

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de  
Características Quantitativas (QTLs) associados à resistência a  
*Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*)  
originários da Amazônia Brasileira**

**Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque  
Engenheiro Agrônomo

**Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características  
Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis perniciosa* em acessos  
de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**

Orientador:  
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Albuquerque, Paulo Sérgio Bevilaqua de  
Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características  
Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis perniciosa* em acessos  
de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira / Paulo Sérgio  
Bevilaqua de Albuquerque. - - Piracicaba, 2006.  
133 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Cacau 2. Mapeamento genético 3. Marcador molecular 4. Resistência  
genética vegetal 5. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDD 633.74

Dedico este trabalho aos meus filhos Camila e Felipe e a minha esposa Natália nos quais muitas vezes busquei a força que precisava para continuar minha jornada.

Ofereço a minha mãe Yolanda (*in memoram*) quem me ensinou o que é amar um filho, e a meu pai Fernando, cujos passos ainda sigo.

## AGRADECIMENTOS

Antes de iniciar os agradecimentos gostaria de enfatizar que sem a ajuda destas pessoas aqui citadas e de outras que por acaso tenha esquecido de mencionar, este trabalho não teria condições de ser realizado.

Ao Prof. Sérgio F. Pascholati pela orientação, confiança depositada e amizade durante a realização do curso de doutorado.

Ao professor e amigo Prof. Antonio Vargas Figueira por ter acreditado neste projeto desde do seu início, por ter disponibilizado o laboratório de melhoramento de plantas do CENA, pela orientação em várias etapas desta tese e pela atuação decisiva para que ela se concretizasse.

Aos Pesquisadores Dr. Cleber Novais Bastos e Dr. Jay Mota pela ajuda e companheirismo nas execuções dos trabalhos realizados em Marituba-PA.

A Dra. Stela Dalva Silva e Dra. Edna Dora Luz pesquisadoras da CEPLAC-CEPEC pela grande colaboração na execução dos ensaios realizados na Bahia.

A Dra. Mariângela Cristofani pesquisadora do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” pelo auxílio nas análises dos dados.

Aos Dr(a)s. Clarice Demétrio (ESALQ), Afrânio Vieira (ESALQ), José Luiz Pires (CEPLAC) e Alexandre Seebben pelas análises estatísticas dos dados.

Ao meu irmão (por afinidade) Edivaldo Emiliano Pimentel a quem devo muito pela sua dedicação e ajuda nos trabalhos desta tese.

Aos meus amigos Sandra Vieira e Carlos Cabral da administração da CEPLAC-SUPOR pelo apoio, dedicação e companheirismo durante todos estes anos de execução do projeto.

Ao Adimil Moura pela sua ajuda nos trabalhos de laboratório realizados na CEPLAC de Marituba-PA.

Aos estagiários da CEPLAC Francimary Carneiro, Elenize e Ricardo.

Aos funcionários da CEPLAC-ERJOH em especial ao José Mangas, Lucena, Zacarias Campos, Francisco Zacarias pelo trabalho de apoio no campo.

Aos funcionários de campo da CEPLAC-CEPEC Ananias, Belmiro, Edésio, Elenizio, Hortêncio, Fabriciano, João, José, Justiniano, Magnaldo, Rubens e Wilson.

As técnicas do laboratório de fitopatologia da CEPLAC-CEPEC, Denise Argolam Ferreira e Cenilda da S. Serra Rocha.

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento de plantas do CENA Eduardo Fonseca, Wlamir Godoy, Raquel, Inês, Seu Zé e Paulo Cassieri.

Aos colegas do CENA Lorena, Raul, Tercílio, Débora, Aline, .....

Aos estagiários do CENA, Rachel Balan, Letícia Barbieri e Ângela Sanches pelo auxílio nos trabalhos.

A Janaína de Cássia Albino pela dedicação quando de sua participação da execução deste trabalho e principalmente pela amizade e apoio recebido durante nosso convívio no CENA.

Aos colegas da ESALQ Cleci Dezordi, Gleiber, Ana Paula, Patrícia, Leonardo, Paulo, Marília, Maurício, Renata, Daniel,.....

A Solange Bonaldo pela amizade.

A Heloisa pelo carinho.

A Liliane Teixeira pelo seu carinho, amizade e apoio durante os momentos alegres e difíceis que tivemos em comum durante estes quatro anos de convivência.

A Fundação Pau-Brasil nas pessoas de Dr. João Louis Pereira, Dra. Neyde Alice Pereira e Uilson Lopes pelo apoio financeiro e logístico na aquisição dos materiais utilizados na tese.

Aos agentes financeiros ACRI (American Cocoa Research Institute), BASA (Banco da Amazônia), CFC (Common Fund For Commodities) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos recursos disponibilizados para realização dos experimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A ESALQ em especial aos professores e funcionários da Fitopatologia pelos ensinamentos recebidos durante o curso.

Ao Professor Eric Balmer pelas sugestões nas análises dos dados.

A CEPLAC pela oportunidade concedida para realização deste curso.

A todas as pessoas que tiveram participação direta ou indireta na realização deste trabalho. Obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1.1 Origem, dispersão e importância do cacaueteiro.....	13
2.1.2 Origem, epidemiologia, etiologia e controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro.....	13
2.1.3 Programas de melhoramento do cacaueteiro visando à obtenção de variedades resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	18
2.1.4 Marcadores moleculares e desenvolvimento de mapas de ligação para o cacaueteiro.....	23
2.1.5 Mapeamento de QTLs associados à resistência a patógenos.....	27
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Seleção de acessos de cacaueteiro resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	34
2.2.2 Origem das progênies de cacaueteiro utilizadas nos ensaios.....	34
2.2.3 Avaliação da resistência dos genótipos de cacaueteiro a <i>C. pernicioso</i> .....	36
2.2.3.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial....	36
2.2.3.2 Análise da resistência em campo por infecção natural.....	42
2.2.4 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacaueteiro.....	43
2.2.4.1 Obtenção das populações contrastantes.....	43
2.2.4.2 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes.....	44
2.2.4.3 Construção dos mapas de ligação.....	47
2.2.4.4 Detecção de QTLs associados à resistência a <i>C. pernicioso</i> .....	47
2.2.5 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	49
2.2.5.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores.....	50
2.2.5.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados.....	52
2.3 Resultados e Discussão.....	53

2.3.1 Avaliação da resistência dos genótipos de cacaueteiro a <i>C. pernicioso</i> .....	53
2.3.1.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial....	53
2.3.1.2 Análise da resistência em campo por infecção natural.....	67
2.3.2 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacaueteiro.....	73
2.3.2.1 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes.....	73
2.3.2.2 Construção dos mapas de ligação.....	81
2.3.2.3 Detecção de QTLs associados à resistência a <i>C. pernicioso</i> .....	86
2.3.3 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	96
2.3.3.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores.....	99
2.3.3.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados.....	103
3 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES.....	122



## RESUMO

### **Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**

A vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) é a doença mais importante da cacauicultura no Brasil. Sua principal forma de controle é o emprego de variedades resistentes, entretanto, devido à estreita base genética encontrada nos plantios comerciais de cacauero, esta resistência tem sido frequentemente quebrada. Os objetivos deste trabalho foram: selecionar novas fontes de resistência a *C. pernicioso* entre acessos de cacauero originalmente coletados na Amazônia Brasileira (série CAB), identificar por mapeamento genético locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados a esta resistência nos genótipos selecionados; e avaliar a relação genética dos clones CAB utilizados como genitores resistentes nos cruzamentos contrastantes com os acessos selecionados por agricultores do Sul da Bahia e as fontes tradicionais de resistência a *C. pernicioso*. Com base na proporção de infecção de vassoura-de-bruxa, foram avaliados os níveis de resistência a *C. pernicioso* de 44 famílias de cacauero em condições de casa de vegetação e campo. Nos ensaios de casa de vegetação, as médias das proporções de infecção foram comparadas através de contrastes pelo teste de Wald, e nos de campo por análise de medidas repetidas e contrastes. Dentre as famílias avaliadas em casa de vegetação e campo, as que apresentaram menores incidências de sintomas de vassoura-de-bruxa foram aquelas derivadas de 'CAB 0169', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392' e 'CAB 0410'. Foram desenvolvidos dois mapas de ligação conjuntos para as populações dos cruzamentos contrastantes entre os acessos selecionados como mais resistentes a *C. pernicioso* e o genitor suscetível 'ICS 39'. Nas construções dos mapas de ligação foram utilizados 65 locos de microssatélites. Para a família derivada do cruzamento de 'ICS 39 x CAB 0208' foram formados 11 grupos de ligação com cobertura total de 541 cM e distância média entre marcas de 14 cM. O mapa de ligação 'ICS 39 x CAB 0214' apresentou cobertura total de 501 cM nos 10 grupos de ligação formados com distância média entre marcas de 11,4 cM. Detectaram-se três QTLs associados à resistência a *C. pernicioso*, um no grupo de ligação VIII de 'ICS 39 x CAB 0208' e dois no mapa de 'ICS 39 x CAB 0214', sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo IX. A relação genética entre os dois clones 'CAB' genitores das populações contrastantes e 81 genótipos de cacauero utilizados como fontes de resistência a *C. pernicioso* foram baseadas nas frequências alélicas de 20 locos de microssatélites. As análises de dissimilaridade genética entre os acessos de cacauero originaram dois grupos. Os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' não fizeram parte dos grupos formados. O grau de parentesco entre estes dois acessos foi muito alto, chegando próximo ao de irmãos-germano, não sendo aparentados com nenhum dos outros acessos. Os clones selecionados por agricultores derivam na sua maioria de 'Scavina 6', a fonte de resistência comumente empregada.

Palavras-chave: Cacauero, *Theobroma cacao*, vassoura-de-bruxa, *Crinipellis pernicioso*, resistência, QTL, mapeamento, marcador molecular, SSR.

## ABSTRACT

### Linkage Maps and Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) associated with resistance to *Crinipellis pernicioso* in cacao (*Theobroma cacao*) accessions from the Brazilian Amazon

The witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) is the most important disease of cacao in Brazil. The main method of disease control is the use of resistant cultivars, however due to the narrow genetic basis found in commercial cacao growing areas, the resistance is frequently broken. The objectives of this work were: to select new sources of resistance to *C. pernicioso* among cacao accessions originally collected in the Brazilian Amazon (CAB series); to identify by genetic mapping, quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance in selected genotypes; and to evaluate the genetic relationship between the selected accessions and clones selected by cacao growers from Southern Bahia with traditional resistance sources against *C. pernicioso*. Based on the proportion of witches' broom infection, the levels of resistance to *C. pernicioso* were estimated in 44 cacao families under greenhouse and field conditions. Under greenhouse conditions, the average proportion of infection was compared based on Wald test, and under field conditions using an analysis of repeated measures and contrast. Among the families evaluated under greenhouse and field conditions, the ones with least incidence of witches' broom symptoms derived from 'CAB 0169', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392' and 'CAB 0410'. Two linkage maps were developed for populations derived from crosses between contrasting accessions selected as the most resistant to *C. pernicioso* ('CAB 0208' and 'CAB 0214') and a susceptible accession 'ICS 39'. The linkage maps were developed using 65 microsatellite loci, applying the software JoinMap 3.0<sup>®</sup>. The identification and localization of QTLs associated with resistance to *C. pernicioso* were performed using MAPQTL<sup>™</sup> 4.0. For the family derived from 'ICS 39 x CAB 0208', 11 linkage groups were formed, with total coverage of 541 cM and 14 cM average distance between markers. The linkage map from 'ICS 39 x CAB 0214' presented a total coverage of 501 cM in 10 linkage groups formed with an average distance between markers of 11.4 cM. Three QTLs associated with resistance to *C. pernicioso* were detected, with one at linkage group VIII of 'ICS 39 x CAB 0208', and two for the 'ICS 39 x CAB 0214' family, with one located at linkage group IV and another at group IX. The genetic relationship between these two CAB accessions and 81 genotypes used as source of resistance to *C. pernicioso* were determined using genetic dissimilarity and co-ancestry based on allele frequencies of 20 microsatellite loci. The dissimilarity analyses among the accessions generated two distinct groups. 'CAB 0208' and 'CAB 0214' did not belong to any of the two groups. The co-ancestry between the two accessions were high, close to full-sib, but without any relationship with any of the other genotypes. The clones selected by growers derived mostly from 'Scavina 6', a commonly used source of resistance to *C. pernicioso*.

Keywords: Cacao; cocoa; *Theobroma cacao*; witches' broom; *Crinipellis pernicioso*, resistance, QTL, genetic mapping; molecular marker; SSR.

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo a cultura do cacauero (*Theobroma cacao* L.) envolve aproximadamente dois milhões de produtores em mais de 50 países (KNIGHT, 2006). A produção mundial de cacau em 2004/2005 foi de três milhões de toneladas, sendo 70% desta produção oriunda de países do continente Africano e 30% do Sudoeste da Ásia e Américas do Sul e Central (GUYTON, 2006). Com uma produção aproximada de 1.275 mil toneladas, a Costa do Marfim é o principal produtor mundial, seguido de Gana (530 mil ton), Indonésia (415 mil ton), Nigéria (170 mil ton) e Brasil (164 mil ton).

No Brasil, 70% da produção de amêndoas de cacau se concentra na Bahia, enquanto que os outros 30% são produzidos principalmente nos estados do Pará, Espírito Santo e Rondônia (Anuário estatístico do Brasil, 2003). Além de representar uma importante fonte de renda para os produtores, a cultura do cacauero possui caráter conservacionista, em função de seu plantio ser associado com árvores nativas nas regiões da Mata Atlântica e Amazônia.

A vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer é a principal doença que afeta a cacauicultura no Brasil, encontrando-se disseminada em todos estados produtores. Entre as diferentes medidas recomendadas para o controle desta enfermidade, as mais freqüentemente empregadas são a poda fitossanitária e o uso de variedades resistentes. A remoção dos pontos de infecções através de podas fitossanitárias tem demonstrado eficácia na redução da incidência da doença, principalmente quando empregada em pequenas áreas (até 10 ha), que utilizam plantas de cacauero com bons níveis de resistência. Em áreas maiores que 20 ha, formadas com genótipos suscetíveis, característica da maioria das plantações do Sul da Bahia, a poda fitossanitária tem se mostrado ineficiente em função de seu alto custo. Em plantios onde medidas de controle não são adotadas, as perdas provocadas pela vassoura-de-bruxa podem comprometer até 80% da produção.

A obtenção de novas fontes de resistência a *C. perniciosa* tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do cacauero. Atualmente, a base genética dos clones utilizados pelos agricultores no Brasil é muito estreita e na Bahia, a maioria destes ainda é altamente suscetível ao fungo. Como forma de aumentar a

variabilidade das fontes de resistência a *C. pernicioso*, vários clones de cacauzeiros nativos da Amazônia Brasileira já foram avaliados e os resultados obtidos indicam para novas fontes de resistência a *C. pernicioso* (FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000; PAIM, 2005).

O uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos locos controladores de características quantitativas (QTLs) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A identificação de QTLs tem sido empregada para determinar os genes associados à resistência poligênica para diferentes patossistemas, sejam de plantas perenes ou anuais (PFLIEGER et al., 2001; WANG et al. 2001; QUEIROZ et al. 2003 e BROWN et al. 2005).

No caso do patossistema cacauzeiro x *C. pernicioso*, QTLs associados a resistência foram localizados nos grupos de ligações I e IX de uma população F<sub>2</sub> do cruzamento entre os clones 'SCA 6' e 'ICS 1' (QUEIROZ et al., 2003 e BROWN et al. 2005). No entanto, a resistência do genitor 'SCA 6' tem sido sistematicamente "quebrada" pelo *C. pernicioso* em países como Equador, Peru e região Norte do Brasil (BARTLEY, 1981; FONSECA et al. 1984 e RIOS-RUIZ, 2001).

Mais recentemente, na região Sul da Bahia, também se tem verificado um aumento da suscetibilidade a *C. pernicioso* de progênies de cacauzeiro oriundas de cruzamentos com 'SCA 6'. Em função disto, faz-se necessária à obtenção de novos genes de resistência a *C. pernicioso* em outros genótipos, diferentes da série 'Scavina'.

A localização de QTLs e a identificação de genes de resistência ou defesa nos mapas de ligação destes genótipos permitirá a realização de seleções assistidas e a utilização da estratégia de piramidização de genes associados à resistência a *C. pernicioso* nos programas de melhoramento genético, diminuindo o tempo e o custo na obtenção de novas variedades de cacauzeiro.

O estudo da diversidade genética de acessos de cacauzeiro nativos da Amazônia Brasileira considerados resistentes a *C. pernicioso*, indicou existir diversidade genética entre estes genótipos, sendo também divergentes do clone 'SCA 6', principal fonte de resistência atualmente utilizada no Brasil (SILVA et al., 1998; PAIM, 2005). Essa diversidade deve ser aproveitada no desenvolvimento de populações acumulando

vários genes para resistência, de modo a aumentar a base genética atualmente existente.

Os objetivos deste trabalho foram: selecionar novas fontes de resistência a *C. perniciosa* entre os acessos da série 'CAB'; nos genótipos parentais selecionados como mais resistentes mapear e identificar locos de QTLs associados à resistência a *C. perniciosa*; verificar a relação genética dos acessos 'CAB' resistentes com os clones da série 'Scavina' e acessos de cacauero selecionados como resistentes a *C. perniciosa* em fazendas do Sul da Bahia.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Origem, dispersão e importância do cacauero**

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie de porte arbóreo, pertencente à família das Malváceas (BAYER et al., 1999), típico de clima tropical e nativo de floresta úmida da América, onde vegeta no sub-bosque. É uma espécie alógama com número de cromossomos  $2n=2x=20$  e tamanho do genoma estimado em 0,43 pg ou  $0,415 \times 10^9$  pb (FIGUEIRA et al., 1992). Seu provável centro de origem encontra-se nas cabeceiras da Bacia Amazônica, no sopé dos Andes, na fronteira do Equador com a Colômbia (CHEESMAN, 1944). Do seu centro de origem, o cacauero dispersou em dois grupos raciais distintos: o Crioulo cultivado mais ao leste da Cordilheira dos Andes, indo da América do Sul até o México e o Forasteiro confinado mais para o oeste da Cordilheira dos Andes, na região que compreende o norte do Brasil até as Guianas (CUATRECASAS, 1964). Um terceiro grupo, o Trinitário, surgiu da hibridação natural entre os dois primeiros, em plantações devastadas por doenças em Trinidad (CHEESMAN, 1944).

Além de ser um dos principais componentes econômicos nas regiões onde é cultivada, a cultura do cacauero exerce também um papel importante na preservação ambiental. Seu cultivo associado com árvores nativas tem auxiliado na preservação de biomas ameaçados, como a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica.

#### **2.1.2 Origem, epidemiologia, etiologia e controle da vassoura-de-bruxa do cacauero**

Dentre as doenças que afetam a cacauicultura, a vassoura-de-bruxa é uma das mais importantes. Originária da região do vale do rio Amazonas foi pela primeira vez descrita no Suriname em 1875. Atualmente encontra-se disseminada em todos os países produtores de cacau da América do Sul, Caribe e Panamá (PURDY E

SCHMIDT, 1996). Embora a vassoura-de-bruxa ainda não tenha sido relatada fora do continente Americano, é considerada uma forte ameaça para os principais países produtores de cacau da África e Ásia (ALBUQUERQUE et al. 2005). Na Amazônia Brasileira, a vassoura-de-bruxa é endêmica nas populações nativas de cacauzeiro localizadas no sub-bosque da floresta e epidêmica em plantios comerciais onde não é controlada (BASTOS, 1990). Em 1989 foi pela primeira vez relatada na região Sul da Bahia, em focos nos municípios de Camacã e Uruçuca (PEREIRA, 1990). Atualmente, a vassoura-de-bruxa está presente em todos os principais estados produtores de cacau do Brasil.

O agente etiológico da vassoura-de-bruxa é o fungo *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer, pertencente à classe dos Basidiomycetes, família Tricholomataceae, ordem Agaricales. A principal fonte de inóculo deste fungo são os basidiocarpos formados durante o período chuvoso sobre os tecidos infectados e mumificados do cacauzeiro. A única estrutura infectiva são os basidiósporos, que são liberados de forma ativa e facilmente disseminados pelo vento (BASTOS, 1990).

A vassoura-de-bruxa afeta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento do cacauzeiro ocasionando hipertrofia. Nos ramos, a doença se manifesta inicialmente como um inchaço seguido pela emissão acentuada de brotos laterais, induzindo a formação de vassouras vegetativas, considerado o sintoma típico da doença. Nas almofadas florais infectadas ocorre a formação de flores hipertrofiadas, vassouras e frutos partenocárpicos denominados “morangos”, que não evoluem em tamanho. Nos frutos infectados, após duas semanas de idade, os sintomas característicos são lesões circulares de coloração negra, formadas na superfície externa dos mesmos e sementes totalmente necrosadas, fortemente aderidas umas as outras sem valor para comercialização (BASTOS, 1990).

A epidemiologia da vassoura-de-bruxa é distinta nas diferentes regiões cacauzeiras do Brasil. Na região Amazônica, em pólos cacauzeiros como os da Transamazônica, a doença é menos severa quando comparada com outras regiões (ANDEBRHAN et al., 1993). Diversos fatores contribuem para uma baixa severidade da vassoura-de-bruxa nestes locais. As propriedades agrícolas são diversificadas, com o cacauzeiro sendo cultivado em pequenos plantios (8-10 ha) em locais distantes um dos

outros, e muitas vezes separados por áreas de mata. As variedades de cacauzeiro plantadas são na maioria híbridos distribuídos pela CEPLAC, nos quais pelo menos um dos genitores utilizados para produção destas sementes possuía níveis aceitáveis de resistência a *C. pernicioso*; Condições climáticas que favorecem o controle da doença, por possuírem período seco bem definido, possibilitando a redução das fontes de inóculo deste patógeno (ANDEBRHAN et al., 1993). No Sul da Bahia, onde existia um maciço contínuo de 600 mil hectares de cacauzeiro plantados na forma de monocultura, a vassoura-de-bruxa atingiu rapidamente proporções epidêmicas após seu primeiro relato. Esta epidemia foi favorecida pelas características climáticas da região, onde as chuvas são bem distribuídas durante o ano, e pelo fato da principal variedade de cacauzeiro plantada ser do tipo 'comum', que é altamente suscetível ao *C. pernicioso* (LUZ et al. 1997). Tal epidemia ocasionou um desastre sócio-econômico nesta região evidenciado pelo fechamento e abandono de várias fazendas de cacau (TREVISAN; SILVA, 1995). Tendo decorrido apenas 10 anos após a entrada da vassoura-de-bruxa na Bahia, já eram fortes os reflexos da doença na produção brasileira de cacau. De 394 mil toneladas de amêndoas produzidas na safra de 1989/90, a produção brasileira de cacau caiu para 135 mil toneladas em 1999/2000, motivada em grande parte por perdas provocadas pela vassoura-de-bruxa na região Sul da Bahia. Neste período, o Brasil passou de exportador para importador de amêndoas de cacau, a fim de suprir a demanda das indústrias nacionais que representam o quinto maior parque industrial chocolateiro do mundo (SOUZA E DIAS, 2001).

De acordo com o hospedeiro de origem, aliado a diferenças morfológicas, bioquímicas e compatibilidade somática, os isolados de *C. pernicioso* podem ser classificados em diferentes biótipos. Os isolados pertencentes ao biótipo-C são patogênicos ao cacauzeiro e à outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*; do biótipo-S afetam inúmeras espécies de *Solanaceae*; do biótipo-B quando são isolados de *Bixa orellana* (urucum) e do biótipo-L quando isolados de lianas, geralmente assintomáticos (GRIFFITH; HEDGER, 1994). A classificação de isolados do biótipo-C foi inicialmente baseada em estudos de patogenicidade (HEDGER et al. 1987; WHEELER; MEPSTED, 1988) em testes bioquímicos e de incompatibilidade somática de micélios saprofitos (HEDGER et al., 1987; MCGEARY; WHEELER, 1988;



GRIFFITH; HEDGER, 1994). Variabilidade morfológica pode ser observada em relação a tamanho de basidiósporo, cor do pileo e origem geográfica (PEGLER, 1978). Wheeler e Mepsted (1988) concluíram que o biótipo-C poderia ser classificado em dois grupos principais de acordo com a capacidade de provocar sintomas em progênies de 'Scavina 6'. Isolados de cacauzeiros cultivados no Equador, Bolívia e na maior parte da Colômbia causavam reações severas nas progênies de 'Scavina 6', enquanto que isolados de cacauzeiros cultivados no Brasil, Trinidad e Venezuela induziam reações restritas no mesmo tipo de inoculação. Isolados do Equador, principalmente da região oriental, contida no centro presumível de diversidade de *T. cacao* (CHEESMAN, 1944) apresentavam a maior diversidade para patogenicidade. Estudos de incompatibilidade somática usando os mesmos isolados distinguiram 6 grupos, consistentes com a classificação de acordo com a reação do hospedeiro (MCGEARY; WHEELER, 1988). A separação entre isolados do Equador e Colômbia, e do Brasil, Venezuela e Trinidad foi corroborada por análises empregando marcadores AFLP (PLOETZ et al., 2005).

Andebrhan e Furtek (1994) demonstraram a utilidade do uso de marcadores moleculares do tipo RAPD para distinguir isolados de *C. perniciosus* de diferentes hospedeiros, sugerindo que a proximidade geográfica poderia ser mais importante do que hospedeiro para determinar a similaridade genética entre isolados do biótipo-C. Andebrhan et al. (1999) utilizaram RAPD para determinar a relação genética entre 46 isolados da região do Sul da Bahia em relação ao aparecimento original de dois focos independentes em 1989. A hipótese de ter havido duas introduções independentes no Sul da Bahia (ANDEBRHAN et al., 1999) foi corroborada recentemente por estudos de cariótipos, com dois grupos distintos de isolados de *C. perniciosus* identificados no Sul da Bahia baseados em cariotipagem por gel eletroforese em campo pulsado (PFGE), com polimorfismo para comprimento de cromossomos e correlacionado com dados de amplificação de seqüências teloméricas (RINCONES et al., 2003). A análise de seqüências repetidas do tipo ERIC por PCR de diversos isolados de *Crinipellis* de três hospedeiros (*T. cacao*; *Solanum lycocarpum*; e *Heteropterys acutifolia*) e de diferentes estados e localidades permitiu a clara separação entre isolados de acordo com o hospedeiro (como biótipo-C ou -S) e uma correlação com origem geográfica (ARRUDA et al., 2003a). Os mesmos isolados não apresentaram polimorfismo para seqüências

de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA nuclear e para o gene da subunidade ribossomal pequena do rDNA de mitocôndria (mtDNA SSU rDNA) por digestão de produtos amplificados (ARRUDA et al., 2003b). Já a região IGS (*Inter Genic Spacer*) do gene rDNA apresentou polimorfismo, separando os isolados de acordo com hospedeiro por PCR-RFLP, e permitiu parcialmente por seqüenciamento e análise filogenética, a separação por hospedeiro e origem geográfica. A seqüência da região ITS1 e ITS2 apresentou níveis muito limitados de alterações, mesmo entre isolados coletados de hospedeiros distintos (biótipo-C e S) (LEAL JUNIOR, 2002).

Diferenças quanto aos níveis de agressividade têm sido observadas nos isolados de biótipos-C de *C. pernicioso* procedentes de diferentes regiões do Brasil. Bastos (1990) verificou diferenças de agressividade entre isolados provenientes dos estados de Rondônia, Amazonas e Pará. Na Bahia, isolados de *C. pernicioso* de vários municípios apresentaram níveis de agressividade diferentes quando confrontados com os mesmos clones de cacaueteiro (NIELLA et al., 2001).

O controle da vassoura-de-bruxa pode ser realizado através da integração de quatro medidas: a poda fitossanitária, aplicação de fungicidas, uso de agentes biológicos e variedades de cacaueteiro resistentes a *C. pernicioso*. A poda fitossanitária consiste na remoção dos pontos de infecções de vassoura-de-bruxa da planta, durante o período de menor precipitação pluviométrica. Tem como objetivo reduzir as fontes de inóculo do patógeno e conseqüentemente o número de infecções de um ciclo para o outro da doença. Na Amazônia são realizadas duas podas fitossanitária por ano, sendo uma no meio do período seco, que nesta região ocorre nos meses de julho a outubro, e outra considerada como repasse, nos meses de novembro a dezembro, antes do início das esporulações do patógeno (ANDEBRHAN et al., 1993). Nas condições do Sul da Bahia, por não apresentar um período seco definido, são realizadas quatro podas por ano, nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro (LUZ et al., 1997). O emprego da poda fitossanitária não é recomendado para grandes plantios realizados com variedades de cacaueteiro suscetíveis a *C. pernicioso*. Nestas condições, típicas das propriedades do Sul da Bahia, a poda fitossanitária se mostra ineficiente e inviável economicamente.

Embora existam princípios ativos que controlem a vassoura-de-bruxa, o uso de fungicidas não tem sido adotado com frequência para o controle desta enfermidade no campo. A baixa eficiência das aplicações em árvores adultas, aliado ao alto custo dos fungicidas são os motivos freqüentemente alegados para a não adoção desta técnica de controle pela maioria dos agricultores. No viveiro, aplicações de fungicidas cúpricos e triazois em especial o tebuconazole, vêm sendo utilizadas para o controle da vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro (ALBUQUERQUE et al., 2005).

O controle biológico tem sido empregado em larga escala nos plantios de cacaueteiro do Sul da Bahia. Formulações comerciais do fungo *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss são aplicadas visando a diminuição das fontes de inóculo de *C. pernicioso*, principalmente através da redução das frutificações do patógeno nos tecidos infectados presentes no solo, como vassouras e frutos que foram removidos durante as podas (BASTOS, 1996; SANOGO et al. 2002).

A utilização de variedades de cacaueteiro resistentes a *C. pernicioso* é uma das medidas mais importantes para o controle da vassoura-de-bruxa.

### **2.1.3 Programas de melhoramento do cacaueteiro visando a obtenção de variedades resistentes a *C. pernicioso***

O primeiro programa de melhoramento do cacaueteiro visando a obtenção de genótipos resistentes a *C. pernicioso*, foi iniciado no Equador a partir de 1918, através de seleção massal de plântulas originadas de árvores selecionadas sem sintomas, conhecidas como 'refractarias' (BARTLEY, 1986). A resistência também foi avaliada em cultivos comerciais em Trindade na década de 1930, mas apenas pequenas variações na reação à infecção foram detectadas (BAKER e HOLLIDAY, 1957). Na busca da resistência, cacaueteiros silvestres foram coletados no vale Amazônico por via seminal em 1938, e por via clonal em 1942 (POUND 1938; 1943). Esses materiais foram enviados para Trindade, onde foram avaliados para resistência à *C. pernicioso*. Os clones 'Scavina 6' (SCA 6) e 'Scavina 12' (SCA 12) destacaram-se como altamente resistentes, enquanto o genótipo 'IMC 67' foi considerado como moderadamente resistente (BARTLEY, 1986). O clone 'SCA 12' era aparentemente heterozigoto para

resistência, enquanto 'SCA 6' foi considerado homozigoto, mas devido à suas características agrônômicas inferiores, principalmente peso de sementes e auto-incompatibilidade, esses genótipos não foram utilizados diretamente como clones, mas empregados como genitores de combinações híbridas.

O programa de melhoramento de Trinidad foi bem sucedido no desenvolvimento das séries de clones 'TSH' ('Trinidad Selected Hybrids') e 'TSA' ('Trinidad Selected Amazonian'), derivadas de seleções realizadas em famílias de cruzamentos contendo 'SCA 6' como genitor (BARTLEY, 1986). Esses clones foram usados comercialmente em Trinidad e aparentemente contribuíram para redução do nível de ataque da vassoura (LAKER et al., 1988). No entanto, em países como Equador, Colômbia e Peru, onde a vassoura-de-bruxa é mais agressiva, os clones da série 'Scavina' e clones derivados de seus descendentes tiveram a resistência a *C. pernicioso* rapidamente quebrada, provavelmente devido à alta variabilidade do patógeno nestas regiões (BARTLEY, 1986; RIOS-RUIZ, 2001).

Na Amazônia Brasileira os clones da série 'Scavina' também foram utilizados como principais fontes de resistência a *C. pernicioso* no programa de melhoramento de cacaueteiro iniciado em 1976 pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Como verificado nos outros países, decorridos poucos anos após as introduções destes genótipos, já podiam ser constatados altos níveis de incidência de vassoura-de-bruxa, tanto nas matrizes clonais utilizadas como genitores nos campos de produções de sementes híbridas como em suas progênies nos experimentos de combinações híbridas e plantios comerciais (FONSECA et al. 1984; BARTLEY, 1986).

No Sul da Bahia, um programa de renovação dos cacaueteiros vem sendo implementado, após a introdução da vassoura-de-bruxa, visando a substituição das plantações de variedade 'comum', estimadas em pelo menos 60% dos plantios existentes na região, por variedades mais produtivas e resistentes a *C. pernicioso*. No entanto, o grande desafio dos melhoristas é aumentar a base genética destas variedades de cacaueteiro resistentes a serem distribuídas aos agricultores, que atualmente é considerada bastante estreita (YAMADA; LOPES, 1999; YAMADA, et al. 2001, SANTOS et al., 2005).

