

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

ADEILSON BATISTA LINS

**DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS COM MARCADORES
MOLECULARES E ASSOCIAÇÃO COM PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS DE *Theobroma cacao* L.**

ILHÉUS – BAHIA

JULHO de 2008

ADEILSON BATISTA LINS

**DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS COM MARCADORES
MOLECULARES E ASSOCIAÇÃO COM PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS DE *Theobroma cacao* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Prof. Dra. Antônia Marlene Magalhães Barbosa

L759

Lins, Adeilson Batista.

Distâncias genéticas estimadas com marcadores moleculares e associação com performance de híbridos de *Theobroma cacao* L. /Adeilson Batista Lins – Ilhéus, BA: UESC, 2008.

xiv, 85f. : il.

Orientadora: Antônia Marlene Magalhães Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós - Graduação em Produção Vegetal.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Cacau – Melhoramento genético. 2. Marcadores moleculares. 3. Hibridação vegetal. I. Título.

CDD 633.74

ADEILSON BATISTA LINS

**DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS COM MARCADORES
MOLECULARES E ASSOCIAÇÃO COM PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS DE *Theobroma cacao* L.**

Ilhéus, BA, 04 de julho de 2008

Ioná Santos Araújo – DS
FAPESB/UESC/DCB

Fernanda Amato Gaiotto – DS
DCB/UESC

Antônia Marlene Magalhães Barbosa - DS
DCAA/UESC
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e aos meus irmãos pela força, incentivo, pelos ensinamentos e amável presença em todos os momentos da minha vida.

Ao Bruno por todo apóio e atenção

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um trabalho árduo como este não é algo puramente individual, mas é fruto de todo um conjunto de esforços que se fundem num sinergismo ímpar. Ao longo de todo este percurso ainda é ínfimo poder agradecer tais pessoas pelo incentivo e pelo apóio inestimável.

Gostaria de agradecer de modo especial e acima de tudo, a Deus por ser luz constante na minha vida, por me ouvir e consolar nos momentos mais difíceis e estressantes, por ter sido sempre paciente com minhas inquietudes, por me levantar em minhas quedas e em meus momentos de fraqueza e, sobretudo, por ter me dado o maior e mais bonito de todos os dons, e a capacidade de desvendá-lo: a vida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade e realização deste curso.

À FAPESB, pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Prof. Dra. Antônia Marlene pela troca de experiências, ensinamentos, orientação, amizade e por todos os esforços para a conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa pela orientação sabiamente dirigida, incentivo, dedicação, paciência e profissionalismo. Agradeço pelas oportunidades de aprendizado.

A toda equipe da Empresa Almirante Cacau M&MMars, em especial à Dra. PhD Regina Celle Machado Rebouças, por todo apóio e ensinamentos. Ao Valdivino e Robério pelo apóio na coleta dos dados de campo, e Ednailza pelo apóio em laboratório.

À Prof. Dra. Delmira da Costa Silva pela atuação na minha formação e introdução na Iniciação Científica, assim como pelo vínculo de amizade e ajuda em tantos momentos.

À Prof^a. MS. Miríades Augusto da Silva pela amizade e carinho.

À Dra. Ioná Santos Araújo pelo suporte e ensinamentos na compreensão dos marcadores moleculares.

Ao Prof. Dr. Dário Ahnert pela troca de experiência na aplicabilidade do melhoramento genético do cacaueteiro e pela ajuda na tradução do Abstract

À Prof^a. Dra Fernanda Amato Gaiotto, pelas informações repassadas com relação aos ajustes de dados de marcadores.

Ao Prof. Dr. Sérgio pela consolidação e aprimoramento do meu aprendizado em Estatística.

À Prof. Dra. Norma Eliane, coordenadora e líder do colegiado do Mestrado em Produção Vegetal por todo apoio e pelas sábias palavras em momentos difíceis, agradeço por toda a paciência e atenção.

Aos meus colegas do curso de Mestrado em Produção Vegetal por todas as palavras, em especial à Eileen e Polyana.

