

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



**Interação entre enxerto e porta-enxerto e mapeamento fino de QTL na
resistência do cacaueteiro à murcha-de-ceratocystis**

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Feveireiro de 2014

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

**Mapeamento fino de QTL e efeito do porta-enxerto na resistência do
cacaueiro à murcha-de-ceratocystis**

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2014

F363 Fernandes, Luciel dos Santos
 Mapeamento de QTL e efeito de interações entre
 enxerto e porta-enxerto na resistência do cacau à murcha-
 de-ceratocystis / Luciel dos Santos Fernandes. – Ilhéus,
 BA: UESC, 2014.
 x, 65 f.: il.

 Orientador: Ronan Xavier Corrêa.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
 Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e
 Biologia Molecular.
 Inclui referências.

 1. Cacaueiro. 2. Cacaueiro – Doenças e pragas. 3.
 Cacau – Melhoramento genético. 4. Cacaueiro – Enxertia.
 5. Plantas – Anatomia. I. Título.

CDD 633.74

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

**Mapeamento fino de QTL e efeito do porta-enxerto na resistência do
cacaueiros à murcha-de-ceratocystis**

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Everaldo Gonçalves de Barros
(UCB)

Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
(UESC)

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
(UESC)

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

DEDICATÓRIA

A minha família, incluindo os recém-chegados, que tanto bem fazem à minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e familiares, por sempre estarem presentes.

Aos senhores Ademir Bomfim, Edson Souza, José Coutinho e José Ressurreição, por todo apoio técnico e pelos momentos de diversão.

Aos senhores Marcelo Santos e Valdivino do Carmo, por serem sempre prestativos e atenciosos.

Ao Dr. Stefan Royart, pelo apoio intelectual e boa vontade durante análise dos resultados.

Ao Dr. Jean-Phillippe Marrelli, pelo apoio e pela atenção durante a realização do experimento.

Ao Dr. Fabio Mathias Corrêa, por toda colaboração e pela análise estatística.

Ao meu orientador Ronan Xavier Corrêa, pela confiança, disponibilidade e presteza.

Aos funcionários do Centro Mars de Ciências do cacau, por todo apoio e atenção.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para execução do trabalho.

A Biofábrica de cacau, pela concessão das mudas.

A Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), pelo apoio técnico.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Agradeço.

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Impactos econômicos da murcha-de-ceratocystis na cultura do cacau	
3	
2.2. Agente etiológico da murcha-de-ceratocystis do cacau.....	5
2.3. Infecção e sintomatologia da murcha-de-ceratocystis do cacau ..	6
2.4. Controle fitossanitário da murcha-de-ceratocystis do cacau	8
2.5. Mapeamento genético de QTL visando resistência a doenças	9
2.6. Mapeamento fino de genes candidatos em plantas	11
2.7. Propagação do cacau por enxertia e resistência a doenças.....	12
3. CAPÍTULO 1	15
Efeito do porta-enxerto na resistência do enxerto à murcha-de-ceratocystis	15
Introdução	16
Material métodos	18
Material vegetal	18
Preparação do inóculo e inoculação das mudas	19
Avaliação da resistência nas diferentes combinações de porta-enxertos e enxertos	19
Análises de estatísticas	20
Resultados	21
Discussão	24
Conclusões	26
Agradecimentos	27
Referências	27

4. CAPÍTULO 2	30
Mapeamento de QTL associados com resistência do cacaueteiro à murcha-de-ceratocystis	30
Introdução.....	31
Material e Métodos	33
Material vegetal	33
Inoculação e avaliação fenotípica para resistência murcha-de- ceratocystis	34
Associação entre marcadores SNP e resistência à murcha-de- ceratocystis	35
Mapeamento de QTL e seleção de genes candidatos	36
Resultados	37
Distribuição fenotípicas da resistência do cacaueteiro à murcha-de- ceratocystis	37
Identificação de marcadores SNP e mapeamento de QTL associados com a resistência à murcha-de-ceratocystis.....	42
Identificação de genes candidatos nas regiões dos QTL	50
Discussão	50
Conclusões	53
Agradecimentos	54
Referências bibliográficas	54
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	60

EXTRATO

FERNANDES, Luciel dos Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2014 **Mapeamento fino de QTL e efeito do porta-enxerto na resistência do cacauero à murcha-de-ceratocystis.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientador: Jean-Philippe Marrelli. Colaborador: Fabio Mathias Corrêa.

A murcha-de-ceratocystis, ocasionada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta*, é uma doença sistêmica que atinge o sistema vascular da planta, culminando em sua morte. A ocorrência dessa doença está associada a perdas na produção de cacau, principalmente onde as principais medidas de controle fitossanitário não são empregadas de maneira correta. A busca por novas fontes de resistência se apresenta como uma alternativa importante para se estabelecer medidas de controle mais eficientes. Adicionalmente, porta-enxertos resistentes são empregados pelos agricultores para favorecer o desenvolvimento de clones de cacau que não possuam resistência ao ataque de *C. cacaofunesta*. Os estudos sobre efeitos de porta-enxertos nos enxertos de cacau são escassos, especialmente no caso de resistência a doenças. As informações referentes a QTL relacionados a essa doença poderão ser utilizadas para identificar e selecionar marcadores moleculares, e posteriormente, usá-los em Seleção Assitida por Marcadores (SAM) em programas de melhoramento genético. Assim, no presente trabalho, objetivou-se analisar se existe efeito na interação entre o enxerto e porta-enxertos quanto a resistência de diferentes clones à murcha-de-ceratocystis e mapear Lócus de Características Quantitativas (QTL) relacionados com resistência a essa doença. Para a análise do efeito do porta-enxerto, foi

quantificado o Número de Plantas Mortas (NPM) e medido o Comprimento da Lesão no Xilema (CLX) durante 52 dias após inoculação. Os enxertos de CCN-10 e CCN-51 foram os mais suscetíveis, em que a incidência da doença ficou acima de 80% com todos os porta-enxertos; todos os enxertos de CCN-51 em porta-enxertos de CCN-51 morreram, ao passo que quando enxertado nos clones TSH-1188 e VB-1151, as plantas sobreviveram. A incidência da doença nos enxertos de TSH-1188 e VB-1151 foram menores que 20%. Os melhores porta-enxertos foram TSH-1188 e VB-1151. Para o mapeamento de QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis, foram inoculados 266 genótipos da população de mapeamento (MP01), proveniente do cruzamento entre os clones TSH-1188 e CCN-51. Esses genótipos haviam sido previamente genotipados pela MARS utilizando marcadores SNP. Numa incisão feita no caule das mudas foram depositados 30 µl da suspensão, contendo esporos fungo, na concentração de 1×10^5 esporos/ml. As variáveis NPM e CLX foram avaliadas durante 52 dias. A análise de associação genética foi realizada com base no cálculo da Área Sob a Curva de Progresso da Doença (ASCPD) pelo método de regressão. Os coeficientes de correlação de 0,89 para o NPM e 0,85 para CLX confirmam a forte associação entre marcadores Single Nucleotide Polymorphic (SNP) e a resistência à murcha-de-ceratocystis. Os marcadores associados com resistência estão nos grupos de ligação (GL) 4 e 6. O mapeamento de QTL utilizando mapeamento por intervalo composto (MIC) identificou um pequeno QTL no GL 4, e outro de grande efeito no GL 6. No total 12 genes candidatos foram encontrados, sendo 3 no GL 4 e 9 no GL 6. Portanto, os resultados encontrados comprovam que a resistência do enxerto são favorecidas pelo uso de porta-enxerto resistente à murcha-de-ceratocystis, sendo um método auxiliar no controle dessa doença. Na população em estudo, existem duas regiões genômicas com genes candidatos que podem estar relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis.

Palavras-chave: *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao* L., melhoramento genético, enxertia.

ABSTRACT

FERNANDES, Luciel dos Santos, M.Sc., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, february 2014. **Fine mapping QTL and effect of rootstock resistance of cacao to *Ceratocystis* wilt.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Advisor Committee Members: Jean-Philippe Marelli and Fabio Mathias Corrêa.

Ceratocystis wilt, caused by the fungus *Ceratocystis cacaofunesta*, is a systemic disease that affects the plant's vascular system, culminating in plant death. Because the occurrence of this disease is associated with losses in cocoa production, especially where the main phytosanitary control measures are not correctly used, the search for new resistance sources of is a crucial alternative to establish control measures more efficient in controlling this disease. Resistant rootstocks are used by farmers to promote the development of cacao clones that have no resistance to attack by *C. cacaofunesta*. Research about effects of the rootstocks cocoa grafts are scarce, especially for disease resistance. Mapping QTL related to *Ceratocystis* wilt may be used to identify and select molecular markers for use in marker assisted selection (MAS) for breeding programs. Thus, in the present work aimed to examine whether there is effect of rootstocks on the resistance levels of different clones to *Ceratocystis* wilt and perform QTL mapping associated with resistance. The effect of the rootstock in the cacao grafts was analyzed by number of plant dead (NPD) and lesion size (XLS) for 52 days after inoculation. Grafts of CCN-10 and CCN-51 were more susceptible, in which disease incidence above 80% with all rootstocks. All grafts CCN-51 died when grafted in CCN-51 rootstock, whereas plants

survived when grafted TSH-1188 and VB-1151. The incidence of the disease in grafts TSH-1188 and VB-1151 was not higher than 20%. The best rootstocks were TSH-1188 and VB-1151. For carried out the QTL mapping associated with resistance to *Ceratocystis* wilt in the mapping population (MP01), a set of 266 derived from a cross between TSH-1188 and CCN-51, were previously genotyped using SNP markers and a genetic linkage map was made. An incision was made in the stem of the seedlings and 30µl of the suspension containing fungus spores (1×10^5) were deposited. Disease incidence (NPD) and severity (XLS) was followed for 52 days. A genetic association analysis was carried out on the AUDPC by regression method (LASSO). Identified markers associated with resistance on linkage groups (LG) 4 and 6. The correlation coefficient was 0.89 and 0.85, respectively, indicating a strong degree of association between those markers and resistance. QTL mapping using composite interval mapping (CIM) identified a QTL of major effect for LG 6, and other small effect on LG 4, in which 3 were in the LG 4 and 9 in the LG 6. Knowledge resulting of this work confirms the levels of plant resistance are increased by the use of resistant rootstock to *Ceratocystis* wilt and aids in disease control method. Two new genomic regions were identified in this population and candidate genes for *Ceratocystis* wilt resistance were found. These candidate genes must be analyzed for differential gene expression and protein accumulation in future works.

Key-words: *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao* L., breeding, SAM, grafting.

1. INTRODUÇÃO

O ataque do fungo *Ceratocystis cacaofunesta* à cultura do cacau tem causado perdas na produção de cacau nas principais regiões produtoras da América Latina, incluindo o sul da Bahia. A constatação da murcha-de-ceratocystis na região sul da Bahia requer medidas de controle dessa doença a fim de reduzir essas perdas. Por essa razão, a busca por fontes de resistência a essa doença constitui uma etapa crucial para os programas de melhoramento genético do cacau, haja vista que é uma alternativa mais eficaz no controle dessa doença. Além disso, a identificação de genótipos com genes de resistência à murcha-de-ceratocystis é de vital importância, pois permite desenvolver clones resistentes ao ataque de *C. cacaofunesta*, bem como identificar marcadores moleculares que possam ser utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento genético do cacau. Tais medidas podem acelerar o processo de seleção de clones resistentes ao ataque do fungo.

Os estudos sobre efeitos de porta-enxerto nos enxertos de cacau são escassos, especialmente no caso de resistência a doenças. Diferentes combinações de porta-enxertos e enxertos vêm sendo utilizadas em estudos de natureza fisiológica, bem como visando estudar outras interações planta-patógeno. Esses conhecimentos poderão ser impactantes para prever qual a melhor combinação de enxerto e porta-enxerto, visando controlar a murcha-de-ceratocystis na cultura do cacau. Assim, nossa hipótese foi que o porta-enxerto influencia na resistência do enxerto quanto à murcha-de-ceratocystis no cacau. Nesse aspecto, objetivou-se:

- a) Analisar os níveis de resistência de clones de cacau à murcha-de-ceratocystis em diferentes combinações de porta-enxertos e enxertos.
- b) Inferir se há efeitos nos níveis de resistência a partir dos porta-enxertos resistentes.

Nos estudos realizados por Branco (2011) (dados não publicados) na população MP01 foram encontrados QTL relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis. Contudo, poucos indivíduos foram analisados (apenas 71) o que pode ter influenciado na eficiência do mapeamento do QTL. Assim, faz-se necessário aumentar o número indivíduos da população, e, por conseguinte, aumentar a acurácia do mapeamento genético, de modo que se consiga obter dados fenotípicos mais robustos. Desse modo, a hipótese de trabalho foi que na população MP01, resultante do cruzamento entre os clones 'TSH-1188' e 'CCN-51', é possível encontrar regiões de QTL para resistência à murcha-de-ceratocystis. Neste contexto, objetivou-se:

- a) Caracterizar fenotipicamente 266 indivíduos $F_{1(TSH-1188 \times CS-1)}$ quanto à resistência à murcha- de-ceratocystis;
- b) Analisar dados genômicos do cacau com SNP a fim de identificar a de marcas adicionais que possam discriminar grupos de plantas para o caráter fenotípico avaliado;
- c) Realizar mapeamento fino de QTL associados à resistência à murcha-de-ceratocystis, utilizando marcadores SNP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos econômicos da murcha-de-ceratocystis na cultura do cacau

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L), um membro da família Malvaceae, é uma espécie alógama, diploide ($2n= 20$), originária das florestas tropicais da Amazônia na América do Sul (ARGOUT et al., 2010). Mundialmente cultivada, a cultura contribui significativamente para economia de muitas regiões, incluindo a África, América Latina e Ásia (BOZA et al., 2012). O continente africano se destaca como o maior produtor mundial de cacau, com aproximadamente 71% de toda produção mundial, sendo a Costa do Marfim, Gana, Indonésia e Nigéria, os principais países produtores, respectivamente (ICCO, 2013). Na América Latina, o Brasil ocupa lugar de destaque como um dos maiores produtores de cacau, com ênfase para os estados de Rondônia, Amazônia, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, como os principais estados produtores dessa cultura, sendo que a Bahia é o maior produtor nacional (ICCO, 2013).

Nas principais regiões produtoras de cacau ao redor do mundo, a produção vem sendo reduzida devido ao ataque de fungos, bactérias, e vírus que causam sérias doenças (DORMON et al., 2004; PLOETZ, 2007). As principais doenças que acometem a cultura são vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa* Aime & Philips-Mora), (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) podridão-parda (*Phytophthora* spp) (BROWN et al., 2005), monilíase (*M. roreri*) (BROWN et al., 2005) e murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

No sul da Bahia, o surgimento da vassoura-de-bruxa em 1989 ocasionou a crise da lavoura cacaueteira, o que exigiu o desenvolvimento de estratégias de controle dessa doença (BERTOLDE et al., 2009). Frente a essa situação, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueteira (CEPLAC), recomendou a substituição dos genótipos que se apresentaram suscetíveis à vassoura-de-bruxa por genótipos elite de *T. cacao* que são mais produtivos e resistentes a essa doença (BERTOLDE et al., 2009). A situação se agravou ainda mais em 1997, quando se constatou a murcha-de-ceratocystis em mudas no viveiro (BEZZERA et al., 1997 citado SANCHES et al., 2008), a qual juntamente com a vassoura-de-bruxa e a podridão parda, têm causado a morte de muitas plantas, o que agravou ainda mais a crise da lavoura cacaueteira nessa região.

A doença é conhecida como “mal-do-facão”, morte súbita do cacau, ou murcha-de-ceratocystis, e tem ocasionado perdas enormes na região sul da Bahia e em outras regiões produtoras do continente americano (SILVA et al., 2007; DELGADO, 2003). Essa doença é considerada como uma das mais devastadoras, pois tem o potencial de levar morte da planta infectada em poucos meses após a infecção (ENGELBRECHT et al., 2007). A ocorrência de *C. cacaofunesta* predomina em regiões de cultivo mais antigo do cacaueteiro (BARNES et al., 2003; ENGELBRECHT et al., 2007). A doença provocou a morte de várias plantas de cacau das variedades ‘Trinitário’ e ‘Criollo’, assim como, dos clones com genes da variedade ‘Criollo’ em diversos países da América Central e do Sul (DELGADO, 2003; GOITÍA; ROSALSES, 2001). A murcha-de-ceratocystis foi primeiramente identificada no Equador por volta de 1918, onde causou a morte de milhares de mudas do clone ICS-1 (DELGADO; CAPELLO, 2001; DELGADO, 2003; SILVA et al., 2012). Na década de 1950, causou a morte de diversas árvores de cacau na Venezuela e em diversos outros países, entre eles estão à Colômbia, Costa Rica, Haiti, México e Trinidad e Tobago (DELGADO, 2003; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2012; ENGELBRECHT, et al., 2007). As árvores geneticamente relacionadas com os clones do tipo Criollo são altamente suscetíveis, enquanto que clones do tipo Forasteiros e alguns segregantes do tipo Trinitário apresentam certa resistência à murcha-de-ceratocystis

(DELGADO, 2003). Devido ao curto período entre o surgimento dos sintomas da doença, e morte da planta, torna-se mais difícil aplicar medidas de controle fitossanitário para essa doença (SILVA et al., 2012).

No Brasil, Bastos e Evans (1978) relataram a ocorrência de *C. fimbriata* na plantação de cacau no estado de Rondônia provocou a morte de várias árvores dos clones ICS-39 e CAS-1. A espécie *C. cacaofunesta* é oriundo da região amazônica no estado de Rondônia (ENGELBRECHT et al., 2005).

Na região produtora do sul da Bahia, a doença foi inicialmente identificada em mudas enxertadas em uma estação experimental em 1997 (BEZERRA, 1977), e no ano seguinte, em plantas adultas (BEZERRA et al., 1998). Acredita-se que o patógeno ocorresse de forma esporádica no Sul da Bahia, no entanto, só se manifestou com o plantio da variedade Theobahia, o qual foi altamente difundido pela região e mostrou-se altamente susceptível à *C. cacaofunesta* (OLIVEIRA e Luz, 2005).

Em 2001, a doença foi registrada no Espírito Santo (ALMEIDA et al., 2005) e, em 2004, no município de Marituba no Pará (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2005).