Dos 21 principais genitores utilizados pela CEPLAC durante 40 anos (1960 a 2000) nos programas de produção de sementes híbridas de cacau destinadas aos produtores do Sul da Bahia, somente quatro clones, 'SCA 6', 'SCA 12', 'IMC 67' e 'TSA 644', foram utilizados por apresentarem resistência a *C. pernicioso* (YAMADA et al., 2001). Estudos de similaridade genética realizados com marcadores moleculares têm demonstrado uma alta similaridade entre estes genótipos e também entre seus descendentes. Uma similaridade genética de 93% entre SCA 6 e SCA 12 foi observada por Yamada et al. (2001) usando combinadas as análises de três sistemas de isoenzimas e onze *primers* de RAPD. A alta similaridade destes genótipos decorre do fato de serem derivados de sementes do mesmo fruto (YAMADA et al., 2001). Santos et al. (2005) utilizando marcadores do tipo RAPD avaliaram a diversidade genética de trinta clones da série 'CEPEC' selecionados como resistentes a *C. pernicioso*. Vinte destes clones foram selecionados a partir de descendentes do clone 'TSA 644', originado do cruzamento entre 'SCA 6' x 'IMC 67', e outros dez foram originados de cruzamentos entre clones do grupo forasteiro, alto e baixo amazônicos e trinitários. Os autores concluíram existir uma estreita base genética nos acessos avaliados.

No período de 1995 a 2002, vinte clones resistentes a *C. pernicioso* foram lançados pela CEPLAC, sendo a maioria destes genótipos descendentes de 'Scavina' ou 'IMC 67', como o clone 'Theobahia' e os clones das séries 'EET', 'TSA' e 'TSH'. Observações mais recentes têm revelado a quebra de resistência de alguns destes clones em condição de campo na região Sul da Bahia (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Além dos clones de cacau lançados pela CEPLAC, outros acessos selecionados nas fazendas de cacau, com base em produtividade e resistência a *C. pernicioso*, têm sido utilizados pelos agricultores da Bahia para renovação dos plantios. Porém, análises de similaridade genética baseada em marcadores moleculares, têm revelado uma estreita base genética para estes acessos selecionados.

A baixa diversidade encontrada por Cascardo et al. (1993) dentro das séries 'SIAL' e 'SIC' originadas de seleções em plantios comerciais da variedade de cacau 'comum' no Sul da Bahia, reflete a pouca variabilidade genética destas plantações disponível aos melhoristas. Nas fazendas de cacau que utilizaram sementes híbridas provenientes da CEPLAC para formações de seus plantios, em geral têm sido

selecionadas plantas descendentes de fontes de resistência a *C. pernicioso* já conhecidas. Leal (2004) avaliando a similaridade genética por meio de marcadores moleculares de 102 acessos de cacauzeiro selecionados como resistentes a *C. pernicioso* em plantios comerciais do Sul da Bahia, concluiu que 92 destes eram muito próximos geneticamente tendo como possíveis genitores clones das séries 'Scavina', 'TSH' e 'EET'.

A obtenção de novas fontes de resistência a *C. pernicioso* é considerada uma das prioridades dos programas de melhoramento do cacauzeiro nos países produtores de cacau da América do Sul. Com intuito de aumentar a base genética do cacauzeiro para resistência a este fungo, novos genótipos vêm sendo selecionados tanto entre variedades já desenvolvidas como nos acessos de cacauzeiro silvestres disponíveis nos bancos de germoplasma (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAYAMA, 1998; FONSECA & ALBUQUERQUE, 2000 e RIOS-RUIZ, 2001).

Dentre as coleções de germoplasma de cacauzeiro existentes, a estabelecida pela CEPLAC na Estação de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH) em Marituba-PA é considerada uma das mais importantes. Iniciada em 1965, esta coleção teve como objetivo reunir e preservar a diversidade genética das populações de cacauzeiro silvestres existentes na região da Amazônia Brasileira. Atualmente, esta coleção reúne aproximadamente 1800 acessos clonais e seminiais de cacauzeiro, dentre os quais os das séries 'Cacau da Amazônia Brasileira' (CAB), 'Rio Branco' (RB) e 'Belém' (BE) entre outras, coletados através de expedições botânicas realizadas a 36 bacias hidrográficas durante um período de quase 30 anos (1965 a 1991) (ALMEIDA et al., 1995).

Uma grande variabilidade tem sido encontrada nos acessos de cacauzeiro estabelecidos na ERJOH, em especial para características como vigor, tamanho e coloração de folhas, frutos e sementes, produtividade e resistência a doenças (ALMEIDA et al. 1987; 2005; ALMEIDA; DIAS, 2001; KOBAYASHI et al., 2001, DIAS et al. 2003; BARTLEY, 2005).

O uso de descritores fenotípicos e marcadores moleculares do tipo RAPD e microssatélites foram empregados para diferenciar e quantificar a diversidade genética existente nos acessos de cacauzeiro oriundos das diferentes bacias hidrográficas da

Amazônia Brasileira. Alta diversidade genética foi encontrada entre e dentro das populações de cacaueteiro provenientes das diferentes bacias, em especial nas populações oriundas das bacias hidrográficas dos estados do Amazonas e Acre (MOTA, 2003; MARITA et al., 2001; SERENO et al., 2006).

Diferenças quanto aos níveis de resistência a *C. pernicioso* foram relatadas para acessos de cacaueteiro coletados na Amazônia Brasileira. Fonseca e Albuquerque (2000), avaliando os níveis de resistência de 521 acessos clonais do Alto, Médio e Baixo Amazonas, em condição de alta pressão de inóculo por quatro anos, classificaram como promissores 180 destes clones. Dentre os genótipos selecionados, a maioria pertencia às séries 'CAB', 'RB' e 'BE'. A resistência a *C. pernicioso* de alguns destes genótipos tem sido confirmada através de ensaios em condições controladas de casa de vegetação e campo (ALBUQUERQUE, 1999; PAIM 2005). Clones como 'CAB 0195' 'CAB 0208', 'CAB 214', 'CAB 0270' e 'RB 36', classificados como resistentes a *C. pernicioso*, foram coletados em bacias hidrográficas distintas, aumentando a possibilidade de se tratarem de acessos geneticamente distintos (ALMEIDA et al., 1995). As análises de similaridade genética de alguns destes clones realizadas com marcadores moleculares têm comprovado se tratarem de acessos distintos entre si e também diferentes das fontes tradicionais de resistência 'SCA 6' e 'SCA12' (SILVA et al., 1998; Mota 2003).

Uma grande diversidade genética foi encontrada por Marita et al. (2001) ao avaliarem a variabilidade dos clones de cacaueteiro que apresentaram baixa incidência de vassoura-de-bruxa nos bancos de germoplasma da região Sul da Bahia. De 270 clones avaliados, 180 foram classificados como resistentes por apresentarem baixa incidência da doença. Dos clones resistentes, 67% pertenciam a série brasileira Cruzeiro do Sul ou eram descendentes de 'SCA 6' ou 'SCA 12'. Paim (2005), objetivando selecionar novas fontes de resistência a *C. pernicioso*, avaliou o comportamento de 40 famílias de clones da série 'CAB' nas condições do Sul da Bahia. Após seis anos de avaliações em campo, as famílias dos 'CAB 0066', 'CAB 0194' e 'CAB 0195' foram as que apresentaram maiores níveis de resistência ao patógeno, sendo inclusive superiores as famílias de 'SCA 6'.

#### 2.1.4 Marcadores moleculares e desenvolvimento de mapas de ligação para o cacauzeiro

Os marcadores moleculares são abundantes nos genomas vegetais e não sofrem influências ambientais, revelando diretamente os polimorfismos de seqüências de DNA. Marcadores moleculares, baseados ou não na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido largamente empregados nos programas de melhoramento de plantas, como na caracterização de populações, construções de mapas de ligação e detecção de QTL entre outras aplicações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

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

As características desejáveis para os marcadores moleculares são: que sejam altamente polimórficos, cubram todo o genoma; sejam seletivamente neutros, no sentido de não afetarem o caráter em questão nem as características reprodutivas do indivíduo, e que sejam co-dominantes para que todos os possíveis genótipos possam ser identificados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites estão presentes na maioria dos genomas dos organismos eucariotos e consistem de seqüências curtas de 2-5 nucleotídeos repetidas em *tandem*, flanqueadas por seqüências únicas não repetidas, sendo os elementos repetidos mais comuns os di-nucleotídeos AT e CA. A variação alélica em locos de microssatélites pode ser facilmente detectada por PCR usando *primers* flanqueadores específicos. O polimorfismo baseado na variação do número de seqüências repetidas dos microssatélites é provavelmente ocasionado durante o *slippage* ou escorregamento da DNA polimerase na replicação do DNA ou por *crossing-over* desigual (HANCOCK, 2000).

Microssatélites têm sido amplamente utilizados em muitas espécies de plantas por serem abundantes, com freqüência média de um a cada 50 mil pares de base,



possuírem alto grau de polimorfismo, serem loco-específicos, apresentarem reprodutibilidade dos resultados, baixa quantidade de DNA requerida nas análises, serem detectados facilmente utilizando gel de agarose, poliacrilamida ou através de sequenciamento automático (PUGH et al., 2004). Atualmente existem mapeados aproximadamente 260 locos de microsátélites para o cacauzeiro distribuídos ao longo dos 10 cromossomos (LANAUD et al., 1999; PUGH et al., 2004; BROWN et al., 2005).

O uso de mapas genéticos tem sido amplamente difundido em várias espécies de plantas por permitirem a cobertura e análise completa de genomas; a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos; a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância; a quantificação do efeito destas regiões genômicas que controlam caracteres de importância; facilitar o melhoramento assistido por marcadores e clonagem baseada em mapa (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os mapas genéticos são construídos pela análise de co-segregação dos marcadores genéticos nos produtos da meiose, em progênies originadas de cruzamentos entre genitores contrastantes para um determinado caráter (LIU, 1998). Os marcadores localizados em diferentes cromossomos devem segregar independentemente e os marcadores localizados no mesmo cromossomo são transmitidos conjuntamente, a menos que esta ligação seja quebrada por uma recombinação no gameta genitor. A construção de mapas genéticos e posterior localização de QTLs associados a características de interesse agrônomico baseia-se em metodologias de esperanças matemático-estatísticas que associam as informações da segregação de pares moleculares às características fenotípicas que se desejam mapear (LIU, 1998).

O desenvolvimento de mapas genômicos envolve a seleção da população mais apropriada para mapear; o cálculo das frequências de recombinação em pares, usando esta população; o estabelecimento de grupos de ligação; a estimativa das distâncias no mapa entre marcas e a determinação da ordem linear por marcadores, de forma a minimizar os eventos de recombinação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A escolha de genitores para desenvolvimento de mapas genômicos é crítica em plantas perenes arbóreas e o tipo de marcador a ser utilizado deve ser considerado. Os

genitores devem ser importantes no programa de melhoramento, apresentar nível satisfatório de polimorfismo para o tipo de marcador a ser usado, além de segregar para várias características qualitativas e quantitativas de importância (componentes de produção e resistência à doença, etc.) e de qualidade do produto, para maximizar a obtenção de informações (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001).

Em programas de melhoramento de plantas perenes, as estratégias de mapeamento utilizadas envolvem as progênies  $F_1$  dos cruzamentos contrastantes entre genitores heterozigotos, devido à dificuldade de se obter gerações avançadas. Para mapas baseados em marcadores moleculares dominantes, como RAPD e AFLP, a estratégia normalmente utilizada é a do *pseudo-testcross* desenvolvida por Grattapaglia e Sederoff (1994). O princípio do método é que se um genitor for heterozigoto para um marcador dominante e o outro genitor apresentar formas alélicas não detectadas (alelos nulos), a progênie  $F_1$  segrega na proporção 1:1 para ausência e presença do segmento do marcador utilizado. Em resumo, a geração  $F_1$  obtida do cruzamento entre duas plantas de uma espécie altamente heterozigótica lembra uma  $F_2$  ou um retrocruzamento nos modelos clássicos para culturas anuais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A estratégia de *pseudo-testcross* vem sendo largamente empregada em mapeamento de plantas, principalmente para aquelas de longo ciclo de vida como espécies florestais e frutíferas (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994; CARNEIRO, 2001; QUEIROZ et al. 2003; MATTA, 2005).

O uso de marcadores co-dominantes em populações  $F_1$ , onde os genitores foram heterozigotos, possibilita a visualização de três tipos de segregações dos alelos para um único loco. Segregação dos alelos do marcador na proporção 1:1, para o caso de um genitor ser homozigoto e outro heterozigoto; segregações nas proporções 1:2:1 e 1:1:1:1 nos locos em que ambos os genitores sejam heterozigotos. Marcas co-dominantes que segregam de acordo com as últimas duas possibilidades, podem ser utilizadas como “pontes genéticas”, permitindo a integração dos mapas dos dois genitores gerados a princípio separadamente, formando um único mapa consensual para as duas populações (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994).

Em geral, os mapas genéticos do cacauero vêm sendo gerados a partir de progênies  $F_1$  de variedades híbridas, derivadas de cruzamentos entre genitores

heterozigotos. Para construções destes mapas utilizam-se marcadores dominantes, explorando a configuração de *pseudo-testcross* e marcadores co-dominantes (LANAUD et al., 1995; RISTERUCCI et al., 2000a; FLAMENT et al., 2001; CLÉMENT et al., 2003a; 2003b; PUGH et al. 2004; BROWN et al., 2005). São construídos dois mapas, sendo um para cada genitor, baseado na segregação de marcadores co-dominantes, como RFLPs, microssatélites e isoenzimas, que permitem a fusão dos diversos mapas, ou ainda a comparação direta com o mapa de referência estabelecido para o cacauero ( PUGH et al. 2004). Os marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), mais abundantes, foram usados para saturar esses mapas genéticos. Para o cacauero, comumente um genótipo altamente heterozigótico é cruzado com um genótipo mais homozigoto, tal como o mutante albino 'Catongo'. Alternativamente, já foi utilizada para mapeamento uma população de retrocruzamento, derivada de uma única planta  $F_1$  retrocruzada com o genitor mais homozigoto (CROUZILLAT et al., 1996), enquanto que em outros casos específicos, populações  $F_2$  foram especialmente geradas e usadas para a identificação de regiões genômicas associadas com sabor de chocolate e qualidade da semente (CROUZILLAT et al., 2001; ARAÚJO, 2002) e resistência à *C. pernicioso* (QUEIROZ et al., 2003; BROWN et al. 2005).

O primeiro mapa de ligação do cacauero foi desenvolvido para a população  $F_1$  de 100 indivíduos do cruzamento entre os clones 'UPA402' x 'UF676' (LANAUD et al., 1995). Foram formados dez grupos de ligação, cobrindo 759 cM e contendo 193 locos, incluindo cinco de isoenzimas, 160 de RFLPs, sendo 101 de cDNA, 55 de sondas genômicas e quatro de genes de funções conhecidas e 28 locos de RAPD. Este mapa foi posteriormente saturado com marcadores adicionais, tendo sido incluídos mais 18 locos de RFLP (três sondas de cDNA, dez genômicas, dois genes de funções conhecidas, e três sondas teloméricas); dois locos de RAPD; 191 locos de AFLP e 20 de microssatélites, totalizando 424 marcadores, englobando 885,4 cM com espaçamento médio entre marcadores de 2,1 cM (RISTERUCCI et al., 2000a).

Pugh et al. (2004) realizaram a mais recente saturação do mapa consensual do cacauero acrescentando mais 35 indivíduos à população  $F_1$  originalmente utilizada por Lanaud et al. (1995). A versão mais atualizada do mapa consensual do cacauero conta com dez grupos de ligação, cobrindo 782,8 cM e contendo 465 locos, dos quais 268

são de microssatélites, 176 de RFLPs, cinco de isoenzimas e 16 de Rgenes-RFLP. A média de distância entre cada marcador é de 1,7 cM. Pelo menos 13 outros mapas de ligação já foram desenvolvidos e utilizados principalmente para identificar regiões genômicas associadas com componentes de produção, vigor e resistência à várias espécies e isolados de *Phytophthora* que atacam o cacauzeiro em todas as partes do mundo e também para resistência a *C. pernicioso* (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001; FIGUEIRA; ALLEMANO, 2005).

### **2.1.5 Mapeamento de QTLs associados à resistência a patógenos**

Marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso em programas de melhoramento, sendo que na fitopatologia sua maior contribuição tem sido a de caracterizar fenotipicamente os diversos locos de resistência quantitativa (QTL). Por “caracterização fenotípica” entende-se, primeiro, conhecer quantos são os genes envolvidos em determinada resistência e quais suas localizações cromossômicas. Em segundo lugar, determinar quais os efeitos fenotípicos de cada um e as magnitudes destes efeitos. Em terceiro lugar, estabelecer quão estáveis são os efeitos destes genes face a variações ambientais e, mais importante sob o contexto fitopatológico, face a mudanças genéticas nas populações do patógeno (CAMARGO, 2000). O uso de marcadores moleculares no estudo das bases genéticas das resistências poligênicas, permitem individualizar o efeito fenotípico de cada poligene e acompanhar a sua segregação como se fossem fatores genéticos discretos (LANDER; BOTSTEIN, 1989).

O mapeamento de QTLs é baseado em testes de ligação entre marcadores moleculares e características fenotípicas. Os métodos mais simples empregados na detecção da associação marcador-fenótipo são os modelos lineares de análise de variância e regressão linear. O método não requer a construção de mapas e apenas detecta associações entre marcadores e QTLs sem localizar a posição no mapa (EDWARDS et al., 1987).

Diferentes metodologias de mapeamento envolvendo a análise dos mapas de ligação e a localização de QTLs de interesse agrônomico podem ser empregadas, dentre elas destacam-se o Mapeamento por Intervalo e o Mapeamento por Intervalo

Composto (FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, 1998). O Mapeamento por Intervalo aumenta o poder de detecção da associação QTL-fenótipo, através da estimativa da magnitude do efeito e a posição do QTL. A metodologia se baseia na segregação dos marcadores moleculares usando a função de máxima verossimilhança para estimar a frequência de recombinação e o efeito do QTL no intervalo entre dois marcadores do mapa genético. O método testa a probabilidade de cada intervalo do mapa ser detentora de um QTL através de testes estatísticos, considerando que a região possui um QTL. Uma das limitações deste método é a baixa resolução quando dois ou mais QTLs estão situados próximos nos grupos de ligação (LANDER; BOSTSTEIN, 1989).

O Mapeamento por Intervalo Composto ou *Multiple QTL Models* (MQM) foi proposto simultaneamente por Jansen (1993; 1994) e Zeng (1994). O método utiliza informações de vários marcadores como cofatores aumentando desta forma a precisão no mapeamento e detecção de QTLs que possam ocorrer em intervalos próximos no mesmo grupo de ligação. A estratégia do MQM é combinar em um único modelo, técnicas de mapeamento do método da máxima verossimilhança com as técnicas de regressão linear múltipla. O MQM permite analisar cada intervalo do mapa simultaneamente considerando as diferentes hipóteses e modelos de ocorrência de QTLs em intervalos adjacentes eliminando os efeitos de QTLs ligados no mesmo cromossomo na análise dos QTLs remanescentes.

A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e alelos do QTL. Este desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados através de análises estatísticas adequadas. A detecção de QTLs em geral está baseada no uso de populações segregantes tradicionalmente utilizadas para a construção de mapas genéticos. Duas linhagens puras, geneticamente divergentes e fenotipicamente contrastantes em relação às características de interesse, são identificadas. Estas populações são cruzadas e uma população que pode ser uma  $F_2$ , retrocruzamento, linhagens puras recombinantes ou linhagens dihaplóides, é obtida a partir da  $F_1$ . Um certo número de indivíduos desta população segregante é avaliado para as características de interesse e genotipados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Para o mapeamento de QTLs em espécies de plantas perenes, onde muitas

vezes não estão disponíveis aos melhoristas populações  $F_2$  ou retrocruzamento, a população a ser mapeada pode ser uma  $F_1$ , desde que os genitores envolvidos no cruzamento sejam altamente heterozigotos e seja utilizado um grande número de marcadores co-dominantes multialélicos que permitam o rastreio, compreensão e manipulação adequada de toda a variabilidade alélica que segrega aos QTLs (GRATTAPAGLIA, 2001).

Siviero (2001) utilizando a estratégia *pseudo-testcross* e marcadores moleculares dominante do tipo RAPD, mapeou QTLs associados a resistência a gomose dos citros causada por *Phytophthora parasitica*, em uma população  $F_1$  envolvendo o cruzamento de *Citrus sunki*, genitor suscetível e *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux', genitor resistente ao patógeno. Foram gerados dois mapas de ligação sendo um para cada genitor. Nestes mapas foram localizados quatro QTLs, sendo três no mapa de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e um no mapa de *C. sunki*, indicando que a resistência a *P. parasitica* em citros é de natureza quantitativa. As variações fenotípicas explicadas pelos QTLs ligados a resistência a *P. parasitica* em citros variou de 14,7% a 38% nos dois mapas de ligação.

Matta (2005) estudando a resistência de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg.) a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizou a estratégia de *pseudo-testcross* para construir e integrar os mapas de ligação gerados para cada genitor. A população  $F_1$  mapeada foi obtida a partir do cruzamento entre as variedades 'IAPAR-123' resistente ao patógeno e 'IAPAR-06' tida como suscetível. As construções dos mapas de ligação foram realizadas com marcadores dominantes AFLP segregando na proporção de 1:1 e 3:1, sendo que estas últimas serviram de pontes para integração dos mapas construídos. O autor concluiu que a resistência a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* das variedades de maracujazeiro empregadas era poligênica e havia pelo menos três QTLs envolvidos.

Calenge et al. (2004) detectaram diferentes QTLs relacionados a resistência a *Erwinia amylovora*, agente causal do fogo bacteriano das pomáceas, em duas progênes  $F_1$  de macieira (*Malus spp.*). Para construção dos mapas de ligação dos genitores foram utilizados marcadores moleculares dominantes, AFLP e RAPD, e co-dominantes, RFLP e microssatélites. As progênes  $F_1$  foram obtidas de cruzamentos

entre a variedade 'Fiesta', resistente a *E. amylovora*, com as variedades 'Discovery' e 'Prima' tidas como suscetíveis a este patógeno. A utilização de um genitor em comum para as duas populações e o emprego de marcadores microssatélites que segregaram na proporção de 1:1:1:1 permitiram a integração dos mapas de ligação dos genitores de ambos os cruzamentos. Foram detectados quatro QTLs nos mapas de ligação integrados, sendo um QTL de maior efeito, responsável por 46% da variação fenotípica, presente nas duas populações e sendo associado à variedade resistente 'Fiesta'.

Crouzillat et al. (2000b) mapearam QTLs associados a resistência a *Phytophthora palmivora* em duas progênies de cacaueteiro, uma  $F_1$  e a outra retrocruzamento. Como genitores das progênies  $F_1$  utilizaram-se os clones 'Catongo' (altamente homocigoto) e 'Pound 12' (altamente heterocigoto), ambos suscetíveis ao patógeno. O retrocruzamento foi obtido a partir de uma das plantas  $F_1$  cruzada com o 'Catongo'. No mapeamento das progênies utilizaram-se marcadores moleculares dominantes (AFLP e RAPD) e co-dominantes (RFLP). Os marcadores RFLP representaram 77,2 e 56,5% das marcas utilizadas nas construções dos mapas da  $F_1$  e do retrocruzamento, respectivamente. Nos dez grupos de ligação dos dois mapas foram detectados seis QTLs associados com resistência a *P. palmivora* com a variação fenotípica explicada por cada um deles variando de 7,4 a 47,9%. O QTL de maior variação fenotípica foi comum as duas populações. Os resultados confirmaram que a resistência do cacaueteiro a *P. palmivora*, é poligênica controlada possivelmente por genes de maior e menor efeito.

Flament et al. (2001) mapearam cinco QTLs associados à resistência a *P. palmivora* em população  $F_1$  do cruzamento entre os clones T60 / 887 (genitor resistente) com IFC 5 (genitor susceptível). Os marcadores utilizados foram microssatélites e AFLP. Todos os QTLs encontrados estavam associados ao genitor T60 / 887. Quatro dos QTLs estavam associados à resistência de *P. palmivora* em frutos e um à resistência em folhas. A porcentagem de variação fenotípica explicada pelos QTLs variaram de 9 a 17%. Alguns destes estavam localizados nos mesmos cromossomos onde anteriormente já haviam sido relatados QTLs associados a resistência a *P. palmivora*, como nos cromossomos III, VI e X (LANAUD et al. 2000; RISTERUCCI et al., 2000a; 2000b; CROUZILLAT et al., 2000b)

Risterucci et al. (2003) encontraram 13 QTLs associados à resistência de *Phytophthora spp.*, mapeados em população do cruzamento entre IFC1 (susceptível e homocigoto) com um híbrido de SCA 6 com trinitário (genitor resistente). O mapa de ligação conjunto dos genitores foi construído com 213 marcas das quais 190 AFLP e 23 microssatélites. Dos QTLs associados à resistência a *P. palmivora*, *P. megakarya* e *P. capsici*, três estavam localizados nos grupos de ligação I, V e VI e foram comuns às três espécies de *Phytophthora*. A porcentagem de variação fenotípica explicada por cada QTL variou de 7,5% a 12,4%.

Para identificação de regiões genômicas associadas à resistência a *C. pernicioso*, um mapa genético foi desenvolvido no Brasil para uma população de 82 indivíduos F<sub>2</sub> derivados da autofecundação do genótipo 'TSH 516', um híbrido selecionado do cruzamento de 'ICS1' x 'Scavina 6' (QUEIROZ et al., 2003). O mapa genético continha 124 marcadores RAPD e 69 AFLP em 25 grupos de ligação, cobrindo 1.713 cM, e permitiu a identificação de um loco principal de QTL, responsável por cerca de 35% da variância fenotípica para resistência a *C. pernicioso*, avaliada sob condições de campo por dois anos. Esse mapa genético foi recentemente saturado para um total de 343 marcadores (232 RAPD; 77 AFLP; e 33 microssatélites), perfazendo 19 grupos de ligação com um total de 670 cM (FALEIRO et al., 2006). Novas avaliações de resistência foram conduzidas num período de seis anos, permitindo a confirmação do QTL descrito por QUEIROZ et al. (2003). Na saturação do mapa, três locos de microssatélites (*mTcCIR35*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24*) foram mapeados nessa mesma região do QTL sendo que esses locos já haviam sido mapeados no cromossomo IX do mapa consensual (RISTERUCCI et al., 2000a; KUHN et al., 2003).

Um novo mapa para a população F<sub>2</sub> de autofecundação de 'TSH 516' foi recentemente construído por Brown et al. (2005). Neste mapa 146 indivíduos foram genotipados com 182 marcadores sendo 170 microssatélites, oito genes homólogos de resistência (RGH) e quatro genes candidatos relacionados a estresse (WRKY). O comprimento total do mapa foi estabelecido em 671,9 cM. Dois QTLs foram encontrados, um no grupo de ligação IX, como já descrito por Queiroz et al. (2003) e Faleiro et al. (2006) e outro no grupo I, com porcentagem de variação fenotípica de 51% e 6%, respectivamente. O QTL do grupo de ligação I foi localizado próximo das



marcas *mTcCIR22*, *mTcCIR264* e *RGH11*, enquanto que o QTL do grupo IX foi próximo das *mTcCIR24*, *mTcCIR35* e *mTcCIR157*. Ambos os QTLs tiveram efeito de dominância para resistência a *C. pernicioso*, sendo que o QTL de maior efeito do grupo IX foi originário do 'SCA 6' e o de menor efeito do grupo I foi herdado de 'ICS 1'.

Em muitas espécies de plantas, genes que conferem resistência a patógenos têm sido clonados (FARIS et al., 1999; KUHN et al., 2003). Os genes responsáveis pelo reconhecimento dos patógenos, genes de resistência (genes R), e os que acionam os mecanismos de defesas da planta, genes de respostas de defesas (DGA), encontram-se em geral dispostos em *clusters* ao longo de diferentes regiões do genoma (SIMONS et al., 1998; SELA-BUURLAGE et al., 2001).

O mapeamento do genoma da batateira (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) permitiu a localização de *clusters* destas duas classes de genes em regiões onde anteriormente tinham sido mapeados QTLs associados a resistência a diferentes patógenos (GEBHARDT; VALKONEM, 2001). Pflieger et al. (2001) mapearam vários RGH no mapa de ligação da pimenteira (*Capsicum annuum* L.) em regiões que continham QTLs associados à resistência *P. capsici*. Diferentes seqüências expressas (ESTs), mostrando alta similaridade com genes R e genes DGA, foram mapeadas em *clusters* nos grupos de ligação 6 e 11 do mapa do arroz (*Oryza sativa* L.). Alguns destes *clusters* foram localizados em regiões onde haviam sido mapeados QTLs associados a resistência parcial do arroz a vários patógenos (WANG et al., 2001).

KUHN et al. (2003) usaram a abordagem para amplificar marcadores RGH usando iniciadores degenerados a partir de DNA de sete genótipos de cacauero. Dos 600 clones obtidos, foram identificadas 74 seqüências de RGH, que foram classificadas em 11 categorias. A partir de iniciadores específicos para cada categoria, foi utilizada a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples (*single strand conformation polymorphism*, SSCP), que foram mapeados na população F<sub>2</sub> derivada de 'Scavina 6 x ICS1', juntamente com outros 15 locos de microssatélites (KUNH et al., 2003). Essa mesma população F<sub>2</sub> foi mapeada por Borrone et al. (2004) e Brown (2005), que encontraram marcas RGH nos grupos de ligações IX e I. No grupo I houve coincidência entre localização de uma marca de RGH e o QTL para resistência a *C. pernicioso*. Lanaud et al. (2004) mapearam *clusters* de candidatos a genes do tipo RGH e DGA em

regiões de QTLs associados à resistência a diferentes espécies de *Phytophthora* no grupo de ligação IV do mapa consensual do cacauero.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Seleção de acessos de cacauero resistentes a *C. pernicioso***

Os acessos utilizados nos ensaios de avaliação de resistência à *C. pernicioso* foram previamente selecionados com base nas avaliações realizadas por Fonseca e Albuquerque (2000) no banco de germoplasma de cacauero da CEPLAC em Marituba-PA. Foram selecionados 180 clones promissores quanto à resistência a *C. pernicioso* em condição de alta incidência de vassoura-de-bruxa. Dentre estes genótipos, optou-se por utilizar os da série 'CAB' por terem apresentado os maiores níveis de resistência e por se tratarem de acessos Alto, Baixo e Médio Amazônicos, cujos pontos de coleta foram distantes geograficamente ao provável ponto de coleta dos clones 'SCA 6' e 'SCA 12', fontes de resistência a *C. pernicioso* tradicionalmente utilizadas nos programas de melhoramento.

### **2.2.2 Origem das progênies de cacauero utilizadas nos ensaios**

Na Tabela 1 estão descritas as origens dos 44 acessos da série 'CAB' utilizados como genitores das famílias de polinização aberta avaliadas nos ensaios. Destes clones, 24 foram coletados no Amazonas, 12 em Rondônia, cinco no Acre, dois no Pará e um de origem desconhecida, provavelmente devido a erro no momento da etiquetagem (ALMEIDA et al, 1987 e 1995).

Tabela 1 - Origens dos 44 acessos da série 'CAB' utilizados como genitores das famílias de polinização aberta nos ensaios de avaliação dos níveis de resistência de famílias de cacaueteiro a *Crinipellis pernicioso*

Acesso	Bacia hidrográfica	Local da coleta	Estado
CAB 0012	Rio Ji-Paraná	Seringal Muqui, Presidente Médice-RO	Rondônia
CAB 0031	Rio Acará	Barcarena-PA	Pará
CAB 0049	Rio Guamá	Benevides-PA	Pará
CAB 0148	Rio Acre	Rio Acre-AC	Acre
CAB 0153	Rio Acre	Rio Acre-AC	Acre
CAB 0160	Rio Acre	Rio Acre-AC	Acre
CAB 0169	Rio Acre	Rio Acre-AM	Amazonas
CAB 0180	Rio Ji-Paraná	Ji - Paraná e Ouro Preto - RO	Rondônia
CAB 0181	Rio Tarauacá	Rio Tarauacá-AC	Acre
CAB 0186	Rio Embira	Rio Tarauacá-AC	Acre
CAB 0191	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0193	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0198	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0208	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0213	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0214	Rio Purus	Rio Purus-AM	Amazonas
CAB 0219	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0221	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0232	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0233	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0260	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0270	Rio Solimões	Tefé-AM	Amazonas
CAB 0275	Rio Solimões	Médio Solimões-AM	Amazonas
CAB 0307	Rio Solimões	Parnás, Copeá e Carapanatuba-AM	Amazonas
CAB 0309	Rio Solimões	Parnás, Copeá e Carapanatuba-AM	Amazonas
CAB 0310	Rio Solimões	Parnás, Copeá e Carapanatuba-AM	Amazonas
CAB 0313	Rio Solimões	Parnás, Copeá e Carapanatuba-AM	Amazonas
CAB 0327	Solimões/Amazonas	Médio Solimões próximo a Tefé-AM	Amazonas
CAB 0328	Solimões/Amazonas	Médio Solimões próximo a Tefé-AM	Amazonas
CAB 0329	Solimões/Amazonas	Médio Solimões próximo a Tefé-AM	Amazonas
CAB 0332	Solimões/Amazonas	Médio Solimões próximo a Tefé-AM	Amazonas
CAB 0334	Solimões/Amazonas	Alto Solimões próximo a Tabatinga-AM	Amazonas
CAB 0352	Rio Javari	Rio Javari e afluentes-AM	Amazonas
CAB 0356	Rio Itaquí	Rio Javari e afluentes-AM	Amazonas
CAB 0364	Rio Içá	Rio Içá-AM	Amazonas
CAB 0371	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0383	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0388	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0392	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0410	Rio Jamari	Ariquemes-RO	Rondônia
CAB 0486	Rio Japurá	Alto médio Japurá-AM	Amazonas
CAB 0501	Rio Japurá	Alto médio Japurá-AM	Amazonas
CAB 0531	Rio Japurá	Alto médio Japurá-AM	Amazonas
CAB 0992	-	-	-

### **2.2.3 Avaliação da resistência dos genótipos de cacauero a *C. pernicioso***

As avaliações dos níveis de resistência dos genótipos de cacauero a *C. pernicioso* foram realizadas nas estações da CEPLAC localizadas em Marituba-PA (Estação de Recursos Genéticos José Haroldo - ERJOH) e em Ilhéus-BA (Centro de Pesquisa do Cacau - CEPEC). Inicialmente foram realizados ensaios em condição de casa de vegetação nos anos de 1998 e 1999. Utilizaram-se famílias oriundas de polinizações abertas nos experimentos realizados em Ilhéus-BA e famílias obtidas de polinizações controladas nos experimentos realizados em Marituba-PA. As famílias que mais se destacaram nos ensaios em casa de vegetação foram avaliadas em condição de campo, no período de 2000 a 2005, no CEPEC.