À Fabiana Zanelato Bertolde, Bruna do Carmo Rehen, Jeiza Botelho, Claudine, e ao casal Daniele e Samuel por todo o suporte e ajuda no laboratório de Biologia Molecular e Citogenética.

Aos amigos Alberto, Marayana, Sandra, Kamila, Sarah, Paloma, Valéria, Ana Paula, Cíntia, Grazi e Priscila.

Ao bolsista de Iniciação Científica, Wallace, pela ajuda em análises genéticas.

Aos amigos Emerson e Roney pela ajuda na coleta de dados em campo.

Aos funcionários do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelo apoio.

A todos os meus professores do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela contribuição na minha formação.

A todos àqueles, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 O cacauero	4
2.2 Marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas.....	8
2.3 Marcadores microssatélites (SSR).....	12
2.4 Marcadores RAPD	15
2.5 Diversidade genética obtida por marcadores moleculares em <i>Theobroma cacao</i> e associação com performance de híbrido.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Descrição das genitores e dos híbridos.....	31
3.2. Delineamento genético e experimental.....	31
3.3 Metodologia utilizada para obtenção dos dados moleculares.....	32
3.3.1 Extração de DNA.....	32
3.3.2 Amplificação de DNA com <i>primers</i> microssatélites.....	35
3.3.3 Amplificação de DNA com RAPD.....	36
3.4 Análises genético-estatísticas de dados moleculares.....	37
3.4.1 Cálculo das distâncias genéticas utilizando o marcador SSR.....	37
3.4.2 Cálculo das distâncias genéticas utilizando o marcador RAPD.....	38
3.5. Análise descritiva dos dados fenotípicos	39
3.5.1. Correlações entre dados de distâncias genéticas obtidas por SSR e RAPD e dados fenotípicos.....	39
3.6 Agrupamento dos clones e análises de coordenadas principais.....	40
3.6.1 Correlação entre os marcadores RAPD e SSR.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

4.1 Extração do DNA.....	42
4.2 Marcadores microssatélites.....	42
4.3 Marcadores RAPD.....	53
4.4 Correlações entre as distâncias genéticas obtidas com marcadores SSR e RAPD.....	58
4.5 Análise descritiva dos dados fenotípicos	59
4.6 Correlações de Pearson entre as distâncias genéticas dos genitores (RAPD e SSR) e média de características fenotípicas, e entre características fenotípicas.....	61
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE	82

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Identificação e principais características dos 11 clones de <i>T. cacao</i>	34
Tabela 2. <i>Primers</i> microssatélites utilizados nas reações de PCR dos 11 clones de <i>T. cacao</i>	36
Tabela 3. Heterozigosidade observada (H_o) e comprimento dos alelos amplificados em 15 locos microssatélites a partir de 11 genitores de <i>T. cacao</i>	43
Tabela 4. Distâncias genéticas, entre 11 genitores de híbridos de <i>T. cacao</i> , estimadas com 15 locos microssatélites com base no coeficiente de Rogers (GOODMAN e STUBER, 1983) modificado.....	45
Tabela 5. Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores microssatélites entre e dentro de genitores pertencentes a dois grupos raciais.....	46
Tabela 6. Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores microssatélites entre e dentro de genitores de diferentes origens geográficas.....	46
Tabela 7. Distâncias genéticas, entre 10 genitores de híbridos de <i>T. cacao</i> , estimadas com 13 locos RAPD, com base no índice de Jaccard (1908).....	54
Tabela 8. Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores RAPD entre e dentro de genitores pertencentes a dois grupos raciais.....	77
Tabela 9. Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores RAPD entre e dentro de grupos raciais de diferentes origens geográficas.....	82
Tabela 10. Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de <i>T. cacao</i> avaliados para característica altura do fuste (AF).....	87
Tabela 11. Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de	