2.2. Agente etiológico da murcha-de-ceratocystis do cacauero

C. cacaofunesta é um fungo ascomiceto que ataca o xilema das árvores de cacau e provoca a murcha dos galhos e ramos, culminado na morte da planta (ENGELBRECHT et al., 2005; PLOETZ, 2007). O fungo faz parte do complexo de espécies de *C. fimbriata*, conhecido por causar murcha e cancro em diversas espécies de importância econômica ao redor do mundo (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005; ENGELBRECHT et al., 2007; JOHNSON et al., 2005), a exemplo do *Eucalyptus* spp. (BARNES et al., 2003; FERREIRA et al., 2013); café (*Coffea arabica* L.) (BAKER et al., 2003); cupuaçu (*T. grandifolium*) (OLIVEIRA et al., 2013); *Mangifera indica* L. (HARRINGTON et al., 2011); acácia-negra (*Acacia decurrens*) ((SANTOS et

al., 2003); Seringueira (*Hevea brasiliensis*) (RIBEIRO et al., 1987); *Cassia* spp). (RIBEIRO et al., 1987); *Platanus* sp (BARNES et al., 2001) e *Citrus* sp. (BARNES et al., 2001).

O fungo *C. fimbriata* foi inicialmente descrito como agente infeccioso da murcha-de-ceratocystis do cacau. Posteriormente, análises filogenéticas entre diferentes isolados de *C. fimbriata* de batata (*Ipomoea batatas*), cacau (*T. cacao*), e *Platanus* spp permitiram descrever o patógeno do cacau como uma nova espécie, *C. cacaofunesta*, como um patógeno específico da cultura cacauera (ENGELBRECHT et al., 2005). Outras espécies desse complexo também são patógenos específicos de outras culturas (ENGELBRECHT et al., 2007). *C. cacaofunesta* produz peritécios globosos, com rostros longos e fimbriados, possuindo tonalidade do castanho ao preto, e ascósporos elipsóides, hialinos, (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). Embora o patógeno do cacau seja morfológicamente similar a *C. fimbriata*, as espécies diferem na patogenicidade ao cacau e na produção de conídios (ENGELBRECHT; HARRINGTON., 2005).

Estudos com isolados de *C. cacaofunesta* demonstraram haver variabilidade patogênica entre os isolados de diferentes localidades (SILVA et al., 2007; SILVA et al. 2004; HARRINGTON, 2000; ENGELBRECHT et al., 2007). Na região Sul da Bahia, a elevada agressividade do patótipo que ataca as plantações de cacau tem dificultado a utilização de metodologias que permitam avaliar e selecionar os genótipos resistentes à murcha-de-ceratocystis (SILVA et al., 2007). Essa diversidade deve ser considerada nos estudos fitopatológicos no cacau.

2.3. Infecção e sintomatologia da murcha-de-ceratocystis do cacau

Diferente das outras doenças do cacau, a murcha-de-ceratocystis é uma infecção sistêmica severa que compromete todo o sistema vascular, e tem o potencial de levar a morte da planta dentro de poucos meses (AMBROSIO et al., 2013).

C. cacaofunesta, um fungo de solo, penetra no xilema da planta por meio de ferimentos ou rachaduras nas raízes (YADETTA; THOMMA, 2013; SILVA et al., 2007; DELGADO, 2003). Na parte aérea, a penetração de *C. cacaofunesta* no tronco da planta é favorecida pelas práticas de enxertia e poda da cultura, em que, ferimentos provocados por instrumentos utilizados durante as referidas práticas funcionam como via de acesso ao xilema da planta (OLIEVIRA; LUZ, 2005). Além do mais, na parte aérea da planta, espécies de coleóptera do gênero *Xyleborus* sp. estão associados com a disseminação de *C. cacaofunesta* (GOITÍA; ROSALSES, 2001). Muitas espécies do gênero *Ceratocystis*, incluindo *C. cacaofunesta*, produzem substâncias químicas voláteis com odor de fruta que atraem os insetos que perfuram o tronco das árvores para depositarem suas larvas, por conseguinte, transmitem o patógeno de uma planta à outra (BARNES et al., 2003; GOITÍA; ROSALSES, 2001; RIBEIRO et al., 1986).

Independentemente do modo de penetração, após invadir os vasos do xilema, *C. cacaofunesta* produz esporos que rapidamente colonizam o sistema vascular do hospedeiro, causando a necrose das células xilemáticas (YADETTA; THOMMA, 2013). Comumente, durante os 7 dias após a infecção, surgem os primeiros sintomas de murchas das folhas e ramos, em seguida, entre 15 e 25 dias ocorre a clorose progressiva, as folhas secam, mas permanecem aderidas a planta por volta de 25 a 30 dias, por fim, por volta de 30 a 35 dias a infecção culmina na morte da planta ou do ramo infectado (Figura 1).

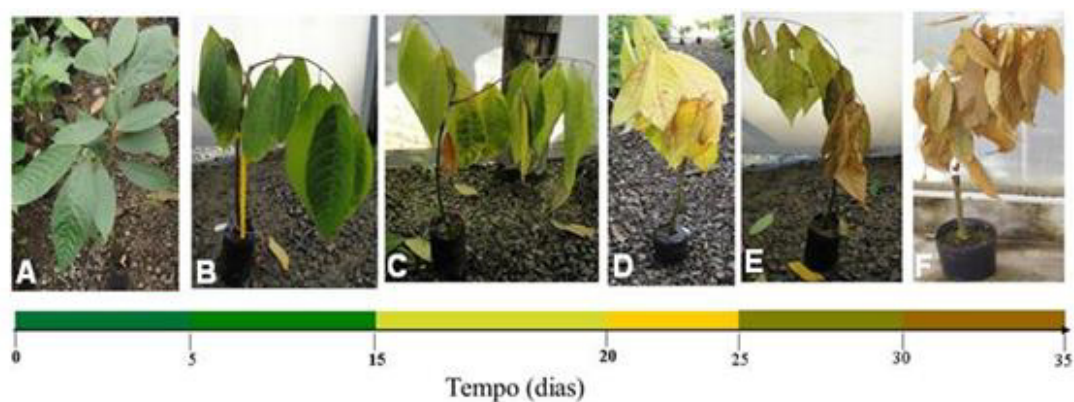


Figura 1. Sintomas e progressão da murcha-de-ceratocystis em mudas seminais de cacau. A= Sem sintomas, B= Murcha, C e D= Murcha e clorose, E= Seca das folhas e ramos, F= Morte da planta. Fonte: acervo pessoal.

O desenvolvimento dos sintomas ocorre de maneira acrópeta e surgem devido à disfunção do sistema vascular causada pela extensiva colonização dos vasos do xilema por *C. cacaofunesta*. Logo, a lesão causada pelo fungo ao longo do sistema vascular da planta, bloqueia os vasos do xilema, dificultando o transporte de água das raízes até a parte aérea (GENIN, et al., 2010; SILVA et al., 2007; DELGADO, 2003). Tal lesão pode ser observada como uma extensa mancha de coloração escura em secções de ramos infectados.

2.4. Controle fitossanitário da murcha-de-ceratocystis do cacaeiro

As principais recomendações técnicas de manejo dessa doença incluem a esterilização dos instrumentos agrícolas com solução de hipoclorito a 1%, cuidados durante as práticas de poda e colheita do cacau, com intuito de minimizar lesões mecânicas que poderiam ser utilizadas pelo fungo para infectar a planta, proteção dos tecidos expostos com pasta antifúngica e remoção e queima das plantas infectadas (DELGADO, 2003; OLIVEIRA e LUZ, 2005). Fungicidas sistêmicos e inseticidas têm sido utilizados como outras formas de medidas de controle do fungo e do agente de dispersão do fungo, *Xyleborus* spp, e alguns, tem se mostrado bastante promissores (OLIVEIRA e LUZ, 2005).

Além disso, estratégias alternativas, tais como, a solarização e a fumigação, vem sendo utilizados com sucesso no controle de murchas vasculares provocadas por fungos e bactérias em outras culturas (GENIN, 2010; YADETA e THORMMA, 2013). Contudo, cuidados devem ser tomados durante a aplicação de métodos químicos, tal como fumigação, considerando-se as possíveis complicações a saúde pública e ambiental

decorrente da utilização de tais compostos químicos (YADETA e THORMMA, 2013). Outros métodos compreendem a utilização de micro-organismos antagonistas como agentes de biocontrole de microrganismos patogênicos que causam murcha vascular em diversas espécies vegetais (AKHTAR et al., 2010; KIDANE; LAING, 2008; SHISHIDO et al., 2005).

Ainda que as estratégias de controle da murcha-de-ceratocystis ajudem a reduzir as perdas na produção, a utilização de genótipos resistentes ao ataque de *C. cacaofunesta* atualmente corresponde a uma das alternativas mais promissoras para controle efetivo dessa doença, haja vista que é uma alternativa menos onerosa, mais eficaz e ecologicamente correta.

2.5. Mapeamento genético de QTL visando resistência a doenças

Os estudos de Morgan (1910) e Sturtevant (1913), interpretando dados de segregação de genes ligados, serviram como base para idealização da teoria do mapeamento genético, com base na frequência de recombinação entre *loci* (CARNEIRO;VIEIRA, 2002). Mapas genéticos são a representação linear do genes nos cromossomos, e são ferramentas importantes que podem ser utilizadas para observar a segregação gênica (SCHUSTER; CRUZ, 2008). Quando os mapas genéticos apresentam alto grau de saturação, proporcionam a manipulação e clonagem de genes de interesse (CHEEMA; DICKS, 2009). Além do mais, permite a localização de regiões que controlam caracteres quantitativos (QTL), bem como a quantificação dos efeitos dessas regiões na variação da característica (FALEIRO et al., 2003).

A construção de mapas genéticos envolvem algumas premissas básicas que vão desde a escolha da população até o estabelecimento do grupos de ligação em cada cromossomo. O primeiro passo consiste em escolher uma população proveniente de genitores contrastantes, é importante que a população proveniente desse cruzamento esteja em desequilíbrio de ligação (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Além disso, deve atentar para o tipo de cruzamento, tal como populações derivadas de linhagens endogâmicas, F2, retrocruzamento (RIL e NIL) (BHERING et al., 2008) e o tipo de marcador

molecular empregado no estudo, uma vez que o máximo de informação será obtido utilizando marcadores codominantes com populações tipo F2 (ROCHA et al., 2004; SCHUSTER & CRUZ, 2008). Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados no mapeamento genético, os quais incluem marcadores de natureza codominante, tal como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphic*), e de natureza dominante, a exemplo dos RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*) (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). O passo seguinte consiste em verificar se há distorção de segregação entre os loci, e por fim, calcular frequência de indivíduos recombinantes e estabelecer a distância e os grupos de ligação para cada marcador molecular (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

O advento das novas tecnologias de sequenciamento possibilitou o desenvolvimento de marcadores moleculares altamente informativos, tais como os marcadores microssatélites e SNP (MOTAMAYOR et al., 2013; TRICK et al., 2012). Tais avanços forneceram novos caminhos para acelerar as análises genéticas de características, assim como possibilitou a construção de mapas genéticos mais saturados e com maior precisão (TRICK et al., 2012). Diante desses avanços, procedimentos como o mapeamento de QTL passaram a ser feitos de forma mais eficiente, possibilitando estimar e localizar regiões que controlam características de importância econômica (ARGOUT et al., 2010).

A maioria dos caracteres de importância econômica tem natureza quantitativa e, resulta da ação cumulativa de um conjunto de genes, cuja expressão fenotípica é fortemente influenciada pelo ambiente (GRATTAPAGLIA, 2004). Essas características são conhecidas quantitativas e são controladas por locos denominados QTL (Quantitative Trait Loci ou QTL). O mapeamento do QTL é feito por meio de associação entre dados fenotípicos e de marcadores moleculares. O mapeamento de QTL possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como suas localizações cromossômicas, modo de ação gênica, além de possibilitar a decomposição da interação genótipo ambiente ao nível de cada QTL (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

No cacauero, um grande número de QTL para resistência a doenças têm sido detectados. QTL mapeados para resistência a várias doenças do cacauero, incluindo vassoura-de-bruxa, podridão-parda e monilíase, foram identificados em diferentes trabalhos e utilizados em uma abordagem de meta-análise para que resultou em um mapa mais preciso de diferentes regiões genômicas, confirmando a existência de diferentes fontes de resistência a diferentes doenças do cacauero (LANAUD et al., 2009).

2.6. Mapeamento fino de genes candidatos em plantas

Uma das principais dificuldades com as análises de características quantitativas é a fraca relação genótipo-fenótipo, uma vez que, são altamente influenciados por fatores ambientais e, geralmente, por vários genes (KOROL et al., 2007). De posse dessas informações, alguns fatores podem acarretar em erros na estimativa da posição do QTL no mapa genético de ligação, tais como, o tamanho da população, a porcentagem de variação explicada pelo QTL, acurácia da fenotipagem e a escolha de marcadores informativos (BERING; CRUZ, 2008). A precisão na localização do QTL requer mapas altamente saturados, visto que, do contrário, centenas de genes estariam entre os marcadores moleculares.

Quando é encontrada uma ligação significativa entre o QTL e os marcadores moleculares, uma prática comum para aumentar a informação genética na região vinculada é realizar a genotipagem com novos marcadores na região de interesse e, repetir as análises de ligação (ATWOOD; HEARD-COSTA, 2003). Tal procedimento é comumente chamado mapeamento fino e consiste na identificação e localização de marcadores que flanqueiam o gene alvo numa distância genética de 1 ou menos centiMorgan (cM). Essa estratégia pode ser aplicada com eficiência, mesmo para características de baixa herdabilidade, pois proporciona maior poder de detecção de QTL (JANGARELLI et al., 2010). Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com esse procedimento para várias espécies-modelo e de importância econômica, por exemplo, *Arabidopsis thaliana* (KOVER et al., 2009), arroz (CHEN et al., 2009; WANG et al., 2011),

Brachypodium distachyon (CUI et al., 2012), milho (DUCROCQ et al., 2009), nabo (WATANABE et al., 2012), soja (LIU et al., 2009) e tomate (ZHANG et al., 2011). Aliado à saturação do mapa, a utilização da estratégia de genes candidatos possibilita investigar os genes conhecidos que ocorrem nas regiões de QTL. A abordagem de genes candidatos, combinado com estratégia de mapeamento de QTL, constituem um passo importante para definir as bases genéticas de QTL relacionados com a resistência do cacaueteiro a patógenos (LANAUD et al., 2004). Os polimorfismos encontrados nesses genes podem ser testados quanto a possíveis efeitos na variação das características avaliadas na população de mapeamento. Assim, o mapeamento fino de um loco específico permite estimar o efeito e a posição do QTL com maior precisão, o que é de fundamental importância para o sucesso da clonagem posicional, ou mesmo para uso na seleção assistida por marcadores.

2.7. Propagação do cacaueteiro por enxertia e resistência a doenças

A técnica de enxertia vem sendo utilizada na agricultura a mais de 2000 anos, pelas culturas romana e chinesa (HAROLDSEN et al., 2012). As principais aplicações eram exclusivamente hortícolas a fim de prover melhorias na produtividade e propagação das espécies de interesse, tal como a videira e oliveira (TURNBULL, 2010). A enxertia é uma ferramenta indispensável que oferece uma oportunidade para combinar características benéficas entre as plantas enxertadas, porta-enxerto e enxerto (HAROLDSEN *et al.*, 2012). A técnica implica na união entre o tecido enxertado (doador) e o porta-enxerto (receptor), em que podem ser da mesma espécie (enxertia intraespecífica) ou em um membro próximo da mesma família botânica (enxertia interespecífica)(COHEN *et al.*, 2007). Ambos, porta-enxerto e enxerto, estabelecem uma interação vascular que afeta significativamente a taxa de crescimento vegetativo, precocidade e produtividade do genótipo enxertado (STEGEMANN; BOCK 2009;TURNBULL, 2010).

A enxertia propicia um número grande de benefícios que vão desde a propagação clonal, resistência a pestes, doenças, e tolerância a estresses abióticos (MUDGE et al., 2009). Por meio da enxertia, um porta-enxerto resistente favorece o desenvolvimento do enxerto suscetível sem a necessidade de um longo programa de melhoramento genético, bem como, permite uma resposta mais rápida ao aparecimento de novas raças de um agente patogênico, e fornece uma solução menos cara e mais flexível no controle de doenças (COHEN et al., 2007). Uma vantagem econômica da enxertia é que variedades descritas como bons porta-enxertos podem ser utilizados com sucesso, combinados com vários enxertos distintos (HAROLDSEN et al., 2012).

De fato, quase todas as espécies frutíferas de produção comercial utilizam enxertos para aumentar a produtividade ou evitar doenças (KUBOTA et al., 2008). Em muitas partes do mundo, diferentes combinações de porta-enxertos e enxertos vêm sendo utilizadas em estudos de natureza fisiológica, bem como visando estudar outras interações planta-patógeno em várias espécies economicamente importantes, a exemplo do pepino (*Cucumis sativus* L.) (WILCKEN et al., 2010); (CANIZARES; GOTO, 2002); melão (*C. melo* L.) (RIZZO et al., 2004; SIGUENZA et al., 2005); tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) (VENEMA et al., 2008; KUDO; HARADA, 2007); melancia (*Citrullus lanatus* L.) (DOU et al., 2010; 3); batata (KUDO; HARADA, 2007); *Citrus* sp. (TZARFATI et al., 2013), mandioca (*Manihot esculenta*) (BOMFIM et al., 2011; WAGABA et al., 2013). Os principais ganhos providos pela enxertia estão relacionados com a precocidade na produção, redução no porte da planta, viabilização no cultivo de variedades suscetíveis a fitopatógenos, bem como a estresses ambientais, entre outros fatores (MUDGE et al., 2009).

Tal como utilizado no tomate e melancia, pesquisas ao redor do mundo tem demonstrado que o porta-enxerto influencia na resistência do enxerto contra o ataque de patógeno de solo (RIVARD; LOUWS, 2008; BULLER et al., 2013). Todavia, estudos semelhantes não têm sido relatados para cultura cacau. Portanto, tais experimentos são importantes para o cacau, uma vez que a prática de enxertia tem sido largamente utilizada para diversos fins, incluindo a obtenção de clones com alta produtividade, maior

precocidade, cultivos de variedades de cacau suscetíveis a patógenos, propagação de clones superiores e manutenção de bancos de germoplasmas.