#### **2.2.3.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial**

Foram coletados ao acaso frutos e ramos de plantas de cacauero apresentando sintomas da doença vassoura-de-bruxa. Após a secagem, os materiais infectados foram mantidos em gabinetes (em laboratório), ou em telados (no campo) denominados de “vassoueiros” para produção dos basidiocarpos de *C. pernicioso*. Nos vassoueiros do tipo gabinete, as condições de luz, temperatura e umidade foram controladas, seguindo metodologia descrita por Rocha e Wheeler (1985). Os materiais infectados foram submetidos a um regime de molhamento de 8 h seguidos de secagem por 16 h (SILVA, 1997). Nos vassoueiros do tipo telado, procurou-se estabelecer um regime de 12 h de molhamento seguido de 12 h de secagem.

Os basidiocarpos produzidos nos vassoueiros foram lavados em água destilada e posteriormente imersos por alguns segundos em solução de 1% cloranfenicol. Após a imersão na solução, os basidiocarpos foram lavados mais duas vezes em água destilada. Os basidiocarpos tiveram seus estipes removidos, e somente os píleos foram colocados no interior de tampas de placas de Petri, contendo gel de silicone para aderência dos mesmos. As tampas com os basidiocarpos foram colocadas sobre béqueres contendo suspensão de 16% glicerol sob agitação constante a temperatura ambiente, para liberação dos basidiósporos (Figura 1). Decorridas 12 h de

liberação, os basidiocarpos eram descartados e a suspensão de esporos filtrada em membrana tipo Millipore® (0,45 µm). Os basidiósporos retidos na membrana foram ressuspensos novamente em suspensão de 16% glicerol, posteriormente distribuída em tubos plásticos de 2 ml e congeladas em nitrogênio líquido, onde permaneceram em bujões até o momento das inoculações das plântulas.

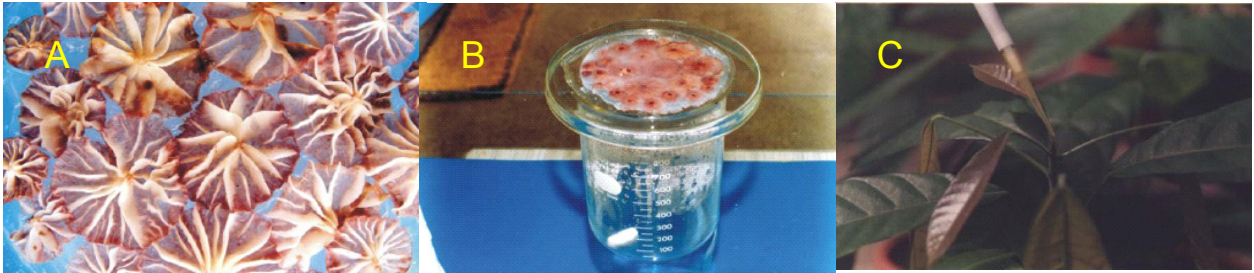


Figura 1 – Basidiocarpos de *C. perniciosus* (A), obtenção de basidiósporos de *C. perniciosus* (B) e inoculação de plântulas de cacaueiros em casa de vegetação (C)

As famílias dos 45 genitores das séries ‘CAB’ (41), ‘SCA’ (2) , ‘SIC’ (1- Catongo) e ‘Theobahia’ (Tabela 2 - ensaios 1, 2 e 3) foram obtidas através de polinizações abertas ocorridas nos bancos de germoplasmas da CEPLAC - ERJOH e CEPLAC - CEPEC. As sementes, após a remoção das mucilagens, foram colocadas por 48 horas em sacos de sarrapilheira umedecidos para uma pré-germinação. O plantio das sementes foi realizado em tubetes plásticos contendo aproximadamente 300 g de terriço esterilizado com brometo de metila. As plântulas ficaram em condição de casa de vegetação durante três a quatro semanas antecedendo as inoculações.

Tabela 2 - Relação dos ensaios e acessos de cacauero utilizados como genitores das famílias avaliadas quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação

<b>Ensaio 129/8/98</b>	<b>Ensaio 2 15/9/98</b>	<b>Ensaio 3 12/10/98</b>	<b>Ensaio 4 04/02/99</b>	<b>Ensaio Campo 2000-2005</b>
Catongo	Catongo	Catongo	Catongo	CAB 0031
SCA 6	SCA 6	SCA 6	CAB 0049	CAB 0169
SCA 12	SCA 12	SCA 12	CAB 0191	<b>CAB 0186</b>
Theobahia	CAB 0153	Theobahia	<b>CAB 0208</b>	<b>CAB 0208</b>
<b>CAB 0208*</b>	CAB 0160	CAB 0012	PA 195 x ICS 39	<b>CAB 0213</b>
<b>CAB 0213</b>	<b>CAB 0208</b>	CAB 0148	<b>CAB 0214</b>	<b>CAB 0214</b>
<b>CAB 0219</b>	<b>CAB 0219</b>	<b>CAB 0153</b>	CAB 0313	<b>CAB 0219</b>
<b>CAB 0232</b>	CAB 0221	<b>CAB 0160</b>	CAB 208 x CAB 214	<b>CAB 0232</b>
<b>CAB 0233</b>	<b>CAB 0233</b>	CAB 0180	CAB 0208 x PA 195	<b>CAB 0233</b>
<b>CAB 0260</b>	<b>CAB 0327</b>	CAB 0181	CAB 0214xICS 39	<b>CAB 0260</b>
<b>CAB 0270</b>	CAB 0328	CAB 0186	CAB 0270 x ICS 39	<b>CAB 0270</b>
<b>CAB 0275</b>	CAB 0329	CAB 0193	ICS 39 x CAB 0270	<b>CAB 0275</b>
<b>CAB 0307</b>	<b>CAB 0334</b>	CAB 0198	PA 195 x CAB 0208	<b>CAB 0307</b>
<b>CAB 0309</b>	CAB 0356	CAB 0214		<b>CAB 0309</b>
CAB 0310	CAB 0364	CAB 0501		<b>CAB 0327</b>
<b>CAB 0327</b>	CAB 0383			<b>CAB 0332</b>
<b>CAB 0332</b>	<b>CAB 0388</b>			<b>CAB 0334</b>
<b>CAB 0334</b>	CAB 0486			<b>CAB 0352</b>
<b>CAB 0352</b>	<b>CAB 0992</b>			<b>CAB 0371</b>
<b>CAB 0371</b>				<b>CAB 0388</b>
<b>CAB 0388</b>				CAB 0392
<b>CAB 0410</b>				<b>CAB 0410</b>
<b>CAB 0531</b>				<b>CAB 0531</b>
<b>CAB 0992</b>				<b>CAB 0992</b>
				SCA 6
				SCA 12
				Theobahia

\* Em negrito, acessos que foram repetidos em mais de um ensaio

As plântulas originadas de polinizações controladas foram obtidas conforme os esquemas de cruzamentos descritos na Tabela 2 (ensaio 4). Os clones utilizados como genitores foram os suscetíveis 'ICS 39' e 'PA 195', e os da série 'CAB' que mais se destacaram nos ensaios de seleções de genótipos de cacauero resistentes a *C. pernicioso* em condição de campo em bancos de germoplasma e nas avaliações realizadas em casa de vegetação com as plântulas provenientes de polinização aberta.

Para obtenção dos frutos, as flores dos acessos utilizados como genitores foram protegidas antes da abertura no estágio de botão floral. Com o auxílio de uma pinça, removeram-se as brácteas das flores dos genitores masculinos, de modo a expor as anteras, favorecendo a troca de pólen durante a polinização manual. Nas flores dos genitores femininos, os estames foram removidos, de modo a diminuir os riscos de ocorrência de autofecundação. Após as polinizações manuais, as flores dos genitores femininos foram novamente protegidas, permanecendo desta maneira por mais três semanas, até a visualização dos frutos. As sementes foram pré-germinadas conforme descrito anteriormente e plantadas em sacos plásticos contendo aproximadamente 1,5 Kg de terriço. As plântulas permaneceram em casa de vegetação por aproximadamente 45 dias antes de se proceder às inoculações.

As inoculações das famílias originadas de polinizações abertas, realizadas na CEPLAC-CEPEC, foram procedidas conforme metodologia descrita por Silva (1997). Um dia antes das inoculações, as plântulas mantidas em casa de vegetação tiveram dois terços do tamanho das folhas cortados, para acelerar o crescimento apical. Após o descongelamento das suspensões de basidiósporos em temperatura ambiente, a concentração de glicerol foi reduzida para 3%, a fim de permitir a germinação dos mesmos. Com o auxílio de um hemacitômetro, a concentração das suspensões foi calibrada para  $7,5 \times 10^4$  basidiósporos/mL. Somente suspensões de basidiósporos com porcentagem de germinação acima de 95% foram utilizadas. Cada plântula foi pulverizada com aproximadamente 1 mL da suspensão de esporos, de modo a atingir todas as folhas da região apical.

Após as inoculações, as plântulas permaneceram 24 h em câmara climatizada, com temperatura aproximada de 25°C e umidade relativa de 100%. Em seguida, foram transferidas para a casa de vegetação.

As plântulas oriundas de polinização controlada foram avaliadas na CEPLAC – ERJOH. Com o auxílio de uma micropipeta, cada plântula foi inoculada com 30 µL de uma suspensão de  $1 \times 10^5$  basidiósporos/mL. A suspensão foi distribuída nos lançamentos novos na região das axilas das folhas. Após as inoculações, as plantas permaneceram em uma câmara com 100% de umidade relativa durante 24 hs. Em



seguida, foram transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até serem avaliadas.

Em todos os ensaios de casa de vegetação foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Para os ensaios realizados na CEPLAC - CEPEC (ensaios 1, 2 e 3 da Tabela 2), cada repetição era composta de 28 plântulas. Nos ensaios CEPLAC – ERJOH, cada repetição foi representada por 20 plântulas (ensaio 4; Tabela 2). Como padrão de suscetibilidade foram utilizadas progênies de polinização aberta de ‘Catongo’, ‘ICS 39’ e ‘PA 195’ e os padrões de resistência foram representados pelas progênies de ‘SCA 6’, ‘SCA 12’ e ‘Theobahia’.

As avaliações dos níveis de resistência das famílias foram realizadas 60 dias após as inoculações sendo utilizadas as variáveis: incidência de plântulas com sintomas, incidência de plântulas com vassoura terminal, e incidência de plântulas com vassoura axilar (Figura 2).

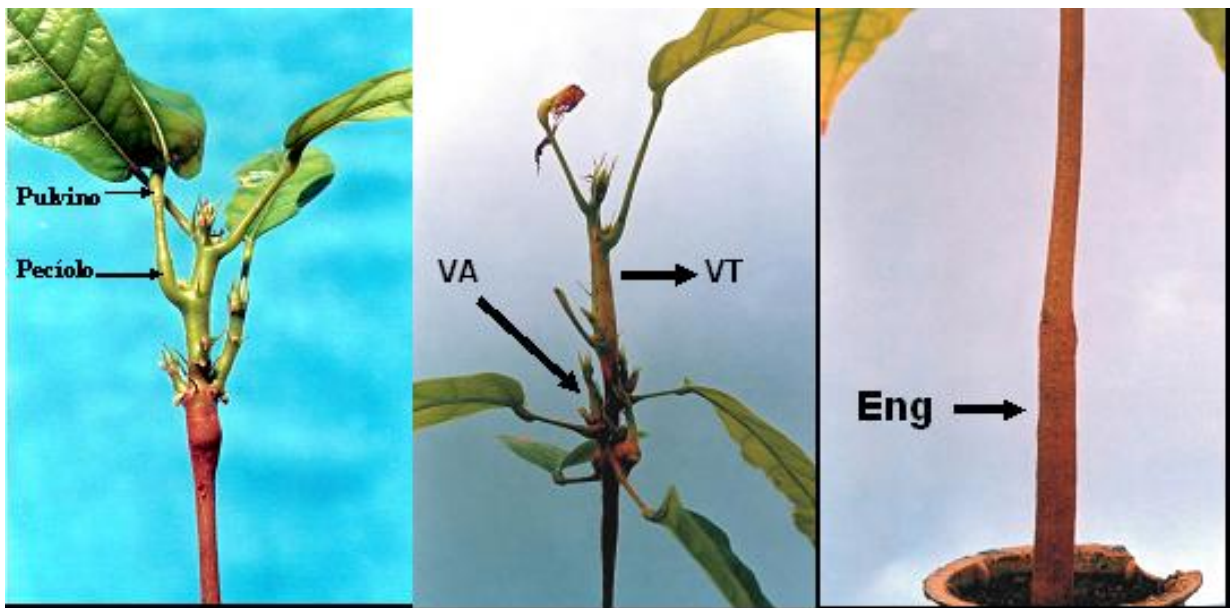


Figura 2 - Sintomas de vassoura-de-bruxa utilizados como variáveis para avaliação dos níveis de resistência de plântulas de cacauero em casa de vegetação. Pecíolo inchado, pulvino inchado, vassoura axilar (VA), vassoura terminal (VT), engrossamento (Eng)

As variáveis respostas, medidas nos ensaios 1, 2, 3 e 4 referem-se a número de plântulas  $Y_i$ , que manifestaram sintomas de vassoura-de-bruxa dentre  $m_i$  plântulas e o objetivo está em comparar as proporções de plantas com sintomas para as diversas famílias. Dados de proporções, em geral, são analisados usando um modelo de regressão binomial, que é um exemplo de modelos lineares generalizados (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Se supõe que o número de plântulas  $Y_i$ , que manifestaram sintomas de doença, de um total de  $m_i$  plântulas,  $i = 1, 2, \dots, n$ , são variáveis aleatórias e o modelo binomial padrão assume que  $Y_i \sim \text{Bin}(m_i, \pi_i)$ , onde  $\pi_i$  é a probabilidade de uma plântula manifestar o sintoma, com média  $\mu_i = E(Y_i) = m_i \pi_i$  e variância  $\text{Var}(Y_i) = m_i \pi_i (1 - \pi_i)$ . O modelo linear generalizado permite modelar as proporções esperadas  $\pi_i$  em termos de variáveis explanatórias  $x_i$  (efeitos de família e covariáveis) através de  $\eta_i = g(\pi_i) = x_i' \boldsymbol{\beta}$ , em que  $g$  é uma função de ligação adequada e  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor de parâmetros. A função de ligação mais comum é a logit, isto é,  $g(\pi_i) = \ln[\pi_i / (1 - \pi_i)]$ , mas outras escolhas comuns são o probito e o complemento log-log. Para um modelo bem ajustado, espera-se que a *deviance* (uma generalização da soma de quadrados) residual (uma medida do ajuste do modelo) seja aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo. A verificação de significância do efeito de família foi feita através da comparação da *deviance* de progênies com o valor de  $\chi^2_{v,p}$  com  $v$  graus de liberdade e a um nível de significância 100p%. Estimados os parâmetros, pode-se estimar a probabilidade de apresentar o sintoma da doença através de  $\hat{\pi}_i = \frac{\exp(\hat{\eta}_i)}{1 + \exp(\hat{\eta}_i)}$  e o número de plantas doentes por  $\hat{\mu}_i = m_i \hat{\pi}_i$ . Os parâmetros (efeito de família) do modelo foram estimados pelo método da máxima verossimilhança e os contrastes de cada família versus as famílias de referências, 'Catongo', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0214 x ICS 39' e 'CAB 0208 x PA 195' foram testados via Teste de Wald (Dobson, 2002).

### 2.2.3.2 Análise de resistência em campo por infecção natural

Plântulas das famílias que mais se destacaram nos ensaios de casa de vegetação foram transferidas para o campo. O plantio foi realizado na estação experimental Arnaldo Medeiros (CEPLAC-CEPEC-BA), utilizando-se o espaçamento de 3 x 1,5 m entre as plantas e tendo como sombreamento árvores de cacauzeiro adultas com alta incidência de vassoura-de-bruxa.

Foram avaliadas 27 famílias (Tabela 2) utilizando-se delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições de 12 plantas cada. Como padrão de suscetibilidade utilizaram-se plantas de 'Catongo' e de resistência plantas de 'SCA 6', 'SCA 12' e 'Theobahia'.

As avaliações dos níveis de resistência das famílias foram realizadas durante o período de janeiro de 2000 a abril de 2005. As variáveis observadas foram o número de pontos de infecções causados nos ramos e frutos de cada planta em intervalos de 15 dias. Após cada contagem, os ramos infectados eram marcados com uma fita, de modo a não serem contabilizados novamente nas próximas avaliações. No caso dos frutos, estes eram colhidos após as avaliações das plantas, tanto os infectados como os maduros sadios.

Neste ensaio, as variáveis analisadas foram o número de ramos infectados/ano e a porcentagem de frutos infectados/família. Em função do número de plantas sobreviventes ter sido diferente para cada família após sua implantação no campo, o número médio de ramos infectados por vassoura-de-bruxa/família teve de ser corrigido para este fator.

A variável número de vassouras vegetativas / ano foi analisada a partir de sua divisão conforme os cinco anos de avaliação e interpretada como cinco variáveis, utilizando a PROC GLM – MANOVA. A interpretação dos efeitos de ano, família e da interação ano com família foi realizado através da análise de medidas repetidas – PROC GLM – REPEATED ( SAS, 1986).

Para melhor entendimento da interação família versus ano, cada um dos cinco anos foi removido sucessivamente das análises, de modo a permitir a comparação de suas contribuições individuais para a interação através do efeito no teste F. Todas as

famílias estudadas foram comparadas através de contrastes com os controles para resistência 'SCA 6', 'SCA 12' e 'Theobahia'.

Para avaliação da porcentagem de frutos infectados, foi empregada análise univariada (ANOVA) utilizando-se como fonte de variações: ano, progênie e blocos. As médias dos efeitos de família foram comparadas pelo método de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAS (SAS, 1986).

## **2.2.4 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacauero**

### **2.2.4.1 Obtenção das populações contrastantes**

Foram avaliadas duas populações provenientes dos cruzamentos entre acessos de cacauero contrastantes para o caráter resistência a *C. pernicioso*. As populações tiveram genitor feminino comum, 'ICS 39' e dois genitores masculinos, os clones 'CAB 208' ou 'CAB 214'.

O clone 'ICS 39' é altamente suscetível a *C. pernicioso*, porém, com boas características agrônomicas, como frutos grandes, alta produtividade e amêndoas grandes com peso seco superior a 1 g (<http://tropgenedb.cirad.fr>, 2006). Os clones 'CAB 208' e 'CAB 214' são acessos provenientes de coletas realizadas no Alto Amazonas, com características de alta resistência a *C. pernicioso* (FONSECA E ALBUQUERQUE, 2000; ALBUQUERQUE et al., 1999). O clone 'CAB 208' apresenta baixa produtividade, frutos pequenos, com número médio de 45 sementes / fruto e peso médio de amêndoa seca inferior a 0,60 g. O 'CAB 214' possui também baixa produtividade, frutos de tamanho médio, número médio de 45 sementes / fruto e amêndoas secas pesando em média 0,66 g (KOBAYASHI et al., 2001).

Os cruzamentos 'ICS 39 x CAB 0208' e 'ICS 39 x CAB 0214' foram realizados no banco de germoplasma da CEPLAC-ERJOH no período de julho a agosto de 2001 e junho a agosto de 2002, respectivamente. As polinizações foram realizadas manualmente, conforme descrito no item 2.2.3.1.

Foram obtidos 170 indivíduos de cada cruzamento, os quais foram identificados em casa de vegetação com etiqueta definitiva, que permaneceram no campo. Após um

período de seis meses em casa de vegetação, realizaram-se os plantios dos indivíduos em área experimental da CEPLAC-ERJOH.

Implantaram-se efetivamente no campo 166 plantas do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208' e 130 do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0214', utilizando-se fileiras simples com espaçamento de 3 x 1,5 m entre plantas. As fileiras das progênies dos cruzamentos contrastantes foram alternadas com plantas oriundas do cruzamento 'PA 195' x 'ICS 39', com fenótipo de altamente suscetível *C. pernicioso*. O sombreamento provisório foi realizado com bananeiras (espaçamento 3 x 3 m) e o definitivo com essências florestais (espaçamento 12 x 12 m).

#### **2.2.4.2 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes**

As extrações dos DNA das plantas foram realizadas a partir de folhas jovens e saudáveis. O protocolo de extração utilizado foi o de Doyle e Doyle (1990), com modificações. Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido de folha de cada indivíduo foram maceradas em presença de nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidas para tubos Ependorff® de 2 ml, adicionando-se aos mesmos 800 µl de tampão [100 mM tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,2% (v/v) β-mercaptoetanol, 2% CTAB, 1% polivinilpirrolidona e 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> de proteinase K]. Após 60 min em banho-maria a 65°C, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Aos sobrenadantes adicionaram-se 800 µl de 24:1 clorofórmio: álcool isoamílico, agitando por cinco min, seguindo de centrifugação a 10.000 g por dez min. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Os sobrenadantes transferidos para novos tubos, receberam isopropanol gelado, na proporção de 1:1 (isopropanol: sobrenadante), e centrifugados a 10.000 g por cinco min. Descartaram-se os sobrenadantes e os precipitados foram lavados com 1 ml de solução 70% de etanol por 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos ao ar por 12 h e ressuspensos em solução de TE (10 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 40 µg/ml e incubados em banho-maria a 37°C por 60 min.

A qualidade do DNA das amostras foi avaliada em gel de 0,8% agarose corado com brometo de etídio e a concentração determinada por fluorometria (DyNA Quant 2000, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). As amostras de trabalho tiveram suas concentrações ajustadas para 5 ng DNA/ $\mu$ l e foram conservadas a  $-20^{\circ}$  C.

Avaliaram-se 82 locos de microssatélites, sendo 42 analisados em gel de poliacrilamida corado com prata e 40 por seqüenciamento automático (Apêndices A e B, respectivamente) Os locos foram escolhidos de modo a serem distribuídos aleatoriamente nos 10 grupos de ligações existentes no mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004).

Para amplificação do DNA, nas análises em gel de poliacrilamida corados com prata, as reações de PCR foram preparadas com volume final de 13  $\mu$ l, contendo 15 ng de DNA genômico, 100  $\mu$ M de cada dNTP; 0,2  $\mu$ M de cada *primer*; tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % Triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), utilizando programas do tipo *touch down*, conforme temperatura de anelamento de cada *primer* (Apêndice A e B), programado inicialmente com um ciclo a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 46°C ou 51°C por 60 s e 72°C por 60 s. No final dos ciclos, ocorria uma extensão final de 72°C a 60 s por mais 30 min (CRESTE et al. 2001).

Para análise dos locos microssatélites por seqüenciamento automático, as reações de PCR foram conduzidas para cada par de *primer* específico da mesma forma como anteriormente mencionado. Nesse caso, os *primers forward* continham a cauda equivalente de cada fluorescência (OETTING et al. 1995), e a cada reação era adicionado um dos três *primers* marcados com uma das fluorescências na concentração final de 0,02  $\mu$ M, de acordo com a classe de tamanho dos alelos esperados. Os primers marcados com fluorescência foram ORY5437 - FAM(5'GACTATGGGCGTGAGTGCAT3'), OG8S1132 - HEX (5'GGCTAGGAAAGGTTAGTGCC3') ou OSD12 - NED (5'ACCAACCTAGGAAACACAGT 3'), de acordo com Missiaglia (2005).

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida ou seqüenciamento automático. As análises dos fragmentos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata seguiram protocolo proposto por Creste et al. (2001). Para as corridas de eletroforese, utilizaram-se cubas de sequenciamento S2001 *Life Technologies* Mod. e SQ3 Hoefer Mod. Os produtos amplificados foram separados em gel de 7 % de poliacrilamida desnaturante (7 M uréia). Previamente, realizou-se uma pré-corrída de aquecimento de 70 W por 60 min. As amostras foram desnaturadas com 7 µl do tampão de carregamento (95 % formamida, 0,05 % xileno cyanol; 0,05 % azul de bromofenol; 12,5 % sacarose; 10 mM NaOH) a 94<sup>0</sup> C por 4 min e mantidas em gelo até o carregamento no gel. Aplicaram-se 7 µl das amostras por poço, sendo que cada gel possuía uma capacidade para 54 amostras. As corridas de eletroforese dos fragmentos foram realizadas a uma potência de 40 W por dez min, sendo em seguida alterada para 50 W por 120 min para fragmentos até 280 pb e por 160 min para fragmentos iguais ou acima de 290 pb.

Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com base em padrão molecular 10 pb DNA Ladder (Invitrogen). Cada gel possuía duas canaletas com padrão de peso molecular, sendo uma no início do gel e outra no final. Este procedimento foi realizado de modo a diminuir o efeito das distorções das corridas das amostras nos géis, provocadas por fatores outros que não fossem os tamanhos dos fragmentos.

As análises dos fragmentos no sequenciador automático foram realizadas após conduzir as amplificações em paralelo com três locos distintos de microssatélites. De acordo com o tamanho esperado do fragmento amplificado, uma alíquota de 1 µl foi retirada de cada reação para o mesmo genótipo, totalizando 3 µl, que foram misturados a 12 µl de *Hi-Di formamide* (Applied Biosystems) e 0,5 µl de marcador de peso molecular (35-500 pb) ROX-500 *size standard* (Applied Biosystems) na concentração original de 8 nM. Essa mistura era então desnaturada a 94°C por cinco min em termociclador e logo após mantida em gelo. As amostras eram então levadas para o analisador automático de capilar ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem) e as corridas resultantes foram analisadas pelos programas GeneScan<sup>®</sup> e Genotyper<sup>®</sup>.

### 2.2.4.3 Construção dos mapas de ligação

Os mapas de ligação foram construídos a partir das análises de 166 indivíduos do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208' e 130 indivíduos para o 'ICS 39 x CAB 0214'.

As análises de ligação e a determinação da ordem dos marcadores foi feita com o auxílio do programa JoinMap 3.0<sup>®</sup> (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001). O mapeamento foi realizado utilizando o procedimento "CP" (*Cross Pollinators*), que é recomendado pelo programa para o mapeamento de populações resultantes dos cruzamentos entre genitores heterozigotos, cujas fases de ligação dos locos são desconhecidas. Pelo fato de terem sido utilizados marcadores do tipo microssatélites, que são co-dominantes, foram avaliadas três tipos de segregações genótípicas nos locos das populações. Para os locos em que os genitores apresentavam os <nn x np> e <lm x ll> foi esperada uma segregação de 1:1 (nn, np) e (ll, im), para cada classe genotípica das progênies, nos locos <hk x hk> a segregação esperada foi de 1:2:1 (hh, hk, kk) e nos locos <ef x eg> (ee, ef, eg, fg) e <ab x cd> (ac, ad, bc, bd) a segregação de 1:1:1:1 nas classes dos genótipos das progênies. A verificação das segregações das classes genótípicas de cada loco foi realizada através do teste "qui-quadrado" ( $\chi^2$ ), sendo que os locos que apresentavam grandes distorções nas segregações Mendelianas eram descartados para as análises de ligações. As marcas foram agrupadas utilizando-se LOD mínimo de 4,0, e para o ordenamento destas utilizou-se LOD mínimo de 2,0 e fração máxima de recombinação de 0,40. A conversão das freqüências de recombinação em distâncias de mapa em centiMorgans (cM) foi feita através da função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

### 2.2.4.4 Detecção de QTLs associados à resistência a *C. pernicioso*

As fenotipagens dos níveis de resistência a *C. pernicioso* das progênies das populações contrastantes foram realizadas no campo através de inoculações controladas no período de abril a junho de 2005. Duas semanas antes das inoculações as copas das plantas foram podadas a fim de estimular a emissão de novos brotamentos. Com auxílio de micropipetas depositaram-se nas axilas das folhas de



ramos jovens, 30  $\mu$ l de uma suspensão de  $1 \times 10^5$  basidiósporos / ml de *C. perniciosa*. Em cada planta foram inoculados quatro ramos, sendo estes em seguida etiquetados e cobertos com sacos plásticos transparentes umedecidos com água destilada. Um total de 109 plantas no cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208' e 100 do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0214' foram inoculadas. Como controle da efetividade do método de inoculação, foram utilizadas 101 plantas de 'PA 195 x ICS 39', que encontravam-se alternadas às plantas dos cruzamentos analisados. Após 40 dias das inoculações, procederam-se às avaliações utilizando-se a variável número de ramos infectados por planta.

A localização dos QTLs associados à resistência a *C. perniciosa* nos mapas de ligação das populações 'ICS 39 x CAB 0208' e 'ICS 39 x CAB 0214' foi realizada com o auxílio do programa MAPQTL<sup>TM</sup>. Dois métodos de mapeamento por intervalos foram empregados para detecções e localizações dos QTLs, sendo eles o Mapeamento por Intervalo Simples (SIM) (LANDER; BOTSTEIN, 1989) e o Mapeamento por Intervalo Composto (JANSEN, 1993, 1994).

### 2.2.5 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacauero selecionados como resistentes a *C. pernicioso*

Foram analisados 87 acessos de cacauero (Tabela 3), sendo 78 selecionados por agricultores em plantios comerciais na região Sul da Bahia com base nos critérios de resistência a *C. pernicioso* e produtividade; os clones ‘CAB 0208’ e ‘CAB 0214’ resistentes a *C. pernicioso* do banco de germoplasma da CEPLAC-ERJOH e sete acessos do banco de germoplasma do CEPLAC-CEPEC, sendo cinco utilizados como candidatos a genitores dos acessos selecionados pelos agricultores e dois como controle das análises. Os clones candidatos a genitores foram ‘ICS 1’, ‘ICS 6’, ‘SCA 6’, ‘SIC 824’ e ‘SIAL 70’ escolhidos por terem sido freqüentemente utilizados pela CEPLAC como genitores no seu programa de produção de sementes híbridas de cacauero no Sul da Bahia (YAMADA et al., 2001). Como controle, utilizaram-se os híbridos ‘TSH 516’ e ‘Theobahia’, cujos genitores conhecidos são o ‘ICS 1’ e ‘SCA 6’.

Tabela 3 - Relação dos 87 acessos utilizados nas análises de genealogia e similaridade genética de clones de cacauero selecionados como resistentes a *Crinipellis pernicioso*

(continua)

Clones plantio comercial	Clones plantio comercial	Clones plantio comercial	Clones CEPEC	Clones ERJOH
ALV0214	MC 04	SM 06	ICS 1	CAB 208
ALV1102	MC 23	SP 50	ICS 6	CAB 214
AME02	MC 36	SR 01	SCA 6	
BB1392	Minaouro 01	STAEUL 01	SIAL 70	
BB97	NO 83	SV 02	SIC 824	
BE007	PH 15	TR 15	Theobahia	
BE 71	PH 60	VB 03	TSH 516	
BE 79	PH 96	VB 1128		
BJ 11	PS 0106	VB 1139		
CA 14	PS 1030	VB 1142		
CA 71	PS 1712	VB 1144		
FA 13	PS 1817	VB 1151		
FB 28	PS 1910	VB 1154		
FB 30	PS 2006	VB 1156		
FCONV 150	PS 4007	VB 1159		
FF 01	PS 4828	VB 1160		
FL 57	PS 5101	VB 184		
FM 31	PS 5302	VB 515		
FO 242	PS 5702	VB 547		
FO 50	PS 5704	VB 679		

Tabela 3 - Relação dos 87 acessos utilizados nas análises de genealogia e similaridade genética de clones de cacaueteiro selecionados como resistentes a *Crinipellis pernicioso*

(conclusão)				
Clones plantio comercial	Clones plantio comercial	Clones plantio comercial	Clones CEPEC	Clones ERJOH
FSR 02	PS 5705	VB 841		
HW 25	PS 57111	VB 900		
HW 96	PS 57139			
LIB 366	PS 5784			
LP 13	SB 24			
LP 24	SC 94			
MC 01	SL 70			
MC 03	SL 71			

As extrações, quantificações dos DNA genômicos e reações de PCR foram realizadas conforme o item 2.2.4.2. Foram genotipados 20 locos de microssatélites (Apêndice C), cujos fragmentos foram analisados em gel poliacrilamida corados com solução de nitrato de prata.

