

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



MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À
VASSOURA-DE-BRUXA EM ALMOFADAS FLORAIS DE
Theobroma cacao L.

DANIELA VIANA DA SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2011

DANIELA VIANA DA SILVA

**MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À
VASSOURA-DE-BRUXA EM ALMOFADAS FLORAIS DE
Theobroma cacao L.**

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2011

586

Silva, Daniela Viana da.

Mapeamento genético da resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais de *Theobroma cacao* L. / Daniela Viana da Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2011. xi, 72f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo.

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

Inclui bibliografia.

1. Cacao – Melhoramento genético. 2. Marcadores genéticos. 3. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). I. Título.

CDD 633.74

DANIELA VIANA DA SILVA

MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA À
VASSOURA-DE-BRUXA EM ALMOFADAS FLORAIS DE
Theobroma cacao L.

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Aprovada: 25 de fevereiro de 2011

Dr. Carlos Ivan Aguilar-Vildoso
(UESC)

Dra. Anete Pereira de Souza
(UNICAMP)

Dr. Carlos Priminho Pirovani
(UESC)

Dra. Ioná Santos Araújo
(UFERSA – Orientadora)

“Um sábio não é aquele que a tudo responde, mas sim aquele que sabe abstrair do cotidiano as respostas para a sua complementaridade interior.”

(DVS)

Aos meus pais, Maria das Graças e Raimundo, meu irmão Diogo, minha sobrinha Maria Vitória e meu namorado Samuel, pessoas que muito amo e que enriquecem o meu viver.

DEDICO

Aos que percorreram este caminho alicerçando-me com vibrações que ecoaram garra, integridade e perseverança.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, minha fortaleza e fonte de todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, MARIA DAS GRAÇAS e RAIMUNDO, que semearam no meu ser a humildade e a integridade essenciais para a valorização de cada conquista.

Ao meu irmão, DIOGO, que sempre me guiou no caminho da honestidade e do trabalho, ensinando-me o quão valioso e gratificante é o significado da persistência na caminhada do viver.

À minha sobrinha, MARIA VITÓRIA, pessoinha muito amada e que enriquece os meus dias, fazendo-me crer que a simplicidade de um sorriso inocente de criança é a melhor recompensa para um rosto cansado do árduo cotidiano.

Ao meu namorado, SAMUEL, pela companhia, atenção e amor demonstrados.

A todos os demais familiares, pessoas de grande importância na construção do meu caráter.

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

Ao Dr. RONAN XAVIER CORRÊA, por toda atenção e supervisão que intensificaram o andamento do projeto.

Ao Dr. UILSON VANDERLEI LOPES, por todo o apoio demonstrado e pela adição de conhecimentos.

Ao Dr. CARLOS IVAN AGUILAR-VILDOSO, por toda atenção disponibilizada e pela contribuição contínua, alicerçando e enriquecendo o meu aprendizado.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia e Genética, que vivenciaram momentos de aprendizado, humor e amizade.

À *MARS* – Centro de Ciências do Cacau, por disponibilizar e manter a população de *Theobroma cacao* L. utilizada neste estudo.

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

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

Ao PPGGBM, pelo mestrado em Genética e Biologia Molecular.

A CAPES, pela concessão da bolsa à discente.

À FAPESB e ao CNPq, pela concessão de apoio financeiro ao projeto.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, com o andamento do projeto e com a minha qualificação profissional.

Enfim, os meus fartos agradecimentos a cada rabisco aqui presente que enfatizou a infinita gratidão a todos que demonstraram que amizade, competência e humildade são os requisitos básicos para a formação de qualquer ser humano.

SUMÁRIO

EXTRATO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. A espécie <i>Theobroma cacao</i> L.	5
2.1.1. Classificação botânica e origem.....	5
2.1.2. Importância econômica	6
2.2. Almofada floral.....	7
2.3. Interação planta-patógeno	8
2.4. <i>Moniliophthora perniciosa</i>	10
2.5. Marcadores moleculares.....	11
2.6. Melhoramento genético do cacau	13
2.7. Mapas genéticos.....	14
2.8. QTL	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18

3.1. Material vegetal	18
3.2. Análise fenotípica	19
3.3. Estudo da herança da resistência	22
3.4. Análise molecular	22
3.4.1. Extração de DNA	22
3.4.2. Detecção de polimorfismos utilizando marcadores RGH's	23
3.4.3. Análise de BSA	25
3.4.4. Genotipagem da população utilizando marcadores RGH's ...	25
3.4.5. Genotipagem da população utilizando marcadores SSR	25
3.4.6. SSCP (Polimorfismo Conformacional Fita Simples)	26
3.5. Obtenção de mapas de ligação	27
3.6. Análise de QTL's	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Estatística descritiva	28
4.2. Distribuições de freqüência das características fenotípicas	31
4.3. Hipóteses mendelianas para herança da resistência	36
4.4. Obtenção de DNA.....	42
4.5. <i>Screening</i> dos marcadores RGH's.....	43
4.6. Análise de <i>Bulks</i> Segregantes (BSA) com marcadores RGH's ...	44
4.7. Mapeamento da população segregante.....	47
4.7.1. Genotipagem utilizando marcadores RGH's	47
4.7.2. Genotipagem utilizando marcadores microssatélites (SSR) ..	48
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

EXTRATO

SILVA, Daniela Viana. M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. **Mapeamento genético da resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais de *Theobroma cacao* L.** Orientadora: Dra. Ioná Santos Araújo. Co-orientadores: Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dr. Uilson Vanderlei Lopes.

Theobroma cacao L. é uma espécie alógama, perene, monóica, cauliflora e composta de inflorescências chamadas de almofadas florais. Dentre as 22 espécies que compreende o gênero *Theobroma*, *T. cacao* é a de maior importância econômica devido à produção de chocolate a partir de suas amêndoas. Na década de 1980, as plantações da região sul da Bahia foram infectadas pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005), causador da doença vassoura-de-bruxa, que resultou em grandes perdas na produção. Este fungo coloniza almofadas florais, frutos e ramos vegetativos. Os tecidos florais infectados por este patógeno apresentam hipertrofia e geralmente se fundem. A identificação de regiões genômicas envolvidas com a resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais é um estudo de grande importância para o melhoramento do cacau, já que as mesmas posteriormente darão origem aos frutos. Neste sentido, o objetivo central do trabalho foi caracterizar e mapear geneticamente uma população de *T. cacao*, oriunda do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51, quanto à resistência à vassoura-de-bruxa nas almofadas florais. Os

experimentos foram conduzidos sob duas condições distintas, uma de baixo e outra de alto potencial de inóculo. Avaliações fenotípicas foram realizadas nos genitores e em todas as 282 plantas constituintes da população quanto à incidência de vassoura-de-bruxa nas almofadas florais, por três vezes, em cada condição. Os DNAs dos genitores da população foram amplificados com doze marcadores RGH's (Homólogos de Genes de Resistência). Nove fenótipos resistentes e nove fenótipos suscetíveis foram selecionados para a aplicação da técnica de Análise de *Bulks* Segregantes (BSA). Os marcadores RGH's contrastantes nos *bulks* foram genotipados na população, assim como um conjunto de 93 marcadores microsatélites (SSR). Os resultados provenientes dos experimentos fenotípicos indicaram que o grupo de indivíduos mais suscetíveis apresentou-se na proporção de 1/64, o qual indicaria que eles seriam homocigotos recessivos para poucos genes. Os dados de herança confirmaram a presença de genes de resistência em ambos os genitores. Dos doze marcadores RGH's utilizados, sete mostraram-se polimórficos entre os genitores; destes sete, dois RGH's foram segregantes e possibilitaram discriminar grupos de marcas específicas para os *bulks*. Tais marcadores foram utilizados na amplificação dos DNAs das plantas da população. Dos 93 SSR utilizados, 55 apresentaram-se distribuídos em grupos de ligação. Foram identificadas associações significativas entre a característica fenotípica estudada e os marcadores moleculares presentes, principalmente nos grupos de ligação um, quatro, sete e nove. Conclui-se assim, que a herança vinculada com a resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais deve ser quantitativa, com efeito de dominância entre os alelos e sob influência de poucos genes.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores moleculares, TSH 1188, CCN 51, Herança da resistência, Melhoramento genético.

ABSTRACT

SILVA, Daniela Viana. M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2011. **Genetic mapping for resistance to witches' broom in flower cushions of *Theobroma cacao* L.** Advisor: Dra. Ioná Santos Araújo. Committee members: Dr. Ronan Xavier Corrêa and Dr. Uilson Vanderlei Lopes.

Theobroma cacao L. is pollinating, perennial, monoecious, cauliflora specie and composed of inflorescences called flower cushions. Among the 22 species of the *Theobroma* genere, *T. cacao* is the most economically important due to the production of chocolate from their beans. In the 1980s, the plantations of southern Bahia have been infected by *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (Aime & Phillips-Mora, 2005) basidiomycete who cause the witches' broom disease, which resulted in great losses in production. This fungus colonizes flower cushions, fruits and vegetative shoots. The floral tissues infected by this pathogen have hypertrophy and often melt. The identification of genomic regions involved in resistance to witches' broom in flower cushions is a study of great importance for improvement of cocoa, as they later give rise to fruits. Thus, the mean objective of this study was to characterize and genetically mapping a population of *T. cacao*, from the cross between the TSH 1188 and CCN 51, clones for resistance to witches' broom in the inflorescences. The experiments were conducted under two different conditions, a low and a high inoculation potential. Phenotypic evaluations were conducted in the

genitors and all the 282 plant of the population regarding the incidence of witches' broom in buds three times in each condition. The genitors' DNAs of the population were amplified with twelve RGH's markers (Resistance Gene Homologues). Nine resistant and nine susceptible phenotypes were selected for the application of Bulk Segregant Analysis (BSA) technique. The RGH's markers contrasting in the bulks were genotyped in the progeny, as well as a set of 93 microsatellite markers (SSR). The results from the phenotypic analysis indicated that the most susceptible group of individuals presented at a ratio of 1 / 64, which would indicate that they would be recessive homozygous for a few genes. The inheritance data confirmed the presence of resistance genes in both parents. Of the twelve RGH's markers used, seven showed be polymorphic between the genitors and, of these seven, two were segregating RGH's and discriminated groups of specific brands for the bulks. Each marker was used in the amplification of the each population DNA. Of the 93 SSR used, 55 were distributed in the linkage groups. We identified significant associations between phenotypic characteristics and molecular markers studied, mainly present in the one, four, seven and nine linkage groups. It follows therefore, that the inheritance linked to witches' broom inflorescences resistance should be quantitative, with dominance effect among alleles and under the influence of a few genes.

KEYWORDS: Molecular markers, TSH 1188, CCN 51, Inheritance of resistance, Genetic breeding.

1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta monóica, perene, alógama e composta por inflorescências denominadas almofadas florais (DIAS, 2001). Pertence ao gênero *Theobroma*, família Malvaceae e a ordem Malvales (ALVERSON *et al.*, 1999).

O cultivo desta monocultura estende-se por territórios das Américas Central e do Sul, Ásia, África e Oceania. A produção mundial de amêndoas de cacau no ano de 2008 obteve a seguinte classificação de acordo com a FAO (2011): Costa do Marfim (1.370.000 mil toneladas), Indonésia (792.761 mil toneladas), Gana (700.000 mil toneladas), Nigéria (500.000 mil toneladas), Brasil (202.030 mil toneladas), Camarões (187.532 mil toneladas), Equador (94.300 mil toneladas), Togo (80.000 mil toneladas), Papua Nova Guiné (48.800 mil toneladas), Colômbia (44.740 mil toneladas), República Dominicana (42.154 mil toneladas), Peru (34.003 mil toneladas), Malásia (27.955 mil toneladas), México (27.548 mil toneladas), Venezuela (20.457 mil toneladas), Guiné (13.000 mil toneladas), Uganda (13.000 mil toneladas), Guatemala (11.807 mil toneladas), Índia (10.560 mil toneladas), Serra Leoa (10.500 mil toneladas).

No Brasil, o estado da Bahia é o maior produtor, com 137.459 mil toneladas produzidas no ano de 2005, seguido pelo Pará com 38.119 mil toneladas, Rondônia com 19.719 mil toneladas e Espírito Santo com 11.782 mil toneladas (IBGE/SIDRA, 2011).

A cacauicultura fortaleceu-se pela importância nas questões alimentares e industriais, já que as suas amêndoas são a matéria-prima para a produção de chocolates e derivados, como manteiga de cacau, licor e polpas (PURDY & SCHMIDT, 1996). No entanto, vários fatores favoreceram o declínio da lavoura cacauieira, desde fatores climáticos adversos, desvalorização do produto no mercado internacional e avanço de doenças. Dentre as mais importantes destaca-se a vassoura-de-bruxa (CEPLAC, 2003).

A vassoura-de-bruxa é causada por um basidiomiceto chamado *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Esta patologia foi constatada nas plantações sul baianas na década de 80 (PEREIRA *et al.*, 1989), provavelmente oriunda da Amazônia, e acarretou em perdas na produção, dizimação de propriedades, êxodo rural e crise no setor financeiro. A dispersão do fungo ocorreu de forma eficiente na região sul da Bahia devido às condições climáticas e predominância de cacauzeiros da variedade comum, condição de uniformidade genética na região (CASCARDO & FIGUEIRA, 1995).

O *M. perniciosa* possui fase saprofítica e parasítica, e ocasiona mudanças morfológicas, fisiológicas e histológicas tanto nos frutos, quanto nas brotações vegetativas e nas almofadas florais (FRIAS *et al.*, 1991; ORCHARD *et al.*, 1994; SILVA, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2003). Quando infectadas pelo fungo, as almofadas florais sofrem hipertrofia e se fundem, o que as torna inviáveis para a polinização e produção de frutos. No intuito de amenizar as perdas causadas pelo fungo, muitas estratégias são realizadas, desde podas fitossanitárias, controles químicos e biológicos, até o melhoramento genético (OLIVEIRA & LUZ, 2005). O melhoramento voltado à resistência é influenciado tanto por características do hospedeiro quanto por fatores do patógeno (RIOS-RUIZ, 2001). Em plantas que possuem cultura perene é de extrema importância a presença de vários genes de resistência, pois o acúmulo dos mesmos acarreta no aumento da dificuldade do patógeno em transpor a defesa da planta (DIAS, 2001).

No melhoramento vegetal a aplicabilidade de ferramentas moleculares possibilita explicar sobre as diferenças presentes no DNA, e o quanto as mesmas podem acarretar em alterações fenotípicas, sejam elas de resistência, produtividade, entre outras. E neste âmbito, uma das ferramentas de extrema importância e funcionalidade é a utilização de marcadores moleculares. Tal técnica permite a

detecção de polimorfismos genéticos em qualquer estágio da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos e a identificação de genótipos sem influência ambiental (FALEIRO, 2007). Existem diversos tipos de marcadores moleculares, dentre os quais, destacam-se na cultura do cacau o uso dos microssatélites ou Sequência Simples Repetida (SSR) e os Homólogos de Genes de Resistência (RGH) (KUHN *et al.*, 2003), os quais vêm sendo utilizados no mapeamento genético e na caracterização de germoplasma.

Os microssatélites são seqüências curtas de DNA repetidas em tandem, e seu polimorfismo é proveniente de erros da DNA polimerase ou por crossing-over entre os cromossomos (HANCOCK, 2000). Os marcadores SSR são obtidos por via de amplificação de regiões específicas que flanqueiam estes microssatélites. Por outro lado, os RGH's são marcadores genes candidatos, ou seja, são seqüências de DNA que se associam a famílias de genes que proporcionam resistência às doenças (KUHN *et al.*, 2003; BORRONE *et al.*, 2004; CLEMENT *et al.*, 2003). Para a sua detecção é necessário a utilização da técnica de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples), pois a mesma permite identificar a variação da seqüência de nucleotídeos de cada fragmento responsável pela estrutura secundária.