3. CAPÍTULO 1

Efeito do porta-enxerto na resistência do enxerto à murcha-de-ceratocystis

Luciel dos Santos Fernandes, Fábio Mathias Corrêa, Jean-Philippe Marelli, Ronan Xavier Corrêa

Resumo. O fungo *Ceratocystis cacaofunesta* infecta o sistema vascular do cacau e causa uma doença letal conhecida como murcha-de-ceratocystis. A infecção está associada a ferimentos provocados por instrumentos utilizados durante as práticas de manejo e propagação do cacau. Clones de cacau têm sido propagados em porta enxertos de resistentes a fim de promover resistência a essa doença. Neste contexto, objetivou-se analisar se existe efeito do porta-enxerto nos níveis de resistência de diferentes clones à murcha-de-ceratocystis. Neste trabalho, cada combinação entre porta-enxerto e enxerto foi clonada com até 5 repetições e inoculados com o isolado CF-20 na concentração 1×10^5 esporos por ml. A incidência e a severidade da doença foi avaliada durante 52 dias. As combinações foram avaliadas por análise fatorial com parcelas subdivididas no tempo. Os dados de severidade foram submetidos à análise de variância. Independentemente da combinação morreram 100% dos enxertos do clone CCN-10, em que não houve interação significativa com os porta-enxertos avaliada. O número de plantas mortas dos enxertos de CCN-51 foram 100% para combinações com CCN-51 e FL78, e 60% para FC 150, e 20% para porta-enxertos de TSH-1188 e VB-1151. Os enxertos dos clones TSH-1188 e VB-1151 não apresentaram altos valores de

proporção de plantas mortas, indicando que a resistência do porta-enxerto aumenta os níveis de resistência do enxerto. TSH-1188 e VB-1151 foram os melhores porta-enxertos para quase todas as combinações com enxertos. Os dados de comprimento da lesão no xilema revelam que o porta-enxerto não tem efeito significativo na restrição do crescimento do fungo ao longo do sistema vascular da planta, dependendo apenas do tipo de enxerto utilizado. Houve formação de 2 grupos, formados por CCN-51 e CCN-10 (a), e TSH-1188 e VB-1151 (b).

Introdução

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie perene cultivada em diversos países, principalmente devido as suas amêndoas bastante apreciadas na produção do chocolate, e outras iguarias (BOZA et al., 2012). O Brasil destaca-se como o 6 maior produtor mundial (ICCO, 2013), sendo que os estados de Rondônia, Amazônia, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, como os principais estados produtores dessa cultura (LIMA et al., 2013).

Na região sul da Bahia, importante região produtora de cacau, a ocorrência do fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* está associada com grandes perdas na produção de cacau (AMBROSIO et al., 2013). O fungo possui a capacidade de penetrar e infectar o xilema da planta, causando uma doença letal conhecida como murcha-de-ceratocystis do cacauieiro, a qual é caracterizada pelo surgimento de murcha das folhas e ramos, clorose, e morte das plantas infectadas (ENGELBRECHT et al., 2005). A infecção com o fungo está associada a ferimento provocados por instrumentos utilizados durante o manejo e a colheita, bem como durante a propagação de mudas por enxertia.

A enxertia é uma importante estratégia de manejo integrado de pragas para gerenciar patógenos habitantes do solo e outras pragas (LOUW et al., 2010). A técnica de enxertia implica na união entre as plantas enxertadas, combinando características benéficas, em que tal interação afeta

significativamente a taxa de crescimento vegetativo, precocidade e produtividade do genótipo enxertado (STEGEMANN; BOCK 2009). A importância dessas técnicas reveste-se de maior influência, já que os ferimentos provocados pelas ferramentas utilizadas durante a realização da técnica podem contribuir para infecção por *C. cacaofunesta*.

Pesquisas tem demonstrado que o porta-enxerto influencia na resistência do enxerto contra o ataque de patógeno de solo em cultura economicamente importantes (RIVARD; LOUWS., 2008). De fato esse fenômeno foi demonstrado em ensaios de campo utilizando melancia triploide (*Citrullus lanatus*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), enxertados, não enxertados e auto-enxertados, em que se comprovou que porta-enxertos influenciam efetivamente na tolerância da melancia à murcha de *Verticillium*, provocada por *Verticillium dahliae* (BULLER et al., 2013). Também no tomateiro, porta-enxertos resistentes tem favorecido o desenvolvidos de mudas enxertadas frente à inoculação com dois patógenos importantes que causam murcha vascular nessa cultura, *Ralstonia Solanacearum* e *Fusarium oxysporum*f.sp.lycopersici (RIVARD; LOWS, 2008).

Apesar de ser uma prática comum em outra cultura e da previsão de boa parte dos efeitos, estudos sobre efeitos de porta-enxertos nos enxertos de cacau são escassos, especialmente no caso de resistência a doenças. Portanto, o presente estudo é de vital importância, uma vez que permite preencher lacunas relacionadas às análises sobre efeitos do porta-enxerto no enxerto, visando favorecer a identificação de genótipos resistentes para utilização como porta-enxertos, o que possibilita o cultivo de variedades de cacau suscetíveis ao fungo *C. cacaofunesta*. Esses conhecimentos seriam impactantes para prever qual a melhor combinação de enxerto e porta-enxerto, com intuito de controlar a murcha-de-ceratocystis na cultura do cacau. Sendo assim, o objetivo deste estudo é analisar se existe efeito do porta-enxerto nos níveis de resistência de diferentes clones à murcha-de-ceratocystis.

Material métodos

Material vegetal

A fim de analisar se o porta-enxerto influencia na resistência do cacau à murcha-de-ceratocystis, diferentes combinações de porta-enxerto seminais foram feitas com diferentes enxertos (Tabela 1). Esses clones foram escolhidos por apresentarem contrastes quanto aos níveis de resistência à murcha-de-ceratocystis.

As sementes dos porta-enxertos foram colocadas para pré-germinar durante 4 dias em pó de serra umedecido. Logo após, as sementes foram plantadas em sacolas plásticas contendo uma mistura de subsolo, pó-de-serra curtido, esterco bovino, casca de cacau **decomposta**, cloreto de potássio e fonte de fósforo, entre outros componentes, e acondicionada em casa de vegetação. Quando atingiram o tamanho ideal para enxertia, cerca de 6 meses após a semeadura, ramos plagiotrópicos dos clones CCN-51, CCN-10, TSH-1188 e VB-1151 foram utilizados como enxertos. O tipo de enxertia utilizada foi de garfagem de fenda cheia.

Tabela 1. Lista dos porta-enxertos seminais e enxertos.

Porta-enxerto	Enxerto			
	CCN-51	CCN-10	TSH-1188	VB-1151
TSH-1188	TSH-1188 + CCN-51	TSH-1188 + CCN-10	TSH-1188 + TSH-1188	TSH-1188 + VB-1151
FL-78	FL-78 + CCN-51	FL-78 + CCN-10	FL-78 + TSH-1188	FL-78 + VB-1151
VB-1151	VB-1151 + CCN-51	VB-1151 + CCN-10	VB-1151 + TSH-1188	VB-1151 + VB-1151
FC-150	FC-150 + CCN-51	FC-150 + CCN-10	FC-150 + TSH-1188	FC-150 + VB-1151
CCN-51	CCN-51 + CCN-51	CCN-51 + CCN-10	CCN-51 + TSH-1188	CCN-51 + VB-1151

As mudas enxertadas foram acondicionadas em casa de vegetação coberta com lona plástica nas laterais e na parte superior. Cada combinação (porta-enxerto + enxerto) foram clonadas com 5 repetições cada.

Preparação do inóculo e inoculação das mudas

O inóculo foi obtido por meio do isolado CF-20 de *C. cacaofunesta*, pertencente à Micoteca da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), o qual teve sua virulência comprovada em trabalhos anteriores (SILVA et al.2004; SANCHES et al., 2008; SANTOS et al., 2012). O isolado foi mantido e preservado em óleo em meio ágar invertido e acondicionado em temperatura ambiente. E, em seguida, foi repicado em placas de Petri com meio BDA (2 % batata, 0,1 % dextrose e 2 % ágar) acidificado e mantido em incubadora com temperatura de 25 °C, por 8 dias. À colônia foi acrescentada água destilada estéril, em seguida raspou-se a colônia com lâminas de vidro e filtrou-se a suspensão inicial em gaze estéril. A concentração de propágulos foi aferida em microscópio óptico, com auxílio de uma câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração do inóculo para 1×10^5 esporos/ml. Essa concentração de trabalho foi estabelecida em trabalhos prévios (SANCHES et al., 2008).

Após o estabelecimento das mudas enxertadas, cerca de 4 meses, foi realizada a inoculação com o isolado de CF-20, em que se utilizou a metodologia descrita por SANCHES et al., (2008). A incisão foi feita 4-5 cm acima do ponto de enxertia com profundidade de aproximadamente 1-1,5 cm, tal como estabelecido por Santos et al (2012). No local da incisão foram depositados 30 µl de suspensão de 1×10^5 esporos/ml. Logo em seguida, foi colocado algodão umedecido com água destilada e autoclavada para formar a câmara úmida e o local foi vedado com fita biodegradável.

Avaliação da resistência nas diferentes combinações de porta-enxertos e enxertos

As variáveis utilizadas para quantificar as respostas das diferentes combinações entre porta-enxerto e enxertos quanto à resistência à murcha-

de-ceratocystis foram o número de plantas mortas (NPM) e o comprimento da lesão no xilema (CLX). Essas duas variáveis vem sendo utilizadas na avaliação dessa doença, sendo o NPM empregado em trabalhos prévios de inoculação em mudas (SILVA et al.2004; SANCHES et al., 2008) e o tamanho de lesão utilizado para mudas (SANCHES et al., 2008).

Para o número de plantas mortas, inicialmente foram feitas 5 avaliações a cada 4 dias após a inoculação (DAI), em que se verificou o número de repetições mortas para cada combinação. Após esse período, foram feitas 8 avaliações a cada 7 dias, nos seguintes tempos: 4, 7, 11, 14, 18, 21, 24, 28, 31, 38, 45 e 52 DAI. No total, 12 avaliações foram realizadas ao longo de 52 DAI.

Assim que se constatou a morte da planta, as mudas das diferentes combinações foram dissecadas longitudinalmente com uma tesoura de poda, em que foi mensurado o comprimento da lesão no xilema a partir do ponto de inoculação. Ao término do experimento, após 52 dias, todas as plantas ainda remanescentes foram avaliadas para essa característica.

Análises de estatísticas

Para avaliação da interação entre porta-enxerto e enxerto quanto à resistência a murcha-de-ceratocystis foi realizada análise fatorial com parcelas subdivididas no tempo para o NPM. Sendo o tempo a subparcela e a parcela uma fatorial com 5 porta-enxertos e 4 enxertos, totalizando 20 tratamentos.

Foi adotado um modelo linear generalizado com função de ligação logit, conforme descrito abaixo:

$$\text{logit}[E(Y|\alpha,\beta,\lambda)] \sim \mu + \alpha + \beta + \eta + \lambda + \lambda\alpha + \lambda\beta + \lambda\alpha\beta + \text{epsilon}_{ijk}$$

sendo,

μ , constante associada à todas observações;

α , efeito do enxerto;

β , efeito do porta-enxerto;

η , erro A;

λ , efeito do tempo de inoculação;

$\lambda\alpha$, efeito da interação entre enxerto e tempo de inoculação;

$\lambda\beta$, efeito da interação entre porta-enxerto e tempo de inoculação;

$\lambda\alpha\beta$, interação entre enxerto, porta-enxerto e tempo de inoculação;

ϵ , o erro, sendo considerado aleatório.

Os dados de comprimento da lesão no xilema foram submetidos à análise de variância considerando um esquema fatorial de 5 x 4, com 20 tratamentos. A comparação das médias foi realizada com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados

Na avaliação do número de plantas mortas nos enxertos combinados com diferentes porta-enxertos para resistência à murcha-de-ceratocystis, verificou-se um padrão de sobrevivência oposto entre os clones CCN-10 e TSH-1188 (Figura 2). Independentemente do nível de resistência do porta-enxerto utilizado nesse experimento, os enxertos do clone CCN-10 apresentam valores altos de número de plantas mortas, consistente com o alto de nível de suscetibilidade desse clone. Observou que morreram 100% das plantas de CCN-10 com os porta-enxertos de TSH-1188, VB-1151, FC 150 e FL 78, e 75% com CCN-51.

O clone CCN-51 apresentou 100% das plantas mortas quando enxertado com os porta-enxertos de CCN-51 e FL78, e 60% para FC 150. Ao

passo que quando CCN-51 foi enxertado com TSH-1188 e VB-1151 apenas 20% das repetições morreram. Isso indica que TSH-1188 e VB-1151 contribuíram para alteração positiva na taxa de sobrevivência de CCN-51.

Independente da combinação, os enxertos de TSH-1188 e VB-1151 não apresentaram altos valores de proporção de plantas mortas. Os maiores valores observados para TSH-1188 foram de 20% de plantas mortas com os porta-enxertos de TSH-1188 e CCN-51. Para os demais porta-enxertos não foram observadas plantas mortas.

Resultados semelhantes foram encontrados para VB-1151, em que nenhuma das repetições desse clone morreu quando combinado com FC 150. Para as outras, observou-se 20% de plantas mortas com os porta-enxertos de CCN-51, TSH-1188 e VB-1151 e, para combinação com FL 78, 40% de plantas mortas.

Todas as plantas de CCN-51 enxertadas nele mesmo morreram de murcha, ao passo que quando esse clone foi enxertado nos clones sabidamente resistentes (TSH-1188 e VB-1151) as plantas sobreviveram. Para todos os clones que exibiram 80% ou mais de plantas mortas, esse fenômeno foi verificado até os 30 dias após inoculação.

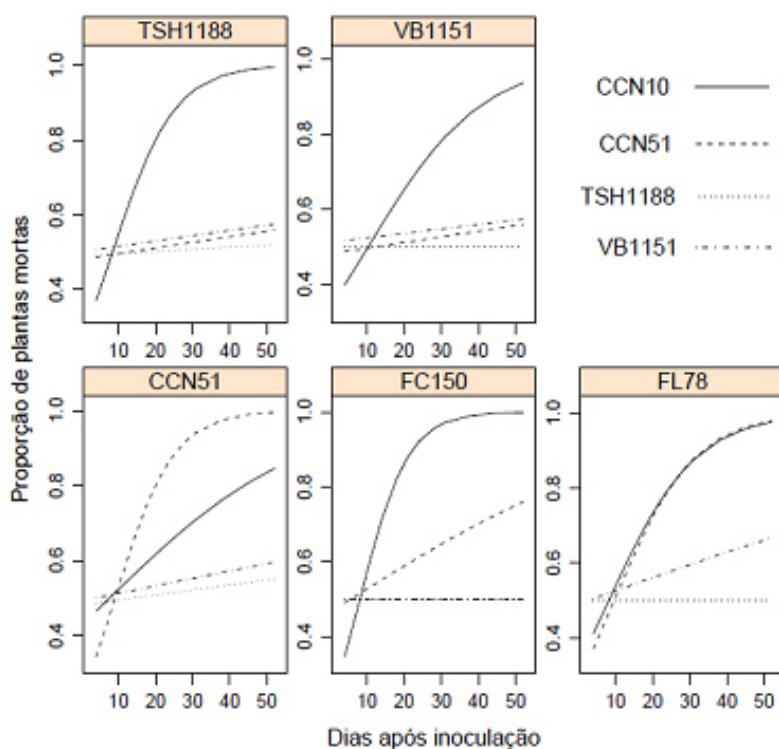


Figura 2. Proporção de plantas para a interação entre porta-enxerto e enxerto nas 12 avaliações para avaliação da resistência do enxerto de CCN-51, CCN-10, VB-1151 e TSH-1188, enxertados em TSH-1188, FL-78, VB-1151, FC-150 e CCN-51.

Para uma avaliação mais detalhada das diferentes combinações entre os porta-enxerto e enxerto utilizados, foi feita análise de variância dos dados de CLX

(Tabela 2). Os resultados de significância estatística pelo teste F não evidenciam efeito da interação entre o porta-enxerto e o enxerto. Esse efeito não significativo da interação sugere que o comprimento da lesão no xilema depende apenas do tipo de enxerto utilizado.

Table2. Análise de variância de comprimento da lesão no xilema para as combinações de porta-enxertos e enxertos.

	GL	SQ	QM	F	P
Porta-enxerto	4	32,31	8,08	0,78	0,5518 ^{ns}
Enxerto	3	382,12	127,37	12,31	0,000*
Porta-enxerto*enxerto	12	191,88	15,99	1,55	0,1294 ^{ns}
Resíduos	69	714,08	10,35		

(*= significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo)

Pelo teste de comparação de médias de Scott-Knott é possível distinguir as diferenças de comportamento dos enxertos em relação comprimento da lesão no xilema como resultado da inoculação com *C. cacaofunesta* (Tabela 3). Verifica-se que os enxertos comportaram-se de maneira distinta, em que houve a formação de 2 grupos (a e b). Os enxertos de CCN-51 e CCN-10 formam o grupo dos mais suscetíveis. Já TSH-1188 e VB-1151 formam o grupo dos mais resistentes.

Em geral, o comprimento da lesão no xilema foi menor nos enxertos de TSH-1188 e VB-1151, quando comparado com os outros enxertos. Por outro lado, os enxertos de CCN-51 e CCN-10 apresentaram estatisticamente valores de CLX maiores, demonstrando que o *C. cacaofunesta* conseguiu

proliferar-se ao longo dos vasos do xilema, o que reforçar que esses clones são altamente suscetíveis ao patógeno.

Tabela 3. Comparação entre as médias das combinações de porta-enxertos e enxertos pelo teste de Scott-Knott (SK).

Níveis	Médias SK (5%)	
CCN-10	8,47	a
CCN-51	7,41	a
VB-1151	4,92	b
TSH-1188	3,02	b

Discussão

O ataque do fungo *Ceratocystis cacaofunesta* à cultura do cacau tem sido associado com perdas na produção na região sul da Bahia, importante cultura nesta região. De fato, a ocorrência da murcha-de-ceratocystis é preocupante, uma vez que, é um fator limitante na produção, pois, o fungo causa a morte de planta pouco tempo após a infecção (ENGELBRECHT et al.,2007). Diante dessa realidade, diversos clones de cacau vêm sendo avaliados em ensaios de caracterização de genótipos para resistentes a essa doença (DELGADO, 2003; SILVA et al., 2007). Novas fontes de resistências ao fungo foram identificadas nesses trabalhos, e os clones identificados geralmente são indicados como porta-enxertos de variedades comerciais de cacau que por ventura, não possuíam resistência ao patógeno.

O clone CCN-10 apresentou altos níveis de mortalidade, em que não houve interação significativa com os porta-enxertos avaliados. O fato não de ter sido observado efeito positivo na interação dos enxertos de CCN-10 com todos os porta-enxertos, indica alto grau de suscetibilidade desse clone ao ataque de *C. cacaofunesta*. Esses resultados evidenciam que nenhum dos cinco porta-enxertos contribuiu para alteração do desempenho do enxerto de

CCN-10 na reação a infecção pelo fungo no seu sistema vascular. De fato, o clone CCN-10 é um dos mais suscetíveis à murcha-de-ceratocystis, sendo muitas vezes comparado aos clones CCN-51 e SJ02, descritos como padrão de suscetibilidade (SANCHES et al., 2008; SILVA et al., 2004).