<i>T. cacao</i> avaliados para característica altura total (AT).....	87
Tabela 12. Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de <i>T. cacao</i> avaliados para característica largura da copa (LC).....	88
Tabela 13. Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de <i>T. cacao</i> avaliados para característica comprimento da copa (CC).....	88
Tabela 14. Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de <i>T. cacao</i> avaliados para característica circunferência do caule (DC).....	89
Tabela 15. Distâncias genéticas obtidas com os marcadores RAPD e microssatélites (SSR) e médias para as cinco variáveis fenotípicas analisadas.....	89
Tabela 16. Valores de correlação entre marcadores microssatélites e RAPD e média das cinco variáveis fenotípicas analisadas.....	82
Tabela 17. Valores de correlação entre as médias das cinco variáveis fenotípicas analisadas.....	62
Figura 1. - Análise de agrupamento dos 11 genitores de <i>T. cacao</i> ., baseado na distância de Rogers modificada (GOODMAN e STUBER, 1983), utilizando o método UPGMA, a partir de dados obtidos da amplificação de 15 locos microssatélites.....	47
Figura 2. Análise de coordenadas principais de 11 genitores de <i>T. cacao</i> baseada na matriz de distâncias, a partir dos dados de marcadores SSR.....	52
Figura 3. Análise de agrupamento dos 10 genitores de <i>T. cacao</i> , baseada no coeficiente de Jacard, utilizando o método UPGMA, a partir de 28 bandas amplificadas com 13 primers RAPD.....	74
Figura 4. Análise de coordenadas principais de 10 genitores de <i>T. cacao</i> baseada na matriz de distâncias, a partir dos dados de marcadores RAPD.....	76

DISTÂNCIAS GENÉTICAS ESTIMADAS COM MARCADORES MOLECULARES E ASSOCIAÇÃO COM PERFORMANCE DE HÍBRIDOS DE *THEOBROMA CACAO* L.

RESUMO

Onze clones de *Theobroma cacao* L., utilizados como genitores, derivados de dois grupos raciais, Forasteiros e Trinitários, foram genotipados com os marcadores RAPD e microssatélites (SSR), visando estimar as distâncias genéticas e correlacionar com as performances de seus respectivos híbridos. As distâncias genéticas entre todos os genitores foram determinadas utilizando o coeficiente de Jaccard (RAPD) e as distâncias modificadas de Rogers (dados SSR). As análises de agrupamento foram feitas conforme o método UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages). As correlações entre os marcadores foram feitas utilizando o teste de Mantel (1967). As correlações entre as distâncias genéticas e as performances dos híbridos foram estimadas através do coeficiente de correlação de Pearson.

Os híbridos simples intra e intergrupos foram obtidos segundo um esquema dialélico parcial e avaliados em delineamento experimental com quatro blocos casualizados localizados no Jardim clonal da Fazenda Almirante Cacau sob condições de sombreamento. Alguns cruzamentos não foram obtidos ou não geraram sementes suficientes para instalação de todos os tratamentos (55 híbridos). Apenas 22 híbridos foram instalados e avaliados em campo, quatro anos após o plantio, com relação aos seguintes caracteres: altura da planta (AP); altura do fuste (AF); largura e comprimento da copa (LC e CC, respectivamente) e circunferência no coleto (DC). Foram utilizados apenas os híbridos pertencentes a dois blocos com mesma idade de plantio. Os onze genitores foram genotipados com quinze primers microssatélites (SSR) e 13 primers RAPD. Todos os cruzamentos envolvendo o clone SCA 24 foram retirados somente da análise RAPD devido à insuficiência de informações moleculares geradas.

As distâncias genéticas foram em média maiores para os cruzamentos intergrupos e dentro do grupo dos Forasteiros, com ambos os marcadores. As distâncias entre todos os Forasteiros variaram de 0,56 a 0,88 (SSR) e 0,91 a 0,94 (RAPD), indicando uma maior variabilidade entre estes quando comparado com a variação nos Trinitários.