Para uma rápida detecção de regiões específicas do genoma utiliza-se a técnica de BSA (Análise de *Bulks* Segregantes ou *Bulk Segregant Analysis*) proposta por Michelmore *et al.* (1991), a qual consiste na comparação entre grupos (*Bulks*) de amostras idênticas para determinadas características e a detecção de distinções entre amostras de DNAs provenientes de populações segregantes.

Os marcadores moleculares baseados em amplificações de fragmentos de DNA por reação de polimerase em cadeia são bastante utilizados em análises de caracterizações de populações e detecção de QTL (*Quantitative Trait Loci* ou Locus de características quantitativas) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Nas últimas décadas, houve uma ampliação considerável das metodologias da genética molecular e da sua aplicabilidade em programas de melhoramento vegetal. Estratégias vêm sendo desenvolvidas para gerar informações adicionais que acarretem no progresso a nível molecular de análises relacionadas com resistência à patógenos. E neste sentido, trabalhos com avaliações fenotípicas

acuradas em populações de cacauzeiros visando caracterização de resistência são fundamentais.

No contexto da interação *M. pernicioso* e *T. cacao*, o presente estudo foi realizado com os objetivos de: caracterizar e avaliar uma população segregante quanto à resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais; detectar variabilidade genética nos genitores; discriminar marcas para a característica em análise e genotipar a população. Desta forma, buscou-se determinar uma metodologia de inoculação e avaliação de infecção de cacau por *M. pernicioso* em condições de campo, elucidar o tipo de herança relacionada com a resistência nas almofadas florais, e identificar regiões genômicas (QTL's) relevantes para essa característica, as quais são de fundamental importância econômica para a cultura do cacau, já que as almofadas florais originam o produto comercial, os frutos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espécie *Theobroma cacao* L.

2.1.1. Classificação botânica e origem

A espécie *Theobroma cacao* L. pertence ao gênero *Theobroma*, família Malvaceae e a ordem Malvales (ALVERSON *et al.*, 1999). Das 22 espécies que compõem este gênero, o cacau (*T. cacao*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Schum) são utilizados comercialmente no Brasil (BARTLEY, 2005).

O cacaueiro é uma planta nativa das florestas úmidas das Américas do Sul e Central e o seu provável centro de origem são as nascentes do alto Amazonas (DIAS, 2001). É uma espécie alógama, perene e com genoma composto por $2n=20$ cromossomos (FIGUEIRA *et al.*, 1992).

Segundo Cuatrecasas (1964), a dispersão do cacau a partir da sua origem acarretou no surgimento de dois grupos raciais distintos: os crioulos e os forasteiros. O grupo crioulo era o cacau cultivado na região leste da cordilheira dos Andes, abrangendo territórios desde a América do Sul até o México. O grupo forasteiro era o cacau cultivado na região oeste da cordilheira dos Andes, abrangendo áreas do norte do Brasil até as Guianas.

O grupo crioulo é considerado como o primeiro cacau a ser domesticado, possui frutos com casca enrugada, grandes, e produz o melhor chocolate. Já o

grupo forasteiro é considerado como o verdadeiro cacau brasileiro, possui frutos com casca lisa e ovóides (ROSÁRIO *et al.*, 1978). Além disso, Marita *et al.*, (2001) afirmam que o grupo forasteiro é o que apresenta a maior diversidade genética, assim como, o melhor desempenho agrônômico.

Com a hibridação decorrente destes dois grupos surgiu um terceiro grupo, o Trinitário. Este grupo apresenta amêndoas que variam de tonalidade desde o roxo escuro até o amarelo (DIAS, 2001).

Em 1746, um colono francês Luís Frederico Warneaux trouxe amêndoas do Pará para a Bahia, e as plantou na fazenda Cubículo no atual município de Canavieiras (VELLO & GARCIA, 1971), inserindo o cacau na região baiana.

Seguindo ainda a ordem cronológica da história de dispersão do cacau, em 1822 as amêndoas foram transportadas do Brasil para a Ilha do Príncipe na África, de onde se dispersou posteriormente para a ilha de Fernando Pó, Gana, Nigéria, Costa do Marfim (maior produtora atual em escala mundial de amêndoas) e Togo (PAULIN & ESKES, 1995). A dispersão pela Ásia, mais precisamente na região oeste do continente asiático, e na Oceania foi decorrente da atuação dos alemães na República de Camarões (WOOD, 1991).

2.1.2. Importância econômica

Menezes & Carmo-Neto (1993) relatam que o cultivo do cacau é uma importante atividade agrícola para muitos países em desenvolvimento situados nas regiões tropicais. O seu produto comercial de maior valor é a semente, devidamente fermentada e seca, a qual passa a ser denominada amêndoa. A amêndoa é usada na fabricação do chocolate e confeitos sob as mais variadas formas e também pela utilização da manteiga de cacau nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. A polpa de cacau também é muito apreciada e vem conquistando mercados. O mel de cacau, extraído da polpa de suas sementes, pode ser utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias de boa qualidade.

O setor produtivo que gira em torno da cacauicultura aborda as mais distintas áreas, desde o produtor rural das amêndoas, os compradores destas, as empresas

que estão envolvidas com importações e exportações, indústrias alimentícias e de cosméticos e as distribuidoras. Todo este setor movimenta recursos financeiros de 2,3 bilhões de reais (ICCO, 2009). Segundo Guyton (2006), cerca de 50 países, com aproximadamente dois milhões de produtores, utilizam a cacauicultura como fonte relevante de renda econômica.

Na safra de 2007/2008 a produção mundial foi de 3,6 milhões de toneladas, sendo que deste total, as Américas do Sul e Central contribuíram com 11%, enquanto que os países africanos totalizaram 70% da produção (ICCO, 2009).

Com os avanços das enfermidades que assolaram o cacauero, como a vassoura-de-bruxa, muitas perdas e dizimações de propriedades acarretaram em falências e êxodo rural. Dentre os anos de 1990 e 2003, houve a redução de 356,2 mil toneladas para 170,0 mil toneladas na produção brasileira.

2.2. Almofada floral

As almofadas florais do cacauero são caulifloras e hermafroditas e se estendem desde o tronco até as ramificações mais desenvolvidas. A depender da idade do cacauero a dispersão das almofadas florais se torna mais abundante, ou seja, em plantas mais jovens as almofadas florais são verificadas no tronco, a partir do seu desenvolvimento, percebe-se que elas surgem também nos galhos (DIAS, 2001).

A almofada floral possui sépalas e pétalas, estaminódios e estames, e o número de óvulos presentes no seu ovário oscilam entre 30 e 70. Os órgãos reprodutivos apresentam-se protegidos pelas sépalas e pelos estaminódios, esta organização necessita de agentes externos para a realização da polinização (DIAS, 2001).

As espécies que polinizam o cacauero são micro moscas pertencentes ao gênero *Forcipomyia*, pois as mesmas depositam quantidade suficiente de pólen para a formação do fruto. Estas moscas habitam as regiões onde há a monocultura, estabelecendo-se em epífitas e nos pseudocaulos das bananeiras. Mesmo assim, insetos como formigas e pulgões podem polinizar o cacauero (CHAPMAN & SORIA,

1983). A flor que não é polinizada se desprende da planta e cai espontaneamente (HASENSTEIN & ZAVADA, 2001).

Um cacauzeiro pode produzir até 100 mil flores por ano, o período de floração desta espécie abrange os meses de outubro e junho. No entanto, a taxa de polinização é muito baixa, cerca de 5%. Os altos índices de fecundação cruzada, característico desta espécie, contribuem para a manutenção do nível de heterogeneidade das populações provenientes de sementes oriundas de forma natural e sem controle de polinização (DIAS, 2001).

A principal doença que afeta as almofadas florais do cacau é a vassoura-de-bruxa. Quando infectadas pelo fungo, as almofadas florais se tornam inviáveis e não produzem frutos, o que acarreta em perda econômica para o agricultor (DIAS, 2001).

2.3. Interação planta-patógeno

Os patógenos geralmente penetram no hospedeiro via estruturas naturais como estômatos (vírus, bactérias e fungos) e pelo sistema radicular (nematóides), ou por aberturas provenientes de ferimentos na planta (KNOGGE, 1996).

As plantas interagem e respondem às invasões dos patógenos de diversas maneiras, e nesta interação duas possíveis relações podem ser estabelecidas, a compatível e a incompatível. Na primeira, o patógeno consegue superar as defesas do hospedeiro acarretando no desenvolvimento da doença, enquanto que na segunda, o patógeno não consegue ultrapassar as barreiras de defesa do hospedeiro, e conseqüentemente não há o aparecimento da doença (JACKSON & TAYLORBI, 1996).

O mecanismo de defesa das plantas é formado primeiramente pelas suas estruturas anatômicas, ou seja, pela barreira física, que impede a colonização dos seus tecidos, e também, pelos mecanismos bioquímicos, que sintetizam substâncias que acarretam em condições não satisfatórias para o desenvolvimento da doença, ou para o crescimento do patógeno (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

As plantas apresentam como sistema de defesa a presença de receptores de reconhecimento específico, que induzem a transcrição de genes em resposta à

interação com o patógeno, produzem espécies reativas de oxigênio e depositam calose no sítio de infecção. Todos estes fatores agem contribuindo para a não colonização ou manutenção do agente causal da doença nos tecidos da planta.

A resposta do hospedeiro à interação com o patógeno envolve etapas desde o seu reconhecimento, até a ativação de genes de defesa e transdução de sinais, sendo as reações à infecção localizadas ou sistêmicas (MONTESINOS *et al.*, 2002).

A singularidade desta resposta aos patógenos propôs que haveria uma relação de especificidade entre alguns fatores dos patógenos para alguns fatores dos hospedeiros, teoria criada por Flor (1942). Este pensamento formulou a conhecida teoria gene-a-gene a qual demonstra haver uma relação complementar entre os genes que proporcionam a resistência (R) do hospedeiro com os genes que condicionam a avirulência (*Avr*) no patógeno (HEATH, 2000).

Os genes de resistência (R) nas plantas geralmente são dominantes e os de suscetibilidade são recessivos, enquanto que os genes para avirulência nos patógenos são dominantes e os para virulência são recessivos. Os genes *Avr* podem codificar proteínas que, se forem reconhecidas pelos receptores das plantas, provocam resposta de defesa, assim como, se não forem reconhecidos desencadeiam no desenvolvimento da doença (HEATH, 2000).

Geralmente, grande parte dos genes de resistência (R) possui a informação genética para codificar proteínas com domínio transmembrana (NBS) e com repetições ricas em leucina (LRR), e proteínas com domínio citoplasmático (DANGL & JONES, 2001).

O reconhecimento feito pelas proteínas NB-LRR pode ser direto ou indireto. O primeiro ocorre quando as proteínas *Avr* são reconhecidas pelas proteínas R, sistema semelhante ao descrito pela teoria do gene-a-gene. E indireto quando as proteínas R aguardam respostas de outras proteínas para responder, neste caso, as proteínas R atuam como sensores (JONES & TAKEMOTO, 2004).

Os genes que codificam para proteínas transmembranas e com repetições ricas em leucina possuem a função de mediar a interação entre proteínas, agindo como receptor do elicitor codificado do gene *Avr* no meio extracelular, ou atuando antes do início da transdução de sinais, em meio intracelular. Baseado nesta especificação dos genes, marcadores moleculares foram sintetizados para identificar regiões homólogas a estes genes (KUHN *et al.*, 2003).

2.4. *Moniliophthora perniciosa*

O *Moniliophthora perniciosa* é o basidiomiceto agente causal da doença vassoura-de-bruxa. Pertence a Ordem Agaricales, Família Marasmiaceae, e ao Gênero *Moniliophthora*. A nutrição durante o ciclo de vida do fungo é hemibiotrófica, ou seja, apresenta duas distintas fases, uma biotrófica e outra necrotrófica (FRIAS *et al.*, 1991; ORCHARD *et al.*, 1994; SILVA, 1997), o que acarreta em alterações histológicas, fisiológicas e morfológicas na planta (GRIFFITH & HEDGER, 1994).

A vassoura-de-bruxa pode infectar diferentes regiões no cacaueteiro, como os ramos vegetativos, as almofadas florais e os frutos. Nos frutos novos a doença se manifesta impedindo o seu desenvolvimento, deixando-o com um formato semelhante a um morango, e por isso estes frutos neste estado são denominados de fruto “morango”. Em frutos já desenvolvidos os sintomas característicos são lesões negras e circulares nas cascas, e amêndoas aderidas umas as outras e necrosadas. Nos ramos ocorre um inchaço e surgimento de muitos brotos laterais. Nas almofadas florais ocorrem agrupamentos e hipertrofias (BASTOS, 1990).

Os tecidos meristemáticos quando infectados por tubos germinativos de basidiósporos, estruturas liberadas pelos basidiomas do fungo, induzem o aumento dos tecidos na região afetada e no desenvolvimento dos sintomas da doença (FRIAS *et al.*, 1991; ORCHARD *et al.*, 1994; SILVA, 1997).

Segundo Wheeler (1985) o fungo inicialmente se desenvolve dentro dos tecidos com o micélio biotrófico, formado por hifas monocarióticas, por um período de seis a nove semanas. Posteriormente, com o início dos processos de necrose, o fungo evolui para o seu segundo estágio, o qual é característico pela presença do micélio saprofítico formado por hifas dicarióticas. Após a morte do tecido vegetal o micélio frutifica e origina os basidiomas, os quais darão origem aos basidiósporos, estruturas responsáveis pela dispersão do fungo.

Várias são as medidas que buscam controlar a dispersão da doença, dentre elas pode-se citar as mais utilizadas, como a poda fitossanitária, que remove da planta os tecidos infectados, a aplicação de fungicidas químicos e a utilização de variedades consideradas resistentes ao patógeno (PURDY & SCHMIDT, 1996).

A poda fitossanitária apesar de ser a medida mais utilizada pelos agricultores só é considerada prática eficiente de controle após análise da lavoura e do seu nível

de infecção (ANDERBRHAN *et al.*, 1998). Os fungicidas utilizados para a monocultura cacaujeira eram a base de cobre, e eram necessárias inúmeras aplicações para controlar a doença devido ao crescimento contínuo das plantas e conseqüentemente colonização do fungo nos tecidos meristemáticos. Tornou-se, por isso, um fator antieconômico e agressor ao meio ambiente (BASTOS, 1996). Outra medida utilizada foi o controle biológico utilizando um fungo antagonista, *Trichoderma viride*, já que o mesmo coloniza as vassouras-de-bruxa e reduz eficazmente o potencial de inóculo (BASTOS, 1996).

Sendo assim, a medida utilizada que mostrou-se mais eficiente e compensatória foi a utilização de variedades resistentes a *M. pernicioso*. A busca por genótipos resistentes iniciou-se no Equador em 1918 utilizando a seleção de plantas que eram provenientes de outras que apresentavam o fenótipo de resistência. Em 1930 selecionaram-se plantas de cultivos comerciais de Trinidad, e em 1938 cacaujeiros silvestres foram coletados na região do Vale Amazônico (DIAS, 2001).

Atualmente, as fontes de resistência à vassoura-de-bruxa mais satisfatórias são provenientes dos clones SCA-6 e SCA-12, os mais resistentes, e de fontes secundárias, como o clone IMC-67, considerado como medianamente resistente (DIAS, 2001).

2.5. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são características moleculares oriundos de gene expresso ou de seqüência de DNA que podem distinguir indivíduos e que são herdadas geneticamente (MILLACH, 1998; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A importância de se utilizar esta ferramenta molecular foi descrita por Ferreira & Grattapaglia (1998) ao afirmar que os marcadores moleculares além de serem abundantes, não sofrem influência ambiental e revelam a variabilidade genética presente nas seqüências de DNA.