Realizaram-se duas análises, uma buscando identificar a genealogia dos clones selecionados pelos agricultores em relação a 'SCA 6', 'CAB 0208', 'CAB 0214', (Alto Amazônicos), a 'SIAL 70' e 'SIC 824' (Baixo Amazônicos) e a 'ICS 6' e 'ICS 1' (Trinitários) e outra para definir a similaridade genética entre estes clones.

### 2.2.5.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores

As análises de paternidade foram baseadas no cálculo da taxa de probabilidade de cada indivíduo candidato a genitor ser o verdadeiro genitor de um outro escolhido ao acaso na amostra. As análises de paternidade (ou maternidade) foram calculadas utilizando o programa estatístico CERVUS 2.0 (MARCHALL et al., 1998). O programa CERVUS 2.0 calcula para cada um dos locos uma razão entre as probabilidades de duas hipóteses alternativas para cada candidato a genitor, de modo que a razão de máxima verossimilhança é  $LR = H_{(1)} / H_{(0)}$ , em que a hipótese  $H_{(1)}$  representa o candidato é verdadeiro genitor e  $H_{(0)}$  representa um candidato a genitor de ocorrência aleatória na população amostra. Um  $LR$  total para cada candidato é calculado por multiplicação dos  $LR$  de cada loco individual, assumindo-se segregação independentes

entre locos (locos em equilíbrio de ligação). O logaritmo natural ( $\log_e$ ) deste  $LR$  total é denominado de  $LOD$ -score (MEAGHER, 1986).  $LOD$ -score positivo implica dizer que o candidato é mais provável de ser o verdadeiro genitor do que um outro indivíduo selecionado aleatoriamente. Quando dois ou mais candidatos apresentam um  $LOD$ -score positivo, uma estatística Delta ( $\Delta$ ) foi aplicada, definida como a diferença do  $LOD$ -score entre o mais provável candidato a genitor (maior  $LOD$ -score positivo) e o segundo mais provável genitor (segundo maior  $LOD$ -score positivo). A significância dos valores de  $\Delta$  são acessadas por testes de paternidade simulados pelo programa. A simulação baseia-se nas freqüências alélicas observadas na população para simular dados genéticos e conduzir testes de paternidade para um grande número de descendentes, com o objetivo de gerar distribuições do  $\Delta$ . As simulações levam em conta o número de candidatos a pai, a proporção amostrada de candidatos a genitores (estimados a partir de dados de campo), a proporção de locos que foram genotipados nos indivíduos e a freqüência de erros de genotipagem. A etapa final da simulação é gerar valores críticos de  $\Delta$ , de modo que a significância dos valores de  $\Delta$  encontrados nos testes de paternidade conduzidos na população estudada possa ser determinada. O genitor com o maior  $LOD$ -score será assinalado como o verdadeiro pai se a diferença entre o seu  $LOD$ -score e o do segundo candidato a genitor ( $\Delta$ -score) for maior do que o  $\Delta$  crítico. Neste trabalho foram usados os limites de 99% e 95% como níveis estritos e relaxados de confiança. Um  $\Delta$  crítico foi calculado para cada nível de confiança. Os parâmetros usados nas inferências de paternidade com o programa CERVUS foram os seguintes: admitiu-se que o tamanho da vizinhança reprodutiva era de 10 árvores, que a proporção de candidatos a pais era de 50% e que a taxa de erro de genotipagem foi de 0,01. Foram usadas 30.000 repetições nas simulações e os níveis de confiança restrito de 99% e relaxado de 95% para determinar o verdadeiro parental paterno.

O grau de parentesco entre indivíduos foi determinado com base no cálculo do coeficiente de coancestria. Este coeficiente mede a probabilidade de amostrar dois alelos homólogos em dois indivíduos e esses serem idênticos por descendência a um alelo de um antecessor recente. Em espécies arbóreas de cruzamento, como é o caso do cacaueteiro, o coeficiente de coancestria para irmãos de autofecundação é de 0,5; 0,25 irmãos completos; 0,125 meios irmãos; 0,25 pais e filhos e 0,0625 primos de

primeiro grau. O estimador multiloco do coeficiente de coancestria entre cada par de indivíduos, foi baseado em método desenvolvido por Loiselle et al (1995), definido para cada  $k$  alelo em cada par de indivíduos,  $x$  e  $y$ , como:

$$\hat{\theta}_{xy} = \frac{(p_x - \bar{p}_k)(p_y - \bar{p}_k)}{\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)} + \frac{1}{n-1}$$

onde,  $p_x$  e  $p_y$  são as freqüências do alelo  $k$  nos indivíduos  $x$  e  $y$  (assumindo valores de 0, 0,5 e 1 em indivíduos homozigotos para o alelo alternativo, heterozigotos e homozigotos para o alelo sob consideração, respectivamente) e  $\bar{p}_k$  é a média da freqüência do alelo  $k$  na subpopulação com tamanho amostral  $n$ . As estimativas da média multiloco foram calculadas pela ponderação de  $\theta_{xy}$  em função do índice de polimorfismo de cada alelo  $k$   $\bar{p}_k(1 - \bar{p}_k)$ . A significância estatística dos valores de  $\theta_{xy}$  foram testadas pelo cálculo do erro padrão da média a 95% de probabilidade (1,96EP). O coeficiente de coancestria e o erro padrão foram estimados usando o programa SPAGeDi versão 1.1 (HARDY; VEKEMANS, 2003).

### 2.2.5.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados

Para avaliar as relações genéticas entre os acessos selecionados utilizou-se o método de fatorial de correspondência. Para isto, montou-se uma matriz com os dados de genotipagem de cada clone assumindo-se os scores 0, 1 e 2, para alelo ausente, em heterozigose, e homozigose, respectivamente, verificado em cada um dos 20 locos de microssatélites utilizados. Com base nessa matriz foi feita a análise de similaridade e de componentes principais. Os resultados foram apresentados na forma de um diagrama bidimensional construído com o auxílio do programa Genetix 4.0<sup>®</sup>.

## **2.3 Resultados e Discussão**

### **2.3.1 Avaliação da resistência dos genótipos de cacauero a *C. pernicioso***

#### **2.3.1.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial**

Foram observadas diferenças significativas entre as famílias de cacauero quanto aos níveis de resistência a *C. pernicioso* em todos os ensaios realizados em casa de vegetação (Apêndices D ao K).

No ensaio 1 (Tabela 4) foram verificadas diferenças significativas entre os contrastes das médias da família suscetível de referência 'Catongo' com as demais famílias, apenas quando se utilizou a variável proporção de plântulas com sintomas. Entretanto, para efeito de seleção de genótipos de cacauero resistentes a *C. pernicioso*, os resultados das análises desta variável mostram-se inconsistentes, com a testemunha suscetível 'Catongo' apresentando uma baixa incidência de plântulas com sintomas (11%), inferior ao observado para testemunha de resistência SCA 12 (21%). Esta baixa incidência de infecção verificada na testemunha de suscetibilidade foi provavelmente ocasionada por falhas durante a etapa de inoculação das plântulas.

As análises dos contrastes das médias das variáveis proporção de plântulas com vassoura terminal e proporção de plântulas com vassoura axilar, não foram capazes de distinguir famílias diferentes da família de referência 'Catongo', em função da baixa incidência destes tipos de sintomas em todas as famílias avaliadas (Tabela 4).

Em função da inconsistência dos resultados das análises dos contrastes entre as médias das famílias do ensaio 1, os resultados deste experimento foram desprezados.

Tabela 4 – Contrastes entre as médias da família de referência ‘Catongo’ e demais famílias de cacauero do ensaio 1 para as variáveis proporções de plântulas com sintomas, de plântulas com vassouras terminais, de plântulas com vassouras axilares. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

(continua)								
Família	SINT <sup>+</sup> (%)	Catongo <sup>++</sup>	Família	VT <sup>+</sup> (%)	Catongo <sup>++</sup>	Família	VA <sup>+</sup> (%)	Catongo <sup>++</sup>
SCA 12	21,0	0,038*	SCA 12	10,0	0,997	Theobahia	10,0	0,997
CAB 0232	15,0	0,089	Theobahia	9,0	0,997	SCA 12	8,0	0,13
CAB 0410	14,0	0,116	SCA 6	6,0	0,997	CAB 0232	7,0	0,145
CAB 0327	14,0	0,116	CAB 0232	6,0	0,997	SCA 6	6,0	1,000
CAB 0531	13,0	0,151	CAB 0327	4,0	0,997	CAB 0352	6,0	0,188
CAB 0352	13,0	0,151	CAB 0352	4,0	0,997	CAB 0327	4,0	0,334
Theobahia	12,0	0,992	CAB 0260	3,0	1,000	CAB 0410	4,0	0,334
SCA 6	11,0	0,509	CAB 0307	3,0	0,997	CAB 0371	4,0	0,334
CAB 0260	11,0	0,321	CAB 0410	2,0	0,997	Catongo	4,0	—
CAB 0371	11,0	0,321	CAB 0531	2,0	0,997	CAB 0260	3,0	0,458
CAB 0275	11,0	0,416	CAB 0371	2,0	0,997	CAB 0531	3,0	0,458
CAB 0307	11,0	0,526	CAB 0310	2,0	0,997	CAB 0307	2,0	0,641
Catongo	11,0	—	CAB 0992	2,0	0,997	CAB 0310	2,0	0,641
CAB 0332	11,0	0,815	CAB 0275	1,0	0,997	CAB 0334	2,0	0,641
CAB 0233	1,0	0,992	Catongo	1,0	—	CAB 0309	2,0	0,636
CAB 0219	1,0	0,814	CAB 0332	1,0	0,997	CAB 0992	1,0	0,916
CAB 0334	1,0	0,814	CAB 0219	1,0	0,997	CAB 0219	1,0	0,916
CAB 0208	1,0	0,642	CAB 0334	1,0	0,997	CAB 0208	1,0	0,901
CAB 0310	1,0	0,614	CAB 0208	1,0	0,997	CAB 0275	0,0	0,689
CAB 0213	1,0	0,425	CAB 0309	1,0	0,997	CAB 0332	0,0	0,689
CAB 0992	1,0	0,425	CAB 0233	0,0	1,000	CAB 0233	0,0	0,996

Tabela 4 – Contrastes entre as médias da família de referência ‘Catongo’ e demais famílias de cacauero do ensaio 1 para as variáveis proporções de plântulas com sintomas, de plântulas com vassouras terminais, de plântulas com vassouras axilares. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

						(conclusão)		
Família	SINT <sup>†</sup> (%)	Catongo <sup>††</sup>	Família	VT <sup>†</sup> (%)	Catongo <sup>††</sup>	Família	VA <sup>†</sup> (%)	Catongo <sup>††</sup>
CAB 0309	1,0	0,267	CAB 0213	0,0	1,000	CAB 0213	0,0	0,996
CAB 0388	1,0	0,266	CAB 0388	0,0	1,0	CAB 0388	0,0	0,694
CAB 0270	1,0	0,143	CAB 0270	0,0	1,0	CAB 0270	0,0	0,689

Códigos de significância : '\*\*\*' P< 0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

<sup>†</sup> Proporção de plântulas com sintomas (SINT), com vassoura terminal (VT) e com vassoura axilar (VA)

<sup>††</sup> Valor – P Referência



No ensaio 2, para as 16 famílias dos acessos CABs foi possível verificar diferentes níveis de resistência a *C. pernicioso* em todas as variáveis (Tabela 5, 6 e 7). Utilizando-se a variável de plântulas com sintomas, os contrastes realizados permitiram distinguir dez famílias com níveis de resistência a *C. pernicioso* superiores a família de 'Catongo'. Dentre estas famílias, a de CAB '0208' foi uma das que apresentou menor proporção de plântulas infectadas (18%), não diferindo estatisticamente das famílias das testemunhas de resistência 'SCA 12' (13%) e 'SCA 6' (28%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Contrastes entre as médias das famílias de referência 'Catongo' e 'CAB 0208' e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 2 para variável proporção de plântulas com sintomas. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Família	SINT <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB0208 <sup>++</sup>
CAB 0356	64,0	18,0	18,0	0,133	6,8 x 10 <sup>-07***</sup>
CAB 0327	58,0	16,5	16,2	0,426	1,1 x 10 <sup>-05***</sup>
Catongo	51,0	14,5	14,2	—	1,9 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0364	48,0	13,5	13,5	0,766	5,1 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0328	43,0	12,0	12,0	0,371	3,2 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0383	41,0	11,2	11,5	0,313	4,7 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0334	4,0	11,5	11,2	0,233	7,5 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0992	39,0	11,0	11,0	0,196	9,8 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0160	38,0	10,5	10,7	0,163	0,012*
CAB 0329	32,0	8,2	8,5	0,040*	0,071
CAB 0221	31,0	8,5	8,5	0,020*	0,087
CAB 0233	29,0	8,5	8,5	0,016*	0,132
SCA 6	28,0	8,0	8,0	0,012*	0,162
CAB 0153	27,0	7,5	7,7	0,009**	0,196
CAB 0388	26,0	7,5	7,5	0,005**	0,271
CAB 0219	21,0	5,7	5,7	6,0 x 10 <sup>-04***</sup>	0,706
CAB 0486	19,0	5,5	5,5	4,2 x 10 <sup>-04***</sup>	0,799
CAB 0208	18,0	5,2	5,0	1,9 x 10 <sup>-04***</sup>	—
SCA 12	13,0	3,7	3,7	2,6 x 10 <sup>-05***</sup>	0,496

Códigos de significância : '\*\*\*' P<0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

<sup>+</sup> Proporção de plântulas com sintomas (SINT)

<sup>++</sup> Valor – P Referência

Resultados semelhantes foram constatados para os contrastes entre as médias das famílias para as variáveis plântulas com vassouras terminais (Tabela 6) e plântulas com vassouras axilares (Tabela 7), onde as proporções de plântulas de 'CAB 0208' com

estes tipos de sintomas foram bastante pequenas (10 e 6%, respectivamente), sendo significativamente menores que as de 'Catongo' (41 e 42%, respectivamente) e não diferindo das testemunhas de resistência 'SCA 6' (14 e 15%, respectivamente) e 'SCA 12' (5 e 5%, respectivamente).

Tabela 6 – Contrastes entre as médias das famílias de referência 'Catongo' e 'CAB 0208' e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 2 para variável proporção de plântulas com vassoura terminal. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Família	VT <sup>+</sup> (%)	Média Ajustada	Média Observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB 0208 <sup>++</sup>
CAB 0356	45,0	13,0	13,0	0,619	4,9 x 10 <sup>-05***</sup>
Catongo	41,0	11,7	11,7	—	2,3 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0364	40,0	11,5	11,5	0,92	3,2 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0327	38,0	10,7	10,7	0,687	7,9 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0383	34,0	9,7	9,5	0,4	2,8 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0334	34,0	9,7	9,7	0,418	2,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0160	30,0	8,5	8,5	0,183	9,7 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0328	28,0	8,0	8,0	0,123	0,016*
CAB 0992	24,0	6,7	6,7	0,037*	0,056
CAB 0221	23,0	6,2	6,5	0,028*	0,072
CAB 0153	21,0	6,2	6,0	0,016*	0,113
CAB 0233	20,0	6,0	5,7	0,012*	0,141
CAB 0329	15,0	4,0	4,2	2,8 x 10 <sup>-03**</sup>	0,388
SCA 6	14,0	4,2	4,2	1,5 x 10 <sup>-03**</sup>	0,465
CAB 0388	14,0	4,2	4,2	1,6 x 10 <sup>-03**</sup>	0,454
CAB 0486	14,0	4,2	4,2	1,5 x 10 <sup>-03**</sup>	0,465
CAB 0219	13,0	3,7	3,7	7,3 x 10 <sup>-04***</sup>	0,65
CAB 0208	10,0	3,0	3,0	2,3 x 10 <sup>-04***</sup>	—
SCA 12	5,0	1,2	1,5	4,6 x 10 <sup>-05***</sup>	0,285

Códigos de significância : ' \*\*\* ' P < 0,001, ' \*\* ' P < 0,01, ' \* ' P < 0,05, ' ! ' P < 0,1

<sup>+</sup> Proporção de plântulas com vassoura terminal (VT)

<sup>++</sup> Valor – P Referência

Tabela 7 – Contrastes entre as médias das famílias de referência ‘Catongo’ e ‘CAB 0208’ e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 2 para variável proporção de plântulas com vassoura axilar. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Família	VA <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB 0208 <sup>++</sup>
CAB 0356	55,0	15,7	15,75	0,159	1,61 x 10 <sup>-06***</sup>
CAB 0327	51,0	14,7	14,5	0,346	6,45 x 10 <sup>-06***</sup>
Catongo	42,0	12,0	12,0	—	8,9 x 10 <sup>-05***</sup>
CAB 0334	35,0	10,0	10,0	0,441	6,5 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0364	33,0	9,5	9,5	0,334	1,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0383	30,0	8,7	8,5	0,191	2,5 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0328	26,0	7,5	7,5	0,077	7,1 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0160	24,0	6,7	6,7	0,038*	0,014*
CAB 0992	23,0	6,7	6,7	0,038*	0,014*
CAB 0233	21,0	6,0	6,0	0,017*	0,029*
CAB 0153	19,0	5,2	5,5	9,6 x 10 <sup>-03**</sup>	0,046*
CAB 0388	16,0	4,5	4,5	2,9 x 10 <sup>-03**</sup>	0,109
CAB 0329	15,0	4,2	4,2	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,119
SCA 6	15,0	4,5	4,5	2,7 x 10 <sup>-03**</sup>	0,113
CAB 0486	12,0	3,5	3,5	6,8 x 10 <sup>-04***</sup>	0,269
CAB 0221	10,0	3,0	3,0	3,4 x 10 <sup>-04***</sup>	0,405
CAB 0219	8,0	2,2	2,0	1,0 x 10 <sup>-04***</sup>	0,851
CAB 0208	6,0	1,7	1,7	8,9 x 10 <sup>-05***</sup>	—
SCA 12	5,0	1,2	1,5	8,0 x 10 <sup>-05***</sup>	0,841

Códigos de significância : '\*\*\*' P<0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

<sup>+</sup> Proporção de plântulas com vassoura axilar (VA)

<sup>++</sup> Valor – P Referência

No ensaio 3, para os contrastes de médias realizados entre as onze famílias dos acessos CABs com a variável plântulas com sintomas, a família de ‘CAB 0214’, com 13% das suas plântulas apresentando incidência de sintomas da doença, foi a que apresentou o maior nível de resistência a *C. pernicioso*, não diferindo significativamente das famílias das testemunhas de resistência ‘SCA 6’, ‘SCA 12’ e ‘Theobahia’ (Tabela 8).

Tabela 8 – Contrastes entre as médias das famílias de referência ‘Catongo’, ‘CAB 0214’ e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 3 para variável proporção de plântulas com sintomas. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Família	SINT <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB 0214 <sup>++</sup>
Catongo	71,0	20,0	20,0	—	3,2 x 10 <sup>-05***</sup>
CAB 0501	69,0	19,5	19,2	0,797	2,8 x 10 <sup>-05***</sup>
CAB 0148	54,0	15,2	15,2	0,193	2,0 x 10 <sup>-05***</sup>
CAB 0180	51,0	14,2	14,2	0,122	5,0 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0153	49,0	13,7	13,7	0,090	9,0 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0198	49,0	13,7	13,7	0,090	9,0 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0193	48,0	12,7	12,7	0,091	1,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0160	47,0	13,2	13,2	0,073	1,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0181	40,0	11,2	11,2	0,023*	8,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0012	40,0	11,5	11,2	0,024*	7,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0186	35,0	9,75	9,7	9,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,025*
Theobahia	37,0	7,5	7,5	6,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,194
SCA 12	23,0	6,5	6,5	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,321
SCA 6	18,0	5,5	5,5	1,0 x 10 <sup>-04***</sup>	0,194
CAB 0214	13,0	3,7	3,7	3,2 x 10 <sup>-05***</sup>	—

Códigos de significância : ' \*\*\* ' P < 0,001, ' \*\* ' P < 0,01, ' \* ' P < 0,05, ' ! ' P < 0,1

<sup>+</sup> Proporção de plântulas com sintomas (SINT)

<sup>++</sup> Valor – P Referência

Quando foram analisados os contrastes das médias das famílias para as variáveis plântulas com vassoura terminal e plântulas com vassoura axilar, constatou-se que a grande maioria das famílias da série ‘CAB’ apresentou nível de infecção inferior ao verificado para testemunha ‘Catongo’. Dentre as famílias de ‘CAB’, a de ‘CAB 0214’ foi a que apresentou menor incidência destes tipos de sintomas, não diferindo, entretanto, de outras famílias desta série e das testemunhas de resistência (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Contrastes entre as médias das famílias de referência 'Catongo' e 'CAB 0214' e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 3 para variável proporção de plântulas com vassoura terminal. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Família	VT <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB 0214 <sup>++</sup>
Catongo	35,0	10,0	10,0	—	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0198	21,0	5,7	6,0	0,2	0,03*
CAB 0180	20,0	5,7	5,7	0,17	0,04*
CAB 0501	18,0	5,2	5,2	0,11	0,069
CAB 0148	15,0	4,5	4,5	0,06	0,138
CAB 0181	15,0	4,5	4,5	0,06	0,138
CAB 0153	13,0	3,7	3,7	0,02*	0,269
CAB 0160	13,0	4,0	4,0	0,03*	0,217
CAB 0012	13,0	3,7	3,7	0,03*	0,26
Theobahia	12,0	3,5	3,5	0,04*	0,463
CAB 0193	10,0	2,7	3,0	0,017*	0,42
SCA 6	8,0	2,5	2,5	0,02*	0,83
CAB 0186	6,0	1,7	1,7	2,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,853
CAB 0214	6,0	1,7	2,0	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>	—
SCA 12	2,0	0,5	0,5	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,31

Códigos de significância : ' \*\*\* ' P< 0,001, ' \*\* ' P< 0,01, ' \* ' P< 0,05, ' ! ' P<0,1

<sup>+</sup> Proporção de plântulas com vassoura terminal (VT)

<sup>++</sup> Valor – P Referência

Tabela 10 – Contrastes entre as médias das famílias de referência 'Catongo' e 'CAB 0214' e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 3 para variável proporção de plantas com vassoura axilar. CEPLAC-CEPEC-BA, Ilhéus-BA

(continua)					
Família	VA <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	Catongo <sup>++</sup>	CAB 0214 <sup>++</sup>
Catongo	49,0	14,0	14,0	—	1,0 x 10 <sup>-04***</sup>
CAB 0501	34,0	10,0	9,7	0,168	2,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0180	26,0	7,5	7,5	0,03*	0,027*
CAB 0148	23,0	6,5	6,5	0,012*	0,07
CAB 0160	23,0	6,5	6,5	0,012*	0,07
CAB 0198	22,0	6,5	6,5	0,012*	0,07
CAB 0012	21,0	6,0	6,0	7,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,11

Tabela 10 – Contrastes entre as médias das famílias de referência ‘Catongo’ e ‘CAB 0214’ e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 3 para variável proporção de plantas com vassoura axilar. CEPLAC-CEPEC-BA, Ilhéus-BA

Família	VA <sup>+</sup> (%)	Média ajustada	Média observada	(conclusão)	
				Catongo <sup>++</sup>	CAB 0214 <sup>++</sup>
CAB 0181	20,0	5,7	5,7	5,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,14
CAB 0153	20,0	5,7	5,7	2,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,14
CAB 0193	18,0	4,7	5,0	4,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,194
Theobahia	15,0	4,5	4,5	7,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,453
SCA 12	12,0	3,5	3,5	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>	0,774
CAB 0186	11,0	3,0	3,2	2,0 x 10 <sup>-04***</sup>	0,866
CAB 0214	10,0	3,0	3,0	1,0 x 10 <sup>-04***</sup>	—
SCA 6	8,0	2,5	2,5	1,0 x 10 <sup>-04***</sup>	0,818

Códigos de significância : '\*\*\*\*' P<0,001, '\*\*\*' P< 0,01, '\*\*' P< 0,05, '.' P<0,1

<sup>+</sup>Proporção de plântulas com vassoura axilar (VA)

<sup>++</sup>Valor – P Referência

No ensaio 4 todas as variáveis foram capazes de distinguir diferenças entre os níveis de resistência das treze famílias de cacaueteiro. Quando se analisaram os contrastes de médias utilizando-se como família de referência a testemunha suscetível ‘Catongo’, a variável plântulas com sintomas distinguiu dois grupos de famílias quanto à proporção de plântulas com sintomas. O grupo dos genótipos com maior proporção de plântulas com sintomas foi composto pelas famílias oriundas do cruzamento controlado entre os clones cacaueteiro suscetíveis a *C. pernicioso* ‘PA 195 x ICS 39’, de ‘Catongo’ e das progênies de ‘CAB 0313’ e ‘CAB 0049’. A proporção de plântulas infectadas variou de 91% a 79% dentro deste grupo (Tabela 11). No outro extremo, o grupo de genótipos de cacaueteiro com menor proporção de plântulas infectadas foram as famílias provenientes dos cruzamentos controlados entre os clones ‘CAB 0208’ e ‘CAB 0214’ ou famílias destes clones originadas de polinizações abertas. Dentro deste grupo, a incidência de plântulas infectadas variou de 27% para o cruzamento ‘PA 195 x CAB 0208’ até 8% no cruzamento ‘CAB 0208 x CAB 0214’. A proporção de plântulas infectadas do cruzamento ‘PA 195 x CAB 0208’ não diferiu das famílias de ‘CAB 0208’, ‘CAB 0214’ e ‘PA 195 x CAB 0208’, no entanto, foram inferiores ao constatado para o

cruzamento entre clones suscetíveis 'PA 195' x 'ICS 39' e 'Catongo' (Tabela 11). Famílias dos cruzamentos 'CAB 0214 x ICS 39' e 'CAB 0208 x CAB 0214' apresentaram as menores incidências de plântulas com sintomas, sendo estatisticamente diferentes das demais famílias (Tabela 11).

O mesmo comportamento foi verificado para a comparação das médias das famílias para a variável plântulas com vassoura terminal, onde as famílias que possuíam menores proporções deste tipo de sintoma foram as provenientes dos clones 'CAB 0208' ou 'CAB 0214' (Tabela 12).

Tabela 11 – Contrastes entre as médias das famílias de referência ‘Catongo’, ‘PA 195 x CAB 0208’, ‘CAB 0214 x ICS 39’, ‘CAB 0208 x CAB 0214’ e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 4 para variável proporção de plântulas com sintomas. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Família	SINT <sup>+</sup> %	Média ajust <sup>++</sup>	Média obs <sup>++</sup>	Catongo <sup>+++</sup>	PA195xCAB 208 <sup>+++</sup>	CAB 0214xICS 39 <sup>+++</sup>	CAB 0208xCAB 214 <sup>+++</sup>
PA 195 x ICS39	91,0	22,0	22,0	0,406	$4,63 \times 10^{-15***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$
Catongo	88,0	22,0	22,0	—	$4,60 \times 10^{-15***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$
CAB 0313	84,0	20,2	20,2	0,563	$7,14 \times 10^{-14***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$	$< 2,00 \times 10^{-16***}$
CAB 0049	79,0	19,3	19,3	0,108	$4,89 \times 10^{-10***}$	$1,99 \times 10^{-15***}$	$1,65 \times 10^{-15***}$
CAB 0270 xICS 39	62,0	15,7	15,5	$5,26 \times 10^{-08***}$	$1,14 \times 10^{-16***}$	$4,68 \times 10^{-12***}$	$3,71 \times 10^{-12***}$
ICS 39 x CAB 0270	48,0	12,0	12,0	$5,26 \times 10^{-08***}$	$7,00 \times 10^{-3**}$	$2,03 \times 10^{-7***}$	$1,15 \times 10^{-7***}$
CAB 0208 x PA 195	33,0	8,3	8,3	$6,45 \times 10^{-12***}$	0,443	$2,00 \times 10^{-4***}$	$1,20 \times 10^{-4***}$
CAB 0191	29,0	7,3	7,3	$4,52 \times 10^{-13***}$	0,833	$1,30 \times 10^{-03**}$	$7,20 \times 10^{-4***}$
PA 195 x CAB 0208	27,0	6,7	6,7	$4,60 \times 10^{-15***}$	—	$1,50 \times 10^{-03**}$	$8,00 \times 10^{-4***}$
CAB 0214	26,0	6,7	6,7	$2,05 \times 10^{-15***}$	0,872	$2,00 \times 10^{-03**}$	$1,20 \times 10^{-03**}$
CAB 0208	25,0	5,7	5,7	$5,75 \times 10^{-15***}$	0,819	$3,00 \times 10^{-03**}$	$1,80 \times 10^{-03**}$
CAB 0214 x ICS 39	9,0	2,0	2,2	$< 2,00 \times 10^{-16***}$	$1,50 \times 10^{-3**}$	—	0,7998
CAB 0208 x CAB 0214	8,0	2,0	2,0	$< 2,00 \times 10^{-16***}$	$8,00 \times 10^{-4***}$	0,7998	—

Códigos de significância : '\*\*\*' P<0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

\*Proporção de plântulas com sintomas (SINT)

\*\* Média ajustada; Média observada.

+++Valor – P Referência



Tabela 12– Contrastes entre as médias das famílias de referência ‘Catongo’, ‘PA 195 x CAB 0208’, ‘CAB 0214 x ICS 39’, ‘CAB 0208 x CAB 0214’ e demais famílias de cacauero do ensaio 4 para variável proporção de plântulas com vassouras terminais. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Família	VT <sup>+</sup> (%)	Média ajust <sup>++</sup>	Média obs <sup>++</sup>	Catongo <sup>+++</sup>	PA195xCAB 0208 <sup>+++</sup>	CAB 0214xICS 39 <sup>+++</sup>	CAB 0208XCAB 214 <sup>+++</sup>
PA 195 x ICS 39	91,0	22,0	21,7	0,1731	4,7910 <sup>-16***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>
Catongo	84,0	21,0	21,0	—	5,08 x 10 <sup>-15***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>
CAB 0313	83,0	19,7	20,0	0,983	1,26 x 10 <sup>-14***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>
CAB 0049	79,0	19,3	19,3	0,377	6,04 x 10 <sup>-11***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	< 2,00 x 10 <sup>-14***</sup>
CAB 0270 x ICS 39	62,0	15,7	15,5	6,00 x 10 <sup>-4***</sup>	1,36 x 10 <sup>-7***</sup>	3,57 x 10 <sup>-12***</sup>	2,56 x 10 <sup>-11***</sup>
ICS 39 x CAB 0270	47,0	11,6	11,6	3,90 x 10 <sup>-7***</sup>	3,00 x 10 <sup>-03**</sup>	1,41 x 10 <sup>-7***</sup>	9,49 x 10 <sup>-8***</sup>
CAB 0208 x PA 195	31,0	7,6	7,6	1,75 x 10 <sup>-11***</sup>	0,399	2,00 x 10 <sup>-4***</sup>	4,81 x 10 <sup>-5***</sup>
CAB 0191	24,0	6,0	6,0	1,88 x 10 <sup>-13***</sup>	0,9	2,70 x 10 <sup>-03**</sup>	6,00 x 10 <sup>-4***</sup>
PA 195 x CAB 0208	24,0	5,7	6,0	5,08 x 10 <sup>-15***</sup>	—	1,70 x 10 <sup>-03**</sup>	3,00 x 10 <sup>-4***</sup>
CAB 0214	22,0	5,7	5,5	9,53 x 10 <sup>-16***</sup>	0,737	4,00 x 10 <sup>-03**</sup>	7,00 x 10 <sup>-4***</sup>
CAB 0208	2,0	5,2	5,2	1,43 x 10 <sup>-14***</sup>	0,909	3,00 x 10 <sup>-03**</sup>	4,00 x 10 <sup>-4***</sup>
CAB 0214 x ICS 39	7,0	2,0	1,7	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	1,60 x 10 <sup>-03**</sup>	—	0,358
CAB 0208 x CAB 0214	4,0	1,0	1,0	< 2,00 x 10 <sup>-16***</sup>	3,00 x 10 <sup>-4***</sup>	0,357	—

Códigos de significância : '\*\*\*' P<0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

\*Proporção de plântulas com vassoura terminal (VT)

\*\* Média ajustada; Média observada.

+++Valor – P Referência

A variável plântula com vassoura axilar revelou um poder de descrição de classes inferior às duas outras variáveis citadas anteriormente. No entanto, foi possível verificar que excetuando as famílias de 'CAB 0313' e 'CAB 0049', todas as demais famílias oriundas de acessos da série 'CAB' apresentaram menores incidências de vassoura axilar que as testemunhas suscetíveis 'Catongo' e 'PA 195 x ICS 39' (Tabela 13). Dentre as famílias que diferiram das testemunhas suscetíveis, a de 'CAB 0214 x ICS 39' foi uma das que apresentou menor incidência deste sintoma, não diferindo estatisticamente das famílias de 'PA 195 x CAB 0208', 'CAB 0191' e 'CAB 0208 x CAB 0214' (Tabela 13).

