatélites, com nível de saturação que permita identificar novos genes de resistência e QTLs para outras características agrônômicas de interesse.

Palavras-chave: *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora* spp., *Theobroma cacao*, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.), is a neotropical species, being exposed to several diseases. In the cocoa region of Bahia, Brazil, the main diseases are Phytophthora pod rot (*Phytophthora* spp.) and witches' broom (*Crinipellis pernicioso*). Aiming at the identification of new resistance genes to those diseases, genomic DNA was extracted from a segregant population of 67 F1 plants, obtained from the SIC-864 and CCN-51 cross. Bulks of DNA of five more resistant plants and five more susceptible plants were obtained. To select the primers used in the amplifications, DNA of the genitors (SIC-864 and CCN-51) was amplified with 49 microsatellite primers. From these, 32 were used in the amplification of the bulks. The band patterns obtained in 6% polyacrylamid gel indicate that the obtained polymorphisms must be linked to resistance genes. To confirm this affirmative DNA samples from the each F1 plant will be amplified using the primers that generated the polymorphisms. To improve the genetic map precision, the population was enlarged for 237 individuals and six clones of each were obtained in greenhouse. Three of these plants will be inoculated with the pathogens, and the other three will be planted in three different environments, for subsequent phenotypic characterization. The obtained results allows the perspective for the construction of a genetic linkage map saturated, with base in microsatellite markers, with a saturation level that allows the identification not only of new resistance genes but, also, the identification of QTLs for other agronomic characteristics of interest, what will contribute positively to the improvement of cocoa breeding programs.

Key-words: *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora* spp., *Theobroma cacao*, molecular markers.

4.1. INTRODUÇÃO

As doenças podridão parda e vassoura-de-bruxa, causadas pelos fungos *Phytophthora* spp e *Crinipellis perniciosa* são as principais doenças da cultura do cacau (*Theobroma cacao* L.), na região cacauceira do sul da Bahia. A podridão parda causa perdas diretas na produção de frutos, sendo que essas perdas variam em torno de 20 a 30% ao ano (MEDEIROS, 1977), de acordo com o local e a severidade do ataque. Já a vassoura-de-bruxa, desde o seu surgimento naquela região no ano de 1989, causou imensos prejuízos econômico-sócio-ambientais, provocados pela redução de até 100% em algumas propriedades rurais.

Para o controle dessas enfermidades são necessárias diversas medidas. Dentre elas, destaca-se a utilização de variedades de alta resistência e produtividade, a fim de assegurar aos produtores rurais a sustentabilidade e o retorno econômico da sua produção. Marcadores moleculares baseados na PCR (*Polimerase chain reaction*) como os microssatélites têm sido uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético, na busca de variedades com essas características, em diversas culturas agrícolas de importância econômica. Dentre as utilizações dos marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, destaca-se a construção de mapas genéticos abrangentes, visando o mapeamento de genes de resistência e a identificação de QTL (*Quantitative trait loci*) para produção e outras características agronômicas de interesse.

Uma das etapas fundamentais para o desenvolvimento de mapas é a obtenção e caracterização fenotípica de populações segregantes, obtidas por cruzamentos entre materiais contrastantes para as características de interesse. Nesse sentido, a CEPLAC dispõe de diversas populações implantadas em campo. Por exemplo, foram desenvolvidos mapas genéticos baseados em plantas F2 obtidas do cruzamento entre ICS-1 e Scavina-6, sendo identificados QTLs associados à resistência do Scavina-6 à vassoura-de-bruxa (QUEIROZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2002). Outra população escolhida e fenotipada para a identificação de novos genes de resistência foi a obtida do cruzamento entre CCN-51, fonte de genes de resistência à vassoura-de-bruxa, e SIC-864 à podridão parda. Além disso, cerca de outros oito mapas genéticos com diferentes *backgrounds* genéticos foram desenvolvidos pela comunidade científica internacional.

Nesse sentido, este trabalho foi realizado com os objetivos de identificar marcadores moleculares potencialmente ligados a genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda e lançar as bases para o desenvolvimento de um mapa genético molecular a partir da população segregante originada do cruzamento entre CCN-51 e SIC-864, materiais dissimilares daqueles utilizados em mapas anteriormente desenvolvidos.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Obtenção e caracterização fenotípica da população segregante

A população segregante empregada neste estudo foi uma progênie de 67 plantas F1 implantada por mudas seminais, em 1996, na área experimental do Centro de Pesquisas do Cacau da CEPLAC, Ilhéus, BA. Esta população foi obtida a partir do cruzamento entre os acessos SIC-864 (Catongo) e CCN-51 (Figura 1), sendo que o Catongo foi empregado como genitor feminino e o CCN-51 como genitor masculino. Esses acessos são dois genótipos contrastantes para diversas características, dentre elas a resistência às enfermidades vassoura-de-bruxa e podridão parda.



Figura 1 – Padrões de frutos e folhas dos acessos CCN-51 (E) e SIC-864 (D) utilizados na obtenção da população segregante.

Para aumentar a acurácia das avaliações, a população segregante foi ampliada para 237 indivíduos, sendo que o genitor feminino foi o CCN-51 e o genitor masculino o SIC-864. Para tanto, flores do CCN-51 foram polinizadas manualmente com pólen do SIC-864, para obtenção dos frutos, cujas sementes foram plantadas em casa de vegetação, em sacos de polietileno, contendo terriço com textura areno-argilosa.

As plantas seminais obtidas e a progênie inicial, ainda em casa de vegetação, foram clonadas para posterior inoculação com *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora* spp. Os propágulos das plantas matrizes utilizados foram borbulhas, e os porta-enxertos empregados foram plantas seminais do acesso SIC-864.

Desde o ano de 2000, vêm sendo feitas avaliações dos dados fenotípicos da população e, dentre eles, a resistência à vassoura-de-bruxa e à podridão parda. Até o presente estão disponíveis os dados coletados no campo, relativos aos anos de 2000 a 2003, sendo que os dados analisados para essas enfermidades referem-se ao número de frutos sadios, número de frutos com vassoura-de-bruxa, número de frutos com podridão parda, número de vassouras vegetativas e número de vassouras em almofada floral.