Sua aplicabilidade abrange estudos em programas de melhoramento de plantas, pois auxiliam na caracterização das populações, na confecção de mapas

genético, na detecção de QTL (*Quantitative Trait Loci*), e na obtenção de resultados preliminares, o que aumenta a eficiência de seleção e reduz o número de cruzamentos testes (DIAS, 2001). A otimização do tempo é explicável porque os marcadores moleculares podem ser utilizados em qualquer estágio do desenvolvimento da planta.

Existem muitas classes de marcadores moleculares, como os isoenzimáticos ou bioquímicos (múltiplas formas de uma enzima decorrente de vários genes codificadores); RAPD ou *Random Amplified Polymorphic DNA* (são fragmentos de DNA aleatórios produzidos por amplificação com *primers* curtos); RFLP ou *Restriction Fragment Length Polymorphism* (são fragmentos de DNA obtidos pela ação de enzimas de restrição e hibridizados com sondas específicas); AFLP ou *Amplified Fragment Length Polymorphism* (são fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição seguida por ligação a adaptadores e ampliações seletivas); VNTR ou *Variable Number of Tandem Repeats* (são seqüências de DNA de 10 a 100 pb repetidas em tandem); SNP ou *Single Nucleotide Polymorphism* (são seqüências de DNA que apresentam polimorfismo em único nucleotídeo) (FALEIRO, 2007).

Dentre estes muitos marcadores moleculares existentes, dois grupos merecem destaque: os genes candidatos e os microssatélites. Os marcadores genes candidatos são seqüências de DNA que apresentam homologia com regiões conservadas das plantas, estas regiões estão associadas a genes que acarretam na resistência da planta às doenças (KUHN *et al.*, 2003; BORRONE *et al.*, 2004; CLEMENT *et al.*, 2003). A esta classe de marcadores pertencem dois grupos de genes. Um dos grupos é o de genes de reconhecimento, ao qual fazem parte os marcadores associados com genes de resistência que são os RGH's (Homólogos de Genes de Resistência) e os RGA's (Análogos de Genes de Resistência). O segundo grupo é composto pelos genes de sinalização de defesa, composto pelos genes codificadores de proteínas ou marcadores WRKY. O primeiro grupo é responsável pelo reconhecimento do patógeno e pela transdução de sinais. Enquanto que o segundo grupo atua na regulação protéica e na inibição do crescimento do patógeno (LANAUD *et al.*, 2004).

Os marcadores RGH's possuem homologia com seqüências conservadas de DNA nos sítios de ligação a nucleotídeos e regiões ricas em leucina (LRR) (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997; KUHN *et al.*, 2003; HULBERT *et al.*, 2001).

Os marcadores microssatélites são constituídos de repetições em tandem de seqüências curtas de DNA, de dois a cinco nucleotídeos. A variabilidade genética encontrada neste tipo de marcador é proveniente de variações no número das repetições, e esta variação pode ser decorrente tanto de erros da DNA polimerase durante a replicação do DNA, quanto da ocorrência de crossing-over desigual (HANCOCK, 2000).

Segundo Pugh *et al.*, (2004), a freqüência dos microssatélites é de um a cada 50.000 pares de bases, o que justifica o seu vasto uso em estudos genéticos. Além disso, esta classe de marcador é utilizada devido às suas características como alta reprodutibilidade, vasta abundância e alto nível de polimorfismo.

Utilizando como referência estudos envolvendo o cacau, cerca de 260 locos de microssatélites já foram mapeados e organizados ao longo dos 10 cromossomos da espécie (LANAUD *et al.*, 1999; PUGH *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2005).

2.6. Melhoramento genético do cacau

Em 1918, no Equador, foram iniciados os primeiros estudos de melhoramento do cacau em prol da obtenção de plantas resistentes a vassoura-de-bruxa (BARTLEY, 1986).

Em 1930, em Trinidad, estudos foram feitos na busca por plantas resistentes a vassoura-de-bruxa, no entanto, poucas variações foram estimadas (BAKER & HOLLIDAY, 1957).

Na década de 50, no Brasil, iniciaram-se estudos em busca do melhoramento do cacau (PEREIRA *et al.*, 1999). Tais estudos priorizaram resultados que viabilizassem a obtenção de genótipos com resistência às doenças, alta produtividade e alta qualidade de amêndoas (DIAS, 2001).

Segundo Anderbrhan *et al.*, (1998), o melhoramento genético está baseado na busca por nova fontes de resistência e conseqüentemente, no aumento da

variabilidade genética dos cacauzeiros para esta característica. Sendo assim, genótipos são selecionados tanto de cruzamentos de clones quanto de germoplasmas silvestres. Os clones que apresentam as características de interesse são então selecionados, multiplicados e distribuídos aos agricultores (PIRES, 2003).

Os cruzamentos de materiais vegetais em busca de genótipos com a característica de resistência mais elevada resultaram no surgimento de clones de escala comercial bastante difundida entre os agricultores: o CCN 51, as séries TSH e TSA (BARTLEY, 1994).

Além dos clones citados anteriormente, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) selecionou também os clones SCA-6, SCA-12, IMC-67 e o TSA-644, classificando-os como resistentes à vassoura-de-bruxa. Devido a isto, estes clones foram bastante utilizados em cruzamentos para obtenção de populações para estudos de melhoramento (YAMADA *et al.*, 2001).

Pires *et al.*, (1996) afirmam que o método de melhoramento da CEPLAC é bastante eficaz para a obtenção e manutenção da resistência, já que utiliza a piramidação de diferentes genes de resistência.

2.7. Mapas genéticos

De acordo com Morgan (1910), os estudos relacionados com mapeamento genético tiveram início após o esclarecimento e entendimento do processo de ligação genética. Este processo de forma simplificada baseia-se na revelação da distância encontrada entre marcadores genéticos, indicando a co-segregação quando os mesmos estão muito próximos, e a possibilidade de permutação gênica quando os mesmos estão mais distantes, e discrimina ainda a organização destes marcadores ao longo dos grupos de ligação (MARTINS, 1998).

A conjugação de métodos estatísticos avançados com a geração de vasta gama de marcadores moleculares acarreta na disponibilidade de saturação genética para mapas em diferentes espécies vegetais, dentre eles podem-se citar o eucalipto (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994), a soja (CORREA, 1995), o milho

(BRUNELLI *et al.*, 2002), o feijão (FALEIRO *et al.*, 2003) e o café (PEARL *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo confecção de mapas genéticos para o cacau iniciaram-se com Lanaud *et al.*, (1995), os quais trabalharam com cerca de 100 indivíduos F_1 provenientes do cruzamento entre PA-402 e UF-676. Posteriormente a este trabalho, distintos mapas genéticos foram desenvolvidos para o cacau (CROUZILLAT *et al.*, 1996; RISTERUCCI *et al.*, 2000; CROUZILLAT *et al.*, 2000; FLAMENT *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2003; CLEMENT, 2003; RISTERUCCI *et al.*, 2003; LANAUD *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2007). Pugh *et al.*, (2004) desenvolveram o primeiro mapa consenso para o cacau.

Outros trabalhos referentes à construção de mapas genéticos para o cacau podem ser abordados, principalmente se o foco do estudo for o melhoramento da espécie, incluindo estudos de produtividade, qualidade de amêndoas e resistência a várias doenças (LANAUD *et al.*, 1995; MOTIAL *et al.*, 2000; ARAUJO, 2002; BROWN *et al.*, 2005; FALEIRO *et al.*, 2006; SCHNELL *et al.*, 2007).

A explicação para esta vasta difusão das análises de mapa genético entre as mais distintas espécies vegetais está no fato de que possibilita o estudo dos genomas, a decomposição de fatores genéticos em componentes mendelianos, a identificação da localização de QTL's e a simplificação da seleção assistida por marcadores (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares quando estão localizados em distintos cromossomos devem segregar de forma independente, enquanto que os marcadores que localizarem-se no mesmo cromossomo devem segregar juntos, a menos que estes não tenham passado por eventos de recombinação nos gametas dos genitores. Assim, estudos de mapas genéticos envolvem análises de co-segregação dos marcadores, que associadas com métodos estatísticos avançados permitem associar as características de interesse que estão sendo estudadas com os seus referidos QTL's (LIU, 1998).

Os mapas genéticos desenvolvidos para estudos com a espécie *T. cacao* geralmente são feitos a partir de análises com populações F_1 , provenientes de cruzamentos controlados e que envolvem características de interesse agrônomico. Seus genitores são escolhidos pela taxa de variabilidade genética presente, sendo por isso selecionados os genitores heterozigotos, o que ocasiona maior segregação

da característica de interesse nos indivíduos da população (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os mapas genéticos podem ser confeccionados tanto por marcadores dominantes quanto por marcadores co-dominantes (LANAUD *et al.*, 1995; RISTERUCCI *et al.*, 2000; FLAMENT *et al.*, 2001; CLEMENT *et al.*, 2003; PUGH *et al.* 2004; BROWN *et al.*, 2005), e as informações geradas podem ser fundidas ou comparadas com mapas de referência para a espécie em estudo.

2.8. QTL

O termo QTL significa, do português, Locos de Características Quantitativas, e as análises são baseadas em testes de ligação entre as marcas moleculares provenientes de estudos com marcadores e as características fenotípicas avaliadas. Ou seja, os QTL's são regiões cromossômicas envolvidas com a expressão e manutenção de características quantitativas, sendo definido por associações estatísticas (LIU, 1998).

O mapeamento de QTL's busca identificar e localizar quais são os genes envolvidos com o fenótipo de interesse (BURROW & BLAKE, 1998).

Segundo Liu (1998), a metodologia empregada para a identificação de QTL's e associação com as características fenotípicas de interesse está baseada na análise dos marcadores individuais utilizando ferramentas estatísticas, tais como regressão e razão de verossimilhança.

Para um perfeito estudo e análise de QTL's em espécies de cultura perene faz-se necessária a utilização de um grande número de marcadores moleculares, pois os mesmos permitirão a identificação da variabilidade genética relacionada aos QTL's. A existência de populações F_2 ou de retrocruzamentos geralmente são menos freqüentes para este tipo de espécie, o que acarreta na escolha de populações F_1 geradas a partir de cruzamentos entre genitores altamente heterozigotos (GRATTAPAGLIA, 2001).

Estudos de QTL's se baseiam resumidamente na utilização de populações segregantes que foram analisadas na confecção de mapas genéticos. Geralmente

utilizam-se linhagens puras divergentes geneticamente e fenotipicamente. Estas linhagens são cruzadas e, a partir da F_1 , alcançam-se populações F_2 , recombinantes e de retrocruzamento. Indivíduos destas populações segregantes são analisados fenotipicamente e avaliados molecularmente. Após a utilização de programas computacionais que utilizam testes estatísticos avançados, os QTL's são identificados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Vários QTL's envolvidos com a resistência às doenças em *T. cacao* já foram detectados, dentre os mais recentes pode-se citar os trabalhos de Lanaud *et al.*, (2000) e Clement *et al.*, (2003) que identificaram QTL's envolvidos com a resistência à podridão parda no grupo de ligação quatro; Queiroz *et al.*, (2003) e Faleiro *et al.*, (2006) encontraram no grupo de ligação nove QTL's envolvidos com a resistência à vassoura-de-bruxa; Brown *et al.*, (2005) localizaram QTL's envolvidos com a resistência à vassoura-de-bruxa nos grupos de ligação um e nove; Albuquerque (2006) detectou QTL envolvido com a resistência à vassoura-de-bruxa no grupo de ligação quatro; Brown *et al.*, (2007) identificaram QTL's envolvidos com a resistência à podridão parda nos grupos de ligação quatro, oito e dez, e QTL's envolvidos com a resistência à monilíase nos grupos de ligação dois, sete e oito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo é proveniente de uma população segregante de *T. cacao* composta por 282 plantas com aproximadamente nove anos. Esta população é oriunda do cruzamento entre os clones TSH 1188 (*“Trinidad Selected Hybrids”*) e CCN 51 (*“Colección Castro Naranjal”*), e está localizada no MCCS – MARS Center of Cocoa Science, no município de Barro Preto – Bahia - Brasil.

Os clones TSH 1188 e CCN 51 foram selecionados como genitores para esta população por possuírem características contrastantes tanto para resistência a doenças, quanto produtividade e incompatibilidade. O clone TSH 1188 originou-se de cruzamentos envolvendo os clones IMC-67, ICS-1, SCA-6 e P-18. Produz frutos vermelhos e rugosos (CEPEC, 1987), e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa (LUZ *et al.*, 1997). O clone CCN 51 é originário de uma planta F₁ do cruzamento entre ICS-95 e IMC-67, cruzada com um clone equatoriano chamado “Canelos” (BARTLEY, 1986). Produz frutos vermelho-arroxeados quando imaturos e amarelo-alaranjados quando maduros, casca levemente rugosa (CASTRO & BARTLEY, 1983), e é medianamente resistente à vassoura-de-bruxa (CAMPO & ANDÍA, 1997).

Para a obtenção da população foram realizadas polinizações manuais no ano de 2002, usando o CCN 51 como pai (fonte de pólen) e o TSH 1188 como mãe (óvulo), protegendo-se os botões florais 24 horas antes e desprotegendo os mesmos 24 horas após a polinização manual. Os frutos gerados foram colhidos, numerados, e as sementes de cada fruto foram pesadas, numeradas e plantadas. Após nove meses, as plantas foram transplantadas no campo em covas de 40 x 40 x 40 cm com espaçamento de 3,0 x 3,0 m, e identificadas quanto ao fruto e a semente que as gerou, evitando misturas de material e garantindo a integridade da população (SANTOS *et al.*, 2007).

3.2. Análise fenotípica

As 282 plantas da população F₁ juntamente com 10 clones de TSH 1188 e 10 clones de CCN 51 foram analisadas quanto à incidência de vassoura-de-bruxa nas almofadas florais.

As avaliações foram realizadas em três áreas distintas das plantas, de 30 cm de comprimento, e escolhidas aleatoriamente, uma no tronco e duas em diferentes galhos (logo acima do jorguete). As medições foram feitas com fita métrica, e a região estabelecida foi pintada nas extremidades, indicando o local que seria considerado nas avaliações em cada área específica. Nestas três áreas contou-se a quantidade de almofadas sadias e infectadas presentes em cada planta (Figura 1A).

As avaliações fenotípicas foram realizadas sob duas condições de campo, baixo e alto potencial de inóculo. Na condição de baixo potencial de inóculo, as plantas recebiam os tratos culturais preconizados para a cultura do cacau, como podas fitossanitárias. Neste período foram realizadas três avaliações quanto à incidência de almofadas florais sadias (Figura 1B) e infectadas por vassoura-de-bruxa (Figura 1C), com intervalos de seis meses entre uma avaliação e outra. Na condição de alto potencial de inóculo foram adicionadas em cada cacauero cerca de cinco a dez vassouras-de-bruxa secas, visando aumentar a pressão de inóculo nas plantas sob avaliação (Figura 1D).

As vassouras-de-bruxa secas foram coletadas em duas regiões adjacentes à população em estudo: no *MCCS* e na estação experimental da *CEPLAC*, *ESJOB* (Estação Experimental Joaquim Bahiana). Durante as observações de sintomas em campo, verificou-se a presença de basidiocarpos em cada vassoura-de-bruxa seca (Figura 1E), o que comprova que as mesmas estavam produzindo inóculo.

A incidência de vassoura-de-bruxa nas almofadas foi calculada com base na porcentagem de infecção (PI). A PI foi estimada pelo número de almofadas florais infectadas vezes 100, dividido pelo número total de almofadas florais avaliadas (sadias + infectadas).