Tabela 13 – Contrastes entre as médias das famílias de referência 'Catongo', 'PA 195 x CAB 0208', 'CAB 0214 x ICS 39', 'CAB 0208 x CAB 0214' e demais famílias de cacaueteiro do ensaio 4 para variável proporção de plântulas com vassouras axilares. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Família	VA <sup>+</sup> (%)	Média ajust <sup>++</sup>	Média obs <sup>++</sup>	Catongo <sup>+++</sup>	PA195xCAB 0208 <sup>+++</sup>	CAB 0214xICS 39 <sup>+++</sup>
PA 195 x ICS 39	53,0	12,5	12,5	0,261	1,62 x 10 <sup>-9***</sup>	8,57 x 10 <sup>-8***</sup>
CAB 0313	46,0	11,25	11,2	0,646	1,63 x 10 <sup>-8***</sup>	3,46 x 10 <sup>-7***</sup>
Catongo	44,0	11,0	11,0	—	6,59 x 10 <sup>-8***</sup>	8,41 x 10 <sup>-7***</sup>
CAB 0049	38,0	9,6	9,6	0,427	2,48 x 10 <sup>-6***</sup>	6,74 x 10 <sup>-6***</sup>
CAB 0270 x ICS 39	16,0	4,0	4,0	2,85 x 10 <sup>-5***</sup>	0,015*	3,0 x 10 <sup>-03**</sup>
CAB 0214	13,0	3,2	3,2	3,70 x 10 <sup>-6***</sup>	0,056	0,01*
CAB 0208	9,0	2,2	2,2	1,45 x 10 <sup>-6***</sup>	0,194	0,032*
ICS 39 x CAB 0270	8,0	2,0	2,0	2,63 x 10 <sup>-6***</sup>	0,446	0,086
CAB 0208 x PA 195	5,0	1,0	1,3	1,50 x 10 <sup>-6***</sup>	0,949	0,26
PA 195 x CAB 0208	5,0	1,0	1,2	6,59 x 10 <sup>-6***</sup>	—	0,264
CAB 0191	4,0	1,0	1,0	2,12 x 10 <sup>-6***</sup>	0,73	0,456
CAB 0214 x ICS 39	2,0	0,5	0,5	8,41 x 10 <sup>-7***</sup>	0,264	—
CAB 0208 x CAB 0214	0,0	0,0	0,0	-	0,993	0,993

Códigos de significância : '\*\*\*' P<0,001, '\*\*' P< 0,01, '\*' P< 0,05, '.' P<0,1

<sup>+</sup>Proporção de plântulas com vassoura terminal (VT)

<sup>++</sup> Média ajustada; Média observada.

<sup>+++</sup>Valor – P Referência

De uma maneira geral, em todos os ensaios realizados em condições de casa de vegetação, observou-se que as famílias dos clones 'CAB 0208' e 'CAB 0214' provenientes de polinizações controladas ou naturais, foram as que apresentaram os maiores níveis de resistência a *C. pernicioso* dentre os genótipos avaliados, tanto para os ensaios realizados na Bahia (ensaios 1, 2 e 3) quanto no Pará (ensaio 4), evidenciando que a procedência do inóculo do fungo não influenciou na resistência destas famílias. Estes resultados concordam com os obtidos preliminarmente por Fonseca e Albuquerque (2000), onde em condições de banco de germoplasma, selecionaram os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' como sendo um dos mais resistentes a *C. pernicioso*. Em casa de vegetação, resultados parciais obtidos por Albuquerque et al. (1999) já evidenciavam uma alta resistência destes genótipos.

Os clones 'CAB 0208' e 'CAB 0214' foram capazes de transmitir altos níveis de resistência a *C. pernicioso* aos seus descendentes, mesmo quando cruzados com genótipos suscetíveis, como foi observado nas famílias oriundas dos cruzamentos 'CAB 0208 x PA 195', 'PA 195 x CAB 0208' e 'CAB 0214 x ICS 39' do ensaio 4. Segundo Queiroz et al. (2003), os altos níveis de resistência a *C. pernicioso* transmitido por 'SCA 6' às suas progênes estariam ligados ao fato desta resistência ser governada por poucos genes com efeito de dominância. Os resultados obtidos com as famílias dos cruzamentos com 'CAB 0208' e 'CAB 0214' demonstram também existir uma resistência com efeito de dominância, entretanto, a alta estabilidade desta resistência no decorrer dos anos, mesmo quando exposta ao inóculo de diferentes procedências, pode estar relacionada a uma resistência poligênica ao invés de poucos genes como é atualmente suposto para 'SCA 6'.

Dentre as variáveis utilizadas para verificar os níveis de resistência a *C. pernicioso* das famílias de cacauero em casa de vegetação, a proporção de plântulas com sintomas e proporção de plântulas com vassoura terminal foram as que discriminaram um maior número de classes fenotípicas para este caráter. Os resultados concordam com os de Silva (1997), que selecionou dentre diferentes sintomas, os de tipos de vassouras (vassoura terminal, vassoura axilar e vassoura cotiledonar) como sendo uma das melhores variáveis para se avaliar a expressão de resistência a *C. pernicioso* em plântulas de cacauero em casa de vegetação.

### 2.3.1.2 Análise da resistência em campo por infecção natural

Foi verificada uma interação significativa entre os fatores família de cacaueteiro e ano, no que se refere à análise da variável número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa / planta (Apêndice L) utilizando o teste Lambda de Wilks.

Em todos os anos de avaliações do experimento, as famílias de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' apresentaram baixas incidências de infecções em ramos causadas por vassoura-de-bruxa, sendo inferiores à maioria das demais famílias da série 'CAB' (Tabela 14). Os contrastes para os conjuntos de médias de incidência de vassoura-de-bruxa em ramos nos diferentes anos, realizados entre 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com os demais genótipos (Tabela 15), demonstraram que as famílias destes clones não diferiram de 'CAB 0169', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392', 'CAB 0410' e 'Theobahia'. Com relação aos padrões de resistência da série 'Scavina', a família de 'SCA 12' apresentou maior incidência da doença do que as famílias de 'CAB 0208' e 'CAB 0214', e a família de 'SCA 6' apresentou maior incidência do que 'CAB 0208' e não diferiu de 'CAB 0214'.

Tabela 14 - Médias do número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa / planta das famílias da série 'CAB' avaliadas no CEPLAC-CEPEC, Ilhéus – BA

(continua)

Família	Evolução (Ano)				
	2000	2001	2002	2003	2004
CAB 0031	6,196	1,876	5,500	3,013	3,098
CAB 0169	1,717	1,976	1,148	0,873	0,732
CAB 0186	4,189	2,451	3,463	2,615	4,798
CAB 0208	1,201	0,187	1,190	0,291	0,040
CAB 0213	3,422	1,851	6,263	3,115	3,631
CAB 0214	0,382	0,398	0,117	0,167	0,160
CAB 0219	2,813	1,297	3,281	2,464	4,651
CAB 0232	6,310	2,973	5,069	4,432	5,284

Tabela 14 - Médias do número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa / planta das famílias da série 'CAB' avaliadas no CEPLAC-CEPEC, Ilhéus – BA

(conclusão)

Família	Evolução (Ano)				
	2000	2001	2002	2003	2004
CAB 0233	5,586	1,108	3,599	2,618	3,375
CAB 0260	5,204	2,824	4,331	2,726	3,237
CAB 0270	2,065	0,226	1,026	0,642	0,571
CAB 0275	6,003	2,217	3,514	2,748	5,398
CAB 0307	5,014	2,275	2,100	0,993	3,004
CAB 0309	5,312	2,134	1,940	1,717	2,339
CAB 0327	6,654	4,612	4,704	2,510	3,541
CAB 0332	4,842	1,417	2,180	1,878	3,405
CAB 0334	7,022	3,126	7,917	4,578	5,595
CAB 0352	3,802	1,908	3,763	1,824	2,689
CAB 0371	1,955	0,779	1,958	1,490	2,111
CAB 0388	3,022	1,003	2,659	1,498	2,486
CAB 0392	3,234	0,975	1,300	0,989	1,085
CAB 0410	3,244	0,741	3,527	1,716	1,524
CAB 0531	7,385	3,935	6,741	5,253	6,826
CAB 0992	5,286	5,161	4,308	2,443	3,433
SCA 12	0,350	0,481	0,864	1,322	5,210
SCA 6	0,296	0,538	1,471	1,889	3,178
Theobahia	1,466	0,574	1,387	1,037	2,429

Tabela 15 – Níveis de significância de F para os contrastes realizados entre as famílias de ‘CAB 0208’ e ‘CAB 0214’ com todas as famílias de cacaueteiro das séries ‘CAB’, ‘SCA’ e ‘Theobahia’, para variável número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa / planta de 2000 a 2004. CEPLAC- CEPEC, Ilhéus – BA

Família	CAB 208 * Pr > F	CAB 214 * Pr > F	Progênes	CAB 208 Pr > F	CAB 214 Pr > F
CAB 0031	0,0002	0,0001	CAB 0327	0,0001	0,0001
CAB 0169	0,4282	0,6510	CAB 0332	0,0042	0,0004
CAB 0186	0,0002	0,0001	CAB 0334	0,0001	0,0001
CAB 0208	-	0,8492	CAB 0352	0,0515	0,0029
CAB 0213	0,0012	0,0001	CAB 0371	0,5470	0,4037
CAB 0214	0,8492	-	CAB 0388	0,3264	0,0766
CAB 0219	0,0084	0,0029	CAB 0392	0,4111	0,1360
CAB 0232	0,0001	0,0001	CAB 0410	0,3305	0,0237
CAB 0233	0,0007	0,0001	CAB 0531	0,0001	0,0001
CAB 0260	0,0004	0,0001	CAB 0992	0,0001	0,0001
CAB 0270	0,9505	0,6178	SCA 12	0,0002	0,0007
CAB 0275	0,0001	0,0001	SCA 6	0,0242	0,0870
CAB 0307	0,0038	0,0003	Theobahia	0,4782	0,4744
CAB 0309	0,0050	0,0007			

\* Nível descritivo para F, considerando teste Lambda de Wilks significativo a 5%.

Das oito famílias da série ‘CAB’ selecionadas como mais resistentes, quatro foram provenientes de acessos coletados em bacias hidrográficas do Alto Amazonas, sendo um coletado na bacia do rio Acre-AM (CAB 0169), dois no rio Purus-AM (CAB 0208 e CAB 0214) e um no rio Solimões-AM (CAB 0270). As outras quatro famílias foram oriundas de acessos coletados na bacia do rio Jamari em Rondônia (CAB 0371, CAB 0388, CAB 0392 e CAB 0410). Genótipos de cacaueteiro com características de resistência a *C. pernicioso* também foram avaliados por Marita et al. (2001) dentro da série Cruzeiro do Sul, provenientes de coletas no Acre, na bacia do rio Juruá. Para estes autores, a resistência a *C. pernicioso* estaria mais associada a clones de cacaueteiro de origem Alto Amazônicos, do que ao Médio e Baixo Amazônicos, o que concorda em parte com os resultados deste trabalho. No entanto, a existência de

genótipos resistentes dentro dos acessos coletados na bacia do rio Jamari-RO, em pontos geograficamente distantes do Alto Amazonas, demonstram que fontes de resistência a *C. pernicioso* também podem ser encontradas em outras regiões da Amazônia Brasileira.

A grande diversidade genética encontrada por Mota (2003) e Sereno et al. (2006) em acessos de cacaueteiro coletados nas bacias hidrográficas do Acre e Amazonas, aumentam a possibilidade dos acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes provenientes destes estados, serem geneticamente distintos e possivelmente se tratem de novas fontes de resistência a *C. pernicioso*, diferentes geneticamente dos clones da série 'Scavina'. Para os acessos de cacaueteiro oriundos de Rondônia, esta possibilidade ainda é maior, pois segundo Mota (2003) os clones das sub-populações de cacaueteiro deste estado, em especial as do rio Jamari, não agruparam geneticamente com nenhuma outra das populações da Amazônia Brasileira. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida et al. (2005) ao verificarem que dentre os 270 acessos de cacaueteiro existentes no banco de germoplasma da CEPLAC em Rondônia, os clones oriundos de coletas nas bacias dos rios Jamari e Ji-Paraná foram dissimilares dos demais, quando comparados através de descritores morfológicos como peso do fruto, número de sementes por frutos, peso de sementes secas, entre outras características.

Durante os cinco anos de avaliações do experimento em campo, as famílias de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' apresentaram uma baixa incidência de vassoura-de-bruxa. Para os acessos utilizados como padrões de resistência, o comportamento foi diferente, verificando-se no decorrer dos anos um aumento da suscetibilidade das famílias de 'Scavinas' e 'Theobahia' (Figura 3). A quebra de resistência destas famílias pode ter sido ocasionada por uma pressão de seleção para isolados de *C. pernicioso* mais agressivos a genótipos da série 'Scavina', a exemplo do ocorrido na região Amazônica (FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000 e RIOS-RUIZ, 2001).

Os maiores níveis de resistência a *C. pernicioso* das famílias de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' em relação às famílias de 'Scavinas' e 'Theobahia', possivelmente está relacionado à atuação de genes de resistência diferentes nos acessos 'CAB', visto que as condições de ambiente e pressão de inóculo foram uniformes dentro da área

experimental. Estes resultados concordam com os obtidos por Paim (2005), que observou níveis de resistência a *C. pernicioso* maiores em progênies da série 'CAB' que nas de 'Scavina' para as condições do Sul da Bahia.

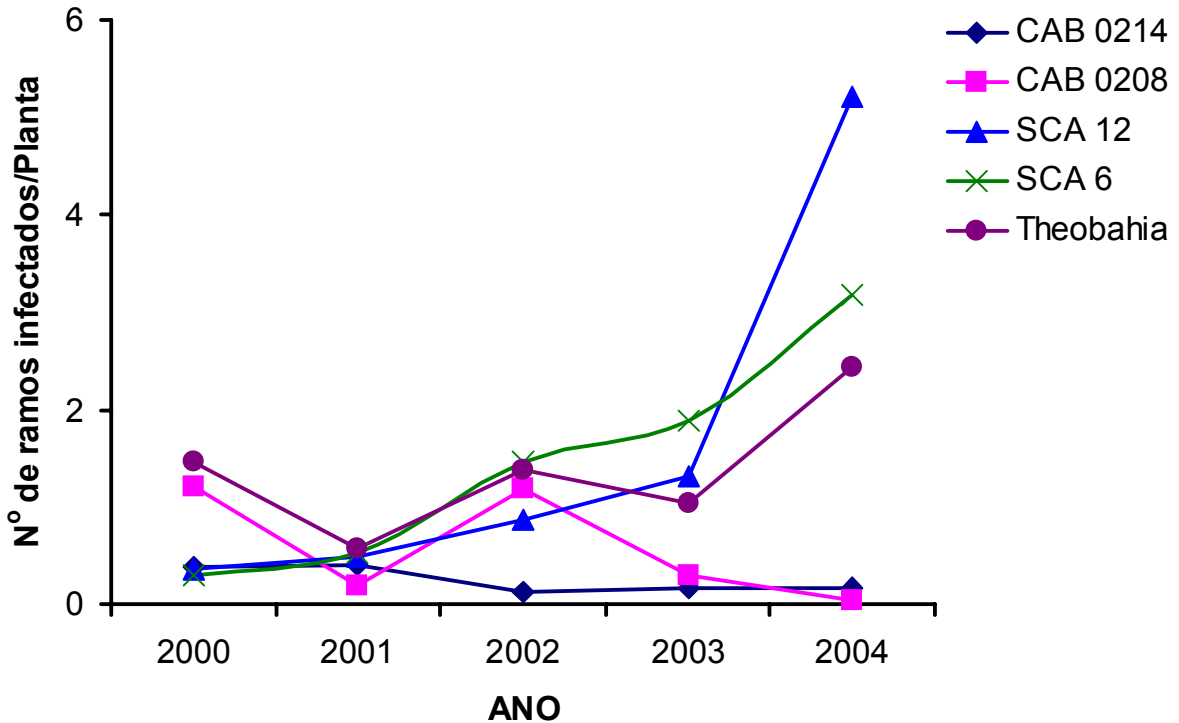


Figura 3 - Média do número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa / planta nas famílias de 'CAB 0208', 'CAB 0214', das séries 'Scavina' e 'Theobahia' no CEPEC / CEPLAC, Ilhéus – BA

Embora o total de frutos produzidos tenha variado entre as famílias no período de 2002 a 2005 (Tabela 16), foi possível distinguir diferenças significativas entre os genótipos de cacaueiro analisados para resistência a *C. pernicioso* em frutos (Apêndice M). As famílias dos clones da série 'CAB' que apresentaram as menores incidências de infecção por vassoura-de-bruxa em frutos foram as do 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0169' e 'CAB 0213' (Figura 4). As comparações dos contrastes das médias das famílias dos 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com as famílias dos padrões de resistência demonstraram uma menor infecção nos frutos destes genótipos quando comparados com as famílias



da série 'Scavina' (Tabela 17). Com relação à família de 'Theobahia', somente a família de 'CAB 0208' apresentou índice de infecção em frutos inferior a esta.

Tabela 16 – Produção de frutos por família de cacaueteiro infectadas com vassoura-de-bruxa em condição de campo no CEPEC/CEPLAC, Ilhéus-BA, de 2002 a 2005

Família	Total de frutos	% de infecção
SCA 6	564	36,9
SAC 12	492	30,3
Theobahia	57	25,5
CAB 0208	219	2,7
CAB 0214	238	13,2

Tabela 17 – Níveis de significância de F para os contrastes realizados entre as famílias de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com as famílias da série 'Scavina' e 'Theobahia', para variável número de frutos infectados /família de 2002 a 2005. CEPEC/CEPLAC, Ilhéus – BA

Família	CAB 0208		CAB 0214	
	F	Pr > F *	F	Pr > F *
SCA 6	25,12	0,0001	11,33	0,001
SCA 12	15,44	0,0001	5,71	0,018
Theobahia	6,89	0,0096	1,96	0,163

\*Probabilidade de cometer erro aceitando a hipótese de ocorrer diferença entre as famílias de cacaueteiro para variável número de frutos infectados por vassoura-de-bruxa / família.

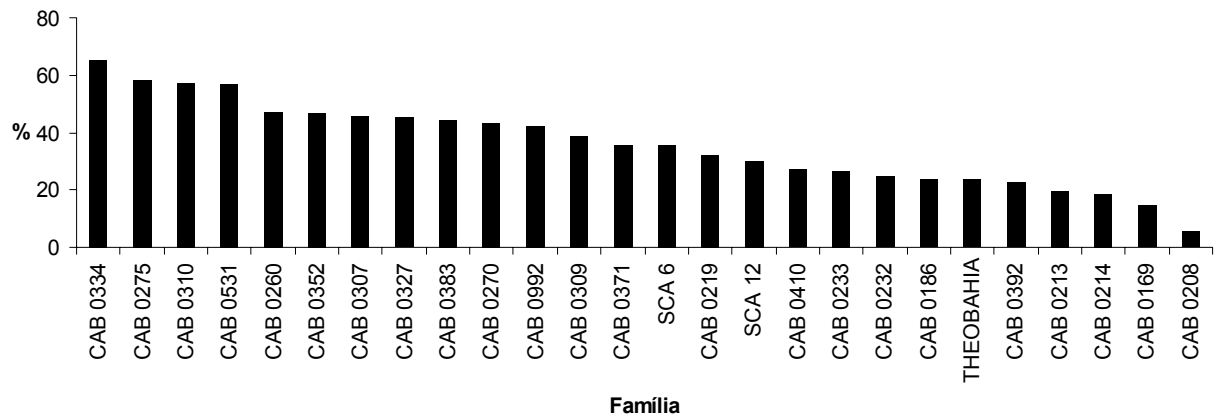


Figura 4 - Porcentagem de frutos infectados por vassoura-de-bruxa em genótipos de cacaueteiro das séries 'CAB', 'Scavina' e 'Theobahia', no CEPEC/CEPLAC. Ilhéus-BA. Dados referentes ao período de 2002 a 2005

## 2.3.2 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacaueteiro

### 2.3.2.1 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes

Dos 82 *primers* de microssatélites empregados na genotipagem das progênies das duas populações, foi utilizado um total de 65 locos (79%), dos quais 49 locos (59,8%) foram aproveitados em ambas populações. Esses resultados foram similares aos observados para outras populações de cacaueteiro (76,9% para a população do mapa consensual 'UF 676 x UPA 402'; Risterucci et al., 2000a), mas superior aos observados para os três cruzamentos analisados por Clément et al. (2003), onde o índice de polimorfismo observado para 22 locos de microssatélites variou de 27,3% ('IMC 78 x Catongo') a 45,5% ('DR 1 x Catongo').

Foram identificados 183 alelos nos 77 locos que exibiram produtos de amplificação na população 'ICS 39 x CAB 0208' (Tabela 18), enquanto que 188 alelos foram revelados na população 'ICS 39 x CAB 0214' em 79 locos (Tabela 19). Com relação a homozigose dos locos, o genitor 'CAB 0208' apresentou 42,1% de homozigose, enquanto que o 'CAB 0214' apresentou 49,1%. Já o genitor 'ICS 39' exibiu entre 5,3% e 8,8% de homozigose para os cruzamentos com 'CAB 0208' e 'CAB 0214', respectivamente. Esses valores diferiram devido aos locos que apresentaram

polimorfismo não terem sido os mesmos para as duas populações. O alto índice de locos homozigotos observado nos genitores 'CAB 0208' e 'CAB 0214' é uma característica freqüentemente observada em materiais silvestres de cacauero coletados na região do Médio Amazonas (SERENO et al., 2006). Mota (2003) estudando a diversidade genética de clones de cacauero da série 'CAB', também observou uma alta homozigose em quinze clones provenientes da bacia do rio Purus, com taxas variando entre 48 a 86 % de homozigose nos 29 locos de microssatélites analisados. A alta heterozigose de 'ICS 39' tem sido observada para outros genótipos do grupo morfo-geográfico Trinitarios (MOTAMAYOR et al., 2003).

Na população 'ICS 39 x CAB 0208', dos 25 locos de microssatélites não utilizados para construção do mapa de ligação, cinco não apresentaram amplificação de bandas, treze foram monomórficos e sete demonstraram grandes distorções nas segregações dos alelos (Tabela 18). Para a população 'ICS 39 x CAB 0214', dos 25 locos não aproveitados, três não amplificaram bandas, quinze foram monomórficos e sete apresentaram grandes distorções para segregação dos alelos (Tabela 19). Entre os locos que apresentaram problemas de amplificações, dois foram coincidentes para ambas as populações (*mTcCIR31* e *mTcCIR173*), sugerindo que a falta de amplificação para os locos poderia derivar de problemas com os iniciadores. Dentre os treze locos monomórficos encontrados, doze foram comuns nas duas populações (*mTcCIR22*, *mTcCIR40*, *mTcCIR73*, *mTcCIR99*, *mTcCIR111*, *mTcCIR117*, *mTcCIR148*, *mTcCIR179*, *mTcCIR186*, *mTcCIR188*, *mTcCIR198* e *mTcCIR203*).

Dos 65 locos polimórficos para pelo menos uma das populações, 57 foram empregados para construção do mapa genético de cada população, sendo que 49 foram comuns às duas progênies e os 8 restantes foram específicos para cada uma. Os locos *mTcCIR26*, *mTcCIR45*, *mTcCIR46*, *mTcCIR49*, *mTcCIR154*, *mTcCIR174*, *mTcCIR182* e *mTcCIR225* foram exclusivos da população 'ICS 39 x CAB 0208'. Já os locos *mTcCIR19*, *mTcCIR107*, *mTcCIR135*, *mTcCIR162*, *mTcCIR169*, *mTcCIR175*, *mTcCIR193* e *mTcCIR291* foram empregados apenas na população 'ICS 39 x CAB 0214'. Para cada loco, o número de alelos obtidos nos locos variou de 1 a 4 e de modo geral, os tamanhos dos fragmentos de microssatélites obtidos corroboraram os valores relatados por Lanaud et al. (1999) e Pugh et al. (2004) (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microsatélites da família 'ICS 39 x CAB 208', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

(continua)

<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado (pb)</b>	<b>Alelos estimados (pb)</b>				<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR1</i>	VIII	143	130	140			2
<i>mTcCIR2**</i>	V	254	130	150			2
<i>mTcCIR3</i>	II	249	210	230	240	250	4
<i>mTcCIR4</i>	n.d	259		250	270		2
<i>mTcCIR6</i>	VI	231		230	250		2
<i>mTcCIR7</i>	VII	160	150	153	157	160	4
<i>mTcCIR8</i>	IX	301		280	290		2
<i>mTcCIR9</i>	VI	274		240	270		2
<i>mTcCIR11</i>	II	298	290	300	310		3
<i>mTcCIR12</i>	IV	188	180	195	210		3
<i>mTcCIR15</i>	I	255		230	250		2
<i>mTcCIR16***</i>	VI	307		n.d.			1
<i>mTcCIR17</i>	IV	271		270	290		2
<i>mTcCIR18</i>	IV	345		290	300		2
<i>mTcCIR19**</i>	II	376	340	375	380		3
<i>mTcCIR22***</i>	I	288		310			1
<i>mTcCIR24</i>	IX	197		180	190		2
<i>mTcCIR25</i>	VI	153	120	140	145	150	4
<i>mTcCIR26</i>	VIII	298		300	310		2
<i>mTcCIR29</i>	I	172		158	165		2
<i>mTcCIR30</i>	IX	183	177	180	184		3

Tabela 18 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICS 39 x CAB 208', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

					(continuação)		
<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado (pb)</b>	<b>Alelos estimados (pb)</b>			<b>Nº Alelos</b>	
<i>mTcCIR31*</i>	X	337	-			-	
<i>mTcCIR32</i>	IV	193	180	193		2	
<i>mTcCIR33</i>	IV	285	270	290	310	330	4
<i>mTcCIR35</i>	IX	235	230	220		2	
<i>mTcCIR37</i>	X	149	150	160	170		3
<i>mTcCIR40***</i>	III	286	265			1	
<i>mTcCIR42</i>	V	232	180	230		2	
<i>mTcCIR43*</i>	IV	206	-			-	
<i>mTcCIR44</i>	II	177	180	165		2	
<i>mTcCIR45</i>	VIII	283	230	240		2	
<i>mTcCIR46</i>	VII	202	190	200	210		3
<i>mTcCIR49</i>	III	197	190	200		2	
<i>mTcCIR53</i>	VI	148	130	140		2	
<i>mTcCIR54</i>	I	165	143	150	155		3
<i>mTcCIR55</i>	VII	234	230	250		2	
<i>mTcCIR56</i>	VII	353	320	330	370		3
<i>mTcCIR57</i>	IV	253	250	260		2	
<i>mTcCIR58</i>	IX	266	240	275		2	
<i>mTcCIR60</i>	II	207	195	230		2	
<i>mTcCIR61</i>	X	199	183	207		2	
<i>mTcCIR62</i>	III	190	180	190	200	220	4
<i>mTcCIR73***</i>	II	112	113			1	
<i>mTcCIR76</i>	IV	139	108	137		2	
<i>mTcCIR93</i>	VII	100	103	105	108		3
<i>mTcCIR99***</i>	VIII	249	240			1	
<i>mTcCIR100</i>	II	244	225	239	245	258	4
<i>mTcCIR107**</i>	IV	120	110	116		2	

Tabela 18 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICS 39 x CAB 208', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado (pb)</b>	<b>Alelos estimados (pb)</b>			<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR109</i>	V	162	161	163	165	3
<i>mTcCIR111***</i>	V	105		105		1
<i>mTcCIR112</i>	X	95	90	94		2
<i>mTcCIR117***</i>	IV	168		160		1
<i>mTcCIR118</i>	I	165	166	177		2
<i>mTcCIR124</i>	IX	131	127	131	138	3
<i>mTcCIR134</i>	VIII	176	166	172	174 176	4
<i>mTcCIR135***</i>	III	246	235	237	245	3
<i>mTcCIR148***</i>	V	235		240		1
<i>mTcCIR152</i>	II	284	270	275	283 290	4
<i>mTcCIR154</i>	IX	167	160	168	175	3
<i>mTcCIR162**</i>	II	162	141	155	158	3
<i>mTcCIR166</i>	IX	215	210	218		2
<i>mTcCIR169**</i>	V	178	177	179		2
<i>mTcCIR173*</i>	III	148		-		-
<i>mTcCIR174</i>	I	167	164	166		2
<i>mTcCIR175*</i>	III	248		-		-
<i>mTcCIR179***</i>	VII	288		282		1
<i>mTcCIR181</i>	VII	197	197	204	218	3
<i>mTcCIR182</i>	VI	148	143	145	150	3
<i>mTcCIR186***</i>	VII	147		140		1
<i>mTcCIR188***</i>	IV	118		120		1
<i>mTcCIR193*</i>	VI	134		-		-
<i>mTcCIR194</i>	I	192	179	183	189	3
<i>mTcCIR198***</i>	III	186		170		1
<i>mTcCIR203***</i>	I	217		213		1
<i>mTcCIR220</i>	X	201	194	200		2

Tabela 18 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICS 39 x CAB 208', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

							(conclusão)
<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado (pb)</b>	<b>Alelos estimados(pb)</b>				<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR223</i>	X	202	175	186	194	200	4
<i>mTcCIR225</i>	VIII	302	301	322	340		3
<i>mTcCIR229</i>	X	307	309	315	325		3
<i>mTcCIR236</i>	VIII	193	170	180	190	195	4
<i>mTcCIR243</i>	IX	141	131	137	141		3
<i>mTcCIR255</i>	VI	203	199	208	222		3
<i>mTcCIR291**</i>	VI	218	208	216	222		3

\*Locos sem amplificação; \*\*Locos com distorção na segregação; \*\*\*Locos monomórficos; n.d.= alelo não determinado.

Tabela 19 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICSA 39 x CAB 214', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

							(continua)
<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado(pb)</b>	<b>Alelos estimados(pb)</b>				<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR1</i>	VIII	143	130	140			2
<i>mTcCIR2**</i>	V	254	130	140			2
<i>mTcCIR3</i>	II	249	210	225	240		4
<i>mTcCIR4</i>	n.d.	259	250	270			2
<i>mTcCIR6</i>	VI	231	228	250			2
<i>mTcCIR7</i>	VII	160	150	153	165		4
<i>mTcCIR8</i>	IX	301	280	310			2
<i>mTcCIR9</i>	VI	274	260	305	310		3
<i>mTcCIR11</i>	II	298	315	320	325		3
<i>mTcCIR12</i>	IV	188	170	180	190		4
<i>mTcCIR15</i>	I	255	240	260			2
<i>mTcCIR16*</i>	VI	307					-

Tabela 19 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICSA 39 x CAB 214', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado(pb)</b>	<b>Alelos estimados(pb)</b>			<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR17</i>	IV	271	270	290		2
<i>mTcCIR18</i>	IV	345	340	350		2
<i>mTcCIR19</i>	II	376	330	340		2
<i>mTcCIR22***</i>	I	288	320			1
<i>mTcCIR24</i>	IX	197	180	200		2
<i>mTcCIR25</i>	VI	153	137	145	160	3
<i>mTcCIR26***</i>	VIII	298	305			1
<i>mTcCIR29</i>	I	172	160	165		2
<i>mTcCIR30</i>	IX	183	180	185		2
<i>mTcCIR31*</i>	X	337	-			-
<i>mTcCIR32</i>	IV	193	180	190		2
<i>mTcCIR33</i>	IV	285	273	310	330	3
<i>mTcCIR35</i>	IX	235	210	220	230	3
<i>mTcCIR37</i>	X	149	135	140	163	4
<i>mTcCIR40***</i>	III	286	268			1
<i>mTcCIR42</i>	V	232	205	212	240	3
<i>mTcCIR43***</i>	IV	206	210			1
<i>mTcCIR44</i>	II	177	160	180		2
<i>mTcCIR45**</i>	VIII	283	300	305		2
<i>mTcCIR46**</i>	VII	202	195	200	215	3
<i>mTcCIR49***</i>	III	197	200			1
<i>mTcCIR53</i>	VI	148	120	133	138	4
<i>mTcCIR54</i>	I	165	140	150	155	3
<i>mTcCIR55</i>	VII	234	230	250		2
<i>mTcCIR56</i>	VII	353	320	335		2
<i>mTcCIR57</i>	IV	253	250	260		2
<i>mTcCIR58</i>	IX	266	240	275		2



Tabela 19 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICSA 39 x CAB 214', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

(continuação)

<b>Loco</b>	<b>Grupo Ligação</b>	<b>Alelo Clonado(pb)</b>	<b>Alelos estimados(pb)</b>				<b>Nº Alelos</b>
<i>mTcCIR60</i>	II	207	190	195	230	3	
<i>mTcCIR61</i>	X	199	180	183	207	3	
<i>mTcCIR62</i>	III	190	180	200	210	3	
<i>mTcCIR73***</i>	II	112	113			1	
<i>mTcCIR76</i>	IV	139	104	106	108	137	4
<i>mTcCIR93</i>	VII	100	103	105	108	3	
<i>mTcCIR99***</i>	VIII	249	240			1	
<i>mTcCIR100</i>	II	244	225	239	245	247	4
<i>mTcCIR107</i>	IV	120	110		116	2	
<i>mTcCIR109</i>	V	162	161	163	165	3	
<i>mTcCIR111***</i>	V	105	105			1	
<i>mTcCIR112</i>	X	95	90	94		2	
<i>mTcCIR117***</i>	IV	168	160			1	
<i>mTcCIR118</i>	I	165	156	167		2	
<i>mTcCIR124</i>	IX	131	127	131	134	3	
<i>mTcCIR134</i>	VIII	176	166	172	174	176	4
<i>mTcCIR135</i>	III	246	135	137	145	3	
<i>mTcCIR148***</i>	V	235	240			1	
<i>mTcCIR152</i>	II	284	270	283	320	3	
<i>mTcCIR154**</i>	IX	167	168	170		2	
<i>mTcCIR162</i>	II	162	141	158		2	
<i>mTcCIR166</i>	IX	215	210	212		2	
<i>mTcCIR169</i>	V	178	177	179		2	
<i>mTcCIR173*</i>	III	148	-			-	
<i>mTcCIR174**</i>	I	167	164	166		2	
<i>mTcCIR175</i>	III	248	244	257		2	
<i>mTcCIR179***</i>	VII	288	282			1	

Tabela 19 - Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 82 locos de microssatélites da família 'ICSA 39 x CAB 214', em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero (PUGH et al., 2004) e alelo clonado (LANAUD et al., 1999)

Loco	Grupo Ligação	Alelo Clonado(pb)	Alelos estimados(pb)				(conclusão)
							Nº Alelos
<i>mTcCIR181</i>	VII	197	197	208	218		3
<i>mTcCIR182**</i>	VI	148	143	150			2
<i>mTcCIR186***</i>	VII	147		140			1
<i>mTcCIR188***</i>	IV	118		120			1
<i>mTcCIR193</i>	VI	134		nd			3
<i>mTcCIR194</i>	I	192	179	183	189		3
<i>mTcCIR198***</i>	III	186		170			1
<i>mTcCIR203***</i>	I	217		213			1
<i>mTcCIR220</i>	X	201		190	200		2
<i>mTcCIR223</i>	X	202	175	187	195	200	4
<i>mTcCIR225**</i>	VIII	302	301	322	340		3
<i>mTcCIR229</i>	X	307	309	315	327		3
<i>mTcCIR236</i>	VIII	193	182	191	194		3
<i>mTcCIR243</i>	IX	141	135	137	141		3
<i>mTcCIR255</i>	VI	203	191	199	208	226	4
<i>mTcCIR291</i>	VI	218	204	208	216	222	4

\*Locos sem amplificação; \*\*Locos com distorção na segregação; \*\*\*Locos monomórficos; n.d.= alelo não determinado.