As maiores médias de distâncias com marcadores microssatélites foram verificadas entre os genitores pertencentes às regiões geográficas do Equador e Peru e também do Peru e Trinidad. Médias semelhantes a esses dois grupos foram verificadas entre os clones peruanos. Em relação aos marcadores RAPD verificou-se que as médias entre genitores pertencentes as diferentes origens geográficas foram altas e equivalente em torno de 0,93. Esperava-se que a distância entre os dois clones LCTEENS fosse a menor entre todos os outros genitores, com menor parentesco, porém esta apresenta-se entre as maiores distâncias obtidas. Pode-se atribuir esse resultado ao tipo de propagação via seminal que gera variabilidade dentro de famílias ou pode ser erro de identificação.

As análises de agrupamentos obtidas a partir dos dados de distâncias genéticas, com cada marcador, concordaram parcialmente com a classificação dos grupos raciais.

Os dados de distâncias genéticas entre os pares de genitores, obtidas com os dois marcadores genéticos, não apresentaram correlação. Os resultados indicam que o número de *primers* RAPD utilizados para determinar as distâncias genéticas deveria ser maior para se obter uma correlação entre os marcadores.

As correlações fenotípicas entre as características avaliadas nos híbridos foram significativas entre: AF e LC, AT e DC, LC e CC.

Não foram observadas correlações entre os caracteres fenotípicos e distâncias genéticas obtidas com qualquer um dos dois marcadores utilizados.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, performance de híbridos, marcadores moleculares.

GENETIC DISTANCES ESTIMATED WITH MOLECULAR MARKERS AND ASSOCIATION WITH PERFORMANCE OF HYBRIDS OF *THEOBROMA CACAO* L.

ABSTRACT

Eleven clones of *Theobroma cacao* L., used as genitors, derived of two racial groups, Forasteros and Trinitarios, were evaluate with the markers RAPD and microsatellites (SSR), to estimate and seeking to correlate the genetic distances and the hybrid performances. The genetic distances among all the genitors were calculated using the coefficient of Jaccard (RAPD) and the modified distances of Rogers (SSR data). The cluster analyses were made according to the method UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Averages). The correlations between the genetic distances and the hybrid performances and morphological variables were estimated through the coefficient of correlation of Pearson.

The simple hybrids, intra and intergroups, were obtained according to a partial diallel scheme and experimentally evaluated in a randomized block design, with four replications, installed in the clonal garden of the Farm Almirante Cacau, under shade conditions. Some crossings were not obtained or they did not generate enough seeds for installation of all the treatments (55 hybrids). Only 22 hybrids were installed and evaluated in the field, four years after planting, for the following traits: plant height (AP); stem diameter and height (DC and AF, respectively); and width and length of the canopy (LC and CC, respectively). For data analyses only hybrids belonging to two blocks with same planting age were used. The eleven genitors were genotyped with 15 microsatellites (SSR) and 13 RAPD primers. All the crossings involving the clone SCA 24 were removed, only of the analysis RAPD, due to the insufficiency of molecular marker data.

The genetic distances had been on average bigger for the intergroups crossings and inside of the group of the Forasteros, with both the markers. The genetic distances between all the Forasteros had varied of 0,56 0,88 (SSR) and 0.91 the 0,94 (RAPD), indicating a bigger variability inter these when comparative with the variation in the Trinitários

The largest averages of distances with microsatellites markers were verified among the geographical areas Ecuador x Peru and Peru x Trinidad. Similar averages of these two groups of crossings were verified among the Peruvian clones. In relation to the RAPD markers, all crossings presented high averages and were equivalent, around 0,93.

The cluster analyses largely agreed with the information about the classification of the racial groups. The data of genetic distances among the pairs of clones, obtained with the two genetic markers, did not present correlation. The results showed that the number of primers used to detect RAPD and SSR markers should be larger due to the accentuated degree of genetic inter-relationship of the genitors. The clones LCT EENs seem to have misidentifications, because the genetic divergence detected among them was high. For the phenotypic traits evaluated in the hybrids, correlations were observed among: AF and LC, AT and DC, LC and CC. No correlations were

observed between the phenotypic traits and genetic distances obtained with any one of the two used markers.