Segundo Dias (2001), um dos componentes utilizados para avaliar resistência parcial para vassoura-de-bruxa é a porcentagem de infecção (PI). Desta forma, utilizando-se a PI como fonte principal de análise, detecta-se o grau de infecção da planta e não apenas a quantidade de almofadas florais infectadas, o que acarreta em dados mais consistentes para análises de resistência.



Figura 1: Região amostrada para avaliação, técnica de aumento da pressão de inóculo e sintomas considerados nas análises fenotípicas. (A) Três áreas utilizadas para as avaliações; (B) Almofadas florais saudáveis; (C) Almofada floral infectada por vassoura-de-bruxa; (D) Uma planta com vassouras secas; (E) vassoura-de-bruxa seca com presença de basidiocarpos.

3.3. Estudo da herança da resistência

As hipóteses mendelianas formuladas para explicar a segregação referente à resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado. Os valores de qui-quadrado foram calculados com nível de significância de 5%, e a distribuição da frequência foi estimada a partir de análises da porcentagem de infecção da população.

O cálculo de fenótipos extremos (FE) foi utilizado para estimar o número de genes envolvidos com a característica em estudo. A fórmula para o referido cálculo é $FE = 1/4^n$, sendo “n” o número de genes envolvidos.

3.4. Análise molecular

3.4.1. Extração de DNA

As amostras de DNA dos genitores (TSH 1188 e CCN 51) e das 282 plantas pertencentes à população foram extraídas de folhas jovens a partir de otimizações feitas utilizando o método CTAB e baseado no protocolo de Doyle & Doyle (1990).

Os reagentes que compunham o tampão de extração eram CTAB 2 %, NaCl 1,4 mol.L⁻¹, EDTA 20 mmol.L⁻¹, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mmol.L⁻¹, PVP (pó) 2%, β – Mercaptoetanol a 0,4 %.

O procedimento para a extração do DNA iniciou-se com a maceração do material vegetal em almofariz com pistilo na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 2 mL e acrescentou-se 800 µL do tampão de extração. Os microtubos foram agitados em vortex (AP56 *Phoenix* Pró-Análise Brasil) e incubados em banho-maria (EV015 EvLab Brasil) a 65°C por 50 minutos, invertendo-os a cada 10 minutos. Com o término do período de incubação, adicionou-se 700 µL de uma mistura de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) em cada microtubo, agitou-os e centrifugou-os (MiniSpin® *plus Eppendorf* Brasil) por 7 minutos a 14.000 rpm.

Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL e, novamente, adicionou-se 700 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). Em seguida, o microtubo foi agitado e centrifugado por 7 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em microtubos de 1,5 mL, no qual foi acrescentado Isopropanol gelado na proporção 1:1. Em seguida, os microtubos foram levemente invertidos e incubados a - 20°C por duas horas.

A etapa seguinte foi centrifugar os microtubos por 10 minutos a 14.000 rpm, descartar o sobrenadante e lavar o precipitado contendo o DNA com 1 mL de etanol gelado a 95% e 75%, respectivamente. Após o descarte do etanol, os microtubos permaneceram em temperatura ambiente até a total evaporação do álcool.

O precipitado de DNA foi diluído em 50 µL de TE (pH 8,0) 10 mmol.L⁻¹ (Tris-HCl (pH 8,0) 100 mmol.L⁻¹; EDTA 20 mmol.L⁻¹) com RNase a 40 µg/µL, e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

As amostras de DNA extraídas foram aplicadas em géis de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹ e fotografados sob luz Ultra Violeta para verificar a integridade do DNA, e em seguida quantificadas em espectrofotômetro (GeneQuantTM Pro RNA/DNA *calculator* GE Healthcare Biosciences). As concentrações das amostras de DNA foram estimadas e as mesmas foram diluídas para a concentração final de 10 ng/µL.

3.4.2. Detecção de polimorfismos utilizando marcadores RGH's

As amplificações dos DNAs dos genitores (TSH 1188 e CCN 51) foram feitas em termociclador automático (Gene AMP PCR System 9700 – PERKIN ELMER) com os 12 *primers* RGH's desenvolvidos por Kuhn *et al.* (2003): RGH 1, RGH 2, RGH 3A, RGH 3B, RGH 4, RGH 5, RGH 6, RGH 7, RGH 8, RGH 9, RGH 10, RGH 11 (Tabela 1).

Tabela 1: Marcadores Homólogos de Resistência (RGH's) e informações obtidas em Kuhn *et al.*, (2003). TA = temperatura de anelamento; pb = pares de bases.

LOCOS	TA (°C)	ALELOS (pb)
RGH 1	58	437
RGH 2	60	440
RGH 3A	60	349
RGH 3B	59	359
RGH 4	58	411
RGH 5	55	581
RGH 6	55	487
RGH 7	55	386
RGH 8	56	472
RGH 9	50	447
RGH 10	55	468
RGH 11	55	300

As condições para a obtenção de ampliações de qualidade foram: 10 mmol.L⁻¹ (pH 8,3) de Tris-HCl, 50 mmol.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 2,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 200 µM de cada um dos desoxinucleotídios, 10 ng de DNA, 200 µM dos primers forward e reverse, e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Fermentas, totalizando 20 microlitros de reação.

O programa utilizado no termociclador automático foi 94 °C por 5 min + 40 ciclos de 94°C a 30 s, T_m específica de cada primer por 40 s, 72 °C por 1 min, extensão final a 72 °C por 7 min e redução a 15 °C.

A verificação do padrão de amplificação foi evidenciada com alíquotas de 10 µL de reação com 2 µL de corante tipo IV (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹ e fotografados sob luz Ultra Violeta. A corrida eletroforética em cuba horizontal (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) foi realizada a 90 volts durante 40 minutos.

3.4.3. Análise de BSA

As 282 plantas foram analisadas fenotipicamente quanto à incidência de vassoura-de-bruxa nas almofadas florais. Dentre estas, 18 plantas foram selecionadas para a aplicação da técnica de BSA (Análise de *Bulks Segregantes*) proposta por Michelmore *et al.* (1991). As plantas foram organizadas em dois grupos por terem apresentado característica fenotípica diferenciada e pertencente aos extremos da população. Assim, das 18 plantas selecionadas, nove apresentaram fenótipo de resistência para vassoura-de-bruxa em almofadas florais e nove apresentaram fenótipo de suscetibilidade.

As amostras de DNA das 18 plantas foram amplificadas com os marcadores RGH's polimórficos entre os genitores nas condições descritas no item 3.4.2.

O padrão de amplificação foi verificado como descrito no item 3.4.2.

3.4.4. Genotipagem da população utilizando marcadores RGH's

Visando análise futura de ligação genética, os marcadores RGH's que apresentaram segregação (nos *bulks* avaliados) quanto à característica de resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais, foram selecionados e genotipados na população.

As condições de amplificação foram realizadas conforme as descritas no item 3.4.2.

Os padrões de amplificação foram verificados também como descrito no item 3.4.2.

3.4.5. Genotipagem da população utilizando marcadores SSR

Os dados de genotipagem relativos a um conjunto de 93 marcadores microssatélites desenvolvidos por Lanaud *et al.*, (1999) e Pugh *et al.*, (2004) foram

cedidos para as análises genéticas relacionadas com resistência à vassoura-de-bruxa (Comunicação pessoal Ioná Santos Araújo).

A genotipagem foi realizada em seqüenciador de DNA modelo (*Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, Foster City, USA*). O protocolo utilizado envolveu uma PCR com volume final de 20 µL usando 4 µL de *Mastermix BigDye (Applied Biosystems, Foster City, USA)*. O programa no termociclador automático foi: 96 °C por 1 min + 40 ciclos de 96°C a 15 s, T_m específica de cada *primer* por 45 s, 72 °C por 1 min; extensão final por 7 min e redução final a 4 °C.

As amostras a serem aplicadas no seqüenciador de DNA 3730xl foram adicionadas a 10 µL de formamida e desnaturadas em termociclador automático por 5 minutos a 96 °C. Após a desnaturação, as amostras foram mantidas no gelo e posteriormente utilizadas.

3.4.6. SSCP (Polimorfismo Conformacional Fita Simples)

Alíquotas de 2 µL de cada uma das reações amplificadas com os marcadores RGH's foram adicionadas a 2 µL de tampão de carregamento (Azul de bromofenol a 0,05%, xileno cianol a 0,05%, formamida a 95% e NaOH a 10 mmol.L⁻¹). As amostras foram desnaturadas em termociclador automático (Gene AMP PCR System 9700 – PERKIN ELMER) a 95°C por 10 minutos e aplicadas em géis de acrilamida 6% utilizando a técnica de SSCP.

O gel de SSCP foi feito utilizando 40% Acrilamida-Bisacrilamida (37,5:1), glicerol 87%, TBE 10X, TEMED 99%, e APS 10%. Os géis foram submetidos a corridas eletroforéticas em cuba de eletroforese vertical (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) a 700 volts e 15 watts por 5 horas e meia em sala refrigerada a 18°C. A detecção dos marcadores foi feita a partir da coloração com nitrato de prata de acordo com Bassam *et al.* (1991).

O peso molecular das amostras foi estimado pelos marcadores DNA *Ladder* de 10pb e de 100pb (Invitrogen).

3.5. Obtenção de mapas de ligação

Os mapas de ligação da população proveniente do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51 foram feitos utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR).

A frequência de recombinação, a distância entre os marcadores e a posição dos mesmos nos grupos de ligação foram feitas utilizando o programa *Mapmaker/Exp* 3.0 (LANDER *et al.*, 1987). O LOD score utilizado foi de 3.0 e o de frequência máxima de recombinação foi de 50%.

3.6. Análise de QTL's

As análises de QTL por intervalo simples foram realizadas com auxílio do programa *Mapmaker.qtl* (LANDER *et al.*, 1987). As análises de QTL por regressão a partir de marcas simples e pelo método de máxima verossimilhança foram realizadas com auxílio do programa GQMol (CRUZ & SCHUSTER 2004). Em ambos os programas, a obtenção de QTL's a partir de mapas de ligação permite expressar os valores de LOD para cada região analisada.

O LOD foi obtido em função do número de marcadores avaliados e do comprimento do mapa. O valor do LOD para cada grupo de ligação deve ser maior do que o valor do LOD para a região do mapa, desta forma, o mesmo pode ser interpretado como possuidor de um QTL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estatística descritiva

A população em estudo apresentou segregação quanto à quantidade de almofadas florais analisadas por planta, variando de 0 a 102 almofadas florais na condição de baixo potencial de inóculo (Figura 2), e de 0 a 91 almofadas florais na condição de alto potencial de inóculo (Figura 3).

Devido a esta oscilação quanto ao número de almofadas florais, realizou-se o cálculo da Porcentagem de Infecção (PI), e detectou-se o grau de infecção da planta e não apenas o número de almofadas florais infectadas, acarretando em dados mais consistentes para análise de resistência a doenças (DIAS, 2001). Foram calculados os valores das médias, desvio padrão e valores de máximo e mínimo (amplitude) da Porcentagem de Infecção (PI) da população em ambas as condições de campo, em três análises distintas (total da população, plantas que possuíam acima de dez almofadas avaliadas e plantas que possuíam acima de 20 almofadas avaliadas (Tabela 2).

A maior presença de almofadas florais foi verificada no tronco, com 42,03% e 44,62%, para as condições de baixo e alto potencial de inóculo, respectivamente (Tabela 3).

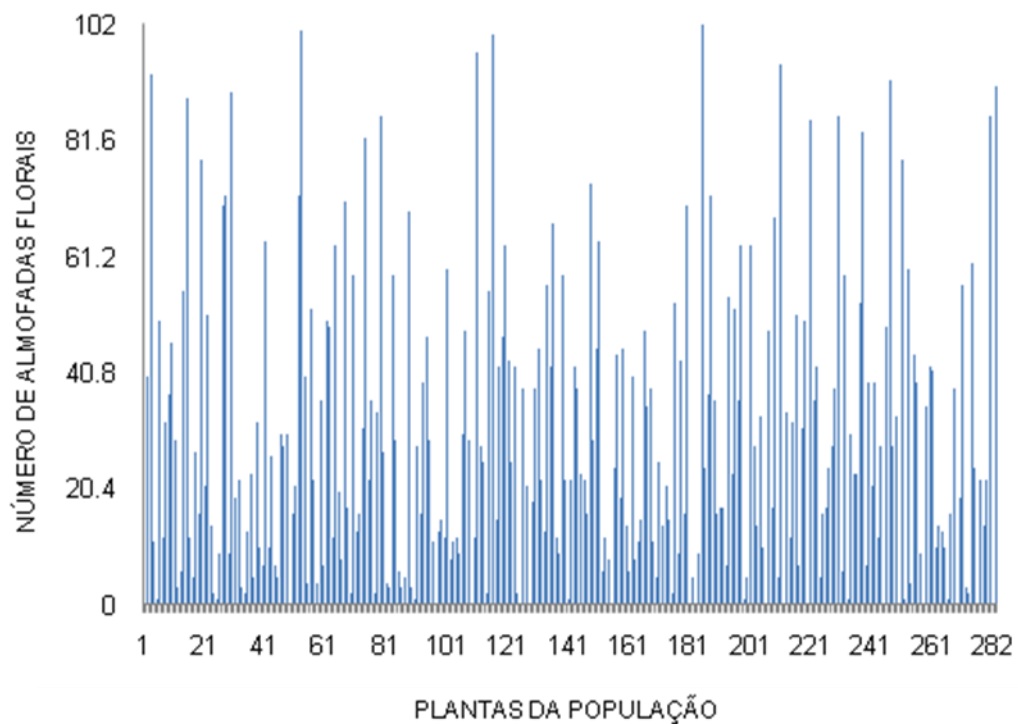


Figura 2: Segregação do número de almofadas florais apresentadas por planta da população TSH 1188 e CCN 51 na condição de baixo potencial de inóculo.

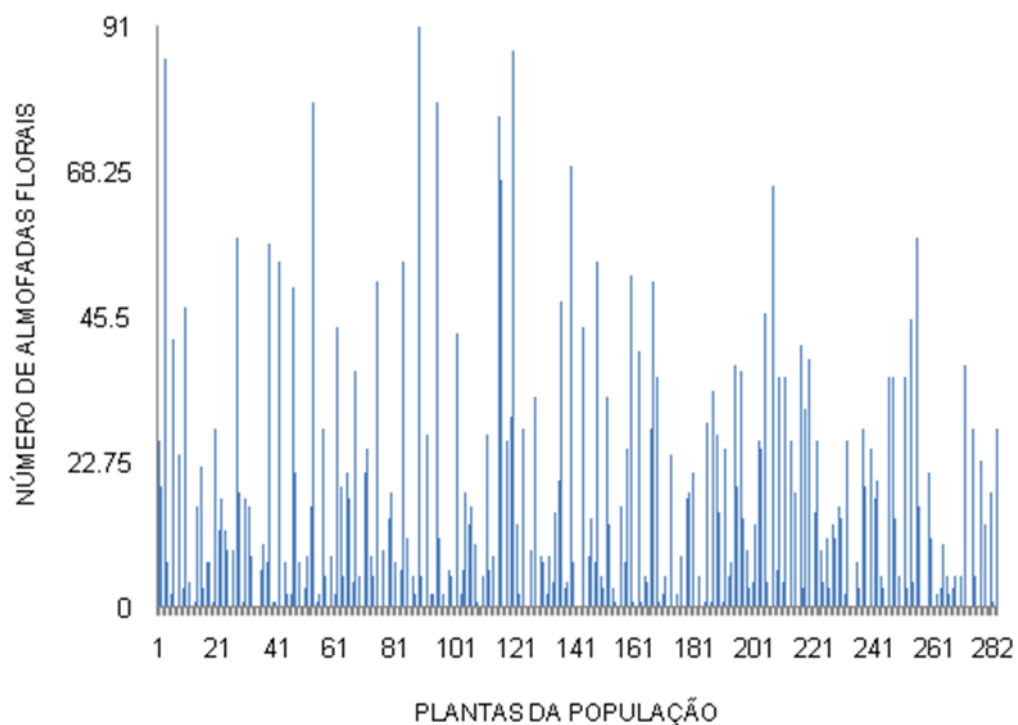


Figura 3: Segregação do número de almofadas florais apresentadas por planta da população TSH 1188 e CCN 51 na condição de alto potencial de inóculo.