### 2.3.2.2 Construção dos mapas de ligação

Os dados de segregação dos alelos de 57 locos de microssatélites foram utilizados para a construção do mapa genético de cada uma das populações. Devido à baixa heterozigose dos genitores 'CAB 0208' e 'CAB 0214', só foi possível obter mapa de ligação conjunto para ambos genitores, ancorado nos locos comuns em heterozigose ou para o genitor 'ICS 39'. De maneira geral, os mapas de ligação formados com as duas populações foram semelhantes, com a obtenção de grupos

similares, congruentes ao mapa consensual do cacauero (RISTERUCCI et al., 2000a; PUGH et al., 2004).

O mapa de ligação conjunto obtido para a população 'ICS 39 x CAB 0208' apresentou 39 marcas ligadas (68,4%) em 11 grupos de ligação (Tabela 20). A distância total de cobertura do mapa foi de 541 cM, o que representou 68 % da cobertura do mapa consensual (796,9 cM) e a distância média entre marcas de cerca de 14 cM, muito superior à do mapa consensual que foi de 1,7 cM, evidenciando a baixa saturação deste mapa.

Das marcas agrupadas, nove apresentaram problemas de distorções nas segregações dos alelos, estando localizadas nos grupos de ligação I (*mTcCIR54*), II (*mTcCIR3*), VI (*mTcCIR9*), IX (*mTcCIR35*, *mTcCIR166*, *mTcCIR243*) e X (*mTcCIR37*, *mTcCIR220* e *mTcCIR229*). Problemas de distorções de segregações em locos de microssatélites de mapas ligação de cacauero também foram relatados por Risterucci et al. (2000a), Pugh et al. (2004) e Brown et al. (2005). Para Brown et al. (2005), o fato destes mapas envolverem dois genitores e dos locos com distorção de segregação normalmente se apresentarem agrupados em regiões que são comuns aos diferentes mapas, por exemplo, nos grupos de ligação V, VI e IX, sugerem que estas distorções sejam causadas por fatores genéticos ou cromossômicos.

Do total de 57 marcas utilizadas para construção do mapa, 18 não permaneceram agrupadas, sendo que destas, três foram marcas acessórias no grupo IV (*mTcCIR32*, *mTcCIR33*, *mTcCIR57*) e uma no grupo II (*mTcCIR11*). As demais marcas foram independentes aos grupos de ligação formados.

Tabela 20- Características dos mapas de ligações das populações contrastantes de cacauero

População	Tamanho progênie	Marcas* agrupadas	Grupos de ligação	Tamanho mapa (cM)	Média entre marcas (cM)	Marcas** desvios
ICS 39						
x	164	39	11	541	13,87	9
CAB 208						
ICS 39						
x	130	44	10	501	11,3	10
CAB 214						

\* Microssatélites

\*\* Desvios de segregações 1:1, 1:2:1, 1:1:1:1.

Dos 11 grupos de ligação obtidos para a população do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208', cinco possuíam apenas duas marcas e um três marcas (Figura 5). Os outros grupos apresentaram entre três e oito marcas, sendo o IX o maior grupo com 91 cM. Nesse mapa, os grupos de ligação equivalentes aos grupos I e X do mapa consensual do cacauero (RISTERUCCI et al., 2000a; PUGH et al., 2004), foram divididos em dois grupos independentes, indicando a necessidade de maior saturação.

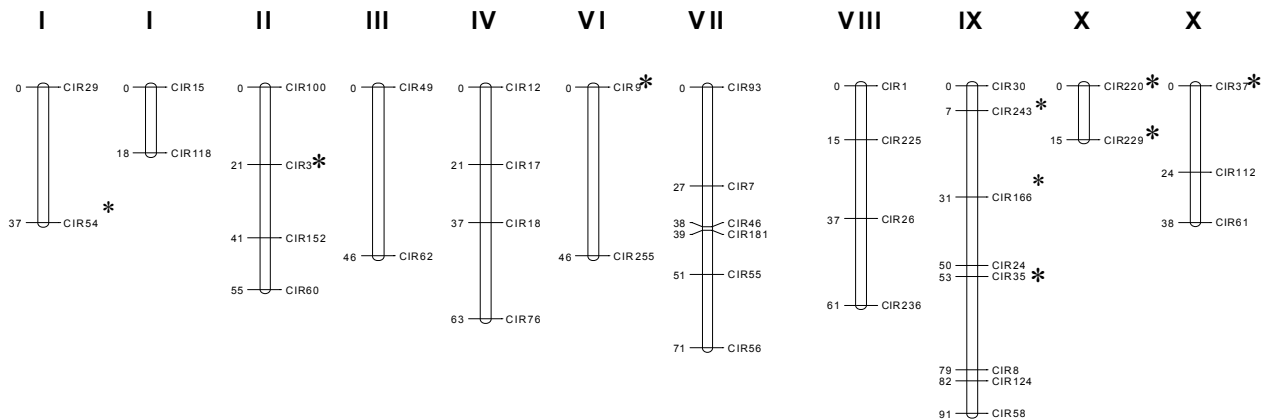


Figura 5 - Mapa genético de ligação da progênie 'ICS 39 x CAB 0208'. Os números em algarismos romanos referem-se aos grupos de ligação do mapa consensual do cacaueteiro de acordo com a numeração proposta por Risterucci et al. (2000) e Pugh et al. (2004). O asterisco (\*) representa as marcas com distorção na segregação dos alelos

Os grupos de ligação obtidos para a população 'ICS 39 x CAB 0208' foram equivalentes aos obtidos por Pugh et al. (2004) no mapa consensual para o cacaueteiro, no entanto, foram verificadas diferenças no ordenamento das marcas. Apenas o grupo de ligação equivalente ao V no mapa consensual não foi obtido no mapa de 'ICS 39 x CAB 0208'.

Para a população 'ICS 39 x CAB 0214' foram analisados 57 locos polimórficos. O nível de heterozigose foi maior para 'ICS 39' do que para 'CAB 0214', não sendo possível obter o mapa para o genitor 'CAB 0214' devido ao pequeno número de marcas segregantes. O mapa conjunto para os dois genitores conteve 44 marcas ligadas (77,1 %) em 10 grupos de ligação (Tabela 20). O mapa apresentou uma cobertura de 501 cM, representando 65 % da cobertura do mapa consensual, com distância média entre marcas de 11,4 cM. Das marcas agrupadas, dez apresentaram problemas de distorções

nas segregações dos alelos, estando localizadas nos grupos de ligações II (*mTcCIR3*, *mTcCIR44*, *mTcCIR100*), IV (*mTcCIR12*, *mTcCIR76*), VI (*mTcCIR9*, *mTcCIR291*), VII (*mTcCIR7*) e VIII (*mTcCIR134* e *mTcCIR236*). Das marcas utilizadas, 18 não agruparam, sendo que uma foi acessória para o grupo II (*mTcCIR4*) e as demais independentes aos grupos de ligação formados.

Os dez grupos de ligação obtidos no mapa da população 'ICS 39 x CAB 214' foram representantes de quase todos os grupos encontrados no mapa consensual do cacauero (RISTERUCCI et al., 2000a; PUGH et al., 2004), excetuando-se apenas o grupo III (Figura 6). Nos dez grupos de ligações formados, o número de marcas agrupadas variaram de duas (grupo V) até oito (grupos IV e IX), sendo o maior deles, o grupo VI com uma cobertura de 87 cM. Em função do LOD, utilizado para ordenamento das marcas o grupo de ligação II ficou dividido em dois.

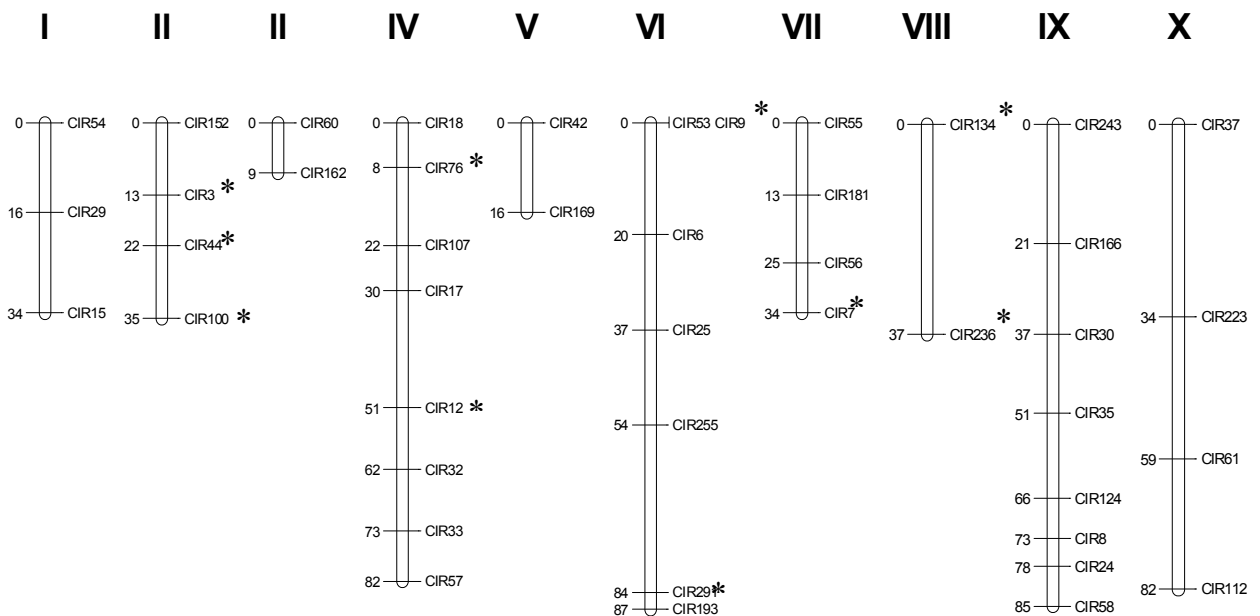


Figura 6 - Mapa genético de ligação parcial obtido da progênie 'ICS 39 x CAB 214'. Os números em algarismos romanos referem-se aos grupos de ligação do mapa consensual do cacauero de acordo com a numeração proposta por Risterucci et al. (2000) e Pugh et al. (2004). O asterisco (\*) representa as marcas com distorção na segregação dos alelos

O grupo de ligação IX é de extremo interesse, pois nele foi localizado o principal QTL para resistência à vassoura-de-bruxa oriundo do genótipo 'Scavina 6' (FALEIRO et al., 2006). Os grupos de ligação obtidos foram equivalentes aos obtidos no mapa consensual (RISTERUCCI et al., 2000a; PUGH et al., 2004), apenas com pequenas diferenças de ordenamento.

### **2.3.2.3 Detecção de QTLs associados à resistência a *C. pernicioso***

A incidência de plantas com sintomas de vassoura-de-bruxa no cruzamento controle 'ICS 39 x PA 195' foi de 93 %, sendo que 87 plantas desta progênie apresentaram de dois a quatro pontos de infecções (Figura 7). Este resultado demonstra a eficácia do método de inoculação e alta agressividade do isolado de *C. pernicioso* empregado nas avaliações, diminuído a possibilidade da ocorrência de plantas assintomáticas em função de escapes.

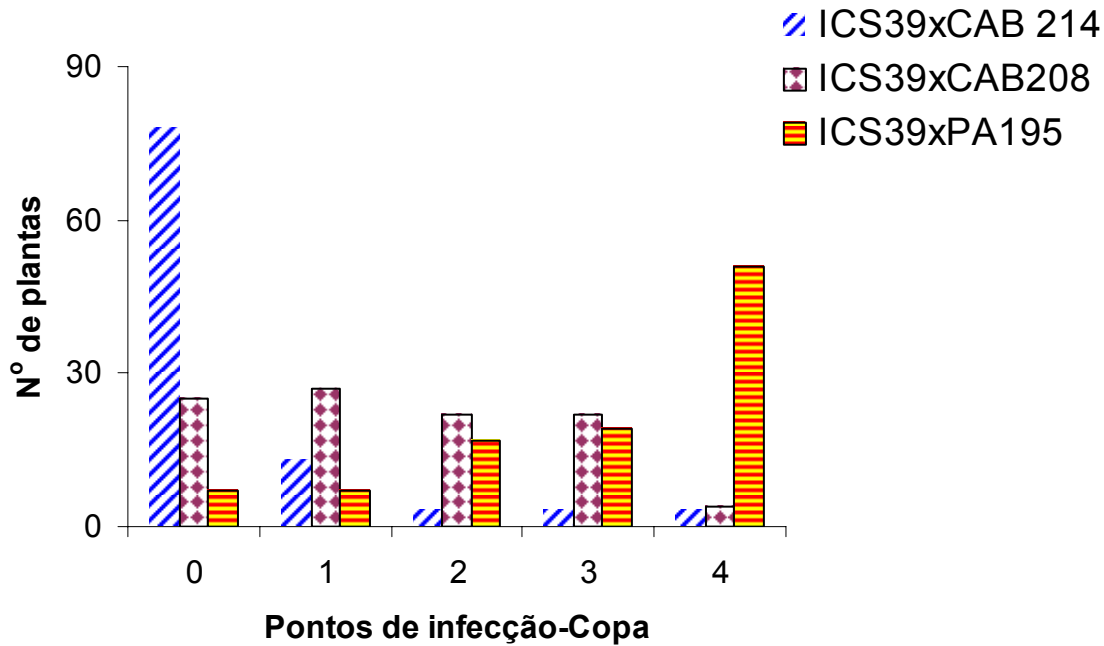


Figura 7 - Plantas dos diferentes cruzamentos entre clones de cacaueteiro agrupadas segundo o número de infecções na copa causadas por vassoura-de-bruxa. Belém-PA. 2005

No cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208' observou-se distribuição mais equilibrada das progênies na maioria das classes fenotípicas utilizadas, com exceção para plantas que apresentaram quatro pontos de infecções causados por vassoura-de-bruxa. Das 100 plantas inoculadas, 25 não apresentaram sintomas da doença, em 71 foram encontrados de um a três pontos de infecção e apenas quatro plantas apresentaram quatro pontos de infecções. Entre as progênies do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0214', 78 não manifestaram sintomas, 19 apresentaram de um a três pontos de infecção e apenas três plantas com quatro pontos de infecções.

Detectaram-se três QTLs ligados à resistência a *C. pernicioso* nas progênies dos dois cruzamentos contrastantes. Dois destes foram encontrados nas progênies do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0214', utilizando o método de mapeamento de múltiplo QTL (MQM), sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo de ligação IX (Tabela 21).



Tabela 21 - Localizações genômicas dos locos controladores de características quantitativas (QTL) nas populações F1 de cacauero

População	Grupo ligação	Posição (cM)	Marcas próximas			LOD	Variação explicada (%)
			Esquerda	Centro	Direita		
ICS 39 x CAB 0214	IV	5,0	<i>mTcCIR18</i>	-	<i>mTcCIR76</i>	33,11	41,90
ICS 39 x CAB 0214	IX	48,1	<i>mTcCIR166</i>	<i>mTcCIR30</i>	<i>mTcCIR35</i>	36,74	94,30
ICS 39 x CAB 0208	VIII	0,0	-	<i>mTcCIR1</i>	<i>mTcCIR225</i>	5,31	68,70

O QTL do grupo de ligação IV foi localizado a uma distância de 5 cM da posição inicial do grupo, tendo como marcas cofatores o *mTcCIR 18* a esquerda e *mTcCIR 76* a direita. Este QTL apresentou um LOD máximo de 33,1 e um ponto de corte com valor de LOD de 17,8 a 10% de significância (Figura 8). Este QTL foi capaz de explicar 41,9% da variação fenotípica das progênies quanto ao caráter resistência a *C. pernicioso*.

Três QTLs associados à resistência do cacauero a *P. palmivora* foram encontrados no grupo de ligação IV, em regiões muito próximas de onde foi localizado o QTL associado à resistência *C. pernicioso* no mapa de 'ICS 39 x CAB 0214'. Um destes QTLs foi encontrado por Cruzilat et al. (2000b) e foi capaz de explicar 13,2% da variação fenotípica da resistência de frutos de 'Catongo' (Forasteiro). Dois QTLs foram encontrados por Clément et al. (2003) associados aos clones IMC 78 (Forasteiro) e DR1 (Trinitário). Estes QTLs foram capazes de explicar 22,6% e 10,1% respectivamente, da variação fenotípica da resistência à podridão em frutos com base em dados de campo acumulados por mais de seis anos.

No mapeamento de genes homólogos de resistência (RGH) realizado por Lanaud et al. (2004) utilizando as mesmas progênies F<sub>1</sub> do mapa de referência do cacaueiro, foram localizados quatro genes alinhados em seqüência no grupo de ligação IV. Estes genes estavam próximos dos locos de microssatélites *mTcCIR17* e *mTcCIR18* na mesma região onde foram detectados os QTLs associados à resistência a *P. palmivora* e o QTL associado a resistência à *C. pernicioso* no mapa de 'ICS 39 x CAB 0214'.

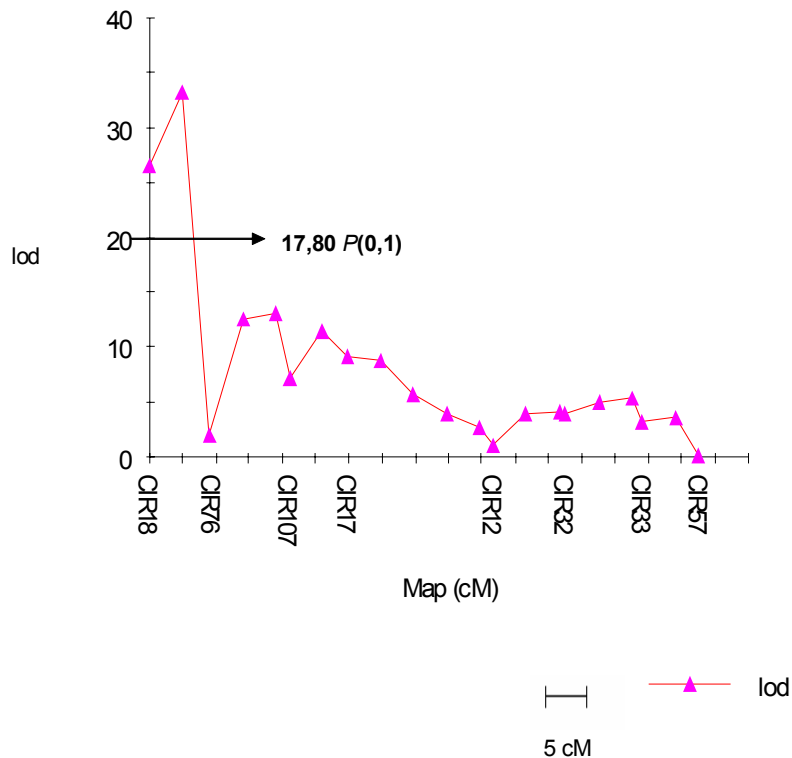


Figura 8 – QTL do grupo de ligação IV do mapa integrado dos clones de cacaueiro 'ICS 39 X CAB 0214'

O outro QTL encontrado no mapa de ligação do cruzamento 'ICS 39 x CAB 214' estava situado à 48 cM do início do grupo IX, exatamente sobre a marca *mtcCIR 30*, tendo como marcas cofatores o *mTcCIR166* a esquerda e *mTcCIR35* a direita (Figura 9). O LOD máximo do QTL foi de 36,74 e um ponto de corte com valor de LOD de 19,00 a 5% de significância. A variação fenotípica explicada por este QTL foi de 94,34%. Um mesmo QTL associado à resistência a *C. pernicioso* foi encontrado por Queiroz et al. (2003) e Brown et al. (2005) no grupo IX do mapa de ligação da população F<sub>2</sub> derivada do cruzamento entre 'SCA6 x ICS1'. No mapa desenvolvido por Queiroz et al. (2003), este QTL estava próximo da marca AV 14.940 (RAPD) no grupo de ligação 11 que corresponde ao grupo IX do mapa consensual desenvolvido por Pugh et al. (2004). O QTL foi capaz de explicar 35 % da variação fenotípica de resistência a *C. pernicioso* das progênies.

Brown et al. (2005) utilizando marcadores microssatélites e *primers* de RGH, localizaram dois QTLs associados à resistência a *C. pernicioso* no mapa F<sub>2</sub> de 'SCA6 x ICS1', sendo um de menor efeito no grupo de ligação I oriundo do genitor 'ICS1' (suscetível) e outro de maior efeito no grupo de ligação IX proveniente do genitor 'SCA6' (resistente). Conforme o método utilizado para localização deste último QTL, houve uma alteração no valor da variação fenotípica explicada, passando de 51 % quando empregado o método "SIM" para 14,4 % no "MQM". Nos dois métodos utilizados, o QTL do grupo de ligação IX foi localizado muito próximo da marca *mtcCIR 35*, a uma posição que variou de 60,8 cM (SIM) a 55,6 cM (MQM) do início do grupo IX. Estes resultados demonstram que o QTL localizado no grupo IX do mapa de 'ICS1 x SCA6' está co-localizado com o do grupo IX de 'ICS39 x CAB0214'.

Ao contrário do ocorrido no QTL do grupo de ligação IV de 'ICS39 x CAB0214', ainda não foram mapeados marcadores do tipo RGH dentro da região de QTL do grupo IX. Brown et al. (2005) mapearam um RGH a 24,9 cM deste QTL, entretanto, a distância foi considerada grande para haver uma associação entre a marca e o QTL.

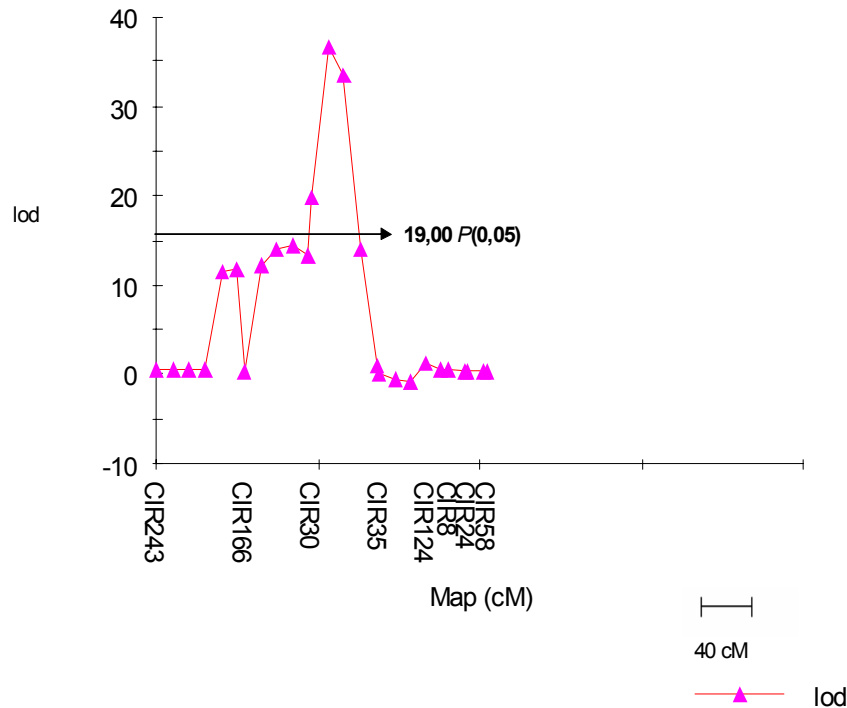


Figura 9 - QTL grupo de ligação IX do mapa integrado dos clones de cacauzeiro de 'ICS 39 X CAB 0214'

No cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208', utilizando o método de Mapeamento por Intervalo Simples (SIM), foi possível detectar um QTL localizado no início do grupo de ligação VIII próximo à marca *mTcCIR1* (Figura 10). O LOD máximo para este QTL foi de 5,31, com o ponto de corte no LOD 4,4 a 5% de significância, sendo capaz de explicar 68,7% da variação fenotípica para o caráter de resistência a *C. pernicioso* nas progênies do referido cruzamento.

Embora quase todas as marcas de microssatélites do grupo VIII do mapa de 'ICS39 x CAB0208' (a exceção do *mTcCIR236*) também tenham sido utilizadas por Brown et al. (2005), nenhum QTL associado à resistência a *C. pernicioso* foi encontrado neste grupo de ligação do mapa de 'ICS1 x SCA6'. O fato deste QTL não ser detectado no mapa da população de 'ICS39 x CAB0214' sugere que deve estar associado ao genitor 'CAB0208' e não ao 'ICS39', que é comum às duas populações.

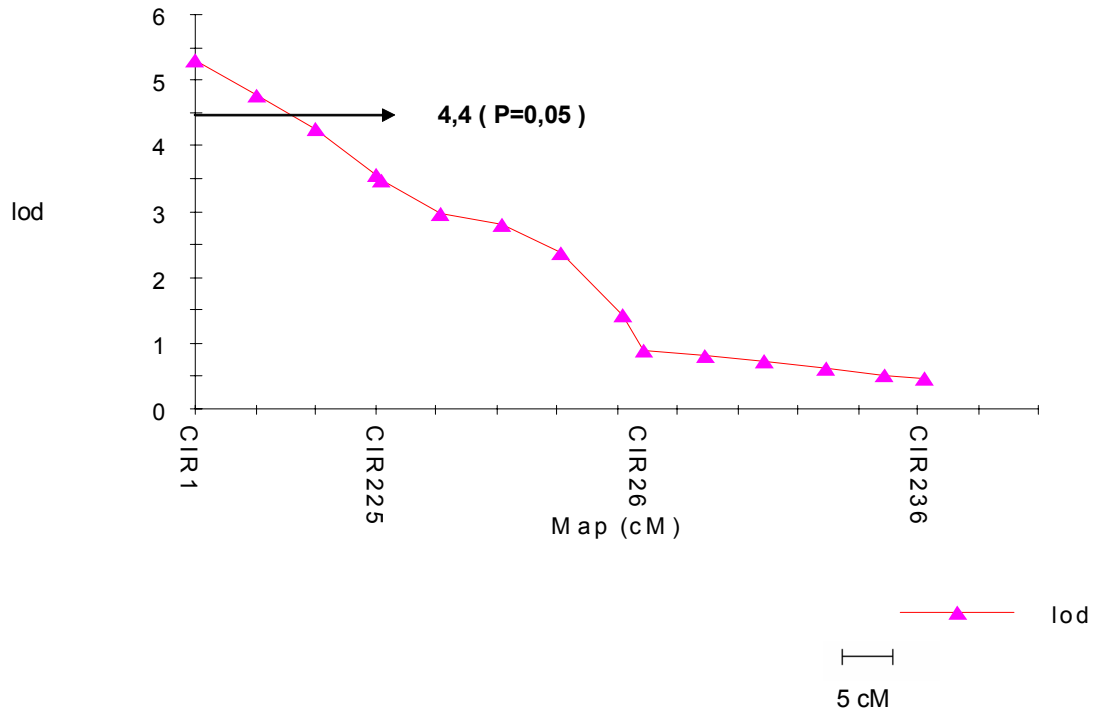


Figura 10 - QTL do grupo de ligação VIII para o mapa integrado dos clones de cacaueteiro de 'ICS 39 x CAB 0208'

A grande variação fenotípica explicada pelo único QTL encontrado e a proporção de 3:1 (resistente:suscetível) na segregação das progênies  $F_2$  de 'ICS1 x SCA6' fizeram com que Queiroz et al. (2003) concluíssem que a resistência a *C. pernicioso* era governada por um gene maior com efeito de dominância. No entanto, os três QTLs encontrados nas populações de 'ICS39 x CAB0208' e 'ICS39 x CAB0214' demonstram que esta resistência pode ser poligênica, com os genes responsáveis por este caráter dispostos em *clusters* nestas regiões. Estes resultados concordam com os de Brown et al. (2005) que sugerem que a resistência das progênies de 'ICS1 x SCA6' a *C. pernicioso* poderia ser governada por vários genes de efeito de dominância localizados nos dois QTLs dos grupos de ligação I e IX.

O ordenamento das marcas nos grupos de ligação onde foram detectados os QTLs , de uma maneira geral, apresentaram semelhança com o observado nos grupos de ligação do mapa consensual para o cacaueiro publicado por Pugh et al. (2004). No grupo VIII do mapa de ligação do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208', onde foi detectado um QTL, todas as marcas agrupadas apresentaram o mesmo ordenamento do encontrado no mapa consensual (Figura 11). No entanto, foi verificada uma diferença entre os dois mapas de posicionamento da marca *mTcCIR236*, que no mapa do cruzamento 'ICS 39 x CAB 0208', está a 61 cM e no mapa consensual se localiza a 38 cM. Em função de não terem sido observadas divergências em nenhuma das outras marcas do grupo VIII, a grande diferença de posicionamento da marca *mTcCIR236* observada entre os dois mapas, pode estar relacionada com a baixa saturação deste grupo no mapa de 'ICS 39 x CAB 0208' quando comparado com o mapa consensual.

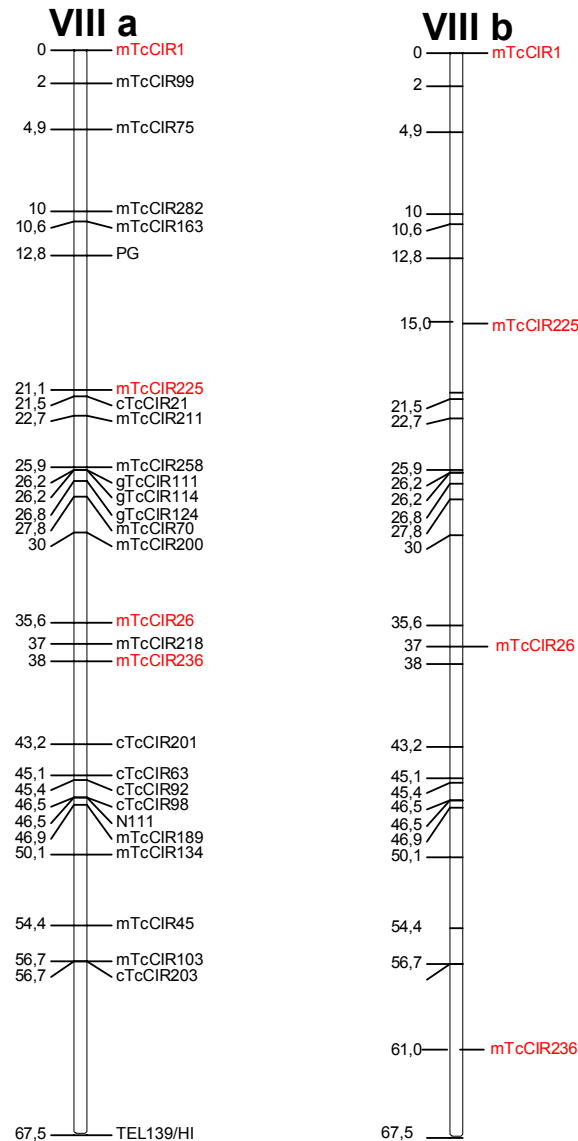


Figura 11 - Grupos de ligação VIII do mapa consensual do cacauero do CIRAD (a) (PUGH et al. 2004) e mapa do cruzamento ICS 39 x CAB 208 (b)

Inversões de ordenamento das marcas foram encontradas nos grupos IV e IX do mapa 'ICS 39 x CAB 0214' quando comparado com os ordenamentos das marcas dos mesmos grupos do mapa consensual de Pugh et al (2004) (Figura 12). No grupo IV ocorreram inversões dos locos *mTcCIR18* e *mTcCIR76* e diferenças no posicionamento das demais marcas. No caso do loco *mTcCIR76* além da baixa saturação do mapa, as distorções das segregações dos alelos verificadas neste loco, poderiam estar

influenciando para que ocorresse a inversão de posicionamento. Das marcas do grupo IX, apenas a *mTcCIR24* apresentou inversão de ordenamento em relação ao mapa consensual. As demais marcas, excetuando-se *mTcCIR243* e *mTcCIR166*, divergiram apenas no posicionamento.