4.2.2. Extração e amplificação do DNA

Foi extraído o DNA genômico de folhas em estágio intermediário de maturação de cada uma das 67 plantas F1 e dos genitores (CCN-51 e SIC-864), empregando-se o método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), otimizado por Faleiro et al. (2002). Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm (SAMBROOK et al., 1989). Após a extração, amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, objetivando verificar sua integridade e pureza, sendo as amostras de DNA de boa qualidade diluídas para uma concentração de 10 ng/ μ L.

As reações de PCR (*Polimerase chain reaction*) foram realizadas em um volume total de 15,5 μ L de mistura, contendo: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 0,15 mM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos dois *primers* (*forward and reverse*), meia unidade da enzima *Taq* polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador, conforme o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 60 °C –1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos à temperatura específica para cada *primer* (Tabela 1) + 90 segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C, sendo que após a amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4°C. Foram utilizados 49

primers disponíveis na literatura (LANAUD et al., 1999), conforme disposto na Tabela 1.

4.2.3. Seleção dos *primers* microssatélites polimórficos

Para a seleção dos *primers* microssatélites informativos para a progênie em estudo, procedeu-se as reações de PCR (*Polimerase chain reaction*) com amostras de DNA dos genitores (CCN-51 e SIC-864). As seqüências dos *primers* microssatélites, isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) para a cultura do cacau, foram cedidas pelo CIRAD ao Laboratório de Biotecnologia da CEPLAC/CEPEC (Tabela 1). Os produtos das reações foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida e, após eletroforese, corados com prata de acordo com a metodologia empregada por Creste et al. (2001). Os pares de *primers* selecionados foram agrupados em triplex e marcados com as fluorescências amarela (NED), verde (VIC) e azul (FAM), conforme a especificação do filtro GS 36A 2400, utilizado no seqüenciador automático de DNA ABI 377 utilizado no trabalho.

4.2.4. Formação dos *bulks* de DNA

Conforme proposto por Michelmore et al. (1991), de acordo com os dados fenotípicos disponíveis da progênie, foram identificadas as cinco plantas mais resistentes e as cinco mais susceptíveis à vassoura-de-bruxa e à podridão parda. Quantidades equimolares de DNA de cada planta selecionada foram misturadas para formar os *bulks* de acordo com as diferentes características: *bulk* resistente à vassoura-de-bruxa; *bulk* suscetível à vassoura-de-bruxa; *bulk* resistente à podridão parda; e *bulk* suscetível à podridão parda.

Da mesma forma que os genitores, os *bulks* também foram amplificados via PCR, conforme metodologia descrita no item 4.2.2.

Tabela 1 – *Primers* para microssatélites utilizados nas reações de PCR dos *bulks* e dos genitores

| Nome do Marcador | Seqüência do <i>primer</i> | | T (°C) | C | COR | Estrutura da Repetição |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|-----|-----|--|
| | <i>Foward</i> | <i>Reverse</i> | | | | |
| mTcCIR2 | CAG GGA GCT GTG TTA TTG GTC A | AGT TAT TGT CGG CAA GGA GGA T | 51 | 254 | FAM | (GA) ³ N ⁵ (AG) ² GG (AG) ⁴ |
| mTcCIR3 | CAT CCC AGT ATC TCA TCC ATT CA | CTG CTC ATT TCT TTC ATA TCA | 46 | 249 | VIC | (CT) ²⁰ (TA) ²¹ |
| mTcCIR4 | CGA CTA AAA CCC AAA CCA TCA A | AAT TAT TAG GCA ACC CGA ACT | 51 | 259 | VIC | (TCTCTG) ² (TC) ⁸ |
| mTcCIR7 | ATG CGA ATG ACA ACT GGT | GCT TTC AGT CCT TTG CTT | 51 | 160 | FAM | (TCTCTG) ² (TC) ⁸ |
| mTcCIR9 | ACC ATG CTT CCT CCT TCA | ACA TTT ATA CCC CAA CCA | 51 | 274 | FAM | (CT) ⁸ N ¹⁵ (CT) ⁵ N ⁹ (TC) ¹⁰ |
| mTcCIR10 | ACA GAT GGC CTA CAC ACT | CAA GCA AGC CTC ATA CTC | 46 | 208 | FAM | (TG) ¹³ |
| mTcCIR11 | TTT GGT GAT TAT TAG CAG | GAT TCG ATT TGA TGT GAG | 46 | 298 | NED | (TC) ¹³ |
| mTcCIR13 | CAG TCT AAC AAA GGT GAG | TGC CCC ACT TGA CAA CTA | 46 | 258 | FAM | (AG) ¹³ |
| mTcCIR15 | CAG CCG CCT CTT GTT AG | TAT TTG GGA TTC TTG ATG | 46 | 254 | NED | (TC) ¹⁹ |
| mTcCIR16 | ACC TTC ACC AGC TCA CC | TAA ATT CTA CTA GCA AAT TAC C | 46 | 308 | FAM | (TC) ⁹ N ³⁷ (TC) ¹³ |
| mTcCIR17 | AAG GAT GAA GGA TGT AAG AGA G | CCC ATA CGA GCT GTG AGT | 51 | 271 | NED | (GT) ⁷ N ⁴ (GA) ¹² |
| mTcCIR18 | GAT AGC TAA GGG GAT TGA GGA | GGT AAT TCA ATC ATT TGA GGA TA | 51 | 345 | VIC | (GA) ¹² |
| mTcCIR21 | GTC GTT GTT GAT GTC GGT | GGT GAG TGT GTG TGT TTG TCT | 46 | 157 | NED | (TC) ¹¹ N ⁵ (CA) ¹² |
| mTcCIR22 | ATT CTC GCA AAA ACT TAG | GAT GGA ACG AGT GTA AAT AG | 46 | 289 | VIC | (TC) ¹² N ¹⁴⁶ (CT) ¹⁰ |
| mTcCIR24 | TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA | TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA | 46 | 198 | VIC | (AG) ¹³ |
| mTcCIR25 | CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG | TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT | 46 | 153 | VIC | (CT) ²¹ |
| mTcCIR28 | GAT CAA TCA GAA GCA AAC ACA T | TAA AGC AGC CTA CCA AGA AAA G | 46 | 336 | VIC | (TC) ⁸ |
| mTcCIR29 | CGA CAT TTC GAC TTT CAT C | TTT TGT TTC TTT CTT TTT CAT T | 46 | 172 | VIC | (CA) ¹⁰ |
| mTcCIR30 | TGA AGA TCC TAC TGT TGA G | TGA TAA TAA CTG CTT AGT GG | 46 | 182 | NED | (CA) ¹¹ |
| mTcCIR31 | GCA TGC TTC TTT ACT CCA | TTA CCT GCC AAT GAC TTA C | 46 | 338 | NED | (GT) ¹² |
| mTcCIR33 | TGG GTT GAA GAT TTG GT | CAA CAA TGA AAA TAG GCA | 51 | 285 | NED | (TG) ¹¹ |