Tabela 2: Valores de média, amplitude e desvio padrão da população (TSH 1188 x CCN 51) referente à porcentagem de infecção apresentada.

ANÁLISES	BAIXO POTENCIAL DE INÓCULO				
	Nº DE PLANTAS	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
TODAS AS PLANTAS	265	4,1	0	50	7,9
PLANTAS \geq 10 ALMOFADAS	208	3,7	0	40	6,1
PLANTAS \geq 20 ALMOFADAS	155	3,2	0	31,8	5,1
ANÁLISES	ALTO POTENCIAL DE INÓCULO				
	Nº DE PLANTAS	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
TODAS AS PLANTAS	233	3,6	0	57,1	8,8
PLANTAS \geq 10 ALMOFADAS	124	3,1	0	24,6	4,8
PLANTAS \geq 20 ALMOFADAS	78	3,6	0	24,6	5

Observa-se que em condições de baixo potencial de inóculo, os valores de desvio padrão variam de acordo com o nível da análise (todas as plantas, versus critérios de número mínimo de unidades de observação a 10 e 20 almofadas florais por planta). Por outro lado, os coeficientes de variação são idênticos nos níveis de 10 e 20 almofadas florais, quando o controle de presença de inóculo (adição de fontes de inóculo) é realizado. Desta forma, tanto em termos operacionais como de segurança do resultado, parece-nos satisfatório adotar a adição de fontes de inóculo e avaliar pelo menos dez almofadas florais por planta, para uma fenotipagem segura de cada planta, e para uma estimativa correta da porcentagem de infecção da população.

O número de plantas analisadas varia de acordo com o critério estabelecido para a análise de resistência por PI. Quanto maior o valor utilizado para discriminar o número de almofadas florais adequado para uma estimativa segura da PI, menor foi o número de plantas avaliadas. Em alto potencial de inóculo, houve uma redução de 47% das plantas quando utilizou-se o critério de plantas com mais de dez almofadas avaliadas, e a redução foi de 67% quando selecionou-se apenas as plantas que

possuíam acima de vinte almofadas. Em baixo potencial de inóculo, as reduções foram em menor escala, de 22% e de 42%, para plantas acima de dez e vinte almofadas avaliadas, respectivamente. O menor número de almofadas por planta apresentado na condição de alto potencial de inóculo pode ser explicado pelo sombreamento da população. No período das análises não houve poda, o que aumentou o nível de sombreamento e acarretou em menor número de lançamentos, e conseqüentemente, de almofadas florais (DIAS, 2001).

Além disso, houve em ambas as condições de campo plantas que não apresentaram almofadas florais nas regiões avaliadas, 6% (baixo potencial de inóculo) e 17% (alto potencial de inóculo), as mesmas foram eliminadas das posteriores análises.

Tabela 3: Porcentagem da população TSH 1188 x CCN 51 quanto à distribuição das almofadas florais nas três regiões avaliadas das plantas.

CONDIÇÕES	PARTE DA PLANTA		
	TRONCO	RAMO 1	RAMO 2
BAIXO INÓCULO	42,03%	29,01%	28,96%
ALTO INÓCULO	44,62%	27,30%	28,08%

Verificou-se que as porcentagens da distribuição das almofadas florais nas três regiões específicas de avaliação, foram similares em ambas as condições de campo.

4.2. Distribuições de freqüência das características fenotípicas

A população apresentou-se segregante quanto ao nível de porcentagem de infecção em ambas as condições de campo analisadas. O grupo dos fenótipos extremos de suscetibilidade mostrou-se na proporção de 1/64, e o grupo de resistência mostrou-se na proporção de 27/64, tanto em baixo quanto em alto potencial de inóculo.

Neste sentido, análises utilizando diferentes padrões quanto ao número de almofadas florais adequado para uma estimativa segura da porcentagem de infecção (PI) foram realizadas: avaliando a PI em todas as plantas analisadas (Figura 4A e Figura 5A), avaliando a PI somente nas plantas que apresentaram acima de dez almofadas florais analisadas (Figura 4B e Figura 5B), e avaliando a PI somente nas plantas que possuíam acima de vinte almofadas florais avaliadas (Figura 4C e Figura 5C). Desta forma, testes de χ^2 foram realizados a fim de se estabelecer o critério adequado para a avaliação da PI e discriminar a distribuição de frequência da população (Figuras 4 e 5).

Os valores de χ^2 a 5% de significância confirmam que em baixo potencial de inóculo a segregação da população apresentou uma proporção de 27:27:9:1 e que as análises com plantas que possuíam mais de vinte e dez almofadas florais são significativas, sendo a primeira a análise com menor erro de significância. Enquanto que a segregação da população sob condições de alto potencial de inóculo apresentou a proporção de 27:9:9:9:3:3:3:1, os valores de χ^2 a 5% de significância indicaram a análise em plantas que possuíam mais de vinte almofadas florais como a única significativa.

Ressalta-se que essa metodologia de avaliação em campo, utilizando como fonte de inóculo vassouras-de-bruxa secas, justifica-se apenas em regiões infectadas, visto que a introdução de patógeno em regiões de escape poderia acarretar problemas fitossanitários às áreas produtivas ou de potencial uso para expansão da cultura.

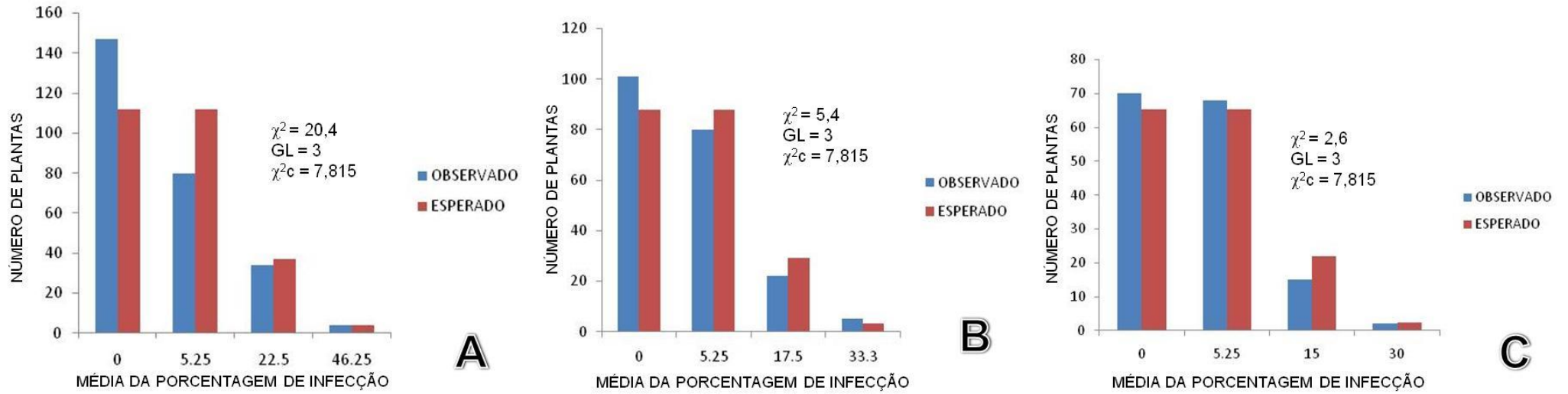
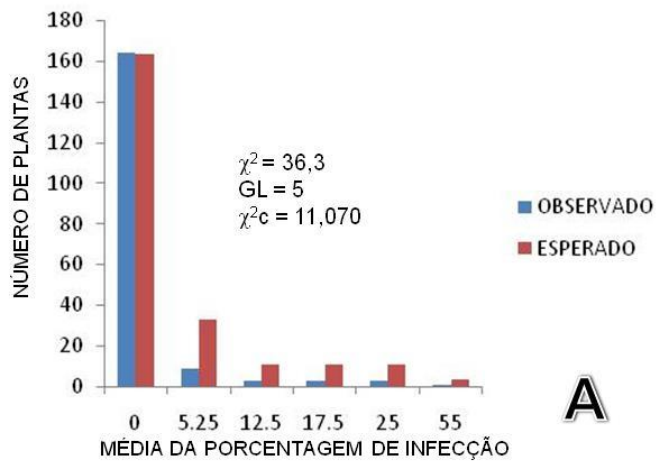
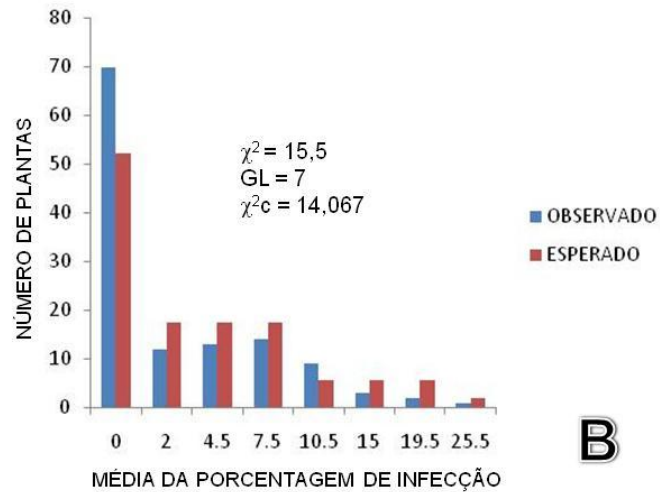


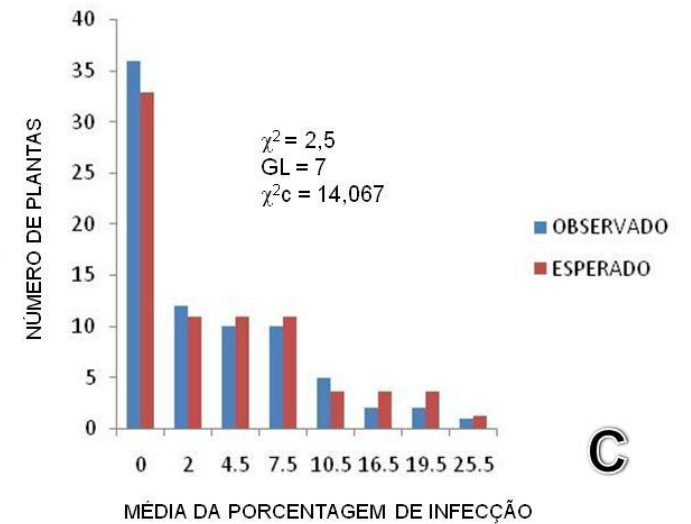
Figura 4: Segregação da população F_1 (TSH 1188 X CCN 51) sob baixo potencial de inóculo do fungo *M. pernicioso*. (A) Distribuição de todas as plantas da população. (B) Distribuição das plantas que apresentaram acima de 10 almofadas analisadas. (C) Distribuição das plantas que apresentaram acima de 20 almofadas avaliadas.



A



B



C

Figura 5: Segregação da população F_1 (TSH 1188 X CCN 51) sob alto potencial de inóculo do fungo *M. pernicioso*. (A) Distribuição de todas as plantas da população. (B) Distribuição das plantas que apresentaram acima de 10 almofadas analisadas. (C) Distribuição das plantas que apresentaram acima de 20 almofadas avaliadas.

Os resultados demonstram a importância da utilização do ajuste de potencial de inóculo para distinguir as classes fenotípicas, e estabelece um padrão metodológico de análise em campo da PI em plantas que apresentem número de almofadas florais acima de 20, número sugerido como suficiente para predizer sobre aspectos de resistência.

Em trabalhos anteriores, foram avaliados o número de vassoura-de-bruxa vegetativa por planta (SANTOS *et al.*, 2007) e o número de vassoura-de-bruxa vegetativa e de inflorescência por planta (NETO *et al.*, 2005). No entanto, nos estudos supracitados não foram realizados cálculos da PI para inferir sobre a resistência. O padrão de estimativa quanto ao número de almofadas florais adequadas para a obtenção de uma PI eficiente garantiu que não houvesse incorreta inferência de resistência. Este fato pôde ser observado principalmente em alto potencial de inóculo, pois ao analisar o número total de plantas verificou-se o acúmulo das mesmas no zero absoluto. Esta ocorrência pode ser explicada pela presença, em algumas plantas, de poucas almofadas florais avaliadas nas três regiões observadas. Desta forma, ao inserir critérios para o cálculo de PI e utilização das plantas, evidenciou-se a correta distribuição da população.

Nos histogramas das Figuras 4 e 5 percebe-se a segregação da característica resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais, sendo que a maioria das plantas apresenta um alto nível de resistência. Fato também relatado por Neto *et al.*, (2005) nos seus experimentos com uma população de *T. cacao* proveniente do cruzamento entre os clones SIC-864 x CCN 51, e por Santos *et al.*, (2007), os quais trabalharam com a mesma população deste estudo, observando que estes últimos analisaram vassouras vegetativas.

O alto nível de resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais pode estar relacionado à presença de fatores envolvidos com a expressão da característica nos dois genitores. O TSH 1188 foi descrito por Luz *et al.*, (1997) como resistente à vassoura-de-bruxa, e o CCN 51 foi descrito como mediantemente resistente à vassoura-de-bruxa por Campo & Andía (1997). A distribuição dos fenótipos, no sentido de maior resistência, foi explicada por Santos *et al.*, (2007) ao afirmar que a presença do QTL do genitor SCA-6, na genealogia do TSH 1188, contribui para a expressão da resistência, e que o CCN 51 também derivou de fontes alternativas

para resistência à vassoura-de-bruxa, como o IMC-67, o que acarreta na distorção da curva para maior resistência.

Os valores de herdabilidade no sentido amplo foram calculados ($H^2 = 0,84$), o que sugere que a variância fenotípica encontrada é decorrente da variabilidade genética e sofre pouca influência ambiental. Estes valores de herdabilidade indicam possibilidades de ganho genético para as gerações subseqüentes, classificando a população como satisfatória para estudos de melhoramento genético vegetal (DIAS, 2001).

4.3. Hipóteses mendelianas para herança da resistência

A freqüência dos genótipos extremos em ambas as condições de avaliação no campo, baixo e alto potencial de inóculo, apresentou-se na proporção de 1:64 para a característica suscetibilidade a vassoura-de-bruxa nas almofadas florais, o que indica que o grupo seja recessivo para poucos genes.

O cálculo efetuado de fenótipos extremos sugere a presença de três genes envolvidos com a resistência à vassoura de bruxa em almofadas florais.

$$FE = 1/4^n$$

$$1/64 = 1/4^n$$

$$1/4^3 = 1/4^n$$

$$n = 3 \text{ genes}$$

Com base no cálculo de fenótipos extremos, hipóteses mendelianas foram formuladas no intuito de explicar sobre a segregação evidenciada na população (Tabela 4). Testes de hipóteses genéticas de segregação possibilitam sugerir o padrão predominante de herança (LIU, 1997).

Tabela 4: Hipóteses mendelianas testadas para determinar a segregação de 1:64 encontrada na população F₁ (TSH 1188 X CCN 51).

HIPÓTESE	PROPORÇÃO DE FENÓTIPOS EXTREMOS	CRUZAMENTO
Hipótese 1	1/64	AaBbCc x AaBbCc
Hipótese 2	1/8	aaBbCc X Aabbcc
Hipótese 3	1/64	AaBbCcDd X AaBbccdd

Seguindo a prerrogativa de que a herança da resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais está associada a três genes (resultado decorrente do cálculo de fenótipos extremos), duas hipóteses foram elaboradas: a Hipótese 1 e a Hipótese 2.