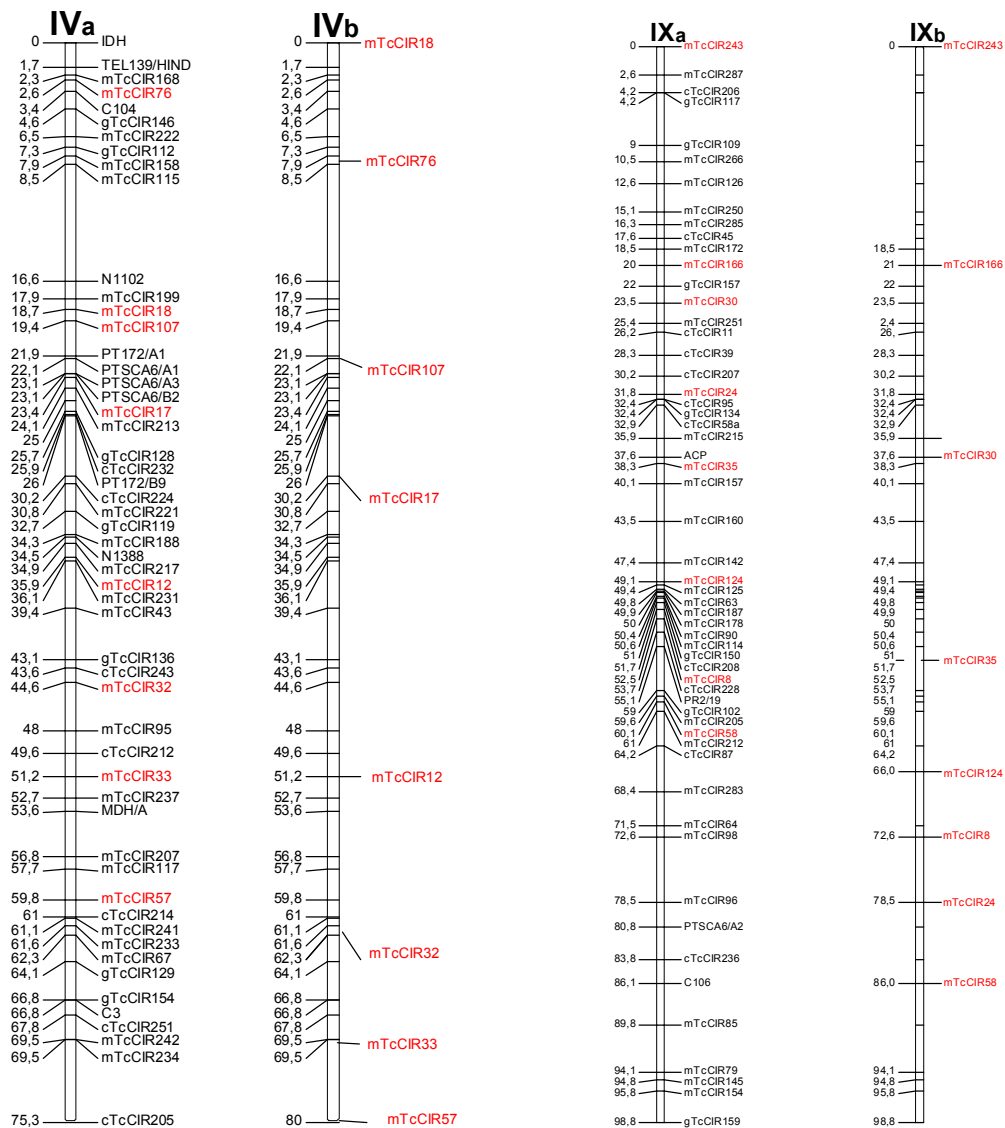


Figura 12 - Grupos de ligação IV e IX do mapa consensual do cacaveiro do CIRAD (a) (PUGH et al. 2004) e mapa do cruzamento 'ICS 39 x CAB 214' (b)



### 2.3.3 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacauero selecionados como resistentes a *C. pernicioso*

Todos os 20 locos de microssatélites utilizados para genotipar os acessos mostraram-se polimórficos, com padrões de bandas facilmente observadas após a coloração com nitrato de prata (Figura 13).

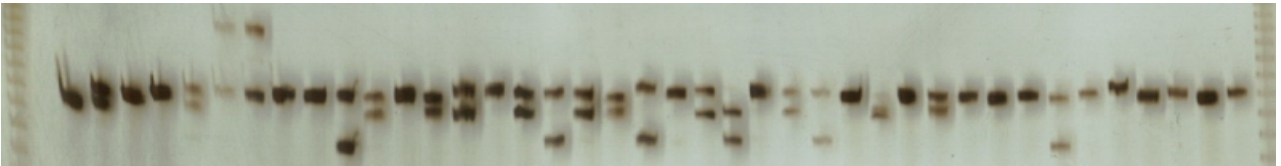


Figura 13 - Fragmentos de microssatélites de cacauero encontrados no loco *mTcCIR 12* em gel de 7 % poliacrilamida corado com nitrato de prata

Os 87 genótipos de cacauero apresentaram 74 alelos nos 20 locos de microssatélites avaliados, com uma média de 3,7 alelos/loco. O número de alelos variou de 2 para os locos *mTcCIR01* e *mTcCIR32* até 5 alelos para os locos *mTcCIR03*, *mTcCIR07*, *mTcCIR25* e *mTcCIR54* (Tabela 22). Estes resultados revelam uma baixa variabilidade dos genótipos analisados, quando comparados com os resultados obtidos por outros autores para diferentes acessos de cacauero. A análise realizada por Motamayor et al. (2002) com 16 locos de microssatélites de uma amostra de 28 acessos de cacauero do grupo forasteiro oriunda de diferentes países, revelou uma média de 8,7 alelos/loco. A avaliação realizada por Mota (2003), utilizando 30 locos de microssatélites e 172 acessos 'CAB' pertencentes a diferentes bacias hidrográficas, revelou uma média de 6,4 alelos/loco. Sereno et al. (2006), avaliando 11 locos de microssatélites em 94 acessos 'CAB', encontraram uma média de 4,45 alelos/loco.

As genotipagens demonstraram que para os locos de microssatélites utilizados em comum, o número de alelos encontrados nos 87 acessos de cacauero foi sempre inferior aos obtidos pelos demais autores (Tabela 22). Vale destacar os locos *mTcCIR01* e *mTcCIR60*, onde no primeiro foram encontrados apenas 2 alelos nos 87 acessos genotipados, contra 6 alelos encontrados por Sereno et al. (2006) e 7 alelos por Mota (2003) e no segundo loco, apenas 3 alelos foram encontrados para os genótipos resistentes, enquanto que Mota (2003) encontrou até 11 alelos nos 172

acessos de cacaueteiro. Este resultado reforça ainda mais a existência de uma base genética estreita entre os acessos resistentes avaliados, que poderia estar associada a um provável parentesco entre alguns destes acessos como, por exemplo, os clones 'Theobahia' e 'TSH 516' que foram originados a partir de genitores em comum, os clones 'ICS 1' e 'SCA 6'. Neste caso, a baixa variabilidade genética dos acessos resistentes poderia estar sendo ocasionada pela identidade por descendência dos alelos.

Tabela 22 - Alelos identificados nos 20 locos de microssatélites dos 87 acessos de cacaueteiro resistentes a *Crinipellis pernicioso*; número de alelos encontrados por Sereno et al. (2006); número de alelos encontrados por Mota (2003)

Nº Loco	Cromo-ssomo	* N <sub>A</sub> Nº alelos	Tamanho dos fragmentos (pb)	N <sub>A</sub> Sereno (2005)	N <sub>A</sub> Mota (2003)
<i>mTcCIR01</i>	VIII	2	130 e 150	6	7
<i>mTcCIR03</i>	II	5	210; 215; 225; 260 e 280		
<i>mTcCIR06</i>	VI	3	240; 245 e 250	7	6
<i>mTcCIR07</i>	VII	5	150; 155; 160; 165 e 170	3	8
<i>mTcCIR09</i>	VI	4	260; 270; 285 e 290		9
<i>mTcCIR11</i>	II	4	270; 275; 300 e 310	7	7
<i>mTcCIR12</i>	IV	4	170; 197; 200 e 240	8	9
<i>mTcCIR24</i>	IX	3	190; 200 e 210		
<i>mTcCIR25</i>	VI	5	135; 140; 150 e 160		8
<i>mTcCIR29</i>	I	3	160; 165 e 170		
<i>mTcCIR30</i>	IX	3	175; 180 e 185		
<i>mTcCIR32</i>	IV	2	190 e 205		3
<i>mTcCIR33</i>	IV	4	250; 280; 300 e 330		10
<i>mTcCIR37</i>	X	4	130; 135; 160 e 170		
<i>mTcCIR42</i>	V	4	200; 210; 225 e 235		8
<i>mTcCIR54</i>	I	5	143; 150; 157; 162 e 167		8
<i>mTcCIR60</i>	II	3	190; 200 e 210		11
<i>mTcCIR61</i>	X	4	185; 190; 200 e 210		
<i>mTcCIR62</i>	III	4	160; 170; 180 e 190		
<i>mTcCIR118</i>	I	3	180; 190 e 200		

\* N<sub>A</sub>- Número de alelos.

Houve uma grande variação no índice de fixação nos acessos analisados, com um valor mínimo de - 0,397 para o híbrido 'TSH 516' até um máximo de 0,68 para o

clone 'SIAL 70'. Para os clones 'CAB 0208', 'CAB 0214' e 'SCA 6' os índices de fixação foram de 0,51, 0,267 e 0,396, respectivamente (Tabela 23). Os valores negativos indicam excesso de locos em heterozigose em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores positivos indicam excesso de homozigose, sugerindo endogamia. A porcentagem de locos em homozigose variou de 13,3 % para a planta 'VB 1156' até 85 % para o clone 'SIAL 70' (Tabela 23).

Tabela 23 - Porcentagem de locos em homozigose e índice de fixação nos 20 locos de microssatélites utilizados para genotipagem dos 87 acessos de cacauero

(continua)

Planta	Homozigose (%)	Índice de fixação*	Planta	Homozigose (%)	Índice de fixação*
ALV0214	40,0	0,0811	PS 1910	50,0	0,0454
ALV1102	35,0	-0,0073	PS 2006	45,0	0,0823
AME02	45,0	-0,0449	PS 4007	45,0	-0,0887
BB1392	45,0	-0,0248	PS 4828	43,8	0,1143
BB97	45,0	0,0579	PS 5101	36,8	-0,0703
BE007	45,0	-0,0459	PS 5302	40,0	0,0917
BE 71	43,3	0,2226	PS 5702	50,0	0,2150
BE 79	65,0	0,2222	PS 5704	35,0	-0,0793
BJ 11	35,0	-0,1031	PS 5705	45,0	0,0764
CA 14	30,0	0,0434	PS 57111	45,0	0,1176
CA 71	25,0	-0,1951	PS 57139	55,0	0,3505
CAB 0208	50,0	0,5103	PS 5784	35,0	-0,0958
CAB 0214	45,0	0,2676	SB 24	30,0	-0,1558
FA 13	26,3	-0,2669	SC 94	60,0	0,3183
FB 28	38,9	-0,1320	SCA 6	75,0	0,3959
FB 30	65,0	0,2718	SIAL 70	85,0	0,6809
FCONV 150	75,0	0,4329	SIC 824	73,7	0,5591
FF 01	50,0	0,2346	SL 70	50,0	0,0426
FL 57	57,9	0,0355	SL 71	30,0	0,0211
FM 31	42,1	-0,0010	SM 06	35,0	0,0305
FO 242	52,6	0,0901	SP 50	33,3	-0,0653
FO 50	35,0	-0,1511	SR 01	40,0	-0,0010
FSR 02	52,9	0,1900	STAEUL 01	50,0	0,0171
HW 25	47,4	0,0743	SV 02	30,0	0,0005
HW 96	66,7	0,1406	Theobahia	35,0	-0,2094
ICS 1	55,0	0,2514	TR 15	30,0	-0,1407

Tabela 23 - Porcentagem de locos em homozigose e índice de fixação nos 20 locos de microsatélites utilizados para genotipagem dos 87 acessos de cacauero

Planta	Homozigose (%)	Índice de fixação*	(conclusão)		
			Planta	Homozigose (%)	Índice de fixação*
ICS 6	65,0	0,4445	TSH 516	25,0	-0,3979
LIB 366	30,0	-0,0102	VB 03	50,0	0,2340
LP 13	57,9	0,1792	VB 1128	45,5	0,3293
LP 24	40,0	-0,0478	VB 1139	60,0	0,1159
MC 01	55,0	0,3592	VB 1142	30,0	-0,1765
MC 03	40,0	-0,0922	VB 1144	50,0	-0,0313
MC 04	50,0	0,1593	VB 1151	64,7	0,2433
MC 23	38,9	0,0593	VB 1154	83,3	0,4707
MC 36	44,4	0,0040	VB 1156	13,3	-0,3832
Minaouro 01	26,3	-0,3200	VB 1159	35,0	-0,2549
NO 83	30,0	-0,3329	VB 1160	25,0	-0,0845
PH 15	35,3	-0,1459	VB 184	40,0	-0,1270
PH 60	41,2	-0,1464	VB 515	35,0	0,0680
PH 96	45,0	0,1823	VB 547	55,0	0,1849
PS 0106	55,0	0,1379	VB 679	33,3	0,0544
PS 1030	60,0	0,2121	VB 841	30,0	-0,2391
PS 1712	45,0	-0,0168	VB 900	55,0	0,1984
PS 1817	41,2	0,1085			

\*Índice de fixação no indivíduo

### 2.3.3.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores

Verificou-se um forte grau de parentesco entre os acessos 'CAB 0208' e 'CAB 0214', os quais não se relacionaram com mais nenhum dos genótipos analisados. O índice de coancestria entre os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' foi de 0,43, próximo ao previsto para irmãos germano (0,5), com um valor de LOD de 3,62 e uma probabilidade de não exclusão de 0,0001. O elevado grau de parentesco entre estes 'CABs' pode estar relacionado com a proximidade entre as áreas de coleta destes dois acessos, pois são provenientes da mesma expedição botânica realizada na bacia do rio Purus em março de 1981 (ALMEIDA et al. 1987 e 1995). As populações de cacauero do rio Purus se caracterizam por formarem grupos de plantas em reboleiras ao longo das várzeas, o que certamente facilita o fluxo de genes entre as sub-populações mais próximas (Caio Márcio V. C. de Almeida, informação pessoal).

A inexistência de relação de parentesco entre os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com os acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes nas fazendas do Sul da Bahia, reforça ainda mais a possibilidade destes 'CABs' possuírem genes de resistência a *C. pernicioso* diferentes dos encontrados nos clones tradicionalmente utilizados pela CEPLAC no seu programa de melhoramento.

Dos 82 acessos analisados, 42 tiveram relações de parentesco com algum dos clones candidatos a genitores utilizados. Considerando-se como genitor o clone 'SCA 6', foram relacionados 21 acessos (Tabela 24), dentre os quais o grau de parentesco com 'SCA 6' variou de uma relação a nível de primos de primeiro grau, no caso do acesso 'NO 83' com coeficiente de coancestria de 0,097, até relações de parentesco a nível de pai e filho ou irmãos completos, como para os acessos 'VB 547', 'VB 900', 'HW 25' e 'FSR 02', que apresentaram coancestrias acima de 0,25. Para os demais acessos verificaram-se níveis de parentesco de meios irmãos com o 'SCA 6'. Os genótipos 'Theobahia' e 'TSH 516', utilizados como controle, são descendentes do cruzamento entre 'ICS 1 x SCA 6' e apareceram relacionados com seus genitores, com coancestria próxima a esperada entre primos (0,0625) para 'TSH 516' e acima da esperada para meios-irmãos (>0,125) para 'Theobahia'.

Relações de parentesco entre acessos selecionados como resistentes a *C. pernicioso* em plantios comerciais de cacaueteiro no Sul da Bahia (clones VB) e os clones da série 'Scavina' também foram encontradas por Yamada e Lopes (1999) ao analisarem 39 destes acessos com três sistemas enzimáticos. Aproximadamente 18 destas plantas foram consideradas progênies de 'SCA 6' ou 'SCA 12', e o restante apresentou relação de parentesco com os clones 'PA 150', 'IMC 67' e demais clones das séries 'PA' e 'UF'. Faleiro et al. (2004) ao analisarem a similaridade genética de 54 acessos de cacaueteiro resistentes a *C. pernicioso* provenientes de plantios comerciais, por meio de marcadores do tipo RAPD, verificaram que 29 destes acessos apresentavam marcas associadas aos clones 'SCA6' e 'SCA12', o que indicava existir um elevado grau de parentesco entre estes genótipos.

A alta frequência de acessos aparentados de 'Scavina' dentro das seleções realizadas em plantios comerciais de cacaueteiro híbrido no Sul da Bahia de certa forma

já era esperada, visto que as principais fontes de resistência a *C. pernicioso* utilizadas no programa de produção de sementes da CEPLAC eram os clones 'SCA 6' e 'SCA 12'.

Tabela 24 – Acessos de cacaueteiro relacionados com o clone candidato a parente 'SCA 6'

Clone	Coancestria	LOD	Probabilidade de não exclusão	Delta
AME 02	0.132	0.09	0.031	*
CA 71	0.144	0.54	0.025	*
FO 50	0.101	0.67	0.016	*
FSR 02	0.288	2.32	0.010	*
HW 25	0.238	3.95	0.006	*
HW 96	0.170	1.35	0.061	*
MC 03	0.217	1.58	0.026	*
NO 83	0.097	1.94	0.115	*
PH 96	0.246	3.90	0.002	*
PS 2006	0.130	0.78	0.005	*
PS 57111	0.192	0.16	0.003	*
SP 50	0.157	0.67	0.013	*
SV 02	0.198	1.57	0.004	*
THEOBAHIA	0.158	4.08	0.029	*
TSH 516	0.067	1.02	0.180	*
VB 03	0.206	1.68	0.002	*
VB 1142	0.175	2.80	0.012	*
VB 1159	0.201	4.85	0.059	*
VB 547	0.290	3.75	0.005	*
VB 841	0.122	1.65	0.026	*
VB 900	0.319	5.80	0.003	*

\*  $P < 95$ .

Considerando o clone 'ICS 1' como genitor presumível, foram encontrados quatro acessos relacionados, com grau de parentesco variando desde filhos, para clones 'MC 23' e 'SL 71' até meios-irmãos para 'PS 1712' e 'SR 01' (Tabela 25). Como descendentes de 'ICS 6' foram encontrados quatro acessos, com LP 24 e PH 15 apresentando relação de pai e filho ou irmãos-completos e 'FA 13' e 'PH 60' como meios-irmãos (Tabela 25).

Tabela 25 – Acessos de cacaueteiro relacionados com os clones candidatos a parentes ‘ICS 1’ e ‘ICS 6’

Clones	Candidato parente	Coancestria	LOD	Prob. não exclusão	Delta
MC 23	ICS 1	0.245	4.30	0.0063	*
PS 1712	ICS 1	0.161	0.39	0.0082	*
SL 71	ICS 1	0.267	2.75	0.0022	*
SR 01	ICS 1	0.190	0.88	0.0106	*
LP 24	ICS 6	0.198	0.45	0.0170	*
FA 13	ICS 6	0.161	3.37	0.0492	*
PH 15	ICS 6	0.317	3.45	0.0520	*
PH 60	ICS 6	0.164	0.15	0.0612	*
ICS 6	ICS 1	0.348	3.23	0.0011	*
THEOBAHIA	ICS 1	0.195	4.33	0.0286	*
TSH 516	ICS 1	0.057	1.20	0.1803	*

\*  $P < 95$ .

Nos casos dos acessos ‘SIC 824’ e ‘SIAL 70’, foram encontrados 13 genótipos aparentados. De maneira geral, o grau de relação foi alto, com coeficiente de coancestria indicando um parentesco ao nível de pai e filho ou irmãos completos para a maioria dos clones (Tabela 26). Observou-se ainda uma forte relação entre os clones ‘SIAL 70’ e ‘SIC 824’, que provavelmente se deve ao fato dos mesmos terem sido originados de seleções em áreas comerciais da região Sul da Bahia, basicamente em plantações de cacaueteiro da variedade ‘Comum’, cuja base genética é bastante estreita (CASCARDO et al. 1993).

São grandes as possibilidades de que os acessos relacionados com os clones das séries ‘ICS’, ‘SIAL’ e ‘SIC’, tidos como suscetíveis a *C. pernicioso*, e muitos dos 40 acessos que não tiveram relação de parentesco com nenhum dos clones utilizados como referência, sejam descendentes de clones Alto Amazônicos. Clones das séries ‘IMC’, ‘PA’ e ‘Cruzeiro do Sul’, considerados Alto Amazônicos, apresentam muitas vezes níveis intermediários de resistência a *C. pernicioso* (MARITA et al. 2001; FALEIRO et al. 2004) e foram utilizados como clones genitores nos programas de produção de sementes da CEPLAC.

Tabela 26 – Acessos de cacaueteiro relacionados com os clones candidatos a parentes ‘SIC 824’ e ‘SIAL 70’

Clones	Candidato parente	Coancestria	LOD	Prob. não exclusão	Delta
FB 30	SIC 824	0.305	0.92	0.0058	*
VB 1156	SIC 824	0.252	0.62	0.0968	*
BB 1392	SIAL 70	0.198	0.60	0.0264	*
BE 71	SIAL 70	0.278	1.79	0.0082	*
BE 79	SIAL 70	0.212	0.60	0.0089	*
FL 57	SIAL 70	0.231	2.65	0.0286	*
MINAOURO 1	SIAL 70	0.073	1.34	0.1018	*
PH 60	SIAL 70	0.129	0.13	0.0612	*
PS 0106	SIAL 70	0.301	4.80	0.0105	*
PS 1817	SIAL 70	0.221	0.74	0.0125	*
PS 4007	SIAL 70	0.144	0.76	0.0389	*
SL 70	SIAL 70	0.297	3.45	0.0170	*
VB 1154	SIAL 70	0.332	3.67	0.0056	*
SIAL 70	SIC 824	0.618	8.17	0.0001	*

\*  $P < 95$ .

### 2.3.3.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados

A Figura 13 apresenta as dispersões dos 87 acessos de cacaueteiro em uma representação de duas dimensões, explicando 17% da variabilidade existente. Foram formados dois grupos distintos, sendo que o maior deles abrigou 72 acessos, entre os quais, todos os acessos que se relacionaram com o ‘SCA 6’ (Tabela 24), os Trinitários ‘ICS 1’ e ICS 6 (Tabela 25) e os Baixo Amazônicos ‘SIC 824’ e ‘SIAL 70’ (Tabela 26). Os acessos acima mencionados ficaram localizados nas margens do maior grupo, sendo que o ‘SCA 6’ no lado oposto dos demais. Ao centro do maior grupo os genótipos ‘Theobahia’ e ‘TSH 516’, ambos originários dos cruzamentos entre ‘ICS 1’ e ‘SCA 6’. Os clones Baixo Amazônicos considerados por Motamayor et al (2003) como possíveis genitores dos materiais Trinitários, aparecem próximos do ‘ICS 1’ e ‘ICS 6’.

Leal (2004) também verificou uma alta similaridade genética entre clones Alto e Baixo Amazônicos e acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes a *C. pernicioso* em plantios comerciais do Sul da Bahia. Cerca de 90% dos 102 acessos



analisados por este autor, agruparam com os clones das séries 'Scavina' e seus descendentes, 'IMC', 'SIAL' e 'SIC'.

Esta alta similaridade genética observada entre os clones utilizados como candidatos aos genitores e os acessos selecionados em fazendas, revela que a maioria destes genótipos é descendente de fontes de resistência a *C. perniciosa* já conhecidas, o que os torna menos importantes para o programa de melhoramento do cacauero.

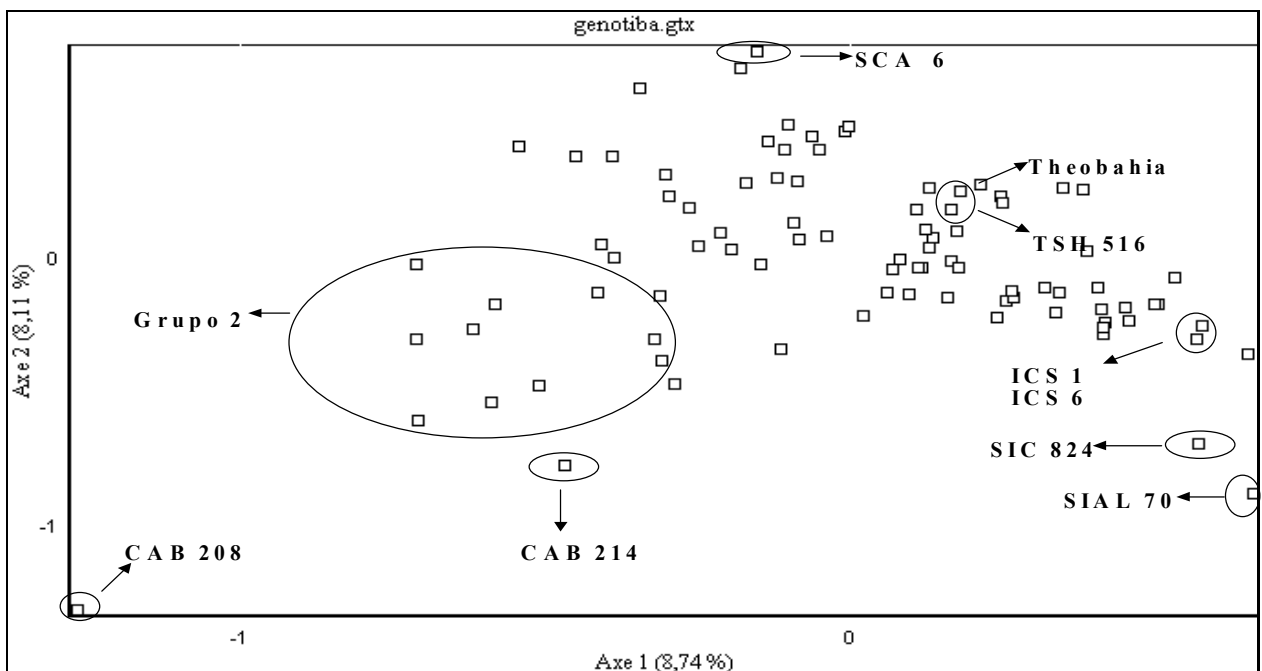


Figura 18 - Dispersões dos 87 acessos de cacauero selecionados como resistentes a *C. perniciosa* obtidas por análise fatorial de correspondência, utilizando 20 locos de microssatélites

O segundo grupo foi formado pelos clones 'ALV 1102', 'FF 01', 'MC 01', 'PS 4828', 'PS 5101', 'PS 5704', 'PS 57139', 'VB 679', 'VB 1128' e 'SC 94'. O grau de parentesco foi muito alto entre estes genótipos, variando de primo de primeiro grau entre os clones 'MC 01' e 'SL 70' até irmãos de autofecundação entre os clones 'PS 4828' e 'MC 01'.

Os clones 'CAB 0208' e 'CAB 0214' foram os únicos acessos destoantes dos dois grupos formados. O clone 'CAB 0208' apresentou muito pouca similaridade com a

maioria dos acessos analisados, com exceção do 'CAB 0214'. Estes resultados são explicados pelo fato destes dois acessos serem originários da mesma bacia hidrográfica e não terem relação de parentesco com nenhum dos outros acessos analisados.

Dentre os 82 acessos utilizados nas análises de similaridade genética, os que fizeram parte do menor grupamento e os clones da série 'CAB' são os mais importantes para o programa de melhoramento. O fato de estes clones serem dissimilares geneticamente dos clones candidatos a genitores e não possuírem relação de parentesco com os acessos que fizeram parte do maior grupo, aumentam as possibilidades de se tratarem de novas fontes de resistência a *C. pernicioso*, diferentes geneticamente das que são atualmente utilizadas.

### 3 CONCLUSÕES

As avaliações realizadas em casa de vegetação e campo distinguiram diferenças de níveis de resistência a *C. pernicioso* nos acessos da série CAB. As famílias mais resistentes foram as descendentes de 'CAB 0169', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392' e 'CAB 0410'.

Os clones 'CAB 0208' e 'CAB 0214' apresentaram maior resistência a *C. pernicioso* que os clones 'SCA 6', 'SCA 12' e 'Theobahia', quando submetidas por cinco anos à alta pressão de inóculo e mesmas condições ambientais em campo, demonstrando existir genes de resistência diferentes nestes acessos.

A seleção de clones resistentes dentro da população de cacaueteiro da bacia do rio Jamari-RO revelou que a resistência a *C. pernicioso* não é exclusiva de clones considerados Alto Amazônicos.

Os mapas conjuntos de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com 'ICS 39', embora pouco saturados, foram semelhantes ao mapa consensual do cacaueteiro quanto ao agrupamento e localização das marcas de microssatélites.

Nos mapas conjuntos de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' com 'ICS 39', os QTLs encontrados representaram de 41,9% a 94,3% da variação fenotípica das progênies para o caráter resistência a *C. pernicioso*.

O QTL associado com resistência a *C. pernicioso* encontrado no grupo IX do mapa conjunto de 'ICS 39 x CAB 0214', foi coincidente com o encontrado por diferentes autores para as progênies de 'ICS 1 x SCA 6'.

Houve coincidência entre a localização do QTL do grupo de ligação IV do mapa de 'ICS 39 x CAB 0214' com QTLs associados à resistência a *P. palmivora* e vários marcadores do tipo RGH no mapa consensual, indicando a possibilidade de existência de *clusters* de genes de resistência nesta região do genoma.

A localização de três QTLs associados à resistência a *C. pernicioso* nos mapas de ligações de 'ICS 39 x CAB 0208' e 'ICS 39 x CAB 0214' e a alta estabilidade desta resistência verificada nas progênies de 'CAB 0208' e 'CAB 0214' indicam que este caráter é poligênico e não monogênico, como se tem se atribuído as progênies de 'SCA 6'.

Os clones 'CAB 0208' e 'CAB 0214' foram dissimilares geneticamente dos 'clones SCA 6', 'Theobahia' e dos acessos selecionados nos plantios comerciais de cacauero do Sul da Bahia.

A não existência de relação de parentesco e a alta dissimilaridade genética encontrada entre o clone 'SCA 6' e os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' reforça a possibilidade destes acessos possuírem diferentes genes de resistência a *C. pernicioso*.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.S.B; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacau. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed., Piracicaba: Ceres, 2005. cap.18 v.2, p.151-164.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; NAKAYAMA, L.H.I.; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M. 'Screening' para obtenção de genótipos de cacau resistentes a *Crinipellis pernicioso*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.19-20, jan. 1999.

ALMEIDA, C.M.V.C.; DIAS, L.A.S. Recursos genéticos. In: DIAS, L.A.S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacau**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap.5, p. 163-216.

ALMEIDA, C.M.V.C.; BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; BARTLEY, B.G.D. Evolução do programa de conservação dos recursos genéticos de cacau na Amazônia Brasileira. **Boletim Técnico. Ministério da Agricultura. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**, Belém, n. 5, p.108, 1987.

ALMEIDA, C.M.V.C.; DIAS, L.A.S.; OKABE, E.T.; MEDEIROS, J.R.P. Variability in genetic resources of cacao in Rondônia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.5, n.3, p.317-323, Sept. 2005.

ALMEIDA, C.M.V.C.; MACHADO, P.F.R.; BARRIGA, J.P.; SILVA, F.C.O. Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia Brasileira: uma abordagem histórica e analítica. **Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**, Porto Velho, 1995. 92 p.

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D.B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of *Crinipellis pernicioso* isolates from different host. **Plant Pathology**, London, v. 43, n.6, p.1020-1027, Dec.1994.

ANDEBRHAN, T.; BONFIM, J.C; CARVALHO, A.L.P.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; Comparative epidemiology experiment: Brazil. In: RUDGARD, S.A.; MADDISON, A.C.; ANDEBRHAN, T. (Ed.). **Disease management in cocoa: comparative epidemiology of witches' broom cocoa**. London: Chapman & Hall, 1993. 33-35p.

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

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.2, p.167-175, Feb.1999.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL – 2003, Rio de Janeiro, v.63, p. 3-23, 2003.

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

ARRUDA, M.C.C.; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; FELIPE, M.S.S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, London, v. 52, n.2, p.236-244, Apr. 2003a

ARRUDA, M.C.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; MILLER, R.N.G.; RESENDE, M.L.V.; FELIPE, M.S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.1, p.25-37, Jan. 2003b.

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

BARTLEY, B.G.D. Status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 6., 1981, Cartagena. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 1981, p.56-69.

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

BARTLEY, B.G.D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. London: CABI Publishing, 2005. 341p.

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

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

BAYER, C.; FAY, M.F.; DE BRUIJN, A.Y. SAVOLAINEN V.; MORTON, C.M.; KUBITZKI, K.; ALVERSON, W.S.; CHASE, M.W. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcl* DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.129, n.4, p.267-303, Apr. 1999.

BORRONE, J.W.; KUHN, D.N.; SCHNELL, R.J. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 109, n.3, p. 495-507, Aug. 2004.