| Nome do Marcador | Seqüência do <i>primer</i> | | T (°C) | C | COR | Estrutura da Repetição |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------|-----|-----|------------------------|
| | <i>Foward</i> | <i>Reverse</i> | | | | |
| mTcCIR35 | TTT CCT TGT ATT GAC CTA | ATA TAA ACA CAC TTC AGA GAT | 46 | 235 | FAM | (GT)11 |
| mTcCIR37 | CTG GGT GCT GAT AGA TAA | AAT ACC CTC CAC ACA AAT | 46 | 150 | FAM | (GT)15 |
| mTcCIR40 | AAT CCG ACA GTC TTT AAT C | CCT AGG CCA GAG AAT TGA | 51 | 286 | FAM | (GT)11 |
| mTcCIR42 | TTG CTG AAG TAT CTT TTG AC | GCT CCA CCC CTA TTT G | 46 | 232 | NED | (GT)15 |
| mTcCIR43 | TCA TGA GAA TGC ATG TG | CTG GAC ATG AAG AAG TTA T | 46 | 206 | NED | (GT)11 |
| mTcCIR44 | CCC ATC AAA AGT ATT AGA AG | ATC AAG CAA TGG TCA AC | 51 | 178 | VIC | (GT)15 |
| mTcCIR45 | GTC ATT GCT GTG TG | CAT AGC ATT AAC TGT GTC TG | 51 | 284 | VIC | (GT)11 |
| mTcCIR47 | TTT GCT TTC ACA TAT TGA G | CTC CAA GTG TTT TCA CCA | 46 | 216 | VIC | (CA)10 |
| mTcCIR49 | GTA AAG CAC ATA TAC TAA ATG TCA | TTT AAC CTT TGT AAG AAG TAT TCA | 46 | 197 | FAM | (TG)8 |
| mTcCIR54 | AAC CTC TTG TCA CGT TA | GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT | 46 | 165 | FAM | (CA)15 |
| mTcCIR60 | CGC TAC TAA CAA ACA TCA AA | AGA GCA ACC ATC ACT AAT CA | 51 | 207 | NED | (CT)7 (CA)20 |

(T °C) temperatura de pareamento do *primer*, em °C; e (C) tamanho médio do alelo, em pares de bases. (LANAUD et al., 1999). (COR) NED = fluorescência amarela; VIC = fluorescência verde; FAM = fluorescência azul

4.2.5. Avaliação da funcionalidade dos *primers* para microssatélites

Após as amplificações, a fim de testar a funcionalidade dos *primers* para microssatélites selecionados como polimórficos entre os genitores, adicionou-se 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água, às amostras dos produtos de PCR dos *bulks* e dos genitores, que foram aplicadas em gel de agarose 3%. O gel foi submerso em tampão TBE 10 X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, três horas e meia, a 100 volts. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta.

As amostras dos produtos das reações de PCR dos *bulks* e dos genitores também foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, sendo que a detecção dos marcadores microssatélites foi feita de acordo com os *primers* marcados com fluorescência. Para detecção dos marcadores, foi utilizado o seqüenciador automático de DNA ABI 377, com o software GeneScan. Com base no marcador GeneScan 500 (ROX 500), calculou-se o tamanho de cada fragmento amplificado em número de pares de bases.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Avaliação fenotípica, ampliação e clonagem da população

As médias das características de resistência à vassoura-de-bruxa e de resistência à podridão parda, obtidas nas 67 plantas F1 no período de 2000 a 2003, encontram-se na Tabela 2. Esses dados permitiram afirmar que existe variabilidade fenotípica na população para as características avaliadas (Capítulo 1) e definir as plantas para formar os quatro *bulks*: *bulk* resistente à vassoura-de-bruxa: plantas, 34, 44, 53, 66, e 87; *bulk* suscetível à vassoura-de-bruxa: plantas 3, 26, 29, 35 e 65; *bulk* resistente à podridão parda: plantas 17, 20, 44, 53 e 83; e *bulk* suscetível à podridão parda: plantas 26, 30, 35, 60 e 87.

Tabela 2 – Médias das características de resistência à vassoura-de-bruxa e de resistência à podridão parda por planta por ano de 67 plantas F1 de cacau, entre os anos 2000 e 2003