Na Hipótese 1 o cruzamento entre plantas heterozigotas para três locos resultam em fenótipos extremos na proporção de 1:64 para suscetibilidade. No entanto, conhecimentos prévios sobre as características dos genitores, auxiliam no falseamento desta hipótese. Os genitores apresentam fenótipos distintos, sendo um resistente e o outro mediantemente resistente, o que infere que os mesmos não poderiam ser genotipicamente iguais.

Na Hipótese 2 o cruzamento envolve uma planta com dois locos heterozigotos e um loco recessivo com outra planta com dois locos recessivos e um loco heterozigoto. Neste caso os genótipos são distintos, o que explicaria a presença de fenótipos diferenciados, no entanto, o fenótipo extremo possuirá a proporção de 1:8 e não mais de 1:64, o que falseia esta hipótese.

A Hipótese 3 apresenta-se distinta das anteriores, pois a mesma infere sobre a possibilidade de quatro locos estarem envolvidos com a característica resistência e não apenas três. Nesta situação teríamos uma planta com quatro locos heterozigotos cruzada com outra planta que possuiria dois locos heterozigotos e dois locos recessivos. Tais diferenças genótípicas explicariam a existência de fenótipos diferentes, e a proporção 1:64 seria mantida para a suscetibilidade.

Após a realização do cruzamento entre AaBbCcDd X AaBbccdd, verificou-se os genótipos que corresponderiam a cada classe da distribuição da população em alto potencial de inóculo (Tabela 5A e 5B).

Tabela 5. Genótipos oriundos da Hipótese 3 (AaBbCcDd X AaBbccdd) associados (por cores) com a distribuição fenotípica da população F₁ (TSH 1188 X CCN 51) em alto potencial de inóculo. (A) 64 genótipos provenientes do cruzamento da Hipótese 3. (B) Associação entre os genótipos e a distribuição fenotípica.

GENÓTIPOS					
AABBCcDd	AABbCcDd	AaBBCcDd	AaBbCcDd	AABbCcDd	AaBbCcDd
AABBCcdd	AABbCcdd	AaBBCcdd	AaBbCcdd	AABBCcDd	AaBbccDd
AABBccDd	AABbccDd	AaBBccDd	AaBbccDd	AABbCcdd	AaBbCcdd
AaBBCcDd	AaBbCcDd	AaBbCcDd	AABBccdd	AaBbccdd	AaBBccdd
AaBBCcdd	AaBbCcdd	AaBbccDd	AABbccdd	AABbccdd	AaBbccdd
AaBBccDd	AaBbccDd	AaBbCcdd	AaBBccdd	AaBbccdd	AaBbccdd
AAbbCcDd	AabbCcDd	AabbCcDd	aaBBCcDd	aaBbCcDd	aaBbCcDd
AAbbccDd	AabbccDd	AabbccDd	aaBBCcdd	aaBbCcdd	aaBbccDd
AAbbCcdd	AabbCcdd	AabbCcdd	aaBBccDd	aaBbccDd	aaBbCcdd
AAbbccdd	aaBBccdd	aabbCcDd	aabbccdd		
Aabbccdd	aaBbccdd	aabbccDd			
Aabbccdd	aaBbccdd	aabbCcdd			

A

PROPORÇÃO	COR	GENÓTIPOS		
27		A_B_C_D_	A_B_C_	A_B_D_
9		A_B_		
9		A_C_D	A_C_	A_D_
9		B_C_D	B_C_	B_D_
3		A_		
3		B_		
3		C_D_	C_	D_
1		aabbccdd		

B

As classes fenotípicas da distribuição de frequência da população associaram-se com os genótipos oriundos do cruzamento citado na Hipótese 3, o que infere que ela possivelmente esteja correta, e que os locos estejam em cromossomos diferentes apresentando segregação independente.

Foram realizados cálculos referentes à interação aditiva dos alelos a partir das médias da porcentagem de infecção indicativas de cada classe na distribuição de frequência da população em alto potencial de inóculo (Tabela 6), e detectou-se o efeito de cada alelo, o qual sugere ordenar os fatores da população e estimar a sua discrepância (Tabela 7).

Tabela 6: Média da porcentagem de infecção (PI) referente a cada proporção da distribuição da população F₁ (TSH 1188 X CCN 51) e o seu respectivo genótipo.

GENÓTIPO	PROPORÇÃO	MÉDIA PI
aabbcc	1	25.5
A	3	19.5
B	3	16.5
C/D	3	10.5
A+B	9	7.5
A+C/A+D/A+C+D	9	4.5
B+C/B+D/B+C+D	9	2
A+B+C+D/A+B+C/A+B+D	27	0

Tabela 7: Valores relativos ao efeito dos alelos na distribuição de frequência da população F₁ (TSH 1188 X CCN 51).

ALELO	EFEITO OBSERVADO
A	6
B	9
C	15
D	15
A+B	18
A+C	21
A+D	21
B+C	23,5
B+D	23,5
C+D	15
A+B+C	25,5

A+B+D	25,5
A+C+D	21
B+C+D	23,5
A+B+C+D	25,5

Os valores encontrados indicam que há redundância no efeito de dois locos, sugerindo que deve haver uma relação epistática entre eles. Quando calculados separadamente ou em conjunto, “C” e “D” apresentam o mesmo valor. Esta observação equivale a descrita por Krakauer & Nowak (1999), os quais definem genes redundantes como dois ou mais genes não-alélicos que podem determinar igualmente um mesmo fenótipo, independente de encontrarem-se ou não juntos no mesmo indivíduo. E esta variância epistática é originada a partir de interações entre alelos de locos diferentes.

Sendo assim, os genótipos dos genitores baseados na Hipótese 3 possivelmente seriam conforme ilustrado na Figura 6. Sendo o TSH 1188 o genótipo possuidor dos quatro locos heterozigotos e o CCN 51 o genótipo possuidor de dois locos heterozigotos e dois locos recessivos.

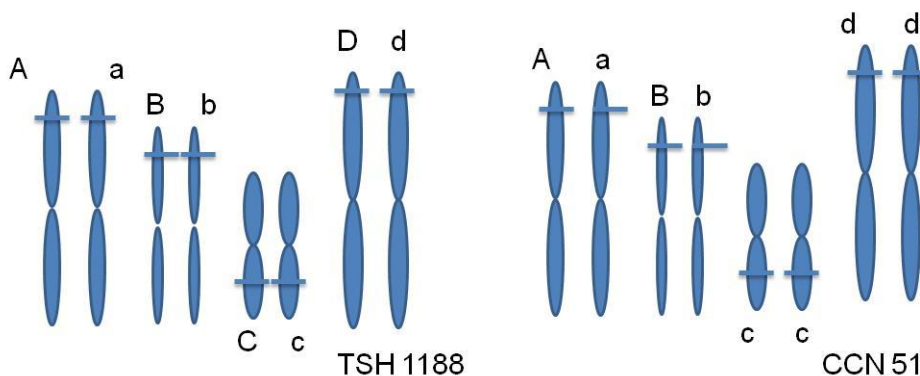


Figura 6: Esquema didático inferindo sobre os genótipos do TSH 1188 e CCN 51 baseado na Hipótese 3, com segregação independente em quatro locos distintos. O tamanho e a forma dos grupos de ligação são efeitos ilusórios apenas para ilustrar cromossomos diferentes, não possuindo relação com os grupos de ligação reais.

Todas as informações até aqui descritas permitem inferir sobre uma escala fenotípica baseada na resistência da população quanto ao número de locos com marcas dominantes (Tabela 8).

Tabela 8: Indicativo do estado dos locos para manifestação de diferentes fenótipos na população. Os números remetem a situação de presença e ausência de locos com efeito redundante.

LOCOS	FENÓTIPO
3 (4) Dominantes ou Heterozigotos	Altamente Resistente
2 (3) Dominantes ou Heterozigotos	Mediamente Resistente
1 (2) Dominantes ou Heterozigotos	Mediamente Suscetível
Recessivo	Altamente Suscetível

Vários autores inferiram sobre a herança da resistência à vassoura-de-bruxa. Pires *et al.*, (1999) afirmaram que a *M. perniciosa* tem uma herança poligênica; Neto *et al.*, (2005) citaram que a resistência à vassoura-de-bruxa é de natureza mono ou oligogênica, baseado em análise de distribuição de frequência da porcentagens de frutos com vassoura-de-bruxa. Faleiro *et al.*, (2002) detectaram padrões de resistência poligênica em populações de SCA-6 x ICS-1, e em populações de polinização aberta de TSH 1188. Ainda segundo estes últimos autores, os padrões poligênicos do TSH 1188 foram maiores do que no clone SCA-6. A explicação para tal resultado baseou-se na genealogia do TSH 1188, a qual conferiu a presença de outras fontes de resistência.

A definição de poligenia e oligogenia muitas vezes se mistura, a depender do posicionamento do autor. Para alguns, características poligênicas são aquelas que são controladas por muitos genes, o que engloba também as características oligogênicas (FLORIS & ALVAREZ, 1996). Para outros, características oligogênicas são aquelas que são decorrentes da ação de dois até cinco genes, enquanto as características poligênicas são decorrentes da ação de seis ou mais genes (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Verificou-se então que a herança para a resistência à vassoura-de-bruxa possivelmente seja controlada por poucos genes, sendo por isso considerada como oligogênica. As características oligogênicas apresentam-se controladas desde dois até cinco genes de interação epistática e possuem padrão de herança mendeliano. No melhoramento vegetal, a característica oligogênica de maior importância é a resistência de plantas aos patógenos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

4.4. Obtenção de DNA

Os DNAs das 282 plantas e dos genitores TSH 1188 e CCN 51 apresentaram qualidade e integridade satisfatória para a execução de análises moleculares. As amostras extraídas quando quantificadas apresentaram concentrações que variaram de 144,0 a 578,0 ng/μL. Géis de agarose a 0,8% foram utilizados para verificar a integridade do DNA (Figura 7).



Figura 7: Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹ após eletroforese em cuba horizontal a 80 volts por 40 minutos. Nos poços 1 e 2 estão as amostras de DNA extraído dos genitores (TSH 1188 e CCN 51), e nos poços de 3 a 25 estão algumas amostras dos DNAs da população F₁.

4.5. Screening dos marcadores RGH's

Dos doze marcadores RGH's utilizados (RGH 1, RGH 2, RGH 3A, RGH 3B, RGH 4, RGH 5, RGH 6, RGH 7, RGH 8, RGH 9, RGH 10, RGH 11), sete mostraram-se polimórficos entre os genitores da população: (RGH 1, RGH 2, RGH 3A, RGH 3B, RGH 4, RGH 5, RGH 7). Este tipo de marcador molecular difere dos demais quanto às condições adequadas para a visualização dos padrões de amplificação. A resolução do gel de agarose é insuficiente para este tipo de marcador, sendo utilizado apenas para o critério de análise de presença e ausência de amplificação (Figura 8). Géis de acrilamida utilizando a técnica de SSCP são os ideais por possibilitar a visualização e análise dos polimorfismos encontrados devido às diferenças no padrão de migração provenientes de alterações na conformação da fita simples de DNA (Figura 9A e 9B).

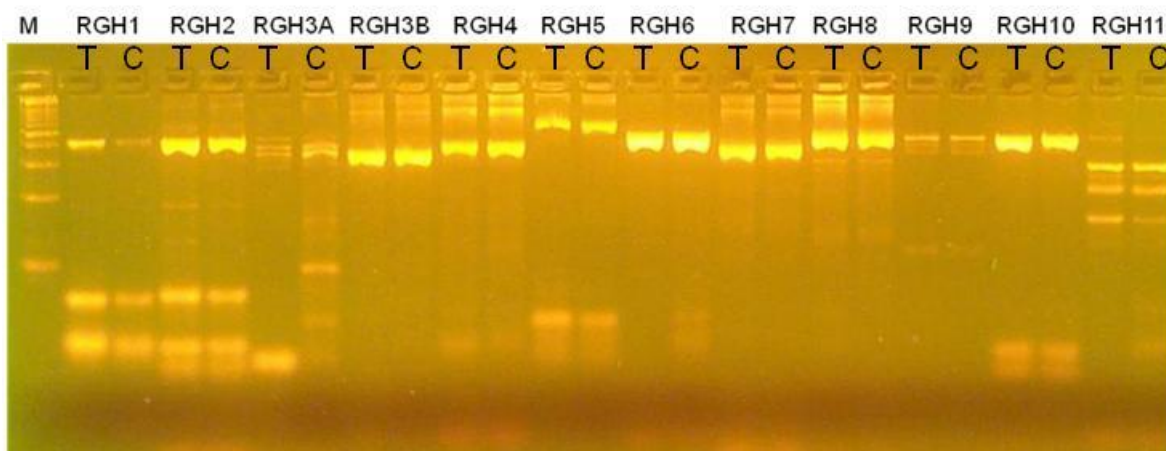


Figura 8: Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 10 mg.mL^{-1} após eletroforese em cuba horizontal a 90 volts por 40 minutos. No primeiro poço está o marcador DNA *ladder* de 10pb (Invitrogen). Nos poços consecutivos estão os DNAs dos genitores TSH 1188 (T) e CCN 51 (C) amplificados com os 12 marcadores RGH's.

(Figura 10A e 10B). Dos sete *primers* utilizados dois apresentaram segregação entre os DNAs dos *bulks* (RGH 4 e RGH 7), e destes, apenas um apresentou segregação associada com a característica em estudo (RGH 4).

Os *bulks* são rotineiramente aplicados em análises moleculares com a finalidade de obtenção de marcas freqüentes na população em tempo reduzido. O tamanho da amostra envolvida varia desde cinco (GILBERT *et al.*, 1999) até quarenta e cinco (SWEENEY & DANNEBERGER, 1995). No presente estudo utilizaram-se nove amostras para cada *bulk*. Os experimentos foram feitos com a técnica de *bulk* aberto, a qual é baseada na amplificação individual dos DNAs pertencentes a cada grupo.

O enquadramento desta técnica a este estudo se justifica pela sua vasta aplicabilidade, permitindo a identificação de marcadores moleculares associados à resistência às doenças, através da discriminação dos padrões de marcas apresentadas pela segregação dos *bulks* de resistência e suscetibilidade (POULSEN *et al.*, 1995); e o mapeamento de características quantitativas (WANG & PATERSON, 1994; SANTOS *et al.*, 2007).