Key words: *Theobroma cacao*, simple hybrid performance, RAPD markers, microsatellites markers, genetic improvement.

1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L. é uma espécie de domesticação relativamente recente (DIAS, 2001) que apresenta características morfológicas variadas dentro da espécie. De acordo com as características de frutos e sementes e com a distribuição geográfica, as diversas formas variantes desta espécie, ou tipos botânicos, são classificadas em dois grandes grupos raciais (CHEESMAN, 1944; CUATRECASAS, 1964; TOXOPEUS, 1985), denominados de Crioulos (Crioulo) e Forasteiros Amazônicos (Forasteros), os quais contêm genes distintos para produção, resistência a pragas e doenças e adaptação a diferentes ambientes. Entre os Forasteiros são encontradas populações do Alto e Baixo Amazonas, podendo haver, também, populações híbridas entre os tipos Forasteiros e os Crioulos. Os tipos híbridos, denominados de Trinitários, teriam surgido naturalmente em Trinidad, entretanto sua classificação é incerta e enfraquece a classificação tradicional (CHEESMAN, 1944). Outras dificuldades em classificar germoplasmas coletados em diferentes regiões como material silvestre ou domesticados foram relatados por diversos pesquisadores (BAKER et al., 1953; BARTLEY et al., 1988; POUND, 1938 citados por DIAS, 2001).

Diante disso, Figueira et al. (1994) propuseram uma classificação baseada em dois grandes grupos, caracterizados como silvestres e domesticados. Um dos interesses de classificação correta de clones de cacauzeiros é a sua utilização nos cruzamentos no melhoramento genético.

Na seleção de genitores visando à obtenção de híbridos considera-se a divergência entre eles com relação a caracteres fenotípicos e, ou distância genética. Dessa forma genitores divergentes pertencentes a diferentes grupos raciais e origens distintas foram cruzados com o objetivo de obter híbridos, pois maiores ganhos são obtidos em cruzamentos entre parentais distantes geneticamente (MOLL et al., 1962; GHADERI et al., 1984; SHAMSUDDIN, 1985; ALI et al., 1995). Segundo BARTLEY (1994) e BORÉM (2006), o uso inteligente da heterose associada aos componentes de produção e aos fatores de adaptabilidade poderia resultar no uso eficaz dos híbridos.

A escolha *a priori* dos genitores apóia-se no desempenho *per se* e inclui métodos de seleção baseados no valor médio dos mesmos, no coeficiente de parentesco, na complementação da expressão fenotípica dos caracteres, na distância geográfica e na análise de distância parental e *a posteriori* pela avaliação das suas progênes, usando dados das gerações F₁ e F₂ (DIAS, 1997).

Distâncias genéticas e análises multivariadas foram estimadas em progenitores de cacau pela utilização de dados fenotípicos (MOTILAL e BUTLER, 2003; DIAS e KAGEYAMA, 1997), isoenzimáticos (SOUNIGO et al., 2005) e de marcadores genéticos de DNA (RISTERUCCI et al, 2000b; MARITA et al, 2001; FALEIRO et al, 2002c, 2004a; SANTOS et al., 2005). A associação entre distâncias obtidas com dados fenotípicos dos progenitores e performance de híbridos em cacauzeiros foram realizadas por Dias e Kageyama (1997).

Distâncias genéticas obtidas a partir de dados de produção e componentes de produção, e também de marcadores de DNA foram estimadas em clones utilizados como progenitores em cacau e correlacionadas com performance de híbridos. Correlações significativas foram encontradas utilizando distâncias a partir de dados de componentes de produção por Dias et al, (2003) e, RAPD (DIAS e KAGEYAMA, 1997).