Nos enxertos de CCN-51 os porta-enxertos de TSH-1188 e VB-1151, favoreceram a sobrevivência desse clone frente à infecção com o fungo. Para todos os clones CCN-51 e CCN-10, verificou-se até os 30 DAI que esses clones exibiram 80% ou mais de plantas mortas. Em ensaios preliminares com a uma população F1 (TSH-1188 vs CCN-51) (BRANCO, 2011), e com os clones TSH-1188 e ICS 1 (SANCHES et al., 2008) verificou-se que o número mínimo de dia para avaliação da resistência dos clones de cacau está entre 30 a 45 DAI, uma vez que, após esse período ocorre estabilização dos sintomas da murcha-de-Ceratocystis. Os enxertos que ultrapassaram os 30 DAI foram os mais hábeis em recuperar os danos causados pelo ataque do patógeno, possivelmente possuem níveis intermediários de resistência.

Com efeito, os clones TSH-1188 e VB-1151 foram os melhores porta-enxertos para quase todas as combinações com enxertos, portanto, podem ser indicados no controle da murcha-de-ceratocystis do cacau, pois contribuíram para sobrevivência da maioria dos enxertos. Esses clones têm sido largamente utilizados pelos agricultores como porta-enxertos, uma vez que, são descritos como padrão de resistência as principais doenças do cacau, incluindo a murcha-de-ceratocystis (SILVA et al., 2012). Realmente, esses clones têm sido avaliados quanto à resistência ao fungo *C. cacaofunesta* em ensaios de caracterização de genótipos, nos quais foram descritos como referência de resistência (SILVA, 2005).

Ficou evidente no comportamento dos enxertos de CCN-51 e CCN-10, comparados com TSH-1188 e VB-1151 analisados pelo comprimento da lesão no xilema que mesmo com a contribuição do porta-enxerto, a capacidade em restringir a infecção depende dos níveis de resistência do genótipo utilizado como enxerto. Os efeitos determinados pelo porta-enxerto na resistência a murcha-de-ceratocystis estão relacionados com sua

capacidade em conter o crescimento do patógeno ao longo dos sistema da vascular da planta, impedindo que o fungo bloqueie o transporte de água através dos vasos do xilema. Clones de cacau resistentes ao ataque de *C. cacaofunesta* produzem tilose, géis e gomas rapidamente para tentar conter a disseminação do patógeno para as células do xilema (SANTOS et al., 2013; YADETTA; THOMMA, 2013). O mesmo acontece com clones suscetíveis, no entanto numa taxa muito menos acelerada (SANTOS et al., 2013).

Apesar de os clones TSH-1188 e VB-1151 serem tradicionalmente utilizados como porta-enxerto pela maioria dos agricultores, nenhuma referência de combinações de enxerto com o porta-enxerto visando estudar interação planta-patógeno foi publicada. Desse modo, é necessário realizar estudos posteriores para elucidação dos fenômenos bioquímicos e moleculares envolvidos na interação do enxerto com o porta-enxerto durante a infecção por *C. cacaofunesta*. Dessa forma, os clones aqui estudados podem ser utilizados em estudos moleculares sobre essa interação.

Como foi constatada a interação significativa entre o porta-enxerto e o enxerto para resistência a murcha de murcha-de-ceratocystis, então vale salientar que esses resultados reforçam a relevância da utilização desses clones, TSH-1188 e VB-1151, como fonte de resistência à murcha-de-ceratocystis em estudos de interação entre porta-enxerto e enxerto.

A metodologia empregada neste trabalho mostrou-se adequada para identificar melhores combinações de clones com diferentes porta-enxertos que possuam a resistência à murcha-de-ceratocystis. Nos programas de melhoramento genético do cacau, tanto os clones como os porta-enxertos de cacau devem ser melhorados para resistência à murcha-de-ceratocystis,

Conclusões

O porta-enxerto resistente à murcha-de-ceratocystis aumenta significativamente o nível de resistência do enxerto, sendo maior nos casos em que o material utilizado como enxerto já apresenta algum nível de resistência.

Os porta-enxertos de TSH-1188 e VB-1151 são indicados no controle da murcha-de-ceratocystis para contribuir na sobrevivência das mudas enxertadas. Os clones FL 78 e FC 150 podem ser indicados com essa mesma finalidade nos casos em que enxerto possui certo nível de resistência.

Agradecimentos

Os autores são gratos à BIOFÁBRICA pela cessão das mudas de cacau e aos técnicos Marcelo Santos, Valdivino do Carmo, José Ressurreição, Ademir Bomfim, José Domigos e Edson Silva x pelo auxílio nos experimentos. Este trabalho foi financiado pelo Centro MARS de Ciência do Cacau e Luciel dos Santos Fernandes SF recebeu uma bolsa de mestrado da CAPES.

Referências

- AMBROSIO, A. B.; NASCIMENTO, L. C.; OLIVEIRA, B. V.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; TIBURCIO, R. A.; TOLEDO, THOMAZELLA, D. P.; LEME, A. F. P.; CARAZZOLLE, M. F.; VIDAL, R. O.; MIECZKOWSKI, P.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. G. CABRERA, O. G. Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria: from genome to proteome. **Biomed Central** 14:91, 2013.
- BOZA, E. J.; IRISH, B. M.; MEEROW, A. W.; TONDO, CECILE L.; RODRÍGUEZ, O. A.; VENTURA-LÓPEZ, M.; GÓMEZ, J. A.; MOORE, J. M.; ZHANG, D.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R. J. et al. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 605–619, jul. 2012.
- BRANCO, Samuel Martins Jesus. M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. **Herança da resistência de cacau à murcha-de-ceratocystis e mapeamento molecular de genes envolvidos**. Dissertação de Mestrado. Genética e Biologia Molecular, UESC Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa.
- DELGADO, R. Fuentes de resistencia al mal del machete en accesiones de cacao silvestre coletadas en la Amazonia Ecuatoriana. **XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal**, Latacunga, Ecuador, 2003.
- DELGADO, A.J.; ECHANDI, E. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. **Turrialba** 15:286-289. 1965.

- ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. Ceratocystis Wilt of Cacao — A Disease of Increasing Importance. **Phytopathology**, v. 97, n. 1, p. 1648–1649, 2007.
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia** 97:57–69. 2005.
- LIMA, Eline Matos; PEREIRA, N. E. ; PIRES, J. L. ; BARBOSA, A. M. M. ; CORRÊA, Ronan Xavier . Genetic molecular diversity, production and resistance to witches broom in cacao clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** (Impresso), v. 13, p. 127, 2013.
- LOUWS, F. J.; RIVARD, Cary L.; KUBOTA, Chieri. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. **Scientia Horticulturae** 127: 127–146, 2010.
- SANCHES, C. L. G.; PINTO, L. R. M.; POMELLA, A. W. V.; SILVA, S. D. V. M.; LOGUERCIO, L. L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 517-528, 2008.
- SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; SILVA, S. D. V. M.; MICHELI, F.; CLEMENT, D.; GRAMACHO, K. P. Identification of quantitative trait loci linked to *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 4, p. 1563–1571, 2012.
- SANTOS, R. M. F.; SILVA, S. D. V. M.; SENA, K.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. **Tropical Plant Biol** 6:37–45, 2013.
- SILVA, S.D.V.M., PAIM, M.C. & CASTRO, W.M. Cacao “Jaca” Resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacaueira da Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 29:538-540. 2004.
- SILVA, S. D. V.M.; MANDARINO, E. P.; DAMACENO, V. O.; SANTOS FILHO, L. P. Reação de genótipos de cacaueiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. **Fitopatol. bras.** [online]. 2007, vol.32, n.6, pp. 504-506. ISSN 100-4158.
- SILVA, S. D. V.M.; PINTO, L. R. M; OLIVEIRA, B. F.; DAMACENO, V. O.; PIRES, J.L.; Dias, C. T. S. Resistência de progênies de cacaueiro à murcha-de-ceratocystis. **Trop. plant pathol.**[online]. 2012, vol.37, n.3, pp. 191-195. ISSN 1982-5676.
- STEGEMANN, S.; BOCK R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. **Science** 324:649–651, 2009.
- YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science** 4, 2013
- YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V. MACEDO, M. M. Agronomic performance of 27 cocoa progenies and plant selection based on productivity, self-compatibility and disease resistance. **Revista Ceres**, v. 60, n. 4, p. 514–518, 2013.

HARRINGTON, T. C.; FRAEDRICH, S. W. Quantification of propagules of the laurel wilt fungus and other mycangial fungi from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*. **Phytopathology**, 100(10), 1118–23.
doi:10.1094/PHYTO-01-10-0032. 2010.

4. CAPÍTULO 2

Mapeamento de QTL associados com resistência do cacauzeiro à murcha-de-ceratocystis

Luciel dos Santos Fernandes, Fábio Mathias Corrêa, Stefan Royaert, Jean-Philippe Marelli, Juan Carlos Motamayor, Ray Schnell, Ronan Xavier Corrêa

Resumo. A murcha-de-ceratocystis é causada pelo fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta*. O fungo penetra na planta por meio de ferimentos e causa uma infecção sistêmica no sistema vascular do hospedeiro que provoca murcha, clorose, culminando na morte da planta. As principais medidas de controle não são tão eficientes, e por esse motivo, a utilização de variedades resistentes apresenta-se como uma estratégia mais eficaz. Em trabalho anterior, um mapa de ligação foi feito para 266 plantas derivadas de um cruzamento entre 'TSH-1188' (resistente) x 'CCN-51' (suscetível), utilizando marcadores SNP. No presente trabalho, os genitores e cada progênie foram clonados por enxertia, em seis repetições. Cada uma dessas mudas foi inoculada com 30 µl de uma suspensão de esporos de *C. cacaofunesta* (1×10^5), numa incisão feita no caule da muda. A incidência da doença foi avaliada durante 52 dias. A análise de associação genética foi realizada com base no cálculo da ASCPD pelo método de regressão (LASSO). O coeficiente de correlação foi de 0,89 para número de plantas mortas e 0,85 para tamanho da lesão no xilema, indicando forte associação entre os marcadores e a resistência a murcha-de-ceratocystis. Os marcadores associados com resistência estão no grupo de ligação (GL) 4 e 6. O mapeamento de QTL utilizando mapeamento por intervalo composto

(MIC) identificou um QTL de grande efeito no GL VI, e outro de pequeno efeito no grupo de ligação IV, onde 13 genes candidatos foram encontrados. Os genes candidatos mais importantes dentro do QTL, com base em suas anotações, estão relacionados com a resistência em outras espécies economicamente importantes, reconhecimento de efetores de avirulência, resposta de hipersensibilidade e recuperação da infecção após o ataque de patógenos. Portanto, esses genes presentes nos QTL mapeados são genes candidatos que podem estar relacionados com resistência a essa doença, devendo-se caracterizá-los molecularmente em estudos futuros.

Palavras-chave: *Ceratocystis cacaofunesta*, morte súbita, SAM, genes candidatos.

Introdução

O fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. e T.C. Harr. é um patógeno específico da cultura cacaueteira (*Theobroma cacao*) e causa a doença letal conhecida como murcha-de-ceratocystis (ENGELBRECHT e HARRINGTON, 2005). A murcha-de-ceratocystis é uma doença sistêmica e pode comprometer todo o sistema vascular da planta, levando-a a morte (AMBROSIO et al., 2013). O fungo penetra por meio de ferimentos nas raízes ou no tronco da planta e infecta o sistema vascular, provocando a obstrução dos vasos do xilema (ENGELBRECHT, 2007), o que dificulta o transporte de água e resulta nos sintomas de murcha das folhas e ramos, clorose e seca das folhas e por fim morte da planta ou do ramo infectado (AMBROSIO et al., 2013). Geralmente os ferimentos são provocados por instrumentos utilizados durante as práticas de poda e colheita da cultura. Algumas vezes, galerias construídas por besouros do gênero *Xyleborus* spp também funcionam como via de acesso para os vasos do xilema (GOITÍA E ROSALES, 2001; HARRINGTON; FRAEDRICH, 2010).

C. cacaofunesta têm sido identificado apenas nas Américas do Sul e Central, podendo ser nativo desta região (ENGELBRECHT et al., 2007), onde

predominam as regiões de cultivo mais antigo do cacau. A doença foi indetificada pela primeira vez no equador em 1918, na Colômbia em 1940 e na Venezuela em 1958 (DELGADO, 2003). No Brasil, a doença foi relatada na região da Amazônia Sul Ocidental, mais precisamente no estado de Rodônia (Bastos, 1978), e mais recentemente no estado da Bahia em 1997 em mudas enxertadas (BEZERRA 1997 citado por SANTOS et al., 2012). A doença tem causado perdas significativas nas principais regiões produtoras de cacau (ENGELBRECHT, et al. 2007).

As principais medidas de controle da murcha-de-ceratocystis incluem a eliminação mediante queima das plantas infectadas, a minimização dos danos mecânicos durante a poda e a colheita, a desinfecção das ferramentas usadas nos tratamentos culturais, bem como remoção e queima das plantas infectadas (OLIVEIRA e LUZ, 2005). A doença tem causado perdas significativas nas principais regiões produtoras de cacau (ENGELBRECHT, et al. 2007), principalmente, onde as medidas de controle fitossanitário não têm sido aplicadas corretamente. Por esse motivo, a utilização de material genético resistente constitui a melhor estratégia de controle dessa doença.

No entanto, a murcha-de-ceratocystis ainda é uma doença pouco estudada, de modo que pouco se sabe sobre as regiões genômicas envolvidas com a resistência. Sendo assim, a identificação de regiões (QTL) relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis em outras populações é uma importante estratégia que permite desenvolver novos cultivares por meio de identificação de marcadores moleculares associados com a resistência, os quais poderiam ser aplicados na seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento genético do cacau.

QTL foram identificados nos grupos de ligação 3 e 9 na população envolvendo resistência proveniente do background genético de SCA 6 e ICS (SANTOS et al., 2012), utilizando avaliações da variável CLX tradicionalmente utilizada nas avaliações dessa doença (SANCHES et al., 2008; BAKER et al., 2003). Também foram identificados QTL nos grupos de ligação 3 e 7 (BRANCO, 2011), porém utilizando escala de notas proposta com base na avaliação de apenas 71 genótipos. Desta forma, justifica-se

testar se essa população que envolve TSH-1188 mostraria essas mesmas regiões relevantes de QTL e também aplicar as avaliações.

O genoma do cacau foi sequenciado, revelando-se as principais classes de genes relacionados com a resistência a fungos, genes envolvidos com a qualidade do cacau (ARGOUT ET al., 2010), assim como, por meio da combinação de haplótipos, mapeamento de associação e de expressão gênica análises, o gene envolvido com a cor do fruto foi revelado (MOTAMAYOR et al., 2013). Além disso, o sequenciamento do genoma do cacau tornou possível a delimitação de genes candidatos nas regiões em que são localizados QTL. (ARGOUT ET al., 2010; MOTAMAYOR et al., 2013)

O objetivo desse estudo foi mapear QTL relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis na população MP01, proveniente do cruzamento entre os clones TSH-1188 e CCN-51. Adicionalmente, os marcadores moleculares presentes nas regiões de QTL foram localizados no mapa físico do cacau, visando detectados genes candidatos envolvidos na resistência a essa doença no cacauero.

Material e Métodos

Material vegetal

A população de mapeamento (MP01) é constituída por 495 genótipos, proveniente do cruzamento entre os clones TSH-1188 e CCN-51. Essa população faz parte do programa de melhoramento genético do Centro Mars de Ciência do Cacau localizado no município de Barro Preto, Bahia. Os parentais da MP01 foram descritos em estudos de resistência à murcha-de-ceratocystis como padrão de resistência (TSH-1188) e suscetibilidade (CCN-51) à murcha-de-ceratocystis do cacauero (SILVA et al., 2012). Foram utilizados 266 genótipos da MP01 para identificar novas fontes de resistência, bem como, encontrar regiões genômicas relacionadas com a resistência à

murcha-de-ceratocystis. No presente estudo, foram utilizados 266 genótipos que haviam sido analisados previamente para resistência a vassoura-de-bruxa (SANTOS et.al, 2007).

Os 266 genótipos da MP01 e os dois genitores parentais foram enxertados em porta-enxertos de VB-1151 aos 4 meses de idade, com 6 repetições por genótipo, totalizando 1608 plantas.

Inoculação e avaliação fenotípica para resistência murcha-de-ceratocystis

O experimento foi conduzido em casa de vegetação protegida com lona plástica nas laterais e na parte superior, para evitar a visitação por vetores do patógeno e a contaminação externa. As plantas foram inoculadas com isolado CF-20 do fungo *C. cacaofunesta* aos 4 meses após enxertia. Os procedimentos de inoculação da população MP01 foram realizados de acordo com metodologia descrita anteriormente (ver tópico 3).

Os níveis de resistência à murcha-de-ceratocystis dos 266 genótipos avaliados mais os parentais foram mensurados pelo número de plantas mortas e pelo tamanho da lesão no xilema. A coleta de dados foi realizada de acordo com procedimentos descritos anteriormente (ver capítulo anterior)

Os dados de número de plantas mortas (NPM) e do comprimento da lesão no xilema (CLX) foram utilizados para calcular área abaixo da curva de progresso da doença ou AUDPC (Area Under The Disease Progress Curve). O modelo para seleção dos genótipos para o NPM foi um modelo generalizado misto em parcelas subdivididas no tempo com função de ligação logit, conforme descrição abaixo.

$$\text{logit}(E[Y]) = \mu + \beta_i + \eta + \alpha_j + \beta\alpha_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

sendo: μ = constante associada a todos os tratamentos;

β = efeito do i^{th} genótipo, $i = 1, \dots, 268$ horas, sendo considerado aleatório;

η = efeito do erro associado entre o genótipo e a repetição;

α = efeito do j^{th} tempo, $j = 0, \dots, 54$, sendo considerado fixo;

ϵ = resíduo, sendo considerado com $N \sim (0, \sigma^2)$;

Os dados de comprimento da lesão no xilema foram avaliados estatisticamente por um modelo misto, conforme descrição abaixo:

$$Y = \mu + \beta_i + \eta + \alpha_j + \beta\alpha_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

sendo: μ = constante associada a todos os tratamentos;

β = efeito do i^{th} genótipo, $i = 1, \dots, 268$ genótipos, sendo considerado aleatório;

ϵ = resíduo, sendo considerado com $N \sim (0, \sigma^2)$;

Os valores de NPM e CLX foram utilizados para ordenar dos 266 genótipos por meio das estimativas dos BLUP (Best Linear Unbiased Predictor) com base nos dados de AACPD. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2013).