| VASSOURA-DE-BRUXA | | | | | PODRIDÃO PARDA | | |
|-------------------|------|------|-----|-----|----------------|------|------|
| Planta | NFS | NFVB | NVV | NVA | Planta | NFS | NFPF |
| 1 | 8,50 | 3,00 | 4,5 | 0,5 | 1 | 8,50 | 2,75 |
| 3 | 7,75 | 7,00 | 2,5 | 2,8 | 3 | 7,75 | 1,75 |
| 4 | 1,50 | 1,25 | 1,0 | 2,0 | 4 | 1,50 | 0,00 |
| 6 | 4,75 | 1,75 | 2,3 | 5,3 | 6 | 4,75 | 3,25 |
| 7 | 0,50 | 0,00 | 0,3 | 0,0 | 7 | 0,50 | 0,00 |
| 9 | 2,75 | 2,00 | 0,5 | 1,0 | 9 | 2,75 | 1,75 |
| 10 | 1,75 | 1,00 | 0,8 | 0,8 | 10 | 1,75 | 2,50 |
| 11 | 1,75 | 0,50 | 0,8 | 0,5 | 11 | 1,75 | 1,00 |
| 13 | 0,50 | 0,00 | 0,8 | 1,3 | 13 | 0,50 | 0,00 |
| 14 | 2,00 | 0,75 | 1,8 | 0,0 | 14 | 2,00 | 3,00 |
| 15 | 0,25 | 0,50 | 0,5 | 0,0 | 15 | 0,25 | 1,00 |
| 17 | 5,00 | 1,75 | 1,5 | 0,5 | 17 | 5,00 | 0,75 |
| 18 | 2,00 | 0,00 | 3,0 | 1,8 | 18 | 2,00 | 0,25 |
| 20 | 3,75 | 1,50 | 3,3 | 1,5 | 20 | 3,75 | 0,50 |
| 21 | 2,00 | 1,00 | 1,5 | 1,3 | 21 | 2,00 | 1,50 |
| 22 | 0,50 | 0,25 | 1,3 | 2,5 | 22 | 0,50 | 0,25 |
| 23 | 5,00 | 2,75 | 1,8 | 3,3 | 23 | 5,00 | 3,25 |
| 26 | 5,50 | 6,00 | 2,3 | 5,3 | 26 | 5,50 | 7,50 |
| 29 | 6,25 | 4,25 | 3,5 | 3,0 | 29 | 6,25 | 2,50 |
| 30 | 7,75 | 2,75 | 2,5 | 2,5 | 30 | 7,75 | 3,75 |
| 33 | 0,00 | 0,75 | 0,3 | 0,0 | 33 | 0,00 | 0,00 |
| 34 | 5,50 | 1,00 | 0,5 | 0,8 | 34 | 5,50 | 2,25 |
| 35 | 8,00 | 7,50 | 3,3 | 1,8 | 35 | 8,00 | 4,00 |
| 38 | 4,75 | 1,25 | 2,8 | 1,0 | 38 | 4,75 | 2,25 |
| 39 | 0,00 | 0,75 | 2,3 | 1,0 | 39 | 0,00 | 0,50 |
| 41 | 2,75 | 1,25 | 1,3 | 2,0 | 41 | 2,75 | 1,00 |
| 42 | 1,25 | 1,25 | 1,5 | 1,0 | 42 | 1,25 | 2,00 |
| 43 | 3,50 | 2,00 | 1,8 | 0,5 | 43 | 3,50 | 1,25 |
| 44 | 4,50 | 0,25 | 0,0 | 0,5 | 44 | 4,50 | 1,00 |
| 45 | 2,75 | 0,50 | 0,5 | 0,0 | 45 | 2,75 | 1,00 |
| 46 | 1,50 | 0,25 | 3,8 | 1,3 | 46 | 1,50 | 0,75 |
| 47 | 0,00 | 0,25 | 0,0 | 0,3 | 47 | 0,00 | 0,00 |
| 48 | 3,50 | 2,00 | 3,3 | 2,0 | 48 | 3,50 | 2,25 |
| 49 | 2,00 | 2,25 | 0,0 | 0,5 | 49 | 2,00 | 2,00 |
| 51 | 5,50 | 1,00 | 1,5 | 3,8 | 51 | 5,50 | 2,50 |
| 52 | 1,25 | 0,25 | 1,5 | 1,5 | 52 | 1,25 | 2,00 |
| 53 | 4,00 | 0,75 | 0,5 | 0,8 | 53 | 4,00 | 0,75 |
| 55 | 1,00 | 0,75 | 1,5 | 1,0 | 55 | 1,00 | 3,25 |
| 57 | 2,50 | 1,75 | 3,8 | 2,8 | 57 | 2,50 | 1,25 |
| 58 | 2,50 | 1,25 | 2,5 | 4,0 | 58 | 2,50 | 3,25 |
| 59 | 2,25 | 0,25 | 0,3 | 0,5 | 59 | 2,25 | 1,75 |
| 60 | 7,75 | 2,50 | 4,0 | 3,8 | 60 | 7,75 | 4,75 |
| 61 | 0,75 | 0,00 | 0,8 | 0,5 | 61 | 0,75 | 0,00 |
| 62 | 2,50 | 3,25 | 3,0 | 2,0 | 62 | 2,50 | 2,75 |
| 65 | 5,50 | 4,25 | 7,5 | 4,0 | 65 | 5,50 | 3,00 |
| 66 | 6,50 | 1,50 | 1,8 | 1,3 | 66 | 6,50 | 2,00 |
| 67 | 2,25 | 0,50 | 2,3 | 1,0 | 67 | 2,25 | 1,00 |
| 68 | 0,75 | 0,00 | 0,8 | 0,8 | 68 | 0,75 | 0,50 |
| 69 | 3,50 | 2,50 | 3,0 | 2,0 | 69 | 3,50 | 1,50 |
| 71 | 1,00 | 1,25 | 5,0 | 2,8 | 71 | 1,00 | 0,00 |
| 72 | 3,75 | 1,75 | 4,8 | 2,3 | 72 | 3,75 | 2,75 |
| 73 | 1,50 | 0,25 | 0,8 | 0,8 | 73 | 1,50 | 1,00 |
| 74 | 2,00 | 1,75 | 0,8 | 1,3 | 74 | 2,00 | 3,00 |
| 75 | 0,00 | 0,25 | 0,3 | 0,0 | 75 | 0,00 | 0,00 |
| 76 | 2,25 | 1,50 | 0,0 | 1,5 | 76 | 2,25 | 0,00 |
| 77 | 1,75 | 0,50 | 1,5 | 1,8 | 77 | 1,75 | 0,75 |