Nesse estudo foram genotipados 11 genitores, com os marcadores RAPD e SSR, os quais foram utilizados para a obtenção de híbridos avaliados para produção e componentes de produção, com o seguinte objetivo:

- 1- Verificar a variabilidade existente entre os genitores por marcadores de DNA, e variáveis fenotípicas;
- 2- Avaliar a divergência genética entre genitores de diferentes origens geográficas e grupos raciais;
- 3- Comparar a correspondência entre as distâncias obtidas com os dois marcadores;
- 4- Verificar a correlação entre distâncias genéticas obtidas com RAPD e SSR e performance de híbridos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O cacauero

O cacauero é uma espécie monóica, alógama, cauliflora e apresenta dois sistemas de auto-incompatibilidade: o esporofítico e o gametofítico. A presença desses sistemas influencia na compatibilidade e incompatibilidade dos cruzamentos entre plantas. O cacauero é uma planta diplóide ($2n = 20$) com um genoma pequeno com cerca de 0,43 pg, correspondendo a cerca de três vezes o tamanho do genoma da *Arabidopsis thaliana* (FIGUEIRA e CASCARDO, 2001). Em 1605, Charles de L'Écluse citou o cacau pela primeira vez denominando-o de *Cacao fructus*, mais tarde, em 1737, Carl von Linné o descreveu como *Theobroma fructus*. Essa última descrição permaneceu até o ano de 1753, quando foi redefinida como *Theobroma cacao* L. pertencente ao gênero *Theobroma*, que já esteve inserido na família Sterculiaceae e, atualmente o cacauero foi incorporado à família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999)

O gênero *Theobroma* é típico de regiões neotropicais, possui uma distribuição natural que abrange a floresta tropical úmida, no hemisfério ocidental, entre as latitudes 18° N e 15° S, cujo raio de extensão situa-se desde o sul do México até a Floresta Amazônica (CUATRECASAS, 1964). Mas, esta distribuição pode ter sofrido

grande influência das civilizações pré-colombianas, pois foram responsáveis pela domesticação do cacau e pela sua distribuição pela América Latina, ao longo de 2.000 anos de cultivo. Nos neotrópicos ocorre por volta de 16 gêneros e 510 espécies, no entanto, existem controvérsias quanto à precisão desses dados (SANTOS, 2003). Segundo Venturieri (1993), as 22 espécies do gênero *Theobroma* estão restritas à América Tropical, nove delas são de uso alimentício, encontradas na Amazônia brasileira, e apenas cinco encaixam-se na preferência para produção de chocolate. Dentre elas, as espécies *T. cacao* e *T. grandiflorum* S. destacam-se pela sua importância na indústria do chocolate.

O provável centro de diversidade genética do cacau, de acordo com Cheesman (1944) abrange a região dos rios Napo, Putumayo e Caquetá, na região do alto Amazonas. Especula-se que a partir desta região, o cacau tenha se dispersado em duas direções: para o leste, dando origem ao grupo dos Forasteiros, e para o norte, onde ficam os Crioulos. Ao leste os Forasteiros distribuem-se no norte do Brasil e nas Guianas, e os Crioulos podem ser encontrados no sul do México, na Venezuela, na Colômbia e no Equador. Para tentar explicar a origem e dispersão das populações de cacau foram formuladas três hipóteses conhecidas como, a hipótese da dispersão sul-norte, norte-sul, e a hipótese da dispersão natural ampla. Dessas três, a mais aceita é a primeira, pois tem suporte nas pesquisas com marcadores moleculares, isoenzimáticos, agronômicos e morfológicos, revelando que os materiais botânicos coletados no alto Amazonas apresentam uma maior variabilidade genética (FIGUEIRA et al., 1994). Análises RAPD apontaram para a origem sul americana dos Crioulos da América Central (DE LA CRUZ et al., 1995)