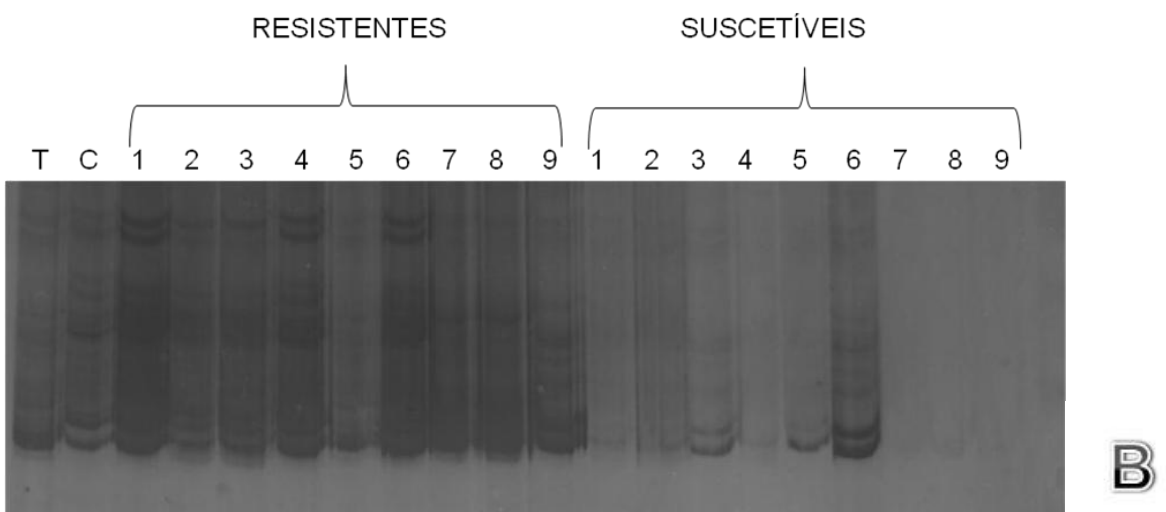
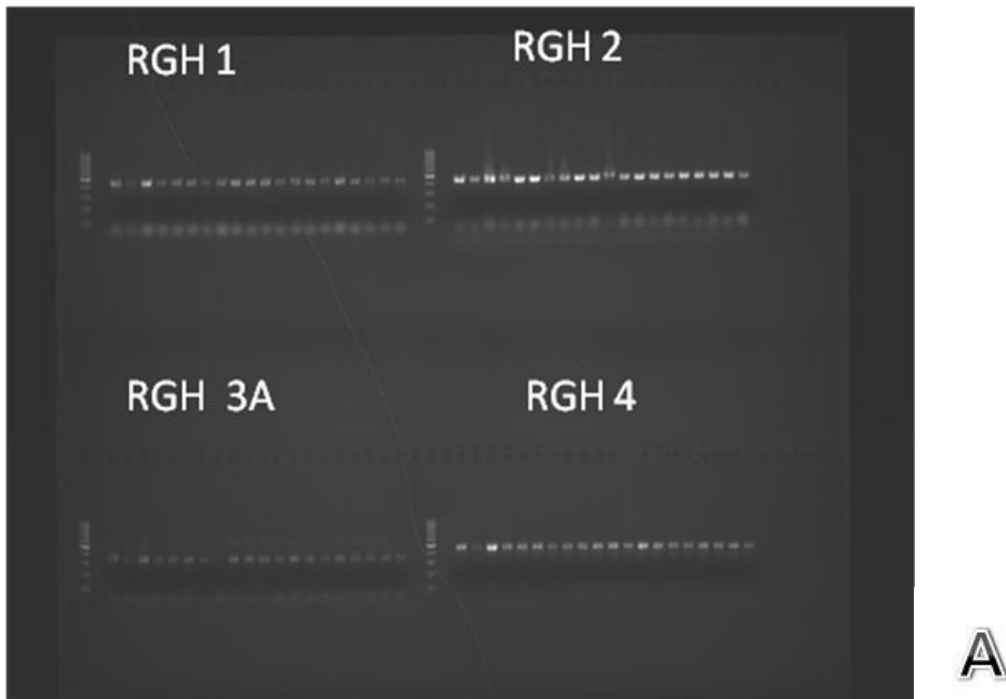


Figura 10: *Bulks* amplificados com marcadores RGH's. (A) Gel de agarose a 1% com os DNAs dos genitores e dos 18 DNAs dos *bulks* amplificados em quatro marcadores RGH's. (B) Gel de poliacrilamida a 6% utilizando a técnica de SSCP com ampliações dos DNAs dos genitores e dos *bulks* com o marcador RGH 4.

4.7. Mapeamento da população segregante

4.7.1. Genotipagem utilizando marcadores RGH's

Os marcadores RGH 4 e RGH 7 que apresentaram segregação nos DNAs dos bulks foram selecionados e genotipados na população (Figura 11).



Figura 11: Gel de poliacrilamida a 6% utilizando a técnica de SSCP. Em destaque (seta) a região amplificada pelo marcador RGH 4 nos DNAs da população F₁ TSH 1188 X CCN 51.

Os marcadores RGH 4 e RGH 7 foram identificados por Kuhn *et al.*, (2003) como pertencentes aos mesmos *clusters* de genes de resistência já descritos para outras espécies vegetais. O RGH 4 apresenta similaridades com o gene Rps2 de *Arabidopsis thaliana*, e o RGH 7 apresenta similaridades com os genes Xa1 de *Oryza sativa*, Rp1 de *Zea mays*, l2 e l2c de *Lycopersicon esculentum*.

Supõe-se que a função do RGH 4 possa ser de mediação da interação entre proteínas, atuando extracelularmente como receptor do elicitor codificado pelo gene *Avr*, ou intracelularmente antes da transdução de sinais relacionados com a defesa da planta, função estimada para os genes que possuem regiões ricas em leucina (BENT, 1996).

Estes marcadores (RGH 4 e RGH 7) apresentaram o mesmo padrão de banda descrito por Kuhn *et al.*, (2003). No entanto os mesmos não apresentaram segregação mendeliana na genotipagem da população, uma vez que as suas

segregações foram de 2:1. O RGH 7 também não apresentou segregação mendeliana em trabalhos anteriores, como o de Brown *et al.*, (2005).

Em situações nas quais os marcadores moleculares não apresentem a segregação mendeliana clássica esperada, estima-se que esteja ocorrendo distorção de segregação (FERREIRA, 2006). Neste caso, incluí-los nos estudos moleculares é uma decisão discutível. Alguns autores recomendam a retirada de marcadores com distorção de segregação, afirmando que os mesmos podem dificultar os testes de detecção de ligação gênica, afetando as estimativas de distância e ordem de marcadores. Outros autores utilizam os marcadores com este tipo de segregação em estudos de mapeamento genético, detectam grupos de ligação baseados no nível de probabilidade utilizado em testes de segregação individual, mas não sabem os efeitos provenientes da utilização de tais marcadores (OLIVEIRA *et al.*, 2004) .

Utilizou-se então o programa GqMol para realizar testes de mapeamento por marcas simples e análise de regressão, o qual indicou índice de determinação apenas para o RGH 4 no valor de R^2 (%) = 1,45. Este valor de R^2 indicou uma associação significativa a 5% de probabilidade entre o marcador e a característica fenotípica em estudo.

4.7.2. Genotipagem utilizando marcadores microssatélites (SSR)

Dos 93 marcadores SSR utilizados, 55 apresentaram-se associados a grupos de ligação (Tabela 9). Por motivo de sigilo provisório, até que o manuscrito de mapeamento genético seja publicado, os marcadores SSR serão apresentados de forma codificada de P (*primers*) de P01 a P55. Os marcadores de cada grupo mostraram similaridade com o mapa consenso de cacau (PUGH *et al.*, 2004), apresentando singelas diferenças quanto à distância entre uma marca e outra. Este fato pode ser explicado pela possível presença de taxa de recombinação nos genitores da população em estudo, ou porque o número de marcadores por grupo de ligação foi pequeno no presente trabalho. Supõe-se que o não agrupamento de alguns marcadores tenha ocorrido pelo fato de que a distância entre as marcas

fosse superior a 50 cM, ou que houvesse apenas um marcador para determinado grupo de ligação.

Tabela 9: Informações referentes aos 55 marcadores SSR ordenados de acordo com o grupo de ligação (LOD = 3,0, $r = 0,50$) ao qual estão associados. O tamanho em pares de bases (pb) dos alelos avaliados foi descrito com base nas informações obtidas em Pugh *et al.*, (2004) e Lanaud *et al.*, (1999).

Locos	Grupo de ligação	Tamanho do Alelo (pb)	Alelos Observados (pb)				Nº de alelos
			TSH 1188		CCN 51		
P23	1	138	129	140	138	140	3
P08	1	139	116	130	116	141	3
P31	1	165	151	154	151	162	3
P41	1	258	253	259	245	259	3
P33	1	304	283	300	280	283	3
P19	2	298	289	316	304	316	3
P09	2	129	123	127	123	135	3
P40	2	316	309	311	295	309	3
P81	2	280	276	280	280	280	2
P32	2	166	140	172	166	172	3
P56	2	112	109	114	114	114	2
P28	2	244	235	243	241	243	3
P15	3	204	205	211	205	213	3
P49	3	98	88	97	91	97	3
P77	3	172	170	170	168	170	2
P76	3	131	128	128	128	130	2
P12	3	157	140	153	142	153	3
P47	3	187	186	188	186	192	3
P34	3	197	196	205	196	209	3
P30	3	216	204	214	204	212	3
P38	4	118	114	126	114	129	3
P39	4	228	207	229	229	238	3
P42	4	261	225	248	248	256	3
P26	4	273	267	273	273	275	3
P84	4	123	121	123	121	121	2
P70	4	109	98	105	105	105	2
P03	4	139	108	136	120	136	3
P27	4	349	344	349	349	351	3
P04	5	105	92	93	92	102	3
P35	5	132	141	143	127	143	3

P80	5	254	241	255	255	255	2
P43	5	246	236	238	236	246	3
P89	7	139	133	133	133	135	2
P11	7	288	281	283	283	291	3
P37	7	197	189	207	197	207	3
P01	7	202	184	202	192	202	3
P02	7	353	352	362	328	362	3
P79	9	131	132	132	128	132	2
P17	9	212	199	211	205	211	3
P73	9	130	127	127	125	127	2
P57	9	288	291	295	291	291	2
P25	9	138	129	138	122	129	3
P75	9	262	259	259	259	261	2
P20	9	198	196	209	205	209	3
P52	9	197	184	192	184	184	2
P18	9	141	131	137	131	141	3
P45	9	188	201	217	186	217	3
P21	9	192	175	190	190	196	3
P22	9	216	217	229	216	229	3
P53	9	183	171	180	180	180	2
P54	9	235	232	237	237	237	2
P68	9	108	102	104	104	104	2
P60	9	301	286	286	286	302	2
P46	9	291	282	291	282	298	3
P67	9	136	133	154	133	133	2

Foram identificados 147 alelos em 55 locos. O número de alelo por cada marcador SSR variou entre dois e três, sendo a média de 2,67 alelos por locos. A segregação proveniente desses marcadores obedeceu à proporção mendeliana de 1:1.

Pela análise de regressão múltipla para mapeamento de QTL por marcas simples, utilizando o programa GqMol, verificou-se a associação entre os marcadores SSR e a característica fenotípica. Dentre os 93 SSR analisados, 14 apresentaram associação significativa, a 5% e 1% de probabilidade, entre o marcador e a característica fenotípica em estudo (Tabela 10).

Tabela 10: Associação entre marcadores SSR e o grupo de ligação (GL), com coeficiente de determinação a 5% e 1% de probabilidade.

LOCO	PROBABILIDADE	R ² (%)	GL
P25	5%	2,46	9
P26	5%	4,42	4
P33	1%	1,53	1
P38	1%	1,45	4
P42	5%	3,13	4
P47	5%	2,38	3
P50	1%	1,86	1
P55	1%	2,07	7
P61	1%	1,44	4
P71	1%	1,81	3
P77	5%	3,33	3
P80	1%	1,40	5
P82	5%	3,17	5
P88	5%	3,80	7

O efeito significativo do coeficiente de determinação indica a existência de associação entre marcador e fenótipo (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

Adicionalmente, utilizou-se o método de máxima verossimilhança para detectar QTL's e as distâncias entre os marcadores SSR (Figura 12A e 12B).

Observa-se que apesar de aparecer uma região genômica associada aos marcadores, esta região encontra-se afastada do loco do marcador (há cerca de 40 cM), indicando fraca associação e que o número de marcadores utilizados para genotipar a população não foi suficiente para cobrir adequadamente as regiões contendo genes de maior efeito na característica.

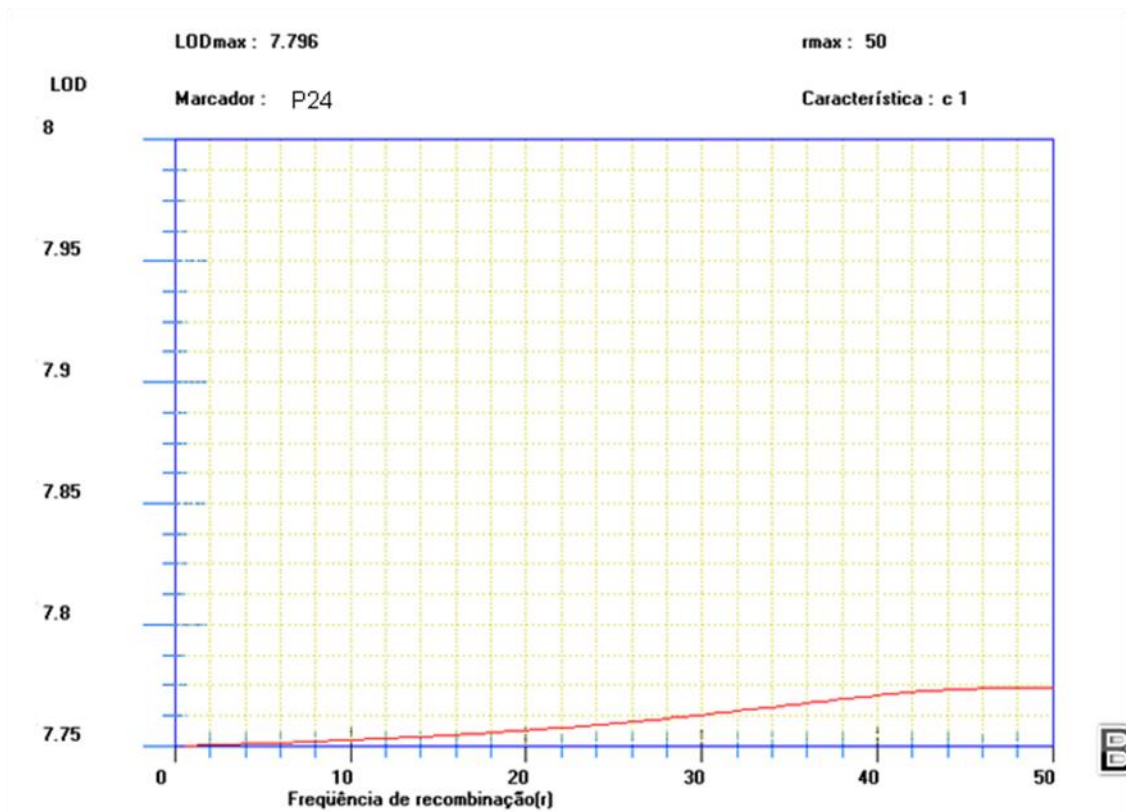
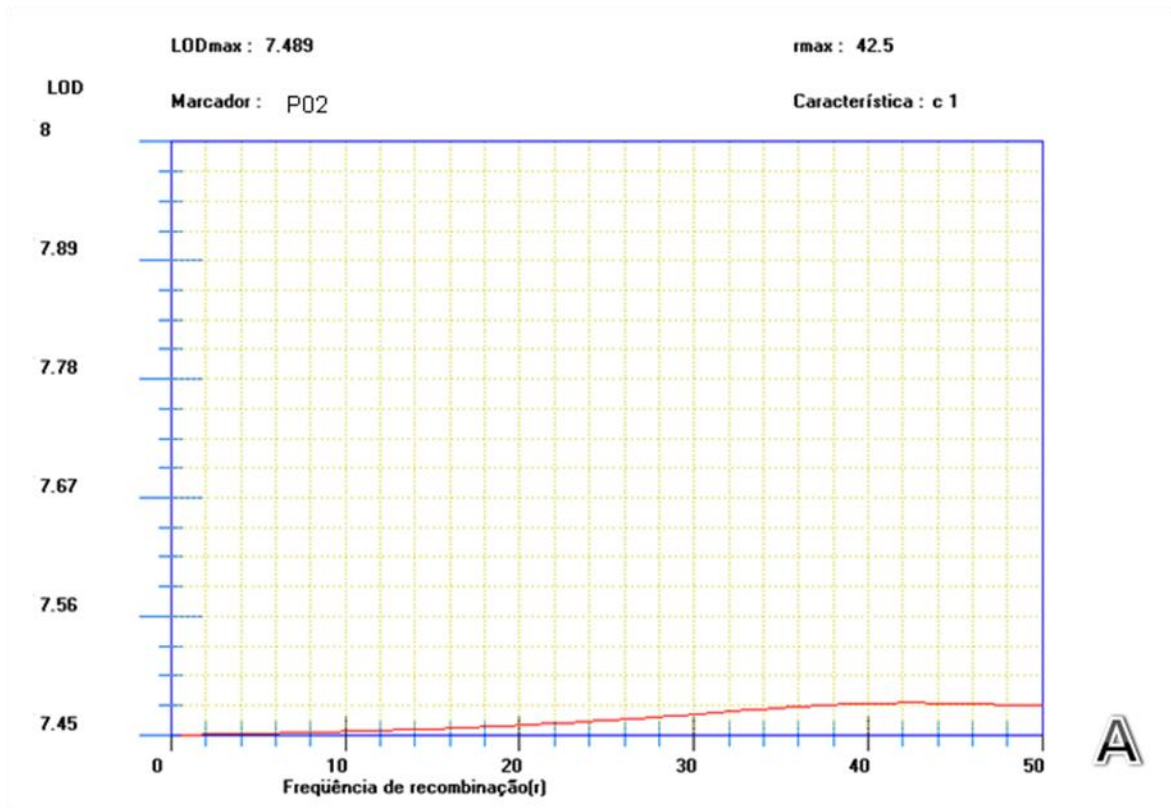


Figura 12: Curva da máxima verossimilhança. O pico corresponde à frequência de recombinação do marcador P02 (A) e do marcador P24 (B) ao fenótipo em estudo.