Associação entre marcadores SNP e resistência à murcha-de-ceratocystis

A população MP01 foi previamente analisada com 5119 marcadores SNP pelo grupo de genética do laboratório de análise gênômica da MARS, localizada em Miami, EUA, e cedido para uso no presente estudo. Esses dados de genotipagem foram utilizados para associação genética entre os marcadores SNP e as variáveis NPM e CLX.

As análises de associação genética foram realizadas com base nos valores das estimativas do BLUP de 231 genótipos, pelo método de regressão (LASSO) usando o pacote Synbreed package (WILMMER et al., 2012).

Os dados de genotipagem da população MP01 foram utilizados para identificar as formas alélicas dos SNP dos parentais TSH-1188 e CCN-51 encontrados nas regiões de QTL. Os SNP mais associados com a resistência foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), para testar a hipótese de associação dos marcadores SNP com a resistência à murcha-de-ceratocystis.

Mapeamento de QTL e seleção de genes candidatos

Para mapeamento do QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis foi utilizado um mapa genético dos 495 genótipos da MP01. Em que, foram utilizados os dados de 3526 SNP presentes na população MP01.

Os valores do BLUP para as variáveis analisadas foram utilizados para identificar QTL associados com a resistência à murcha-de-ceratocystis pelo método de Duplo Haploide (DH) com auxílio do programa MapQTL6 (VAN OOIJEN, 2006). A principal vantagem da abordagem de DH é que possibilita ver a contribuição de cada parental individualmente. O mapeamento do QTL inicialmente foi feito usando pelo método de mapeamento por intervalo simples (MIS). Os limites de significância (thresholds) foram determinados pelos dados de permutação a 5% de probabilidade de ligação entre o marcador e a característica analisada. O valor de permutação maiores ou igual a 3.0 foram considerados significativos. Posteriormente, após seleção do cofator, foi realizado o mapeamento por intervalo composto (MIC) (JANSEN; STAM, 1994). Um conjunto de três cofatores, um para o número de plantas mortas, e dois, para o tamanho da lesão no xilema, foram mantidos para mapear o QTL nos grupos de ligação identificados. Os marcadores que mostraram um LOD superior ao valor de permutação com $P < 0,05$ foram identificados como QTL. A estimativa da posição e porcentagem de variação explicada pelo QTL foi realizada com base no maior valor de LOD na região estudada

Os marcadores SNP localizados flanqueando os QTL para resistência a murcha-de-ceratocystis foram utilizados como referência na identificação dos genes candidatos próximos a essa região. As anotações de genes modelos depositados no banco de dados do genoma de *Theobroma cacao* cultivar Matina 1-6 (<http://www.cacaogenomedb.org/tools/gbrowse>) foram utilizadas a fim de investigar dos genes candidatos.

Resultados

Distribuição fenotípica da resistência do cacauero à murcha-de-ceratocystis

Após a inoculação com o isolado CF-20 de *C. cacaofunesta*, o número de plantas mortas foi analisado por 52 DAI nos pais da população F1, TSH-1188 e CCN-51, respectivamente resistente e suscetível (Fig. 1). Até o 11^a DAI não foram observados sintomas nas plantas, enquanto no 18^a DAI 50% das plantas de CCN-51, haviam desenvolvido os sintomas da doença. O número de plantas sintomáticas continuou a aumentar ligeiramente até o 28^a DAI, após este ponto, a curva de progresso da doença estabilizou, porque todas as plantas estavam mortas. Por outro lado, O pai resistente, TSH-1188, não desenvolveu nenhum sintoma de murcha Ceratocystis durante o período de avaliação das plantas.

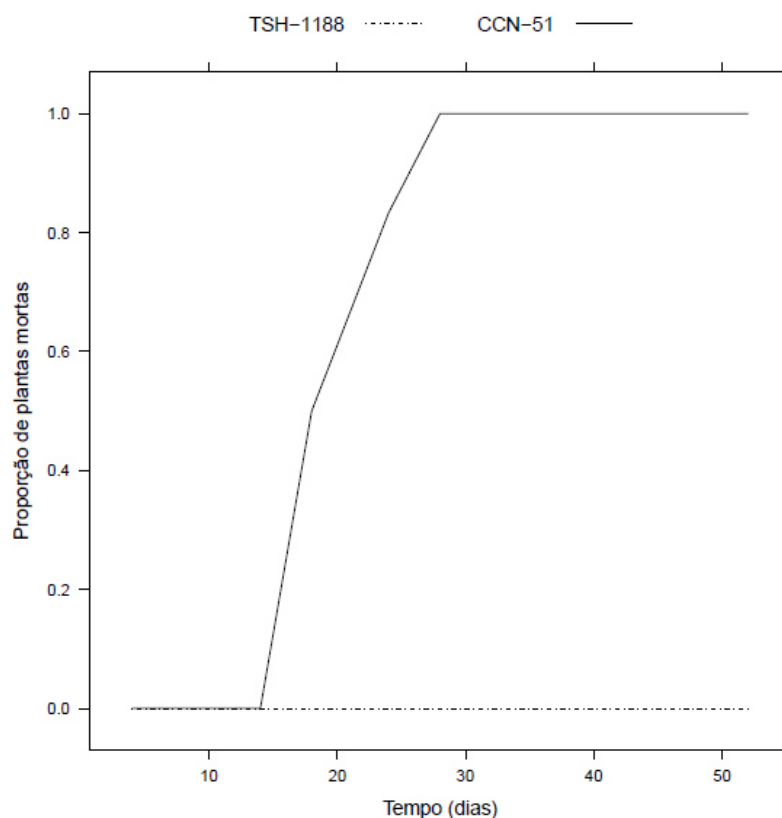


Figura 3. Curva de incidência da murcha-de-ceratocystis para o número de plantas mortas nos parentais, TSH-1188 e CCN-51, da população MP01.

A curva de incidência da murcha-de-ceratocystis para os 266 genótipos avaliados, juntamente com TSH-1188 e CCN-51, pode ser visualizada na Figura (4). O parental TSH-1188 forma o grupo dos mais resistentes com 139 genótipos (53%) que não desenvolveram os sintomas associados com a susceptibilidade a murcha-de-ceratocystis. O outro grupo é formado por 126 genótipos (47%) que tiveram pelo menos uma das repetições mortas, incluindo os 65 genótipos (24%) que todas as repetições morreram. Tal grupo foi considerado como altamente suscetíveis juntamente com o parental CCN-51.

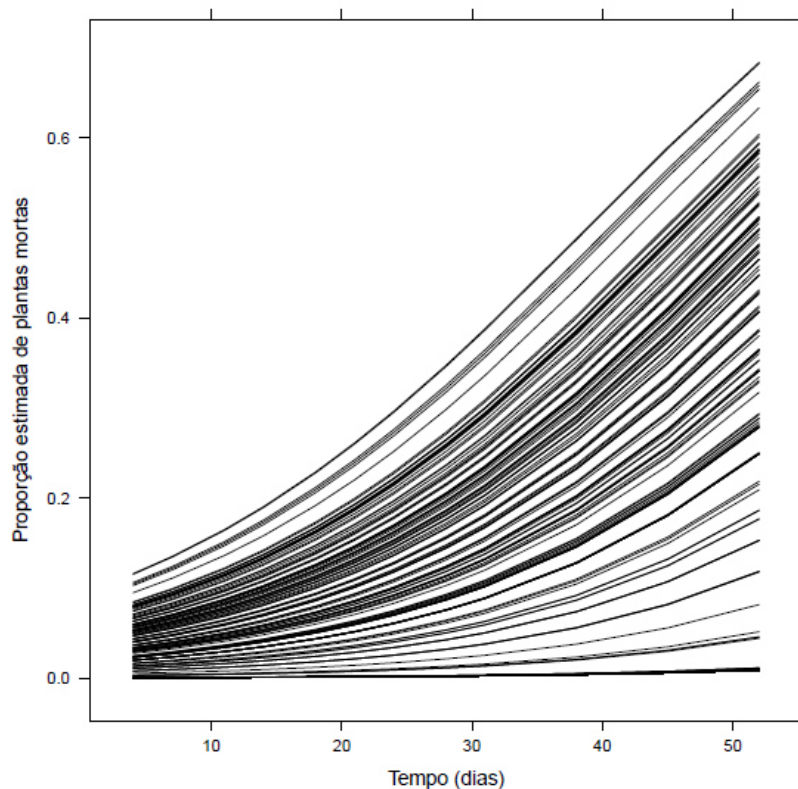


Figura 4. Proporção estimada de plantas mortas para 266 genótipos da população MP01 quanto à resistência à murcha-de-ceratocystis.

Foi observada variação significativa para o CLX entre os pais e filhos na população F1 e a distribuição fenotípica foi contínua (Figura 5). CCN-51 obteve a média de CLX, variando de 12 cm a 14,5 centímetros (cm), enquanto a média de TSH-1188 variou entre 2 cm e 7,5 cm. Dentro da população F1, a média variou de 1,2 cm a 12,5 cm, com ênfase no genótipo 062 que apresentaram média variando de 1,1 a 1,5, que foi a menor média para CLX.

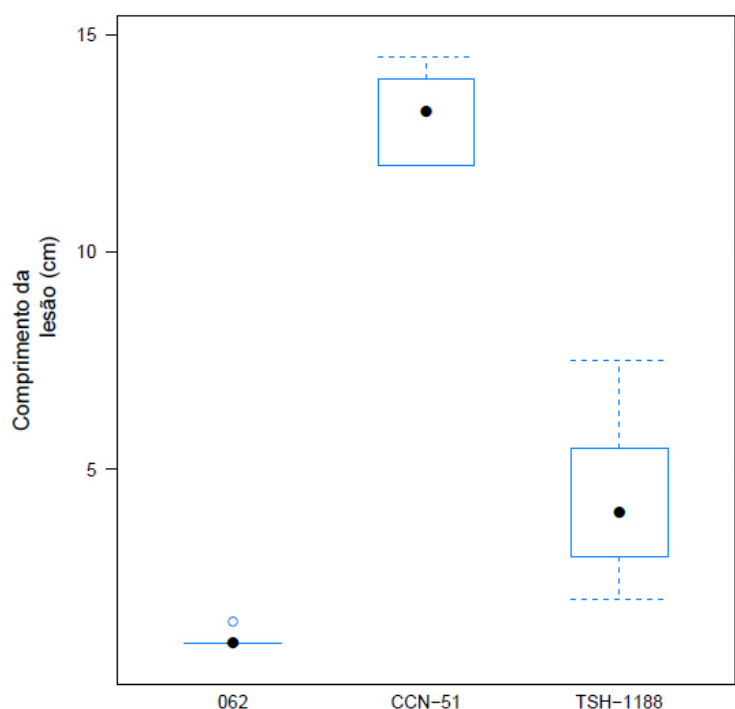


Figura 5. Análise do comprimento da lesão no xilema dos genótipos parentais, mais o genótipo 062.

A ordenação dos 266 genótipos com base no NPM (Figura 6) e CLX (Figura 7) foram estimadas por meio do BLUP. Os critérios de classificação foram os seguintes: os genótipos com valores acima de 0 foram considerados susceptíveis ao ataque de *C. cacaofunesta*, e os genótipos mais resistentes foram os com valores abaixo de 0. De acordo com os valores de BLUP para NPM, foram identificados 127 genótipos suscetíveis a murcha-de-Ceratocystis, juntamente com CCN-51. Assim, o grupo dos genótipos mais susceptíveis consiste em 24% dos genótipos que morreram todas as réplicas, incluindo CCN-51. O maior valor de BLUP observado foi do clone CCN-51 (4,026), e para progênie 3,98. O outro grupo é formado por 140 genótipos, incluindo TSH-1188, os quais obtiveram o menor valor de BLUP, -1,51, e foram classificados como mais resistentes, correspondendo a 53% de genótipos analisados.

Os valores de BLUP obtidos a partir de dados CLX mostrou uma distribuição contínua fenotípica, em que o valor o mais alto foi o do parental CCN-51, ao passo que os valores para o TSH-1188 foi de apenas -0,66. A análise da população F1 variou de 5,42 a -2,92, sendo que um conjunto de

153 genótipo (57,51%) obtiveram valores abaixo de 0, dentro desse conjunto, 123 genótipos (46,15%) obtiveram BLUP variando entre -0,72 a -2,92, tais valores foram menores que o BLUP do TSH-1188. Os 113 genótipos restantes (42,48%) apresentaram BLUP acima de 0, e portanto, foram classificadas como suscetíveis.

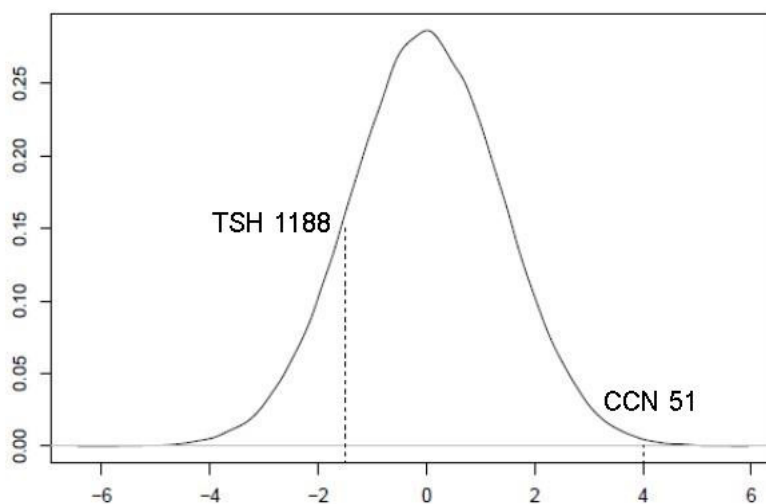


Figura 6. Valores de BLUP para a progênie MP01, estimados pelo número de plantas mortas.

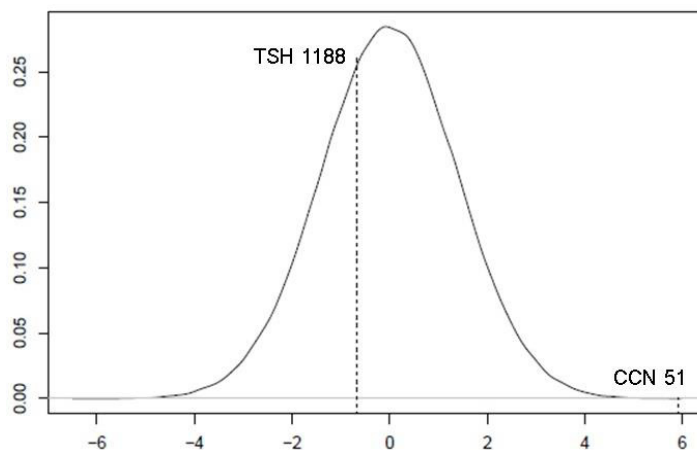


Figura 7. Valores de BLUP para a progênie MP01, estimados pelo tamanho da lesão no xilema.

Identificação de marcadores SNP e mapeamento de QTL associados com a resistência à murcha-de-ceratocystis

Análise de associação genética com marcadores SNP e Ceratocystis resistência à murcha foi realizado no AUDPC pelo método da regressão LASSO e coeficiente de regressão (Beta) foi calculado para as duas características (Tabela 4). A análise de regressão mostrou que os marcadores associados à resistência estão no cromossomo 6 para ambas as características analisadas na população F1 (Figuras 8 e 9). Os coeficientes de regressão para NPM indicou que no cromossomo 6 existem 10 marcadores SNP associados à resistência à murcha de Ceratocystis, dos quais os marcadores TcSNP13 e 14 (Beta = 0,10 para NDP), são os mais significativos para a resistência.

O coeficiente de regressão obtido para CLX revelou também no cromossomo 6, mais 8 SNP, além dos 10 SNP identificados para o NPM (Tabela 4). Mais uma vez, os marcadores TcSNP13 e 14 foram os mais significativos, uma vez que obtiveram Beta de 0,07. Os coeficientes de correlação de 0,89 para NPM e 0,86 para o CLX indicam forte grau de associação genética entre os 18 marcadores SNP identificados e as características fenotípicas analisadas.

Tabela 4. Marcadores SNP associados com resistência à murcha-de-ceratocystis na população MP01 de cacaueiro, considerando-se as variáveis número de plantas mortas (NPM) e tamanho da lesão do xilema (CLX).

Continua...

Loco	Beta estimado	
	NPM	CLX
TcSNP3	0,05	0,04
TcSNP4	0,05	0,04
TcSNP5	0,05	.
TcSNP6	0,05	.
TcSNP7	0,05	.
TcSNP8	0,05	0,04

TcSNP9	0,05	0,04
TcSNP10	0,05	0,04
TcSNP11	0,05	0,04
TcSNP12	0,05	0,04
TcSNP13	0,10	0,07
TcSNP14	0,10	0,07
TcSNP15	.	0,03
TcSNP16	.	0,03
TcSNP17	.	0,04
TcSNP18	.	0,04
TcSNP19	.	0,04
TcSNP20	.	0,04
TcSNP21	.	0,04
TcSNP22	.	0,04

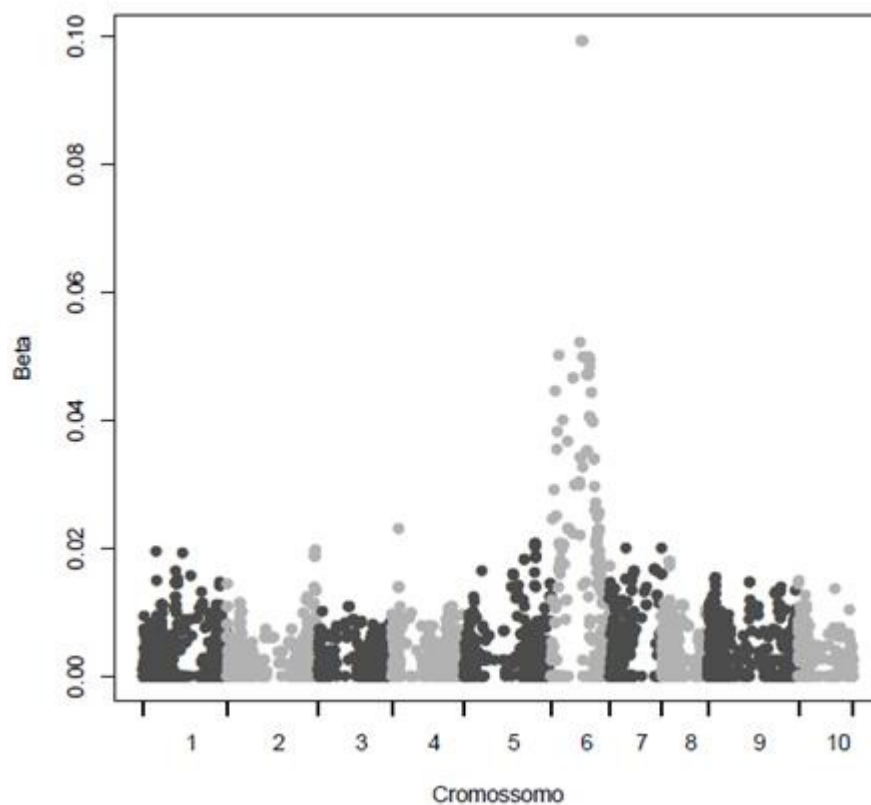


Figura 8. Manhattan plot para o efeito dos marcadores SNP estimados pelo método de regressão (LASSO) para o número de plantas mortas.