| VASSOURA-DE-BRUXA | | | | | PODRIDÃO PARDA | | |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|------------|------------|
| Planta | NFS | NFVB | NVV | NVA | Planta | NFS | NFPP |
| 78 | 1,75 | 0,75 | 5,5 | 1,5 | 78 | 1,75 | 0,75 |
| 79 | 1,75 | 0,50 | 1,5 | 0,3 | 79 | 1,75 | 0,75 |
| 80 | 0,75 | 1,25 | 2,0 | 0,5 | 80 | 0,75 | 0,00 |
| 81 | 2,75 | 2,25 | 0,8 | 0,0 | 81 | 2,75 | 2,50 |
| 83 | 8,50 | 0,50 | 2,8 | 2,3 | 83 | 8,50 | 0,25 |
| 85 | 9,00 | 1,50 | 2,3 | 1,5 | 85 | 9,00 | 2,50 |
| 86 | 4,50 | 0,25 | 2,0 | 1,0 | 86 | 4,50 | 2,00 |
| 87 | 5,00 | 1,75 | 1,0 | 0,0 | 87 | 5,00 | 3,50 |
| 88 | 3,25 | 1,25 | 0,0 | 2,3 | 88 | 3,25 | 1,50 |
| 89 | 5,00 | 2,25 | 3,8 | 0,0 | 89 | 5,00 | 2,00 |
| 90 | 2,25 | 0,75 | 2,0 | 1,3 | 90 | 2,25 | 1,25 |
| N° médio/planta/ano | 3,2 | 1,5 | 1,9 | 1,5 | N° médio/planta/ano | 3,2 | 1,7 |

(NFS) n° de frutos sadios; (NFVB) n° frutos com vassoura-de-bruxa; (NVV) n° de vassouras vegetativas; (NVA) n° de vassouras de almofada floral; (NFPP) n° de frutos com podridão parda. Os dados correspondem à média de cada planta por ano.

Foram obtidas mais 170 plantas, ampliando, assim, a população original para 237 indivíduos, sendo que essas plantas foram clonadas, obtendo-se seis clones de cada uma. Três clones serão inoculados com *C. pernicioso* em casa de vegetação e com *Phytophthora spp.*, em laboratório. Os outros clones serão plantados em três ambientes distintos, para avaliações fenotípicas em condições de campo, nos próximos cinco anos. Essa estratégia contribuirá para a obtenção de dados com repetições no espaço e no tempo, possibilitando avaliações fenotípicas acuradas essenciais para os trabalhos de mapeamento genético e úteis ao melhoramento genético do cacau. A análise da estabilidade da resistência é uma importante estratégia utilizada em diversas espécies (CAMPINHOS, 1996).

4.3.2. Extração e amplificação do DNA

A Figura 2 ilustra que o DNA extraído apresenta-se íntegro e de boa qualidade. A relação entre absorvância a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}) variou de 1,3125 a 2,1611, com média de 1,8024, confirmando que o DNA está livre de proteínas e adequado para as análises moleculares. As amostras de DNA foram obtidas em quantidade satisfatória para as análises, variando de 167,5 a 1.559,0 ng/ μ L, com média de 683,35 ng/ μ L.

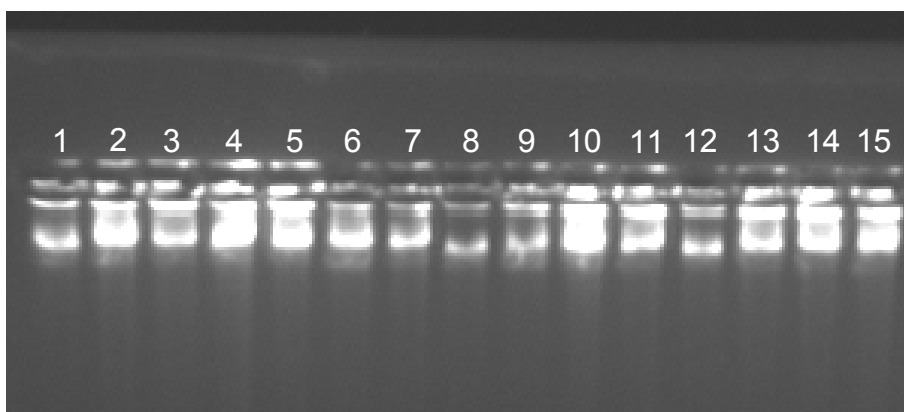


Figura 2 – Padrões de bandas de DNA obtidas em gel de agarose, a 0,8%.

4.3.3. Seleção dos *primers* microssatélites polimórficos

O resultado obtido no *screening* dos 49 *primers* para microssatélites em gel de poliácridamida fixado com prata (Figura 3), permitiu a seleção de 32 *primers*, os quais foram marcados com fluorescência e utilizados na amplificação de amostras de DNA dos *bulks* das plantas resistentes e susceptíveis para ambas as enfermidades e dos genitores.

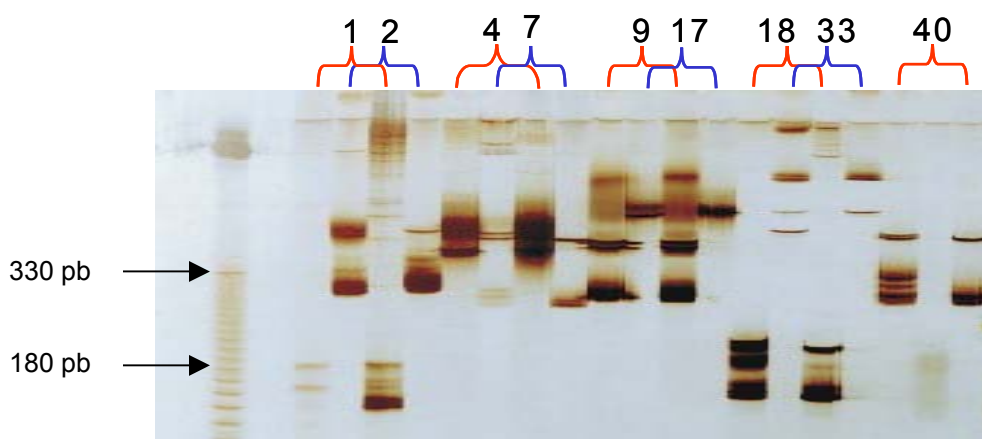


Figura 3 – Padrões de bandas polimórficas obtidas em gel de poliácridamida, corado com prata, obtidas das amplificações dos genitores (SIC-864 e CCN-51). A primeira canaleta corresponde ao padrão de tamanho de fragmento de 10 pb. A numeração corresponde aos seguintes *primers*: (1) mTcCIR1, (2) mTcCIR2, (4) mTcCIR4, (7) mTcCIR7, (9) mTcCIR9, (17) mTcCIR17, (18) *mTcCIR18* e (40) mTcCIR40.