O pico das curvas em cada gráfico indica a distância do marcador com o QTL, o P02 está a uma distância de 42,5 cM, e o P24 está a uma distância de 50 cM. Em ambos os casos o valor do LOD foi superior a $LOD = 3,0$, o que indica que a probabilidade de ligação dos marcadores com um QTL é mil vezes maior do que a hipótese de não ligação (CRUZ & SILVA, 2006). Contudo, a grande distância entre as marcas simples (loco do marcador) com a região de efeito significativo indica que o número de marcadores foi insuficiente para alcançar as regiões genômicas contendo genes de efeito maior nessa característica.

O marcador P02 está localizado no grupo de ligação sete entre os marcadores P01 a 6,6 cM e o marcador P11 a 11,5 cM. E o P24 está no grupo de ligação nove.

O LOD é de extrema importância porque permite a identificação da associação da estatística de verossimilhança com o valor da probabilidade encontrada para cada marcador. É um teste de significância para avaliar hipóteses de ligação. Quando o seu valor é maior que três estima-se que os locos estejam ligados (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

Após a realização de todos os procedimentos descritos até aqui, verificou-se que dos marcadores SSR que mostraram associação significativa com o fenótipo em estudo, 12,5% estão no grupo de ligação um, 25% estão no grupo de ligação quatro, 18,75% estão no grupo de ligação sete e 12,5% estão no grupo de ligação nove.

No grupo de ligação nove está o principal QTL associado com a resistência a vassoura-de-bruxa (QUEIROZ *et al.*, 2003; FALEIRO *et al.*, 2006). No grupo de ligação quatro também foi localizado QTL relacionado com resistência à vassoura-de-bruxa (ALBUQUERQUE, 2006), assim como no grupo de ligação um (BROWN *et al.*, 2005). E no presente estudo, tanto os marcadores SSR (18,75%) quanto o marcador RGH 4, que se mostraram significantes, estão localizados no grupo de ligação sete.

5. CONCLUSÕES

A utilização de um número padrão, para estimar a quantidade total de almofadas florais analisadas que poderiam inferir corretamente a porcentagem de infecção da população, garantiu que não houvesse interpretações errôneas e seleção de falsos resistentes. A quantidade de no mínimo 20 almofadas avaliadas por planta, na presença monitorada de inóculo permite inferir sobre a intensidade de infecção.

A população proveniente do cruzamento entre TSH 1188 e CCN 51 apresentou, em baixo potencial de inóculo, a proporção de 27:27:9:1, enquanto que em alto potencial de inóculo a segregação verificada foi de 27:9:9:9:3:3:3:1. Este resultado indica que o uso das vassouras-de-bruxa secas como fonte de inóculo propiciou a melhor discriminação entre os grupos da distribuição de frequência da população. Essa segregação evidenciada é compatível com herança tipicamente oligogênica, com melhor discriminação entre os grupos da distribuição de frequência da população nas condições de alta pressão de inóculo.

Verificou-se uma alta segregação na população quanto ao número de almofadas florais, e que a maior frequência das mesmas está nos troncos da população.

O marcador RGH 4 mostrou uma associação significativa com a resistência à vassoura-de-bruxa em almofadas florais, assim como outros 16 marcadores SSR.

Dos marcadores que apresentaram-se associados com o fenótipo em estudo 12,5% estão no grupo de ligação um, 25% estão no grupo de ligação quatro, 18,75% estão no grupo de ligação sete e 12,5% estão no grupo de ligação nove. Tais grupos foram citados pela sua relevância, sendo os grupos de ligação um, quatro e nove possuidores de QTL's para a resistência a vassoura-de-bruxa (comprovados em estudos anteriores), e pelo grupo de ligação sete (ainda não citado na literatura para este fenótipo) ter demonstrado relevância.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342.

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

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

BAKER, R.E.D.; HOLIDAY, P. (1957). Witches' broom disease of cocoa. **Phytopathological Paper**, London, n. 2, p. 42.

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

BARTLEY, B.G.D. (1994). A review of Cacao Improvement: Fundamentals, Methods and Results. In: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, **Ingenic**, Kuala Lumpur, p. 3-17.

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

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

BASTOS, C.N. (1990). Epifitiologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) (Stahel) Singer. **Boletim Técnico**. Ministério da Agricultura. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus, n. 168, p. 21.

BASTOS, C.N. (1996). Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 50-54.

BENT, A. F. (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1757-1771.

BORRONE, J.W.; KUHN, D.N.; SCHNELL, R.J. (2004). Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao* L. **Theor Appl Genet**, v. 109, p. 495-507.

BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C.; LOPES, U.; KUHN, D.N.; BORRONE, J.W. (2005). Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F₂ population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 130, n. 3, p. 366-373.

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

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

BURROW, M.D.; BLAKE, T.K. (1998). Molecular tools for the study of complex traits. **Molecular dissection of complex traits**, p. 13-30.

CAMPO, E.C.; ANDIA, F.C. (1997). Cultivo y beneficio del cacao CCN 51. **El Conejo**, Quito, p. 136.

CASCARDO, J.C.M.; FIGUEIRA, A. (1995). Avaliação da diversidade genética em *Crinipellis pernicioso* usando marcadores moleculares PCR-RAPD. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 1, p. 72.

CASTRO, G.C.T.; BARTLEY, B.G.D. (1983). Caracterização de recursos genéticos do cacau. Folha, fruto e semente de seleções da Bahia das séries SIC e SIAL. *Theobroma*, Ilhéus, v. 13, n. 3, p. 263-273.

Censo Agropecuário do Brasil 2005. Rio de Janeiro: IBGE/SIDRA. Disponível: <http://www.ibge.gov.br>. (Acessado em janeiro de 2011).

CEPEC – Centro de pesquisas do cacau. (1987). List of clones in the CEPEC, Bahia, Brazil collection. Fornecido por B.G.D. Bartley, CEPEC, Brasil.

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - <http://www.ceplac.gov.br> (Acessado em janeiro de 2011).

CHAPMAN, R.K.; SORIA, S.J. (1983). Comparative *Forcipomyia* (Diptera, Ceratopogonidae) pollination of cacao in Central America and Southern Mexico. *Theobroma*, v. 13, p. 129-139.

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

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

CROUZILLAT, D.; LERCETEAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEI, J.; FRITZ, P. (1996). *Theobroma cacao* L.: A Genetics linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 93, n. 1, p. 205-214.

CROUZILLAT, D.; RIGOREAU, M.; CABIGLIERA, M.; ALAREZ, M.; BUCHELI, P.; PETIARD, V. (2001). QTL studies carried out for agronomic, technological and quality traits of cocoa in Ecuador. In: Kota Kinabalu, Proceedings International

workshop on new technologies and cocoa breeding, Kota Kinabalu: **INGENIC**, p. 120-126.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. (2004). GQMOL: genética quantitativa e molecular. **Viçosa**: UFV.

CRUZ, C.D.; SILVA, L.C. (2006). Análise de marcadores moleculares. In BORÈM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, p. 307-374.

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

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. (2001). Plant pathogens integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, n.14, p. 826-833.

DIAS, L.A.S. (2001). Melhoramento Genético do Cacaueiro. **Viçosa**: Editora Folha de Viçosa, p. 578.

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

FALEIRO, F. G.; RESENDE, M. L. V.; NIELLA, G. R.; CASTRO, H. A.; PEREZ, J. O.; JÚNIOR, C. A. V.; PIRES, J. L. (2002). Resistência Horizontal/vertical e agressividade/virulência no patossistema *Theobroma cacao* X *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, v. 14, n. 3, p. 121-126.

FALEIRO, F.G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V.A.; CRUZ, C.D.; CORREA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. (2003). 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.

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

FALEIRO, F.G. (2007). Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, **Embrapa**, p. 102.

FAO. Foundation Agricultural Organization. (2008). Roma: FAOSTAT Database Gateway. Disponível: <http://apps.fao.org> (Acessado em janeiro de 2011).

FERREIRA, A. (2006). Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gaméticas e genotípicas. **Tese** (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

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

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

FLOR, H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, n. 8, p. 653-669.

FLORIS, E.; ALVAREZ, J.M. (1996). Nature of resistance of seven melon lines to *Sphaerotheca fuliginea*. **Plant Pathology**, v. 45, p. 155-160.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. (1991). Infection biology of *Crinipellis pernicios*a on vegetative flushes of cacao. **Plant disease**, v. 7, n. 6, p. 552-556.

GILBERT, J.E.; LEWIS, R.V.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, P.D.S. (1999). Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical Applied Genetics**, v. 98, p. 1125-1131.

GRATTAPAGLIA, D. (2001). Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento – plantas**, p. 967-993.

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

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. (1994). The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicios*a. **Heredity**, v. 72, p. 278-289.

GUYTON, B. (2006). Cocoa market: supply and outlook. Chocolate Manufactures Association. Production and marketing statistics. Disponível em: **<http://www.worldcocoafoundation.org/Basics/Market/market.asp>** (Acessado em dezembro de 2010).

HAMMOND-KOSAK, K.; JONES, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 575-607.

HANCOCK, J.M. (2000). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites. Evolution and applications**. Oxford University press. p. 1-9.

HASENSTEIN, K.H.; ZAVADA, M.S. (2001). Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao*. **Physiology Plant**, v. 112, p. 113-118.

HEATH, M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 315–319.

HULBERT, S.H.; WEBB, C.A.; SMITH, S.M.; SUN, Q. (2001). Resistance gene complexes: Evolution and Utilization. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 285-312.

(ICCO). International Cocoa Organization. Update of the annual forecasts of production and consumption and estimates of production levels to achieve equilibrium in the world cocoa market as of 21 may 2009. Moscow: **ICCO, 2009**. (Executive Committee. EX 136/7).

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

JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. (2004). Plant innate immunity: direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 48–62.

KRAKAUERU, D.C.; NOWAK, M.A. (1999). Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. **Cell & Developmental Biology**, v. 10, p. 555-559.

KNOGGE, W. (1996). Fungal infection of plants. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1711-1722.

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

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

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

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

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.A.K.; FARGEAS, D. (2004). Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, v. 13, p. 211-227.

LANDER, E.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLON, A.; DALEY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181.

LIU, B.H. (1997). Statistical Genomics: linkage mapping and QTL analysis. **CRC Press**, p. 610.

LIU, B. H. (1998). Statistical genomics. **CRC**, p. 610.

Luz, E.D.M.N. et al. (1997). Evaluating resistance/tolerance to Witches' Broom disease in Bahia, Brazil. Final Report to ACRI. **CEPLAC/CEPEC**, February, 1997. p. 56. Data supplied to ICGD by Luz & Silva.

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

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

MENEZES, J.A.; CARMO-NETO, D. (1993). A modernização do *agrobusiness*. **Fundação Cargil**, p. 223.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. (1991). 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.

MILACH, S.C.K. (1998). Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: **UFRGS**.

MOTILAL, L.A. et al. (2000). *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.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCES, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, v. 5, p. 169-175.

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

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. (2005). Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil. Seção de Fitopatologia Centro de Pesquisas do Cacau. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (**CEPLAC**). Ilhéus – Bahia.

OLIVEIRA, R.P; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. (2004). Genetic linkage maps of "Pêra" sweet orange and "Cravo" mandarin with RAPD markers. **Pequisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 159-165.

ORCHARD, J.; COLLIN, H.A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. (1994). Changes in morphology and measurement of cytokine levels during the development of witches' brooms on cocoa. **Plant Pathology**, v. 43, p. 65-72.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. (1994). Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n. 2, p. 1-51.

PAULIN, D.; ESKES, A.B. (1995). Le cacaoyer: strategies de selection. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 2 p. 5-18.

PEARL, H.M.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; STEIGER, D.L.; OSGOOD, R.V.; MING, R. (2004). Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 829 – 835.

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

PEREIRA, M.G.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L. (1999). Melhoramento do cacau. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. **Viçosa**: UFV, p. 159-188.

PIRES, J.L. (2003). Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Viçosa.

PIRES J.L.; MONTEIRO, W.R.; PINTO, L.R.M.; YAMADA, M.M.; ANHERT, D. (1996). A proposal for cocoa breeding. In: Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference, 1996. Salvador. **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**, p. 287-292.

PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; PINTO, L.R.M.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; ANHERT, D. (1999). A proposal for cocoa breeding. In: **International Cocoa Research Conference, 12, Proceedings**, p. 287-292.

POULSEN, D.M.E.; HENRY, R.J.; JOHNSTON, R.P.; IRWIN, J.A.G.; REES, R.G. (1995). The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD markers linked to leaf rust resistance in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 270-273.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N`GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 5, p. 1151-1161.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. (1996). Status of cacao Witches' Broom: Biology, Epidemiology and Management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573-94.

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. (2003). Identification of major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v. 122, p. 258-272.

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

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

RISTERUCCI, A.M.; PAULIN, D.; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. (2003). Identification of QTL related to cocoa resistances to three species of *Phytophthora*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 168–174.

ROSÁRIO, M. et al. (1978). Cacau: história e evolução no mundo. Ilhéus: **CEPLAC**, p. 46.

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

SCHNELL, R.J.; KUHN, D.N.; BROWN, J.S.; OLANO, C.T.; PHILLIPS-MORA, W.; AMORES, F.M.; MOTAMAYOR, J.C. (2007). Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1664-1669.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. (2004). Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. **Viçosa**, p. 568.

SILVA, S.D.V.M. (1997). Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacau a *crinipellis* pernicioso. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)**. Universidade Federal de Viçosa.

SWEENEY, P.M.; DANNEBERGER, K.T. (1995). RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop Science**, v. 35, p. 1676-1680.

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

WANG, G.L.; PATERSON, A.H. (1994). Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 355-361.

WHEELER, B.E.J. (1985). The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. In: MOORE, D.; CASSELTON, L.A.; WOOD, D.A.; FRANKLAND, J.C. Developmental Biology of Higher Fungi. **Cambridge University Press**, p. 103-116.

WOOD, G.A.R. (1991). A history of early cocoa introductions. **Cocoa Growers' Bulletin**, v. 44, p. 7-12.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.; PIRES, J.L.; GOMES, L.M.C.; MELO, G.R.P. (2001). Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 1, n. 4, p. 377-384.