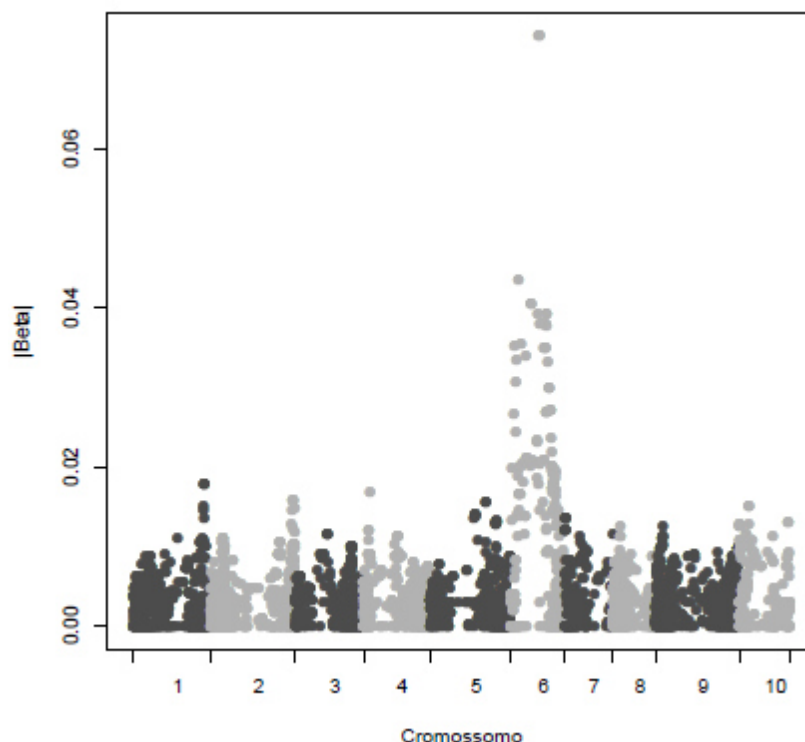


Figura 9. Manhattan plot para o efeito dos marcadores SNP estimados pelo método de regressão (LASSO) para o tamanho da lesão no xilema.

A fim de verificar a região cromossômica e sua influência na resistência à murcha de *Ceratocystis* em *T. cacao* L., foi realizado o mapeamento de QTL via MIS e MIC (tabela 5; Figura 10). A análise de QTL por meio de MIS revelou que os marcadores SNP mais associados à resistência estão no cromossomo 6 para ambas as características. Para NDP os marcadores SNP TcSNP1 e TcSNP2 foram os mais significantes, com LOD máximo de 48,02 e a proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL foi de 62,6%. Esses marcadores estão muito próximos aos marcadores identificados na abordagem de LASSO, o que indica que essa região realmente está associada com a resistência à murcha-de-ceratocystis no cacauero. O MIS para CLX revelou apenas um marcador SNP significativo no cromossomo 6, TCSNP2, com LOD de 35,20 e o QTL explicando 50,7% da variação fenotípica (Figura 11).

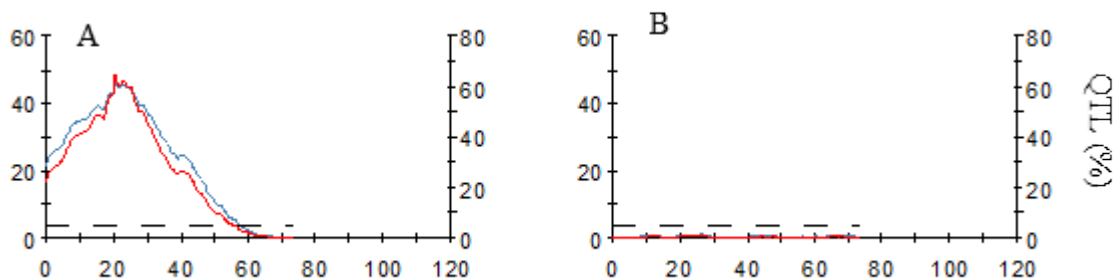


Figura 10. Identificação de QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis analisado pelo número de plantas mortas. A = Região de QTL no genoma do TSH-1188; B = Região de QTL no genoma do CCN-51.

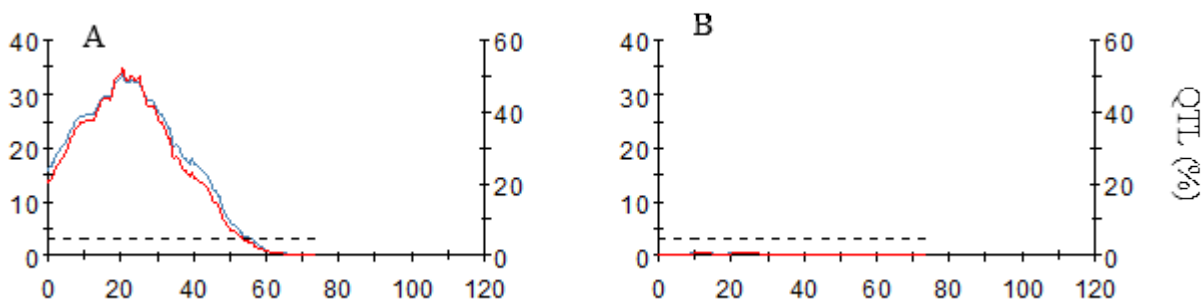


Figura 11. Identificação por MIS de QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis analisado pelo tamanho da lesão no xilema. A = Região de QTL no genoma do TSH-1188; B = Região de QTL no genoma do CCN-51.

Posteriormente foi realizado o mapeamento do QTL para ambas características analisadas pelo método de mapeamento por intervalo composto (MIC). Os resultados encontrados para o MIC do NPM revelou a existência da mesma região de QTL revelado pelo MIS, com o mesmo conjunto de marcadores moleculares. Por outro lado, o MIC para o CLX revelou a existência de dois QTL nos cromossomo 6 e 4 (Figura 13 e Tabela 5). O QTL localizado no cromossomo 6 corresponde a um QTL de grande efeito que explica 50,02% da variação desta característica, tal região é flanqueada pelos marcadores TCSNP1 e 2 localizados a 20,53 cM de distancia do primeiro marcador SNP (0 cM), com LOD 35,20, e limiar de significância 3,1. Enquanto que, o QTL no cromossomo 4 consiste de um QTL de pequeno efeito, explicando apenas 4% da variação fenotípica encontrada, a qual é flanqueada pelo marcador TCSNP23, situado a 10,88

cM, tendo como referência o primeiro marcador SNP situado a 0 cM, com LOD de 4,20, e limiar de significância 3,1.

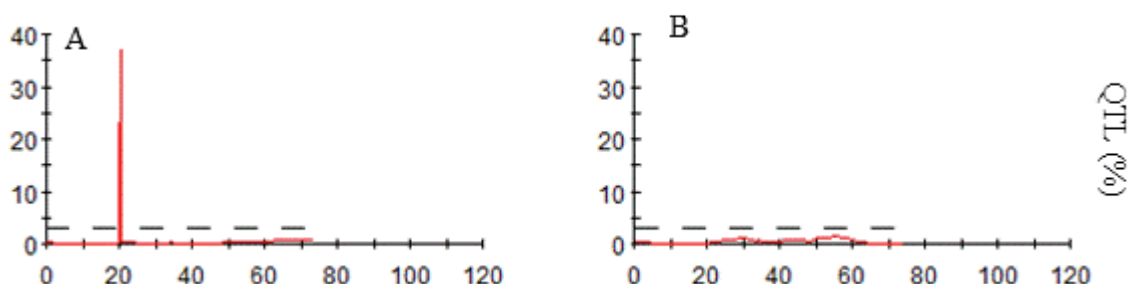


Figura 12. Identificação por MIC de QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis analisado pelo comprimento da lesão no xilema no cromossomo 6. A = Região de QTL no genoma do TSH-1188; B = Região de QTL no genoma do CCN-51.

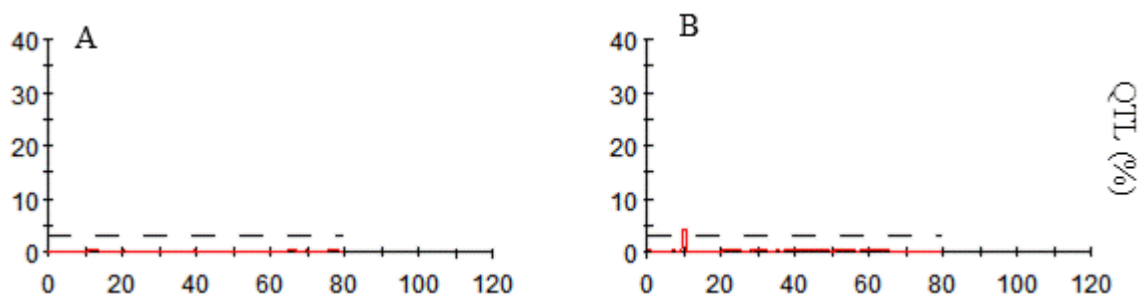


Figura 13. Identificação por MIC de QTL relacionado com a resistência à murcha-de-ceratocystis analisado pelo comprimento da lesão no xilema no cromossomo 4. A = Região de QTL no genoma do TSH-1188; B = Região de QTL no genoma do CCN-51.

Tabela 5. QTL identificados na população MP01 para resistência do cacaueteiro à murcha-de-ceratocystis.

Dados fenotípicos	LG	LOD	Marcador	Posição	QTL (%)
CLX	4	4,20	TcSNP23	10,88	4,0
	6	37,07	TcSNP1	20,53	50,0
NPM	6	48,02	TcSNP2	20,81	62,0

O QTL de grande efeito localizado no cromossomo 6 para o NPM e CLX foi identificado apenas no parental resistente TSH-1188. Enquanto que o QTL localizado no cromossomo 4 foi identificado apenas no parental suscetível CCN-51. Isto indica que os genes de resistência da progênie MP01 são provenientes do clone TSH-1188, por outro, CCN-51 também influencia na resistência, mesmo que em uma porcentagem muito menor.

Análise dos haplótipos

A análise dos haplótipos na região de QTL no cromossomo 6 mostraram que os alelos de TSH-1188 são responsáveis por conferir resistência à murcha-de-ceratocystis no cacauero. In tal análise, os alelo 1 de TSH-1188 foi codificado como T1, e o alelo 2 como T2 para e os alelos de CCN-51 foram codificados como C1 e C2, seguindo o mesmo raciocínio.

A análise de segregação entre os alelos de TSH-1188 e CCN-51 no cromossomo 6, T1 é o mais favorável para a resistência e a frequência observada para T1 foram de 85% ($p < 1.75E-14$) e 86% ($p < 4.14E-15$), respectivamente (Figura 14). A frequência para o T2 foi de 13% ($p < 8.6E-15$) e 12% ($p < 1.87E-15$), respectivamente. Para CCN-51, as frequências de C1 e C2 foram 56,19% e 45,96%, com $p < 0,20$ e $0,36$, respectivamente.

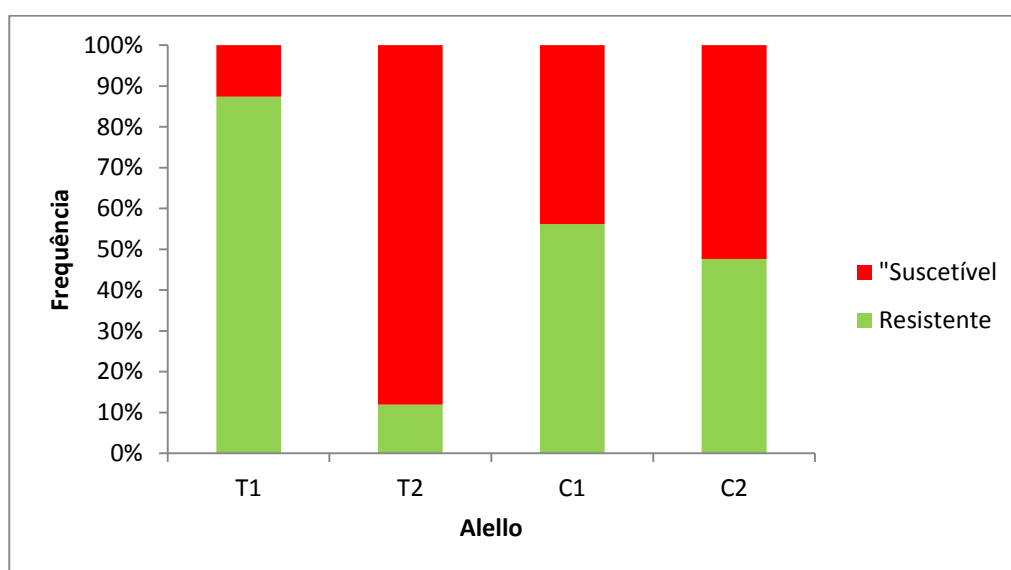


Figura 14. Análise dos SNP, TCSNP1 e 2, identificados na região de QTL no cromossomo 6. T1 e T2= alelos 1 e 2 de TSH-1188. C1 e C2= alelos 1 e 2 de CCN-51.

No cromossomo 6 a combinação mais favorável foi T1-C2 e a sua frequência foi de 88% ($p < 7.58E-09$) (Figura 15). Para as demais combinações, T1-C1, T2-T2 e C1-C2, a frequência foi de 82% ($p < 3.77E-07$), 18% ($p < 3.83069E-05$) e 7,69% ($p < 8.98E-12$), respectivamente.

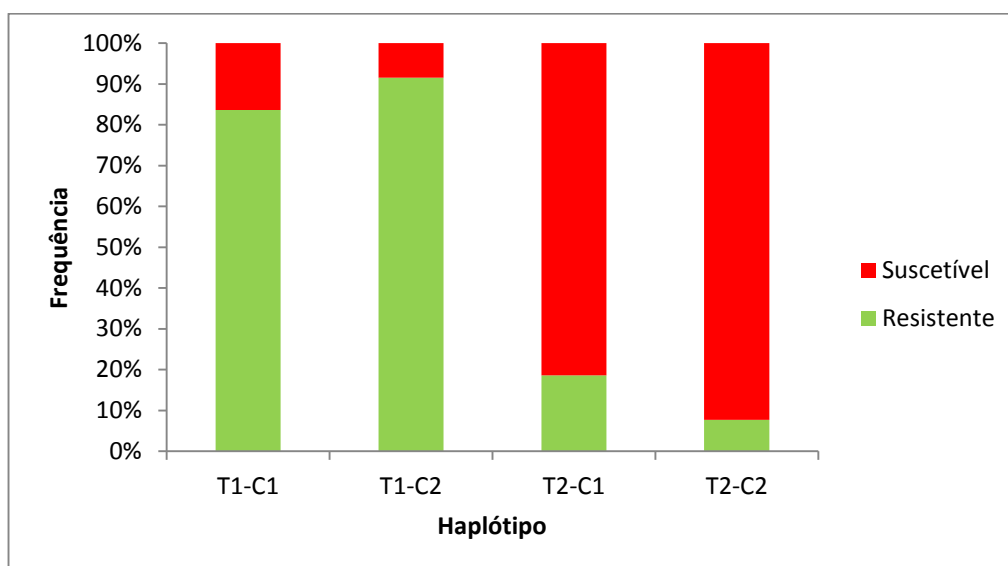


Figura 15. Combinação de haplótipos dos SNP, TCSNP1 e 2, identificados na região de QTL no cromossomo 6. T1 e T2= alelos 1 e 2 de TSH-1188. C1 e C2= alelos 1 e 2 de CCN-51.

No cromossomo 4, o haplótipo favorável de foi T2, que segregou em 54% ($p < 0,39$) dos genótipos resistentes na população F1, enquanto o alelo T1 segregou em 47% ($p < 0,58$) (Figura 16). Além disso, o alelo C1 foi significativo, uma vez que 55% das progênies apresentaram tal alelo ($p < 0,24$), enquanto que e C2 foi observado em 46% das progênies ($p < 0,43$).

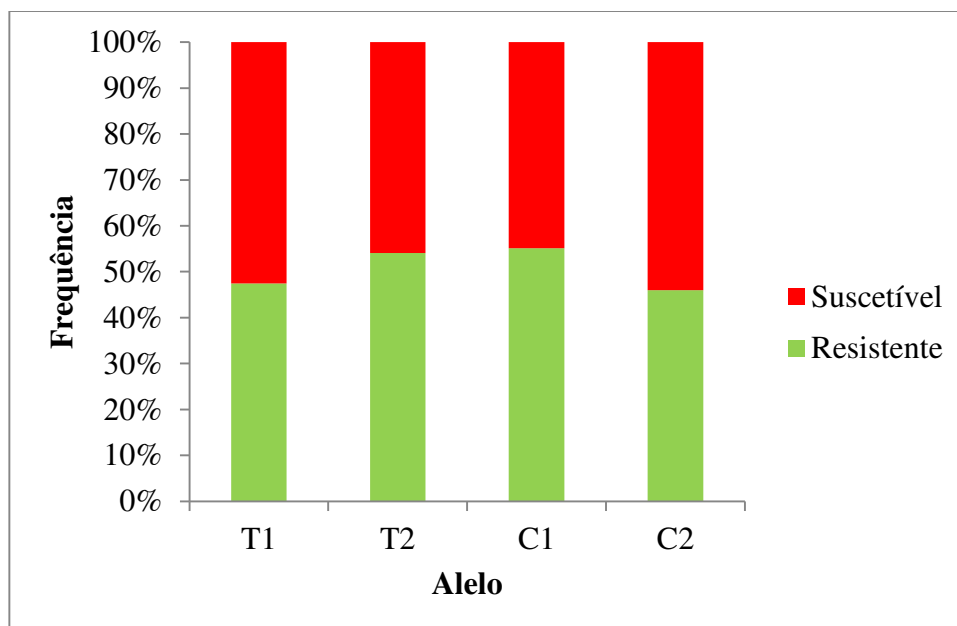


Figura 16 Análise dos SNP identificados na região de QTL no cromossomo 4. T1 e T2= alelos 1 e 2 de TSH-1188. C1 e C2= alelos 1 e 2 de CCN-51.