A Tabela 3 contém os comprimentos dos alelos amplificados pelos 32 *primers* nos genitores da população segregante. Esses resultados irão permitir a correta identificação dos alelos de cada par de *primers* nas análises dos produtos PCR em triplex. Pode-se verificar que a maioria dos locos (81,25%) apresenta dois alelos em cada indivíduo, confirmando a natureza heterozigota dos genitores. Além disso, dos 32 *primers* para microssatélites selecionados, 18 apresentam polimorfismo entre os genitores em, pelo menos, um alelo por loco.

Tabela 3 – Comprimento dos alelos amplificados por cada par de *primers* microssatélites.

| Nome do marcador | CCN-51 | | SIC-864 | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Alelo 1 | Alelo 2 | Alelo 1 | Alelo 2 |
| mTcCIR2 | 409 | 227 | 409 | 227 |
| mTcCIR2 | 271 | 185 | 254 | 182 |
| mTcCIR4 | 509 | 303 | 509 | 303 |
| mTcCIR7 | 365 | - | 365 | 203 |
| mTcCIR9 | 316 | 216 | 316 | 216 |
| mTcCIR10 | 203 | 160 | 203 | 160 |
| mTcCIR11 | 509 | 291 | - | 291 |
| mTcCIR13 | 233 | 166 | 233 | 166 |
| mTcCIR15 | 233 | 164 | 216 | 164 |
| mTcCIR16 | - | 233 | 316 | 239 |
| mTcCIR17 | 788 | 556 | - | 556 |
| mTcCIR18 | 160 | 146 | 164 | 145 |
| mTcCIR21 | 207 | 149 | 254 | 173 |
| mTcCIR22 | 160 | 136 | 254 | 173 |
| mTcCIR24 | 365 | 199 | 365 | 199 |
| mTcCIR25 | 303 | 203 | 303 | 203 |
| mTcCIR28 | 211 | 164 | 171 | 158 |
| mTcCIR29 | 246 | 216 | 246 | 216 |
| mTcCIR30 | 246 | 168 | 227 | 168 |
| mTcCIR31 | 136 | 132 | 162 | 132 |
| mTcCIR33 | - | - | - | - |
| mTcCIR35 | 556 | 409 | 556 | 409 |
| mTcCIR37 | 437 | 185 | - | 188 |
| mTcCIR40 | 239 | 203 | 346 | 207 |
| mTcCIR42 | 131 | - | 131 | - |
| mTcCIR43 | 109 | 99 | 110 | 109 |
| mTcCIR44 | 156 | - | 149 | 137 |

| Nome do marcador | CCN-51 | | SIC-864 | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Alelo 1 | Alelo 2 | Alelo 1 | Alelo 2 |
| mTcCIR2 | 409 | 227 | 409 | 227 |
| mTcCIR45 | 227 | 154 | 173 | 148 |
| mTcCIR47 | 173 | 149 | 173 | 149 |
| mTcCIR49 | - | - | - | - |
| mTcCIR54 | 182 | 141 | 182 | 141 |
| mTcCIR60 | 246 | 145 | 149 | 142 |

4.3.3. Identificação dos candidatos a marcadores genéticos

A Figura 4 ilustra os resultados de separação dos produtos PCR em gel de agarose a 3%. Embora não permita analisar o polimorfismo, essa estratégia permitiu comprovar a funcionalidade dos *primers* microssatélites selecionados como polimórficos nas reações PCR.

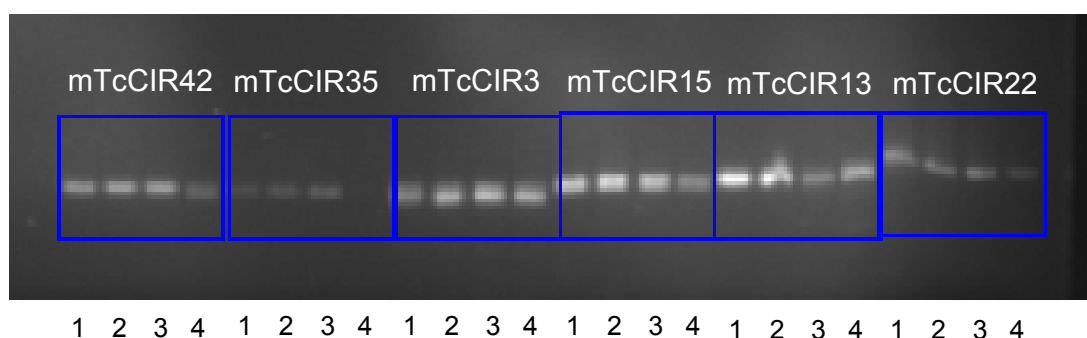


Figura 4 – Padrões de bandas de DNA obtidas em gel de agarose a 3%, de alguns *primers* microssatélites selecionados. (1) *Bulk R VB*; (2) *bulk S VB*; (3) *bulk R PP*; e (4) *bulk S PP*.

Finalmente, todos os produtos de reações que apresentaram bandas no gel de agarose foram aplicados no gel de poliacrilamida a 6%, no seqüenciador automático de DNA ABI 377. A Figura 5 corresponde ao padrão de bandas obtidos em *triplex* para os *bulks* contrastantes para a característica à vassoura-de-bruxa.

Diante dos resultados obtidos, pode-se identificar alguns polimorfismos potencialmente ligados a genes de resistência às enfermidades vassoura-de-bruxa e podridão parda. Esta afirmativa precisa ser confirmada amplificando-se todos os indivíduos da população após acurada fenotipagem decorrente das inoculações

controladas com os patógenos, em casa de vegetação. Adicionalmente, pode-se afirmar que a seleção e caracterização desses *primers* poderá contribuir para futuros trabalhos envolvendo esta e outras populações com potencial para o mapeamento e melhoramento genético do cacaueteiro.