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

CALENGE, F.; DROUET, D.; DENANCÉ, C.; VAN DE WEG, W.E.; BRISSET, M.N.; PAULIN, J.P.; DUREL, C.E. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.111, n.1, p.128-135, Dec. 2004.

CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de QTL`s: contribuições e perspectivas. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.49-62.

CARNEIRO, M.S. **Mapas de ligação de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) baseados em marcadores RAPD**. 2001. 92 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CASCARDO, J.C.M.; PIRES, J.L.; FIGUEIRA, A. Estimating genetic diversity of cacao in Southern Bahia using RAPDs. In: BRAZILIAN PLANT BIOTECHNOLOGY MEETING, 1., 1993, Brasília, **Annals...** Brasília: REDBIO, 1993. p. 47.

CHEESMAN, E.E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. **Tropical Agriculture**, London, v.21, n.8, p.144-159, Aug. 1944.

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

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

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

CROUZILLAT, D.; PHILLIPS, W.; FRITZ, P.; PÉTIARD, V. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations – Polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in cacao. **Euphytica**, Wageningen, v.114, n.1, p.25-36, Jan. 2000b.

CROUZILLAT, D.; RIGOREAU, M.; CABIGLIERA, M.; ALAREZ, M.; BUCHELI, P.; PÉTIARD, V. QTL studies carried out for agronomic, technological and quality traits of cocoa in Ecuador. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON NEW TECHNOLOGIES AND COCOA BREEDING, 2000, Kota Kinabalu, **Proceedings...** Kota Kinabalu: INGENIC, 2001. p. 120-126.

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



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

DIAS, L.A.S.; BARRIGA, J.P.; KAGEYAMA, P.Y.; ALMEIDA, C.M.V.C. Variation and its distribution in wild cacao populations from the Brazilian Amazon. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.46, n.4, p.507-514, Dec. 2003.

DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**, 2nd ed. London: Chapman & Hall/CRC, 2002. 225p.

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

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDELL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. **Genetics**, Bethesda, v.116, p.113-125, 1987.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; ROCHA, J.B.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom base on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, n.1, p.12-17, March. 2004.

FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA FILHO, G.A.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*, 2006. No prelo.

FARIS, J.D.; LI, W.L.; LIU, D.J.; CHEN, P.D.; GILL, B.S. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.98, n.2, p.219-225, Feb.1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. **Documento. Embrapa – Cenargen**, Brasília, n.20, 220p., 1998.

FIGUEIRA, A.; ALEMANNI, L. *Theobroma cacao* Cacao. In: LITZ, R.E. **Biotechnology of fruit and nut crops**. Gainesville: CABI., 2005. p. 639-669.

FIGUEIRA, A.V.O.; CASCARDO, J.C.M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: DIAS, L.A.S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacau**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap.10, p. 385-437.

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

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

FONSECA, S.E.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 2000. p.149-153.

FONSECA, S.E.A.; ALMEIDA, L.C.; ANDEBRHAN, T. Patogenicidade de isolados e avaliação de resistência de clones de cacau a *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 9., Togo, 1984, **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 1984. p.233-236.

GEBHARDT, C. V.; VALKONEN, J.P.T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 79-102, 2001.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap.30, p.967-993.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v.137, n.4, p.1121-1137, Aug.1994.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, London, v.72, n.3, p.278-289, Mar.1994.

GUYTON, B. Cocoa market: supply and outlook. **Chocolate Manufacturers Association. Production and marketing statistics..** Disponível em: <<http://www.worldcocoafoundation.org/Basics/Market/market.asp>> . Acesso em: 11 fev. 2006.

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

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Version for Windows 95. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, n.4, p.618-620, Dec.2003.

HEDGER, J.N.; PICKERING, V.E.; ARANGUNDI, J. Variability of population of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.88,n.4, p.533-545, June1987.

JANSEN, R.C. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v.136, n.3, p.871-881, Mar. 1994.

JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v.135,n.1, p.205-211, Sept.1993.

KNIGHT, C. Cocoa review: supply and demand trends. **American Cocoa Research Institute.** 2000. Disponível em: <<http://www.acri-cocoa.org/acri/index.cfm?item=publications>>. Acesso em: 11 fev. 2006.

KOBAYASHI, R.S.; SANTOS, A.O.S.; BASTOS, C.N.; SILVA, F.C.O.; SCERNE, R.M.C. Caracterização morfológica de frutos e sementes de clones de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) silvestres da Amazônia Brasileira. **Boletim Técnico. Ministério da Agricultura. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**, Belém, n.19, 59p., 2001.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annual Eugene**, London v.12, p.172-175, 1944.

KUHN, D.V.; HEATH, M.; WISSER, R.J.; MEEROW, A.; BROWN, J.S.; LOPES, U.; SCHNELL, R.J. Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.107, n.2, p.191-202, July 2003.

LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; RAJ KUMAR, D. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management**, London, v.34, n.3, p.318-323, July 1988.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.A.K.; FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.13, n.3, p.211-227, Apr. 2004.

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

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; N'GORAN, J.A.K.; CLEMENT, D.; FLAMENT, M.H.; LAURENT, V.; FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.91, n 6-7, p.987-993, Nov. 1995.

LANAUD C.; KÉBÉ, I.; RISTERUCCI, A.M.; CLÉMENT, D.; N'GORAN, J.K.A.; GRIVET, L.; TAHI, M.; CILAS, C.; PIERETTI, I.; ESKES, A.B.; DESPRÉAUX D. Mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Phytophthora palmivora* in *T. cacao*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 2000. p. 99-105.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Bethesda, v.121, p.185-199, 1989.

LEAL, J.B. **Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. 2004. 50 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

LEAL JUNIOR, G.A. **Diagnóstico de *Crinipellis perniciosa* em tecidos infectados de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros**. 2002. 136 p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LIU, B.H. **Statistical genomics**, New York: CRC, 1998. 610p.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 82, n.11, p.1420-1425, Nov. 1995.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. Cacau. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. cap.13, p.611-656.

MARITA, J.M.; NIENHUIS, J.; PIRES, J.L.; AITKEN, W.M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches` broom disease resistance. **Crop Science**, Madison, v.41, n. 4, p.1305-1316, July 2001.

MARSHALL, T. C., SLATE, J., KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Bloomington, v. 7, n. 5, p.639-655, May 1998.

MATTA, F.P. **Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 230 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

McCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized linear models**, 2nd.ed. London: Chapman & Hall, 1989. 511p.

MCGEARY, F.M.; WHEELER, B.E.J. Growth rates of and mycelial interaction between isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. **Plant Pathology**, London, v.37, n. 4, p.489-498, Dec. 1988.

MEAGHER, T. R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, New York, v.128, n. 2, p.199-215, Feb. 1986.

MISSIAGGIA, A.A. **Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e, estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucalyptus spp.*** 2005. 236 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MOTA, J.W.S. **Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao L.* da Amazônia Brasileira por microssatélites.** 2003. 97 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MOTAMAYOR, J.C.; RISTERUCCI, A.M.; HEATH, M.; LANAUD, C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. **Heredity**, London, v.91, n.3, p.322-330, sept. 2003.

MOTAMAYOR, J.C.; RISTERUCCI, A.M.; LOPEZ, P.A.; ORTIZ, C.F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, London, v.89, n.3, p.380-386, Sept. 2002.

NIELLA, G.R.; RESENDE, M.L.V.; FALEIRO, F.G.; CASTRO, H.A.; PEREZ, J.O.; VIANA JÚNIOR, C.A. Diferenças na agressividade de isolados de *Crinipellis pernicioso* da região cacauera baiana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26 (supl.), p.346, ago. 2001.

OETTING, W.S.; LEE, K.S.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L.; SELLERS, T.A.; KING, R.A. Linkage analysis of multiplexed short tandem polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics**, Orlando, v.30, n.3, p.450-458, Dec. 1995.

PAIM, V.R.L.M. **Estudo da diversidade genética de novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero.** 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

PEGLER, D.N. *Crinipellis pernicioso* (Agaricales). **Kew Bulletin**, Norwich, v.32, p.731-736, 1978.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Tropical Agriculture**, London, v.67, n.2, p. 188-189, apr. 1990.

PFLIEGER, S.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; BLATTES, A.; LEFEBVRE, V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.103, p.920-929, 2001.

PLOETZ, R.C.; SCHNELL, R.J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C.T.; MOTAMAYOR, J.C.; JOHNSON, E.S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v.111, n.4, p.317-326, Apr. 2005.

POUND, F.J. Cacao and witchbroom disease in South America. In: TOXOPEUS, H. **Reprint Archives of Cocoa Research**, Brussels: American Cocoa Research Institute, 1938. v. 1. 44p.

POUND, F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*). In: TOXOPEUS, H. **Reprint Archives of Cocoa Research**, Brussels: American Cocoa Research Institute, USA, 1943. v. 1. 43p.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.108, n.5, p.1151-1161, Mar. 2004.

PURDY, L.H.; SMITH, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.573-594, 1996.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v.122, n.3, p.268-272, June 2003.

RINCONES, J.; MEINHARDT, L.W.; VIDAL, B.C.; PEREIRA, G.A.G. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.452-458, Apr. 2003.

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

RISTERUCCI, A.M.; PAULIN, D.; N'GORAN, J.A.K.; DUCAMP, M.; LANAUD, C. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Phytophthora* in *Theobroma cacao* L. **INGENIC Newsletter**, St. Augustine, v.5, p.9-10, 2000b.

RISTERUCCI, A.M.; PAULIN, D.; DUCAMP, M; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.108, n.1, p.168-174, Dec. 2003.

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

ROCHA, H.M.; WHEELER, B.E.J. Factors influencing production of basidiocarps and deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant pathology**, London, v.34, n.3, p.319-328, Sept. 1985.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.10, p.1032-1037, Oct. 2002.

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

SAS INSTITUTE INC. **System for linear models**. Cary: SAS Institute, 1986. 211p.



SELA-BUURLAGE, M.B.; BUDAI-HADRIAN, O.; PAN, Q.; CARMEL-GOREN, L.; VUNSCH, R.; ZAMIR, D.; FLUHR, R. Genome-wide dissection of *Fusarium* resistance in tomato reveals multiple complex loci. **Molecular Genetic and Genomics**, Heidelberg, v. 265, n. 6, p.1104-1111, Aug. 2001.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOVSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Durham, v.7, n.1, p.13-24, Mar. 2006.

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

SILVA, F.C.O.; NETO, E.F.; KODAMA, K.R.; FIGUEIRA, A. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacauero (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa através de marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21 (supl.), p.205, set. 1998.

SIMONS, G.; GROENENDIJK, J.; WIJBRANDI, J.; REIJANS, M.; GROENEN, J.; DIERGAARDE, P.; VAN DER LEE, T.; BLEEKER, M.; ONSTENK, J.; BOTH, M.; HARING, M.; MES, J.; CORNELISSEN, B.; ZABEAU, M.; VOS, P. Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. **The Plant Cell**, Tucson, v.10, n.6, p. 1055-1068, June1998.

SIVIERO, A. **Mapeamento de QTL's ligados a resistência a gomose de *Phytophthora* dos citros**. 2001. 117 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

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

TREVISAN, S.D.P.; SILVA JUNIOR, M.F. Mudanças sócio-econômicas e ambientais associadas à vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 273, ago. 1995.

TROP GENE DATA BASE. **Cocoa database**. Disponível em: <http://tropgenedb.cirad.fr/en/cocoa.html>. Acesso em: 11 fev. 2006.

VAN OOIJEN, J.W.; VOORRIPS, R.E. **Join map**®, **Software for the calculations of genetic linkage maps**. Wageningen: Plant Research International, 2001.

WANG, Z.; TARAMINO, G.; YANG, D.; LIU, G.; TINGEY, S.V.; MIAO, G.H.; WANG, G.L. Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. **Molecular Genetic and Genomics**, Heidelberg, v. 265, n.2, p. 302-310, Apr. 2001.

WHEELER, B.E.J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicios*a from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, London, v.37, n.4, p.475-488, Dec. 1988.

YAMADA, M.M.; LOPES, U.V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches`broom in plantations of Bahia, Brazil. **Agrotrópica**, Itabuna, v.11, n.2, p.83-88, maio 1999.

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

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 136, n.4, p.1457-1466, Apr. 1994.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequência dos *primers* dos locos de microssatélites avaliados em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, com o tamanho do fragmento clonado (LANAUD et al., 1999) e localização no mapa consensual do cacauero (PUGH et al. 2004)

(continua)

Locos	Primer Forward (5'-3') Primer Reverse (5'-3')	Tamanho (pb)	LG
<i>mTcCIR1</i>	GCA GGG CAG GCT CAG TGA AGC A TGG GCA ACC AGA AAA CGA T	143	VIII
<i>mTcCIR2</i>	CAG GGA GCT GTG TTA TTG GTC A AGT TAT TGT CGG CAA GGA GGA T	254	V
<i>mTcCIR3</i>	CAT CCC AGT ATC TCA TCC ATT CAG CTG CTC ATT TCT TTC ATA TCA	249	II
<i>mTcCIR4</i>	CGA CTA AAA CCC AAA CCA TCA A AAT TAT TAG GCA ACC CGA ACT T	259	n.d.
<i>mTcCIR6</i>	TTC CCT CTA AAC TAC CCT AAA T TAA AGC AAA GCA ATC TAA CAT A	231	VI
<i>mTcCIR7</i>	ATG CGA ATG ACA ACT GGT GCT TTC AGT CCT TTG CTT	160	VII
<i>mTcCIR8</i>	CTA GTT TCC CAT TTA CCA TCC TCA GCA TTT TCT TTC	301	IX
<i>mTcCIR9</i>	ACC ATG CTT CCT CCT TCA ACA TTT ATA CCC CAA CCA	274	VI
<i>mTcCIR11</i>	TTT GGT GAT TAT TAG CAG GAT TCG ATT TGA TGT GAG	208	II
<i>mTcCIR12</i>	TCT GAC CCC AAA CCT GTA ATT CCA GTT AAA GCA CAT	188	IV
<i>mTcCIR15</i>	CAG CCG CCT CTT GTT AG TAT TTG GGA TTC TTG ATG	254	I
<i>mTcCIR16</i>	ACC TTC ACC AGC TCA CC TAA ATT CTA CTA GCA AAT TAC C	307	VI
<i>mTcCIR17</i>	AAG GAT GAA GGA TGT AAG AGA G CCC ATA CGA GCT GTG AGT	271	IV
<i>mTcCIR18</i>	GAT AGC TAA GGG GAT TGA GGA GGT AAT TCA ATC ATT TGA GGA TA	345	IV
<i>mTcCIR19</i>	CAC AAC CCG TGC TGA TTA GTT GTT GAG GTT GTT AGG AG	376	II
<i>mTcCIR22</i>	ATT CTC GCA AAA ACT TAG GAT GGA AGG AGT GTA AAT AG	288	I
<i>mTcCIR24</i>	TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA	197	IX
<i>mTcCIR25</i>	CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT	153	VI
<i>mTcCIR26</i>	GCA TTC ATC AAT ACA TTC GCA CTC AAA GTT CAT ACT AC	298	VIII
<i>mTcCIR29</i>	CGACTATTCGACTTTCACT TTTTGTTTCTTTCTTTCTTTTCATT	172	I

APÊNDICE A - Sequência dos *primers* dos locos de microssatélites avaliados em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, com o tamanho do fragmento clonado (LANAUD et al., 1999) e localização no mapa consensual do cacaueiro (PUGH et al. 2004)

(continuação)			
<b>Locos</b>	<b>Primer Forward (5'-3')</b> <b>Primer Reverse (5'-3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>LG</b>
<i>mTcCIR30</i>	TGAAGATCCTACTGTTGAG TGATAATAACTGCTTAGTGG	183	IX
<i>mTcCIR31</i>	GCATGCTTCTTTACTCCA TTACCTGCCAATGACTTAC	337	X
<i>mTcCIR32</i>	GAC TTA CTC CCA TCC TAC TGA TTG GCA CAC TTT	193	IV
<i>mTcCIR33</i>	TGG GTT GAA GAT TTG GT CAA CAA TGA AAA TGA GCA	285	IV
<i>mTcCIR35</i>	TTT CCT TGT ATT GAC CTA ATA TAA ACA CAC TTC AGA GAT	235	IX
<i>mTcCIR37</i>	CTGGGTGCTGATAGATAA AATACCCTCCACACAAAT	149	X
<i>mTcCIR40</i>	AAT CCG ACA GTC TTT AAT C CCT AGG CCA GAC AAT TGA	286	III
<i>mTcCIR42</i>	TTG CTG AAG TAT CTT TTG AC GCT CAA CCC CTA TTT G	232	V
<i>mTcCIR43</i>	TCA TGA GAA TGC ATG TG CTG GAC ATG AAG AAG TTA T	n.i.	IV
<i>mTcCIR44</i>	CCC ATC AAA AGT ATT AGA AG ATC AAG CAA TGG TCA AC	177	II
<i>mTcCIR45</i>	GTCATTGCTGTGTG CATAGCATTA ACTGTGTCTG	283	VIII
<i>mTcCIR46</i>	TATGCTCTCTCTCGTATAAT CAAGAATGTTTTGATACTGA	202	VII
<i>mTcCIR49</i>	GTA AAG CAC ATA TAC TAA ATG TCA TTT AAC CTT TGT AAG AAG TAT TCA	197	III
<i>mTcCIR53</i>	TTGACTGAAATGGTGGTAA CAGTTGACTGTTGACTTGAA	148	VI
<i>mTcCIR54</i>	AAC CTC TTG TCA CTG TA GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT	165	I
<i>mTcCIR55</i>	GAT ATT GTC CAA TAA TTT G TTC CGC CTT GTT CTC	234	VII
<i>mTcCIR56</i>	ATACTTTTACTTCCTTTT TCTTATTTTCTTTACCAG	353	VII
<i>mTcCIR57</i>	TGT AGA TGT GAT TTT ATA GTT TG GGA GGG ATA AGA AGC AG	253	IV
<i>mTcCIR58</i>	TTT TTG GTG ATG GAA CTA T TGG TTA AGC AAC ACT AAA CT	266	IX
<i>mTcCIR60</i>	CGC TAC TAA CAA ACA TCA AA AGA GCA ACC ATC ACT AAT CA	207	II

APÊNDICE A - Seqüência dos *primers* dos locos de microssatélites avaliados em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, com o tamanho do fragmento clonado (LANAUD et al., 1999) e localização no mapa consensual do cacauero (PUGH et al. 2004)

<b>Locos</b>	<b>Primer Forward (5'-3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>LG</b>
	<b>Primer Reverse (5'-3')</b>		
<i>mTcCIR61</i>	GCAGTCTGAAACAAGATAA TGACTATAATATAAGGCGAA	n.i.	X
<i>mTcCIR62</i>	GTTATGTGTATGCTTAGGC AAATCACACAAACACAAAT	190	III

APÊNDICE B - Sequência dos *primers* para 40 locos de microsatélites (PUGH et al., 2004) utilizados na avaliação por fluorescência usando a abordagem de *primer-tail*

(continua)

Loco	Primer Forward (5'-3') Primer Reverse (5'-3')	Fluorescência	Tamanho (pb)	LG
<i>mTcCIR118</i>	TCTGCCTGAAAATGTCTC TGGGGCACTAACTTTTG	HEX- OGBS1132	165	I
<i>mTcCIR174</i>	TGGCAGCAATACTTCAAA TCCCGATGTTCCACTC	HEX- OGBS1132	167	I
<i>mTcCIR194</i>	ACACACAGCCTAAAACGAAA GGGATGTGACGGATATTTAC	HEX- OGBS1132	192	I
<i>mTcCIR203</i>	GTGGATTTGGGTGGGAT ATTGTGTTTTGGCTATGTTT	NED-OSD12	217	I
<i>mTcCIR73</i>	CCAGTCAAGGAAGTATCT AATGTCTGCAATGTTAGC	FAM-ORY 5437	112	II
<i>mTcCIR100</i>	TGATGGAATAAACTAAGAACA TAAGAAGCCAGGTCAGG	NED-OSD12	244	II
<i>mTcCIR152</i>	CAGTAGTCAAAACATCAAA GTAATCCAAATAATAAGCAT	NED-OSD12	284	II
<i>mTcCIR162</i>	AAGATTGAGGTCACTCAGG TAAGTTTTTTGCTTTACTCTTC	HEX- OGBS1132	162	II
<i>mTcCIR135</i>	ATTAGAGAGGGGGTAGATGA CTAGTGGGGTTGACATTTG	NED-OSD12	246	III
<i>mTcCIR173</i>	TCCGGATGGCAATATGT CTACCCCATGATTCTGAACT	FAM-ORY 5437	148	III
<i>mTcCIR175</i>	TTACAATCAACAGAACCTC TATATTGATGCGAAAGTC	NED-OSD12	248	III
<i>mTcCIR198</i>	TGGGACCATAAGGAAATC CCCAGGTGAAGTAAGACA	HEX- OGBS1132	186	III
<i>mTcCIR76</i>	AGCCAAAGAAAGGAT TGAATCCGAGACAAAG	FAM-ORY 5437	139	IV
<i>mTcCIR107</i>	TTGCCTGGAAGAGAGA GATGGAAAGAGAAATAATAGT	FAM-ORY 5437	120	IV
<i>mTcCIR117</i>	TGTGGAATAAAAGAGCAAT CACTGGTGTAGCAAATGATA	HEX- OGBS1132	168	IV
<i>mTcCIR188</i>	GTCCTATTCGGTGTA ACTAC TTCTGCTTCTCTTTGCTC	FAM-ORY 5437	118	IV
<i>mTcCIR109</i>	GGAAAGTGTAGGAAAGTAGAC GGACCAAAAAGAGCATA	FAM-ORY 5437	162	V
<i>mTcCIR111</i>	TTAATAAGATCCAACCAACA CACATTCACCCACAAGTC	FAM-ORY 5437	105	V
<i>mTcCIR148</i>	CGTCCTATCACTTCTCTTTT TTGCCTTTACAGCCATTT	NED-OSD12	235	V
<i>mTcCIR169</i>	CTTTTGGCTGTATGTTTCG CTGCCCTCTCTTTCTCAC	HEX- OGBS1132	178	V

APÊNDICE B - Sequência dos *primers* para 40 locos de microsatélites (PUGH et al., 2004) utilizados na avaliação por fluorescência usando a abordagem de *primer-tail*

(conclusão)				
Loco	Primer Forward (5'-3') Primer Reverse (5'-3')	Fluorescência	Tamanho (pb)	LG
<i>mTcCIR182</i>	CTAATTGTTCAAGGAGGTC AAGTGTTTTTGGCACTATC	FAM-ORY 5437	148	VI
<i>mTcCIR193</i>	AACCTGTGATGGACCG AAATGGTGAATTAGGCTC	FAM-ORY 5437	134	VI
<i>mTcCIR255</i>	TTTACCTCCACCATCTT TGGCACTTATCTATTACTGT	NED-OSD12	203	VI
<i>mTcCIR291</i>	AGTCCCATAGGTTCCAAT CGAGGTTATCCCCAAA	NED-OSD12	218	VI
<i>mTcCIR93</i>	GTTGCCACTGCTCTCGCT CCCTTTTATTGTTCCCCATTA	FAM-ORY 5437	100	VII
<i>mTcCIR179</i>	TTTCCATTTCTCATTTCTCAAG ATGTTTTTCATTTTCGTATCCAA	NED-OSD12	288	VII
<i>mTcCIR181</i>	CTTTATGCTGTCTCTCGTA CCAAGAATGTTTTGATACTG	HEX- OGBS1132	197	VII
<i>mTcCIR186</i>	AAGGCTAAAGAACAAATG CGTAGACGTCACACAATA	FAM-ORY 5437	147	VII
<i>mTcCIR99</i>	CGGAAAATGAAACAGAC AATAAAAAGAAAAGAACCATAC	NED-OSD12	249	VIII
<i>mTcCIR134</i>	CGTCCCAAATCAACAC ATAGTCTGCCCTTCCAA	HEX- OGBS1132	176	VIII
<i>mTcCIR225</i>	AAGACAAAGGGAAGAAGA AGGGGAAGAGCAAATC	NED-OSD12	302	VIII
<i>mTcCIR236</i>	GAAGTCAAAGGAAAGTCAA TCAGAAAACGCAAATAAA	HEX- OGBS1132	193	VIII
<i>mTcCIR124</i>	CAGCGTCTTGAATAAC ACCCACACACAAGACAC	FAM-ORY 5437	131	IX
<i>mTcCIR154</i>	CCTTGTAAGTGTGGCAAT TGGAACAAGAGTTGTCA	HEX- OGBS1132	167	IX
<i>mTcCIR166</i>	ATGAACCACTATGTAAGACC ATTCCAAAGGATTAGCAG	NED-OSD12	215	IX
<i>mTcCIR243</i>	ACAGCAGTAGACGCATTC AAAAGGCTTGGCACAG	FAM-ORY 5437	141	IX
<i>mTcCIR112</i>	TTACTTTGTAGGCTGCTG CATTCCACTCATTTTGCT	FAM-ORY 5437	95	X
<i>mTcCIR220</i>	TGAAGTGTGTGTTTGTGTA CCAATAGAGGGATGTAATA	HEX- OGBS1132	201	X
<i>mTcCIR223</i>	GGTCCCACTCAACACT TTATTCCATTTTCATTTACT	HEX- OGBS1132	202	X
<i>mTcCIR229</i>	ATCTCGGTAATAGCACATAA CGCAATCCTACAACACA	NED-OSD12	307	X



APÊNDICE C - Seqüência dos 20 *primers* dos locos de microssatélites utilizados nas genotipagens dos clones de cacauero selecionados como resistentes a *Crinipellis pernicioso* (LANAUD et al. 1999 e PUGH et al. 2004)

<b>Locos</b>	<b>Forward (5'-3')/Reverse(5'-3')</b>	<b>Alelo (pb)</b>	<b>T.A. (°C)</b>
<i>mTcCIR1</i>	GCA GGG CAG GCT CAG TGA AGC A TGG GCA ACC AGA AAA CGA T	143	51
<i>mTcCIR3</i>	CAT CCC AGT ATC TCA TCC ATT CAG CTG CTC ATT TCT TTC ATA TCA	249	51
<i>mTcCIR6</i>	TTC CCT CTA AAC TAC CCT AAA T TAA AGC AAA GCA ATC TAA CAT A	231	46
<i>mTcCIR7</i>	ATG CGA ATG ACA ACT GGT GCT TTC AGT CCT TTG CTT	160	51
<i>mTcCIR9</i>	ACC ATG CTT CCT CCT TCA ACA TTT ATA CCC CAA CCA	274	51
<i>mTcCIR11</i>	TTT GGT GAT TAT TAG CAG GAT TCG ATT TGA TGT GAG	208	46
<i>mTcCIR12</i>	TCT GAC CCC AAA CCT GTA ATT CCA GTT AAA GCA CAT	188	46
<i>mTcCIR24</i>	TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA	197	51
<i>mTcCIR25</i>	CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT	153	46
<i>mTcCIR29</i>	CGACTATTCGACTTTCACT TTTTGTTTCTTTCTTTCTTTTCATT	172	51
<i>mTcCIR30</i>	TGAAGATCCTACTGTTGAG TGATAATAACTGCTTAGTGG	183	51
<i>mTcCIR32</i>	GAC TTA CTC CCA TCC TAC TGA TTG GCA CAC TTT	193	46
<i>mTcCIR33</i>	TGG GTT GAA GAT TTG GT CAA CAA TGA AAA TGA GCA	285	51
<i>mTcCIR37</i>	CTGGGTGCTGATAGATAA AATACCCTCCACACAAAT	149	51
<i>mTcCIR42</i>	TTG CTG AAG TAT CTT TTG AC GCT CAA CCC CTA TTT G	232	46
<i>mTcCIR54</i>	AAC CTC TTG TCA CTG TA GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT	165	46
<i>mTcCIR60</i>	CGC TAC TAA CAA ACA TCA AA AGA GCA ACC ATC ACT AAT CA	207	51
<i>mTcCIR61</i>	GCAGTCTGAAACAAGATAA TGA CTATAATATAAGGCGAA	n.i.	51
<i>mTcCIR62</i>	GTTATGTGTATGCTTAGGC AAATCACACAAACACAAAT	190	51
<i>mTcCIR118</i>	TCTGCCTGAAAATGTCTC TGGGGCACTAACTTTTG	165	51

APÊNDICE D – Resumo da análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 1 para diferentes variáveis observadas nas avaliações das famílias de cacaueteiro quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Família de referência 'Catongo'. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	23	79,79	1,74 x 10 <sup>-7***</sup>	42,65	7,90 x 10 <sup>-4***</sup>	43,16	7,00 x 10 <sup>-3**</sup>
Bloco	3	10,37	0,02*	3,23	0,28	2,05	0,56
Resíduo	61	64,57		51,53		61,87	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE E – Resumo da análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 2 para diferentes variáveis observadas nas avaliações das famílias de cacaueteiro quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'Catongo'. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	18	171,24	2,90 x 10 <sup>-12***</sup>	156,6	1,12 x 10 <sup>-10***</sup>	243,49	< 2 x 10 <sup>-16***</sup>
Bloco	3	7,57	0,24	3,77	0,56	18,4	0,029*
Resíduo	54	98,54		99,84		110,47	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE F – Resumo da análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 2 para diferentes variáveis observadas nas avaliações das famílias de cacauero quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'CAB 0208'. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	18	171,24	2,90 x 10 <sup>-12***</sup>	156,6	1,12 x 10 <sup>-10***</sup>	243,49	< 2 x 10 <sup>-16***</sup>
Bloco	3	7,57	0,24	3,7	0,56	18,4	0,029*
Resíduo	54	98,54		99,48		110,47	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE G – Resumo da análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 3 para diferentes variáveis observadas nas avaliações das famílias de cacauero quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'Catongo'. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	14	140,4	3,1 x 10 <sup>-6***</sup>	51,54	0,018*	62,23	2,0 x 10 <sup>-3***</sup>
Bloco	3	3,19	0,75	6,05	0,36	9,52	0,16
Resíduo	34	92,37		64,5		63,44	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE H – Resumo da análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 3 para diferentes variáveis observadas nas avaliações das famílias de cacauero quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'CAB 0214'. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus-BA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	14	140,4	$3,18 \times 10^{-6***}$	51,54	0,018*	62,25	$2,0 \times 10^{-3***}$
Bloco	3	3,19	0,75	6,05	0,36	9,52	016
Resíduo	34	92,37		64,56		63,44	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE I – Análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 4 para diferentes variáveis observadas na avaliação de famílias de cacauero quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'Catongo'. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	12	474,57	$5,6 \times 10^{-94***}$	505,8	$1,2 \times 10^{-100***}$	269,8	$1,0 \times 10^{-50***}$
Bloco	3	0,71	0,87	0,9	0,83	1,49	0,68
Resíduo	32	43,6		41,89		45,37	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE J – Análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 4 para diferentes variáveis observadas na avaliação de famílias de cacaueteiro quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'PA 195 x CAB 0208'. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	12	474,57	5,6 x 10 <sup>-94***</sup>	505,8	1,2 x 10 <sup>-100***</sup>	269,8	1,0 x 10 <sup>-50***</sup>
Bloco	3	0,71	0,87	0,9	0,83	1,49	0,68
Resíduo	32	43,76		41,89		45,37	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE K – Análise de Deviance (ANODEV) do ensaio 4 para diferentes variáveis observadas na avaliação de famílias de cacaueteiro quanto à resistência a *Crinipellis pernicioso* em casa de vegetação. Famílias de referência 'CAB 0214 x ICS 39'. CEPLAC-ERJOH, Marituba-PA

Fonte de Variação	GL	Proporção de plântulas com sintomas		Proporção de plântulas com vassoura terminal		Proporção de plântulas com vassoura axilar	
		Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P	Deviance	Valor-P
Família	12	474,57	5,6 x 10 <sup>-94***</sup>	505,8	1,2 x 10 <sup>-100***</sup>	269,8	1,0 x 10 <sup>-50***</sup>
Bloco	3	0,71	0,87	0,9	0,83	1,49	0,68
Resíduo	32	43,76		41,89		45,37	

Códigos de significância: '\*\*\*' P < 0,001, '\*\*' P < 0,01, '\*' P < 0,05, '.' P < 0,1

APÊNDICE L – Resumo da análise de medidas repetidas (Wilks' Lambda) para médias de número de ramos infectados por vassoura-de-bruxa em famílias de cacauero em condição de campo de 2000 a 2004. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus - BA

Fonte de variação	Wilks' Lambda	GL Num *	GL Den *	Pr>F **
Família	0,504	130	3074,53	0,0001
Bloco	0,938	10	1246	0,0001
Ano	0,660	4	624	0,0001
Ano * Família	0,941	8	1248	0,0001
Ano * Bloco	0,677	104	2478,03	0,0001

\* Grau de liberdade numerador (Num); Grau de liberdade denominador (Den).

\*\* Probabilidade de F para o teste de Wilks' Lambda.

APÊNDICE M – Resumo da análise de variância (ANOVA) para médias de frutos de famílias de cacauero infectados com vassoura-de-bruxa em condição de campo de 2002 a 2005. CEPLAC-CEPEC, Ilhéus – BA

Fonte de variação	GL	QM	F	Pr>F
Família	25	1328,97	5,45	0,0001
Ano	3	4049,34	16,62	0,0001
Bloco	2	1914,98	7,86	0,0006
Resíduo	150	243,70		
CV= 46,09				