Análise de combinações de alelos de TSH1188 e CCN-51 no cromossomo 4 mostrou que 64% das progênies ($p < 0,032$) com a combinação favorável de T2-C1, foram o mais resistentes na população F1 (Figura 17). As outras combinações correspondem a 47% (T1-C1), 48% (T1-C2) e 44% (T2-C2) e o seu valor de p correspondente a 0,64, 0,76 e 0,34.

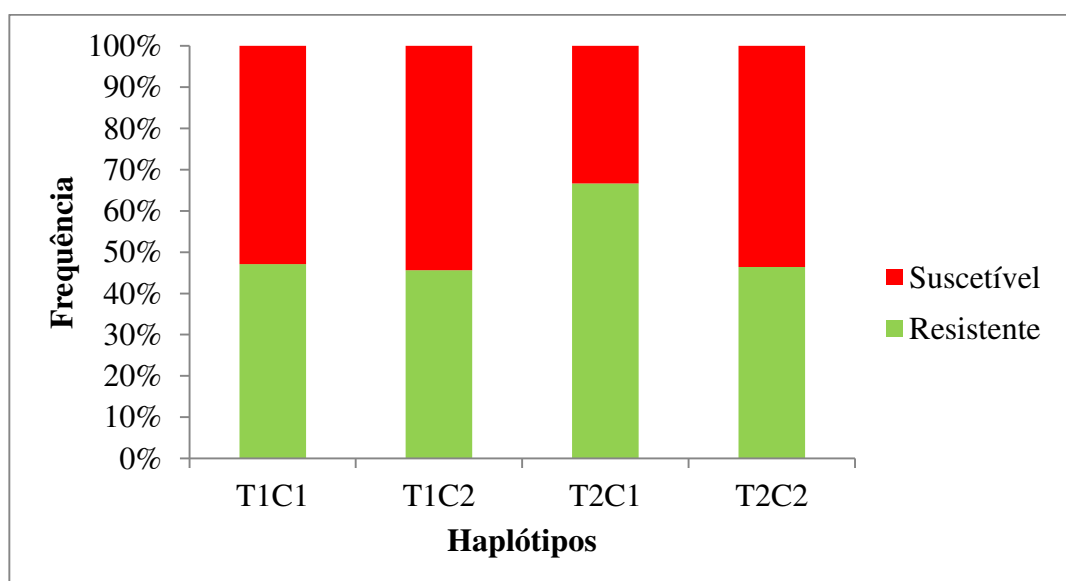


Figura 17. Combinação de haplótipos dos SNP, TCSNP23, identificado na região de QTL no cromossomo 4. T1 e T2= alelos 1 e 2 de TSH-1188. C1 e C2= alelos 1 e 2 de CCN-51.

Identificação de genes candidatos nas regiões dos QTL

Com base nas anotações de genes modelos disponíveis nos bancos de dados do NCBI e do genoma do cacau (*T. cacao* cv Matina 1-6) foram identificadas as proteínas codificadas genes encontrados nas regiões de QTL dos cromossomos 4 e 6 (Tabela 6). No total, 12 genes foram identificados, e considerados como genes candidatos relacionados com resistência, sendo três no QTL do cromossomo 4, e 9 genes no cromossomo 6.

Tabela 6. Genes candidatos para resistência à murcha-de-ceratocystis do cacauero, encontrados nas regiões de QTL.

Cromossomo	Identificação do Gene (CGD)	Característica da proteína codificada
4	1	Contém domínios de F-box/FBD/LRR
4	2	Tipo receptor LRR de cinase serina/treonina
4	3	Tipo receptor LRR de cinase serina/treonina
6	4	Provável proteína de resistência
6	5	Homólogo a proteína de resistência
6	6	Contém domínio Zinc finger
6	7	Contém domínio Zinc finger
6	8	Homologo a proteína cinase
6	9	Tipo receptor de cinase serina/treonina
6	10	Tipo receptor cisteína de cinase
6	11	Contém domínio U-box
6	12	Contém domínios de F-box

LRR, domínio proteico repetições ricas em leucina; FBD, domínio proteico encontrado em F-box; F-box, domínio proteico, U-box, domínio proteico Zinc finger modificado; Zinc finger, domínio proteico.

Discussão

O clone TSH-1188 tem sido considerado como um dos mais resistentes contra o ataque do fungo *C. cacaofunesta* (SANCHES et al. 2008; SILVA et al., 2012). Recentemente, os clones TSH-1188 e CCN-51 foram analisados quanto ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas do fungo, padrão de colonização e a resposta anatômica (SANTOS et al., 2013). Nesses ensaios TSH-1188 apresentou baixa ou nenhuma colonização dos vasos do xilema comparado CCN-51, em que, as principais respostas de defesa do TSH-1188 foram caracterizadas pela formação tilose e géis e gomas ricos em polissacarídeos numa taxa mais acelerada que CCN-51 (SANTOS et al., 2013). A população de mapeamento (MP01) é proveniente do cruzamento entre TSH-1188 e CCN-51, portanto, os indivíduos dessa progênie apresentam resistência ao ataque de *C. cacaofunesta*.

Foi observada que segregação contínua na população MP1 segregou para resistência a murcha-de-ceratocystis analisados pelo NPM e CLX. O padrão de segregação contínuo da progênie sugere que a resistência à murcha-de-ceratocystis possui natureza quantitativa. Esses resultados corroboram com Santos et al (2012), em que os autores relatam que a resistência à murcha-de-ceratocystis é controlada por múltiplos genes e possui natureza dominante. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nesse estudo, uma vez com base nos valores do BLUP (NMP= -1,51 e, CLX= -0,73 a -2,93) a maior parte dos genótipos são mais próximos do parental resistente TSH-1188 (NMP= -1,51 e, CLX= -0,66). Os genótipos da progênie com valores de BLUP de -0,73 a -2,93 para o CLX formam um grupo de 117 indivíduos que foram superiores ao parental a TSH-1188. Esse fenômeno é denominado segregação transgressiva e se caracteriza pela manifestação de características quantitativas em maior ou menor intensidade que os progenitores (RIESEBERG et al., 1999). A ocorrência de segregação transgressiva está relacionada à presença de alelos complementares entre os progenitores (VICENTE; TANKSLEY, 1993). Sendo assim, podemos presumir que o parental CCN-51 também contribui para resistência à murcha-de-ceratocystis. Além do mais, a segregação transgressiva é significativa no que diz respeito ao melhoramento de plantas, visto que, representa novas fontes de variação genética (VICENTE; TANKSLEY, 1993).

Os resultados das análises de QTL indicaram duas regiões genômicas, um QTL de pequeno efeito no cromossomo CLX-4 (LOD= 4,20), e outro de grande efeito no cromossomo NPM-6 (LOD= 48,02), CLX- 6 (37,07). Vale salientar que o QTL no cromossomo 4 foi identificado apenas para o CLX. O QTL no cromossomo 4 explica uma pequena da variação fenotípica do CLX, apenas 4%, enquanto que o QTL no cromossomo 6 explica a maior parte da variação fenotípica das características analisadas, CLX-6= 50,0% e NPM-6= 62,0%. A análise de mapeamento do QTL pelo método Duplo Haploide permitiu identificar em qual dos genótipos parentais estava localizada a região de QTL. O QTL do cromossomo 6 foi identificado apenas no parental resistente TSH-1188, sugerindo que esse parental foi o responsável pela transferência dos genes de resistência para progênie MP01. Entretanto, o pequeno QTL no cromossomo 4 foi identificado no parental CCN-51. Isso sugere que, embora de pequeno efeito, CCN-51 possui regiões de resistência à *C. cacaofunesta*.

Os QTL encontrados nesse trabalho diferem dos identificados por Santos et al., (2012). Os autores identificaram duas regiões de QTL, nos cromossomos 3 (LOD= 2,73) e 9 (LOD= 3,27), analisando a lesão no xilema de uma população F2, proveniente do cruzamento entre SCA 6 x ICS. Essas diferenças provavelmente se devem aos progenitores da população. SCA 6 faz parte da linhagem de TSH-1188, juntamente com IMC 67 e Pound 18 (BEKELE, 2004). O cruzamento entre SCA 6 e IMC 67 resultou no clone TSA 641 (LOCKWOOD; GYAMFI, 1979; TURNBULL, 2014). A polinização aberta de TSA 641 resultou em TSH 753 (BARTLEY, 1996; TURNBULL, 2014). TSH-1188 é resultante de Pound 18 com TSH 753 (MAHARAJ et al., 2011). Apesar de SCA 6 ser um dos progenitores do TSH-1188 acreditamos que os QTL encontrados nesse estudo sejam provenientes de IMC 67.

A análise dos 266 genótipos com 6 repetições possibilitaram obter dados fenotípicos para o mapeamento do QTL. As análises de QTL permitem entender as bases genéticas do QTL relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis, bem como identificar marcadores associados com a resistência a essa doença. Os marcadores SNP identificados nas regiões de QTL podem ser utilizados por programas de melhoramento genético para

seleção de genótipos superiores por meio da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) e para avaliação de banco de germoplasma. Esses resultados comprovam a importância dos SNP localizados para NPM e para o CLX. Isso sugere que na região flanqueada pelos marcadores TcSNP13 e 14, estão localizados os genes relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis.

Genes candidatos para resistência à murcha-de-ceratocystis foram encontrados em ambas as regiões nos grupos de ligação 4 e 6. Um total de 12 possíveis genes candidatos foram relatados, 3 no cromossomo 4 e 9 no cromossomo 6. Os genes encontrados nas regiões de QTL são bons candidatos para futuros experimentos de validação e expressão gênica a fim de certificar que esses genes estão realmente envolvidos com a resistência à murcha-de-Ceratocystis. A análise dos genes candidatos poderá auxiliar na decomposição das bases genéticas do QTL para murcha-de-Ceratocystis, o que permite estimar o seu efeito, bem como identificar genes relacionados com essa doença. Portanto, tal abordagem é fundamental para o sucesso da clonagem posicional, ou mesmo para uso na seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético do cacaueteiro.

Os genes candidatos identificados no presente trabalho poderão ser analisados quanto a polimorfismos em suas sequências, bem como estudos de expressão, em ensaios de inoculação, para identificar com mais precisão quais desses genes estariam envolvidos na resistência à murcha-de-ceratocystis e quais mecanismos moleculares envolvidos.

Conclusões

Dois novos QTL para resistência murcha-de-ceratocystis foram identificados nos cromossomos 4 e 6, onde há 12 genes candidatos possivelmente relacionados com a resistência à murcha-de-ceratocystis do cacaueteiro.

Os marcadores moleculares identificado nessa região de QTL são úteis para seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) e para avaliação de banco de germoplasma.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Centro MARS de Ciência do Cacau (MCCS) pela cessão dos dados genotípicos, o espaço de trabalho e as mudas propagadas dos indivíduos da MP01. Agradeço também aos técnicos Valdivino do Carmo, Marcelo Santos, Eliege Santos e ao Dr. Stefan Royart, Dr. Fábio Corrêa pelo auxílio nos experimentos. Este trabalho foi financiado pelo MCCS e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/AUX/PE/PRODOC-2101/2008). Luciel dos Santos Fernandes recebeu uma bolsa de mestrado da CAPES.

Referências bibliográficas

- AMBROSIO, A. B.; NASCIMENTO, L. C.; OLIVEIRA, B. V.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; TIBURCIO, R. A.; TOLEDO, THOMAZELLA, D. P.; LEME, A. F. P.; CARAZZOLLE, M. F.; VIDAL, R. O.; MIECZKOWSKI, P.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. G. CABRERA, O. G. Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria: from genome to proteome. **Biomed Central** 14:91, 2013.
- ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J. M.; GUILTINAN, M. J.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, S.N.; ABROUK, M.; MURAT, F.; FOUET, O.; POULAIN, J.; RUIZ, M.; ROGUET, Y.; RODIERGOUD, M.; BARBOSA-NETO, J.F.; SABOT, F.; KUDRNA, D.; AMMIRAJU, J.S.; SCHUSTER, S.C.; CARLSON, J.E.; SALLET, E.; SCHIEX, T.; DIEVART, A.; KRAMER, M.; GELLEY, L.; SHI, Z.; BÉRARD, A.; VIOT, C.; BOCCARA, M.; RISTERUCCI, A.M.; GUIGNON, V.; SABAU, X.; AXTELL, M.J.; MA, Z.; ZHANG, Y.; BROWN, S.; BOURGE, M.; GOLSER, W.; SONG, X.; CLEMENT, D.; RIVALLAN, R.; TAHI, M.; AKAZA, J.M.; PITOLLAT, B.; GRAMACHO, K.; D'HONT, A.; BRUNEL, D.; INFANTE, D.; KEBE, I.; COSTET, P.; WING, R.; MCCOMBIE, W.R.; GUIDERDONI, E.; QUETIER, F.; PANAUD, O.; WINCKER, P.; BOCS, S.; LANAUD, S. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, v. 43, n. 2, p. 101–108. 2010.

BARTLEY, B. G. D. Additional Notes with the translation of Coral's field notes from R. Ucayali, Peru (1987-88) expedition. **Personal Communications**. 1996.

BRANCO, Samuel Martins Jesus. M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. Herança da resistência de cacau à murcha-de-ceratocystis e mapeamento molecular de genes envolvidos. **Dissertação de Mestrado**. Genética e Biologia Molecular, UESC Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2011. Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa.

BEKELE, F. L. The History of Cocoa Production in Trinidad and Tobago. **In re-vitalisation of the Trinidad & Tobago Production in Trinidad and Tobago Cocoa Industry**. 2004

DELGADO, R. Fuentes de resistencia al mal del machete en accesiones de cacao silvestre coletadas en la Amazonia Ecuatoriana. **XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal**, Latacunga, Ecuador, 2003.

DELPHINE, C.; BAUER, Z.; REGENASS, M.; BOLLER, T.; FELIX, G The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. **The Plant Cell**, Vol. 18, 465–47. 2006.

ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. Ceratocystis Wilt of Cacao — A Disease of Increasing Importance. **Phytopathology**, v. 97, n. 1, p. 1648–1649, 2007.

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

GOITÍA, W.; ROSALES, C. J. Relación entre la incidencia de escol'tidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)** No. 62 p. 6 5 - 7 1 , 2001

HARRINGTON, T. C. ; FRAEDRICH, S. W Quantification of propagules of the laurel wilt fungus and other mycangial fungi from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*. **Phytopathology** 100:1118-1123, 2010.

JANSEN, R. c.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1447-1455, 1994. Cacao Genome Database. Disponível em: <http://www.cacaogenomedb.org/tools/gbrowse>. Acessado em 23 de janeiro de 2014.

LOCKWOOD G.; Gyamfi M. M. O. The CRIG cocoa germplasm collection with notes on codes used in the breeding programme at Tafo and elsewhere. **Technical Bulletin**, No 10, Cocoa Research Institute, Tafo, Ghana pp 62.

MAHARAJ, K. M.; MAHARAJ, P.; BEKELE, .F. L.; RAMNATH, D.; BIDAISEE, G.G; BEKELE, I.; PERSAD, C.; JENNINGS, K.; SANKAR, R. Trinidad selected hybrids: An investigation of the phenotypic and agro-economic traits of 20 selected cacao cultivars. **Tropical Agriculture**. Trinidad 88: 175-185. 2011.

MOTAMAYOR, J. C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; LIVINGSTONE, D. I. I. I.; CORNEJO, O.; FINDLEY, S. D.; ZHENG, P.;

UTRO, F.; ROYAERT, S.; SASKI, C.; JENKINS, J.; PODICHETI, R.; ZHAO, M.; SCHEFFLER, B. E.; STACK, J. C.; FELTUS, F. A.; MUSTIGA, G. M.; AMORES, F.; PHILLIPS, W.; MARELLI, J. P.; MAY, G. D.; SHAPIRO, H.; MA, J.; BUSTAMANTE, C. D.; SCHNELL, R. J.; MAIN, D.; GILBERT, D.; PARIDA, L.; KUHN, D. N. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. r53, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. 2005. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p, 2005.

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

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

SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; SILVA, S. D. V. M.; MICHELI, F.; CLEMENT, D.; GRAMACHO, K. P. Identification of quantitative trait loci linked to *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 4, p. 1563–1571, 2012.

SANTOS, R. M. F.; SILVA, S. D. V. M. ; SENA, K.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. **Tropical Plant Biol** 6:37–45, 2013.

R Development Core Team . : R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing** . Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.Rproject.org>. 2013.

Wimmer, V., T. Albrecht, H.-J. Auinger, and C.-C. Schoen, 2012 synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using r. **Bioinformatics** 28: 2086{2087.

RIESEBERG, L. H.; ARCHER. M. A.; WAYNE, R. K. Transgressive segregation, adaptation, and speciation. **Heredity** 83:363-372, 1999.

Silva, D. V.; Araujo, I. S.; Branco, S. M. J.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Lopes, U. V.; Marelli, J. P.; Motamayor, J. C.; Royaert, S.; Reboucas, R. C.; Correa, R. X.. Field evaluation of resistance to witches' broom disease in cacao 1 flower cushions 2 using different inoculation levels. **Plant Pathology**, 2014 (no prelo).

TURNBULL, C.J.; Hadley, P. **International Cocoa Germplasm Database (ICGD)**. [Online Database]. CRA Ltd./NYSE Liffe/University of Reading, UK. Disponível em: <http://www.icgd.reading.ac.uk>. Acessado em 23 de janeiro de 2014).

Van Ooijen, J.W. JoinMap 4.0, software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen, The Netherlands: Kyazama B.V. 2006.

VICENTE, M. C.;TANKSLEY, S. D . QTL Analysis of Transgressive Segregation in an Interspecific Tomato Cross . **Genetics** 134 585-596, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A ocorrência da murcha-de-ceratocystis nas plantações de cacau da região sul da Bahia requer esforços para tentar minimizar os danos causados por essa doença. Diante dessa realidade, diversos clones de cacau têm sido testados quanto à resistência a essa doença na região produtora do sul da Bahia, assim como em outras localidades. Diversas estratégias vêm sendo utilizadas em programas de melhoramento genético com intuito de reduzir os danos causados por essa doença. Dentre elas, destaca-se a utilização de porta-enxertos resistentes e a utilização de populações segregantes para mapear regiões genômicas relacionadas com a resistência à murcha-de-ceratocystis. No presente trabalho, foram identificados novos marcadores moleculares ligados ao QTL em regiões genômicas distintas daquelas previamente estudadas, o que permite que estes sejam utilizados por meio da seleção assistida por marcadores (SAM) em programas de melhoramento genético dessa cultura.