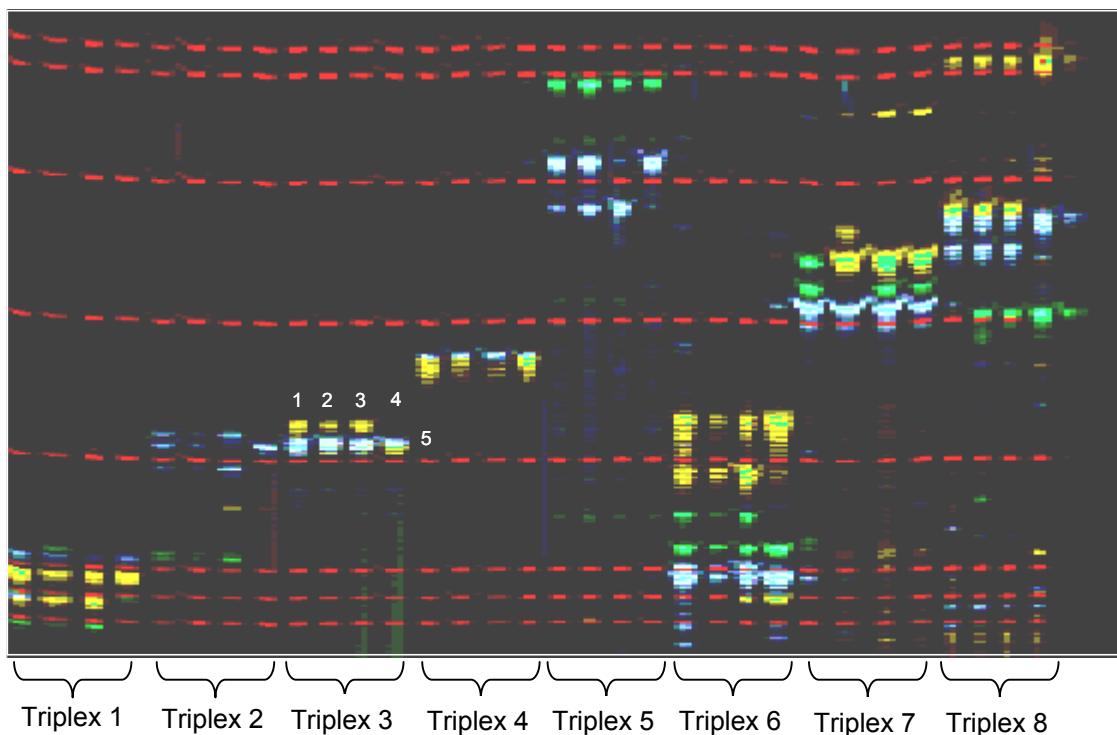


Figura 5 – Padrões de bandas de DNA obtidas em gel de poliacrilamida 6%, dos *bulks* amplificados pelos *triplex* de *primers* microssatélites. (1) *Bulk* R VB; (2) *bulk* S VB; (3) *bulk* R PP; (4) *bulk* S PP; e (5) padrão de peso molecular. Triplex 1 (*primers* mTcCIR 37, 25 e 21); Triplex 2 (*primers* mTcCIR 29, 30 e 49); Triplex 3 (*primers* mTcCIR 24, 43 e 10); Triplex 4 (*primers* mTcCIR 47, 42 e 35); Triplex 5 (*primers* mTcCIR 16, 28 e 31); Triplex 6 (*primers* mTcCIR 7, 44 e 60); Triplex 7 (*primers* mTcCIR 2, 4 e 17); e Triplex 8 (*primers* mTcCIR 9, 45 e 33).

4.4. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o presente constituem-se em elementos preliminares para a realização de novas etapas do projeto de pesquisa “Uso das técnicas de biologia molecular na busca de novas fontes de resistência do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) à vassoura-de-bruxa, em desenvolvimento no Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC).

Inicialmente, três clones das 237 plantas, serão alvo de inoculações com os patógenos *C. pernicioso* e *Phytophthora* spp, em casa de vegetação e laboratório.

Essas inoculações objetivarão avaliar os níveis de resistência da população que, posteriormente, será implantada em três diferentes ambientes, visando dar continuidade às avaliações fenotípicas.

A análise de co-segregação entre os polimorfismos encontrados entre os *bulks* contrastantes para resistência a doenças, será feita nesta população de 237 indivíduos, sendo que este trabalho pode ser feito inicialmente na população das 67 plantas F1.

A acurácia dos dados fenotípicos será melhorada a cada ano, acrescentando-se os dados das avaliações realizadas no campo, a partir de 2004, e também no laboratório.

Finalmente, será construído um mapa genético de ligação saturado, com o emprego de outros marcadores moleculares, visando a obtenção de um mapa com um nível de saturação que permita a identificação não só de novos genes de resistência mas também a identificação de QTLs para outras características agrônômicas de interesse. Isso, certamente, contribuirá de forma positiva para o aprimoramento dos programas de melhoramento genético da cultura do cacau.

4.5. AGRADECIMENTOS

Ao *Common Fund of Commodities (CFC)*, *International Cocoa Organization (ICCO)* e à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) – CFC/ICCO/CEPLAC – *Biomol Project*, pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos para o curso de Mestrado do primeiro autor.

Ao Dr. José Luís Bezerra, pelas correções no *abstract*.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPINHOS, E. N. **Análise de QTLs em *Eucalyptus grandis*: Estabilidade da expressão, mapeamento localizado e preservação de folhas para análise RAPD**. 1996. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

CRESTE, S.; TULLMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299 – 306. 2001.

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

FALEIRO, F. G. et. al. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, v. 2, p. 31 – 34. 2002.

LANAUD, C. et al.. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2141 – 2152. 1999.

MEDEIROS, A.G. **Sporulation of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. in relation to epidemiology and chemical control of black pod disease**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – University of California, Riverside. 1977. 220 f.

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 genomic regions by using segregating populations. **Genetics**, v. 88, p. 9828 – 9832. 1991.

QUEIROZ, V. T. et al. 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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 653 p.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As análises dos dados fenotípicos evidenciaram o caráter segregante da progênie, sobretudo para resistência às enfermidades vassoura-de-bruxa e podridão parda, sendo que a natureza heterozigota da progênie foi confirmada pelos dados moleculares.

Os 32 *primers* selecionados e utilizados nas ampliações evidenciaram polimorfismos entre os genitores e serão utilizados na construção do mapa genético.

Os resultados das análises dos dados moleculares permitiram identificar alguns polimorfismos que podem estar ligados a genes de resistência às enfermidades vassoura-de-bruxa e podridão parda.

A progênie de SIC-864 X CCN-51 segrega para vários caracteres, inclusive para resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda. O seu caráter segregante se constitui num grande potencial para a realização de estudos genéticos em nível molecular, o que justificou a sua escolha para a construção de um mapa genético, com base em marcadores microssatélites; isso cria uma perspectiva muito forte para a identificação de novos genes de resistência do cacaueteiro às enfermidades vassoura-de-bruxa e podridão parda e, também, para o mapeamento de QTLs para outras características agronômicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ALVERSON, W. S. et al. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1474 – 1486. 1999.

ANDEBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the brazilian amazon. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, Lome, Togo, **Proceedings...** 1984. p. 395 – 402.

APG II 2003. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The Linnean Society of London, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399 – 436. 2003.

BARTLEY, B. G. D. Twenty years of cocoa breeding at the Imperial College of Tropical Agriculture. In: TRINIDAD INTERNATIONAL CACAO RESEARCH CONFERENCE, Trinidad, **Proceedings...** 1967. p. 29 – 34.

BHATTRAMAKKI, D. et al. An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Genome**, v. 43, p. 988 – 1002. 2000.

BONDAR, G. **Cacau branco na Bahia. Espécies e variedades de cacau.** Boletim da Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado da Bahia, v. 20, p. 7 – 30. 1958.

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**, v. 28, p. 59 – 66. 2003.

BRUNELLI, K. R.; SILVA, H. P.; CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27(2), p. 134 – 140. 2002.

BUTCHER, P. A.; MORAN, G. F. Genetic linkage mapping in *Acacia mangium*. 2. Development of an integrated map from two outbred pedigrees using RFLP and microsatellite loci. **Theoretical Applied Genetics**, v. 101, p. 594 – 605. 2000.

CAMPO, E. C.; ANDÍA, F. C. **Cultivo y beneficio del cacao CCN-51**. Quito: El Conejo, 1997. 136 p.

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

CROUZILLAT, D. et al. *Theobroma cacao* L: A Genetic Linkage Map and Quantitative Trait Loci Analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v. 93, p. 205 – 214. 1996.

CROUZILLAT, D. et al. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* L. using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. **Euphytica**, v. 114, p. 25 – 36. 2000.

CORRÊA, R. X. **Mapeamento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) utilizando marcadores RAPD**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

DETTORI, M. T.; QUARTA, R.; VERDE, I. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. **Genome**, v. 44, p. 783 – 790. 2001.

FALEIRO, F.G. et al. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica** (submetido). 2004.

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1387 – 1397. 2003.

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

GRAMACHO, I. C. P. et al. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus: CEPLAC/CEDEX, 1992. 124 p.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p. 1121 – 1137. 1994.

GUPTA, P. K. et al. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theoretical Applied Genetics**, v. 105, p. 413 – 422. 2002.

HAUSSMANN, B. I. G. et al. Construction of a combined sorghum linkage map from two recombinant inbred populations using AFLP, SSR, RFLP, and RAPD markers, and comparison with other sorghum maps. **Theoretical Applied Genetics**, v. 105, p. 629 – 637. 2002.

HORI, K. et al. Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. **Theoretical Applied Genetics**, v. 107, p. 806 – 813. 2003.

JOUBEUR T. et al. Development of a second-generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. **Genome**, v. 43, p. 649 – 655. 2000.

LANAUD, C. et al. A Genetic Linkage Map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical Applied Genetics**, v. 91, p. 987 – 993. 1995.

LANAUD, C. et al. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. In: International Cocoa Research Conference, 12, 1996, Trinidad, **Proceedings...** p. 99 – 105.

LANAUD, C. et al. Characterization and genetic mapping of resistance and defense gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, v. 13, p. 211 – 227. 2004.

LIEBHARD, R. et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v. 10, p. 217 – 241. 2002.

LOCKWOOD, G. A comparison of the growth and yield during a 20 years period of Amelonado and Upper Amazon hybrid cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. **Euphytica**, v. 24(3), p. 647 – 658. 1976.

LUZ, E. D. M. N; SILVA, S. D. V. M. Podridão parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacau. In: LUZ, E. D. M. N. et al. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 175 – 265.

MARITA, J. M. et al. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop Science**, v. 41, p.1305 – 1316. 2001.

McCOUCH, S. R. et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Res**, v. 9, p. 199 – 207. 2002.

MEDEIROS, A. G. **Combate à podridão parda com o emprego do cacau Catongo**. CEPLAC/CEPEC. 6 p. 1965.

MOTILAL, L. A. et al. *Theobroma cacao* L.: Genome map and QTLs for *Phytophthora palmivora* resistance. In: International Cocoa Research Conference, 13, 2000, Lagos. **Proceedings...** v. 1, p. 111 – 118.

PEARL, H. M. et al. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 829 – 835. 2004.

PEREIRA, J. L. M. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v. 1(1), p. 79 – 81. 1991.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Boletim Técnico n° 181. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1998 34 p.

PUGH, T. et al. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 1151 – 1161. 2004.

RISTERUCCI, A. M. et al. A High-density Linkage Map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical Applied Genetics**, v. 101, p. 948 – 955. 2000.

ROSÁRIO, M. et al. **Cacau: História e Evolução no Mundo**. Ilhéus: CEPLAC, 1978. 46 p.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiros. **Agrotropica**, v. 14, n. 1, p. 1 – 28. 2003.

SOUZA, C.A.S; DIAS, L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda, 2001. p. 1 – 47.

TEMNYKH, S. et al. Mapping and genome organisation of microsatellites sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 100, p. 697 – 712. 2000.

THAMARUS, K. A. et al. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical Applied Genetics**, v. 104, p. 379 – 387. 2002.

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