Os porta-enxertos resistentes favorecem o desenvolvimento de enxertos suscetíveis de cacau, mesmo frente à inoculação com *C. cacaofunesta*. No entanto, a interação porta-enxerto com o enxerto é mais favorecida quando o enxerto apresenta certo nível de resistência contra o patógeno. Portanto, o presente trabalho comprova que utilização de porta-enxertos resistentes é útil para melhorar os níveis de resistência a essa doença, mesmo após obtenção de cultivares superiores com níveis variáveis de resistência a essa doença.

O mapeamento de QTL na população MP01 pelo NPM e CLX revelou duas novas regiões de QTL para resistência a murcha-de-ceratocystis. Esses dados foram úteis na identificação de marcadores SNP nas regiões de QTL, bem como genes candidatos para resistência a essa doença. Os SNP serão ferramentas importantes na seleção de genótipos superiores resistentes ao ataque de *C. cacaofunesta* por meio da SAM por programas de melhoramento genético do cacauero, assim como a caracterização de banco de germoplasma por todo o mundo.

Os genes candidatos poderão ser comparados quanto às respectivas sequências genômicas de TSH-1188 e CCN-51, proteínas codificadas, padrões de expressão e acúmulo proteico, para certificação se estão envolvidos com a resistência à murcha-de-ceratocystis e quais mecanismos estão envolvidos.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- SANTOS, ESL; CERQUEIRA-SILVA, CBM.; CLEMENT, D; LUZ, EDMN. Resistance gradient of black pod disease in cocoa and selection by leaf disk assay. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.11, n.4, p. 297-303, 2011.
- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**. Vol.97, n. 5, p. 1012-1022, 2005
- AKHTAR, M. S.; SHAKEEL, U.; SIDDIQUI, Z. A. Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. **Turk J Biol**, v. 32, p. 1–7, 2010.
- ALMEIDA, L.C.C.; COSTA, A. Z. M.; LOPES, J.R.M.; BEZERRA, J.L. Distribuição geográfica da murcha-de-ceratocystis do cacauzeiro na Bahia, Brasil. **Agrotropica** 17:83-86. 2005.
- AMBROSIO, A. B.; NASCIMENTO, L. C.; OLIVEIRA, B. V.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; TIBURCIO, R. A.; TOLEDO, THOMAZELLA, D. P.; LEME, A. F. P.; CARAZZOLLE, M. F.; VIDAL, R. O.; MIECZKOWSKI, P.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. G. CABRERA, O. G. Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria: from genome to proteome. **Biomed Central** 14:91, 2013.
- ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J. M.; GUILTINAN, M. J.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, S.N.; ABROUK, M.; MURAT, F.; FOUET, O.; POULAIN, J.; RUIZ, M.; ROGUET, Y.; RODIERGOUD, M.; BARBOSA-NETO, J.F.; SABOT, F.; KUDRNA, D.; AMMIRAJU, J.S.; SCHUSTER, S.C.; CARLSON, J.E.; SALLET, E.; SCHIEX, T.; DIEVART, A.; KRAMER, M.; GELLEY, L.; SHI, Z.; BÉRARD, A.; VIOT, C.; BOCCARA, M.; RISTERUCCI, A.M.; GUIGNON, V.; SABAU, X.; AXTELL, M.J.; MA, Z.; ZHANG, Y.; BROWN, S.; BOURGE, M.; GOLSER, W.; SONG, X.; CLEMENT, D.; RIVALLAN, R.; TAHI, M.; AKAZA, J.M.; PITOLLAT, B.; GRAMACHO, K.; D'HONT, A.; BRUNEL, D.; INFANTE, D.; KEBE, I.; COSTET, P.; WING, R.; MCCOMBIE, W.R.; GUIDERDONI, E.; QUETIER, F.; PANAUD, O.; WINCKER, P.; BOCS, S.; LANAUD, . The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 101–108, dez. 2010.
- ATWOOD, L. D.; HEARD-COSTA, N. L. **Limits of Fine-Mapping a Quantitative Trait**. v. 106, p. 99–106, 2003.

- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A. C.. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. **The American Phytopathological Society**. v. 93, n. 10, p. 1274-1284. 2003.
- BARNES, I.; GAUR, A.; BURGESS, T.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, p. 319-325, 2001.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. na Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica** 8:43-544. 1978.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Doenças fúngicas do cacauero na Amazônia brasileira. Belém PA. CEPLAC Superintendência da Amazônia Oriental. 2005.
- BERTOLDE, F. Z.; Almeida, A.-A. F. D. ;Correa, R. X.;Gomes, F. P.;Gaiotto, F. A.; Baligar, V. C. ;Loguercio, L. L. . Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L.. **Tree Physiology**, v. 30, p. 56-67, 2009.
- BHERING, L.L. ; CRUZ, C. D. . Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43, p. 379-385, 2008.
- BOMFIM, N.; RIBEIRO, D. G.; NASSAR, N. M. A. Anatomic changes due to interspecific grafting in cassava (*Manihot esculenta*). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 2, p. 1011–1021, 2011.
- BOZA, E. J.; IRISH, B. M.; MEEROW, A. W.; TONDO, C. L.; RODRÍGUEZ, O. A.; VENTURA-LÓPEZ, M.; GÓMEZ, J. A.; MOORE, J. M. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 605–619, jul. 2012.
- BROWN, J.S.; SCHNELL, R. J.; MOTAMAYOR, J. C.; KUHN, D. N.; BORRONE, J. W.; Resistance Gene Mapping for Witches' Broom Disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 Population using SSR Markers and Candidate Genes. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 130(3):366-373. 2005
- BULLER; S.; INGLIS; D.; MILES, C. Plant growth, fruit yield and quality, and tolerance to verticillium wilt of grafted watermelon and tomato in field production in the Pacific Northwest. **HortScience** 48(8):1003-1009. 2013.
- CANIZARES, K. A. L.; GOTO, R. Comparação de métodos de enxertia em pepino. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 95–99, 2002.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, 61, n.2, pp. 89-100, 2002.
- CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics : a review. **Molecular Breeding**, v. 7, n. 4, p. 275–291, 2001.
- CHEEMA J; DICKS J. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. **Briefings in Bioinformatics**, 10, Nr. 6, p. 595-608, 2009.

- CHEN, T., ZHANG, Y., ZHAO, L., ZHU, Z., LIN, J., ZHANG, S. WANG, C. Fine mapping and candidate gene analysis of a green-revertible albino gene gra(t) in rice. **Journal of genetics and genomics Yi chuan xue bao**, 36 (2), 117–123, 2012.
- COHEN, R.; BURGER, Y.; HOREV, C.; KOREN, A.; EDELSTEIN, M. Introducing grafted cucurbits to modern agriculture: the Israeli experience. **Plant Disease**, v. 91, n. 8, p. 916–923, 2007.
- CUI, Y., LEE, M. Y., HUO, N., BRAGG, J., YAN, L., YUAN, C., LI, C. Fine Mapping of the Bsr1 Barley Stripe Mosaic Virus Resistance Gene in the Model Grass *Brachypodium distachyon*. **PloS one**, 7(6), e38333, 2012.
- DOU, V. T.; DANG, N. V.; NGUYEN, D. H.; PHAM, L. T.; LE, T. T. M.; PHAN, H. T.; BURGESS, L. W. A simplified technique for grafting watermelon onto resistant cucurbit rootstocks for control of Fusarium wilt of watermelon in Nghe An Province, Vietnam. **Australasian Plant Disease Notes** 4(1):114-116. 2009.
- DELGADO, R. Fuentes de resistencia al mal del machete en accesiones de cacao silvestre coletadas en la Amazonia Ecuatoriana. **XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal**. Latacunga, Ecuador, noviembre, 2003.
- DELGADO, R. A.; SUAREZ-CAPELLO, C. Evaluación de la resistencia al Mal del Machete en clones internacionales de cacao en Ecuador. **In proceeding of: 14th International Cocoa Research Conference**. 2003.
- DORMON, E. N. A.; HUIS, A. VAN; LEEUWIS, C. Causes of low productivity of cocoa in Ghana : farmers ' perspectives and insights from research and the socio-political establishment. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, n. 3-4, p. 237–259, 2004.
- DUCROCQ, S., GIAUFFRET, C., MADUR, D., COMBES, V., DUMAS, F., JOUANNE, S., COUBRICHE, D. Fine mapping and haplotype structure analysis of a major flowering time quantitative trait locus on maize chromosome 10. **Genetics**, 183(4), 1555–1563, 2009
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia** 97:57–69. 2005.
- ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C.; ALFENAS, A. *Ceratocystis* Wilt of Cacao — A Disease of Increasing Importance. **Phytopathology**, v. 97, n. 1, p. 1648–1649, 2007.
- ESTAN, M. T. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 412, p. 703–712, jan. 2005.
- FALEIRO, F. G. ; SCHUSTER, I. ; RAGAGNIN, V. A. ; CRUZ, C. D. ; CORRÊA, R. X.r ; BROMMONSCHENKEL, S. H. ; MOREIRA, M. A. ; BARROS, E. G. de. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de QTLs associados a ciclo e rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n.12, p. 1387-1397, 2003.

- FERREIRA, M. A.; HARRINGTON, T. C.; Gongora-Canul, C. C. ; MAFIA, R. G.; ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C. Spatial-temporal patterns of Ceratocystis wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. 43:153-164. 2013.
- GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into Eucalyptus breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 369-379, 2004.
- GENIN, S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. **New Phytologist** 187, 4, 920–928. 2010.
- GOITÍA, W.; ROSALSES, C. J.; Relación entre la incidencia de escolotídeos y la necrosis del cacao en Aragua , Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 62** p.65 - 71 , 2001.
- HAROLDSEN, V. M.; SZCZERBA, M. W.; AKTAS, H.; LOPEZ-BALTAZAR, J.; ODIAS, M. J.; CHI-HAM, C. L.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B.; POWELL, A. L. T. Mobility of Transgenic Nucleic Acids and Proteins within Grafted Rootstocks for Agricultural Improvement. **Frontiers in plant science**, v. 3, n. March, p. 39, jan. 2012.
- HARRINGTON, T. C.; THORPE, D. J.; ALFENAS, A. C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 101, n. 5, p. 555–566, 2011.
- ICCO – **International Cocoa Organization. Cocoa Market Update.**
Disponível em: <http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-3.20.2012.pdf>. Acessado em 23 de dezembro de 2013.
- ANGARELLI, M.; EUCLYDES, R. F.; CRUZ, C. D.; CECON, P. R.; CARNEIRO, A. P. S. Análise de agrupamento de diferentes densidades de marcadores no mapeamento genético por varredura genômica. **Rev. Ceres**, 57, n.6, pp. 695-705, 2010.
- JOHNSON, J. A; HARRINGTON, T. C.; ENGELBRECHT, C. J. B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1067–92, 2005.
- KIDANE, E. G.; LAING, M. D. Integrated control of Fusarium wilt of banana (*Musa spp.*) International Conference on Banana and Plantain in Africa: Harnessing International Partnerships to Increase Research Impact 879. **Anais...2008**
- KOROL, A.; FRENKEL, Z.; COHEN, L.; LIPKIN, E.; SOLLER, M. Fractioned DNA Pooling: A New Cost-Effective Strategy for Fine Mapping of Quantitative Trait Loci. **Genetics**, 176: 2611–2623, 2007.
- KOVER, P. X., VALDAR, W., TRAKALO, J., SCARCELLI, N., EHRENREICH, I. M., PURUGGANAN, M. D., DURRANT, C. A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics**, 5(7), 15, 2009.
- KUBOTA, C.; MCCLURE, M. A.; KOKALIS-BURELLE, N.; BAUSHER, M. G.; ROSSKOPF, E. N. Vegetable grafting: History, use, and current technology status in North America. **HortScience**, v. 43, n. 6, p. 1664–1669, 2008.

KUDO, H.; HARADA, T. A graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 225–226, 2007.

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

LANAUD C, RISTERUCCI A M, PIERETTI I. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding** , 13: 211–22. 2004.

LIMA, Eline Matos ; PEREIRA, N. E. ; PIRES, J. L. ; BARBOSA, A. M. M. ; CORRÊA, Ronan Xavier . Genetic molecular diversity, production and resistance to witches broom in cacao clones. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Impresso)**, v. 13, p. 127, 2013.

LIU, T., MAO, D., ZHANG, S., XU, C., & XING, Y. Fine mapping SPP1, a QTL controlling the number of spikelets per panicle, to a BAC clone in rice (*Oryza sativa*). **Tag: Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik**, 118(8), 1509–1517, 2009.

MOTAMAYOR, J. C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; LIVINGSTONE, D. I. I.; CORNEJO, O.; FINDLEY, S. D.; ZHENG, P.; UTRO, F.; ROYAERT, S.; SASKI, C.; JENKINS, J.; PODICHETI, R.; ZHAO, M.; SCHEFFLER, B. E.; STACK, J. C.; FELTUS, F. A.; MUSTIGA, G. M.; AMORES, F.; PHILLIPS, W.; MARELLI, J. P.; MAY, G. D.; SHAPIRO, H.; MA, J.; BUSTAMANTE, C. D.; SCHNELL, R. J.; MAIN, D.; GILBERT, D.; PARIDA, L.; KUHN, D. N. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. r53, 2013.

MUDGE, K. A History of Grafting. **Horticultural Reviews**, v.35, p.437-493, 2009.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. 2005. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p, 2005.

OLIVEIRA, M. L.; NIELLA, A. R. R.; SILVA, V. R.; LIMA, L. C. Murcha de ceratocystis, nova doença do cupuaçuzeiro. **Agrotrópica** 25 (1): 33 - 38. 2013.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.

RIBEIRO, I. J. A.; I. T. O.; FUMIKO, M.; ROSSETTO, C. J. *Cassia renigera* Wall.: novo hospedeiro de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst.. **Bragantia** [online]. 1987, vol.46, n.2, pp. 417-423. ISSN 1678-4499.

RIVARD, C. L.; LOUWS, F. J. Grafting to Manage Soilborne Diseases in Heirloom Tomato Production. **HortScience** 43(7):2104–2111. 2008.

RIZZO, A. A. do N.; CHAVES, F. C.M.; LAURA, V. A.; GOTO, R. Avaliação de métodos de enxertia e porta-enxertos para melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 808–810, 2004.

- ROCHA, R. B.; P, J. F.; CRUZ, C. D.; QUEIROZ, V.; ARAÚJO, E. F. Mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, 30, p. 27-32, 2003
- SANCHES, C. L. G.; PINTO, L. R. M.; POMELLA, A. W. V.; SILVA, S. D. V. M.; LOGUERCIO, L. L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 517-528, 2008.
- SANTOS, Á. F. ; FERREIRA, F. A. Murcha-de-ceratocystis em Acácia-Negra no Brasil. **Fitopatol. bras.**[online]. 2003, vol.28, n.3, pp. 325-325. ISSN 0100-4158.
- SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; SILVA, S. D. V. M.; MICHELI, F.; CLEMENT, D.; GRAMACHO, K. P. Identification of quantitative trait loci linked to *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 4, p. 1563–1571, 2012.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. Estatística genômica: aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. 2. Ed. Viçosa, 568 p, 2008.
- SHISHIDO, M.; MIWA, C.; USAMI, T.; AMEMIYA, Y.; JOHNSON, K. B. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. **Phytopathology**, v. 95, n. 9, p. 1072–1080, 2005.
- SIGUENZA, C.; SCHOCHOW, T; T.; PLOEG, A. Use of *Cucumis metuliferus* as a rootstock for melon to manage *Meloidogyne incognita*. **Journal of nematology**, v. 37, n. 3, p. 276, 2005.
- SILVA, S. D. V. M.; PINTO, L. R. M.; OLIVEIRA, B. F.; DAMACENO, V. O.; PIRES, J. L.; DIAS, C. T. S. Resistência de progênies de cacauero à murcha-de-*Ceratocystis*. **Trop. plant pathol.** [online]., vol.37, n.3, pp. 191-195. ISSN 1982-5676. 2012
- SILVA, S. D. V. M.; MANDARINO, E. P.; DAMACENO, V. O.; SANTOS FILHO, L. P. Reação de genótipos de cacaueros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. **Fitopatol. bras.** [online]. 2007, vol.32, n.6, pp. 504-506. ISSN 0100-4158.
- STEGEMANN, S.; BOCK R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. **Science** 324:649–651, 2009
- TRICK, M.; ADAMSKI, N. M.; MUGFORD, S. G.; JIANG, C. C.; FEBRER M.; UAUY, C. Combining SNP discovery from next-generation sequencing data with bulked segregant analysis (BSA) to fine-map genes in polyploid wheat. **BMC Plant Biol** 12:14. 2012.
- TURNBULL, C. G. N. Grafting as a Research Tool. In: HENNIG, L.; KÖHLER, C. (Eds.). **Plant Developmental Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 655p. 11–26.
- TZARFATI, R.; BEN-DOR, S.; SELA, I.; GOLDSCHMIDT, E.E. Graft-induced Changes in MicroRNA Expression Patterns in Citrus Leaf Petioles. **Open Plant Science Journal**, v. 7, p. 17–23, 2013.

VENEMA, J. H.; DIJK, B. E.; BAX, J. M.; VAN HASSELT, P. R.; ELZENGA, J. T. M. Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1-3, p. 359–367, maio 2008.

WAGABA, H.; BEYENE, G.; TREMBLEY, C.; ALICAI, T.; FAUQUE, C. M.; TAYLOR, N. J. Efficient transmission of Cassava brown streak disease viral pathogens by chip bud grafting. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 516, 2013.

WANG, P., ZHOU, G., YU, H., & YU, S. Fine mapping a major QTL for flag leaf size and yield-related traits in rice. **Tag Theoretical And Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik**. Vol. 123(8), 1319–30, 2011.

WATANABE, S.; HARADA, K.; ABE, J. Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. **Breeding Science**. 2012, 61: 531–543.

WILCKEN, S. R. S.; ROSA, J. M. O.; HIGUTI, A. R. O.; GARCIA, M.J.M.; CARDOSO, A. I. I. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos e híbridos de pepino. **Horticultura Brasileira** 28: 120-123. 2010.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science** 4, 2013

YETISIR, H.; ÖZDEMİR, E.; ARAS, V.; CANDIR, E.; ASLAN, Ö. Rootstocks effect on plant nutrition concentration in different organ of grafted watermelon. **Agricultural Sciences**, v. 04, n. 05, p. 230–237, 2013.

ZHANG, Y.-X., WANG, Q., JIANG, L., LIU, L.-L., WANG, B.-X., SHEN, Y.-Y., CHENG, X. N. Fine mapping of qSTV11KAS, a major QTL for rice stripe disease resistance. **Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik**. 2011, 122(8), 1591–1604.