O cacau pode ser classificado também em três grandes grupos raciais, (i) Forasteiros, composto por material do alto e baixo Amazonas, cujo cultivo é recente

e teve início há três séculos atrás no Equador. O material Forasteiro apresenta sementes púrpuras e achatadas, alta rusticidade e alto potencial de produção. O chocolate produzido a partir de suas amêndoas é relativamente amargo e é o mais explorado, cerca de 85%, para a produção industrial. Seus frutos imaturos são verdes tornando-se amarelos quando ideais para a colheita, são dotados de casca dura e superfície lisa com dez sulcos. Forasteiros do alto Amazonas são vigorosos, precoces e resistentes a certos patógenos, os do baixo Amazonas são conhecidos pela uniformidade dos seus frutos – chamados de Amelonados. (ii) As populações de Crioulos foram inicialmente cultivadas pelos povos indígenas da Mesoamérica (México, Guatemala, Belize, Honduras e El Salvador), apresentam sementes grandes, arredondadas e de cotilédones brancos ou violeta claro quando estão umedecidas. São conhecidos devido ao saber fino de seu chocolate e outras qualidades organolépticas; têm baixo potencial de produção e baixa rusticidade em contraste com os Forasteiros. Seus frutos em estágio imaturo são verdes ou vermelhos, tornando-se roxos ou amarelos quando maduros, possuem casca macia e rugosa, também com dez sulcos. (iii) os Trinitários são híbridos naturais entre Forasteiros e Crioulos, embora estejam inseridos no grupo dos Forasteiros constitui um grupo a parte, com características intermediárias (DIAS, 2001)

As tentativas de categorizar os genótipos de cacau nesses três grupos raciais foram frustrantes ao utilizar descritores morfológicos (ENGELS, 1983) e isoenzimas (LANAUD, 1987) devido à sobreposição entre os grupos, o que impediu a separação em raças hortícolas como proposto inicialmente. Com o emprego de marcadores moleculares conseguiu-se comprovar que Forasteiros Alto Amazônicos, Forasteiros Baixo Amazônicos, Crioulos e Trinitários apresentam diferenças genéticas. Em vários estudos de diversidade genética buscou-se caracterizar e definir esses grupos

como uma fonte para cruzamentos intraespecíficos visando à resistência a doenças e pragas (WILDE et al, 1992; LEAL, 2004; FIGUEIRA et al., 1992, 1994; FALEIRO et al, 2004; LERCETEAU et al., 1993, 1997a,1997b; LANAUD et al., 1999, 2000a; RUSSEL et al., 1993; SOUNIGO et al., 2005; N'GORAN et al., 1994; PIRES et al.,2000; DE LA CRUZ et al., 1995; DIAS, 2001, 2003; RISTERUCCI et al., 2000b; WHITKUS et al., 1998; SANTOS et al., 2005; MARITA et al., 2000; BERTOLDE, 2007; SOUNIGO et al., 2000; HAYMES et al., 2004; WILKINSON, 2000). Alguns desses estudos especularam ser possível separar os Crioulos dos Forasteiros por análise isoenzimática (RONNING e SCHNELL, 1994; WARREN, 1994), por meio de marcadores RFLP (LAURENT et al., 1993a), RAPD (N'GORAN et al., 1994) sondas de genes citoplasmáticos (LAURENT et al., 1993b) e sondas de cDNA (LAURENT et al., 1993a, b; N'GORAN et al., 1994, 2000).

A separação em domesticados e silvestres possui potencial para uso no melhoramento do cacauero, como visto no modelo de seleção recorrente empregado por Pires et al. (1999) no CEPEC/CEPLAC/BRASIL e em Trinidad (BARTLEY, 1994). Pires et al. (1999) propuseram o uso de duas populações, uma composta por cacaueros derivados de cruzamentos entre genótipos silvestres (Alto Amazônicos), considerando como características favoráveis a resistência à vassoura-de-bruxa, podridão-parda e alto teor de gordura, enquanto a outra população composta por genótipos domesticados (Baixo Amazônicos e Trinitários) apresentavam como características de interesse a autocompatibilidade, frutos e sementes grandes e alta produtividade. A composição das populações seguintes, a serem lançadas nos próximos ciclos de seleção, foi selecionada com base na dissimilaridade genética via marcadores moleculares.

2.2 Marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas

As primeiras formas de domesticação de plantas, ainda que subjetivas, resultaram nas primeiras mudanças alélicas dirigidas. Contudo, foram os clássicos experimentos de Mendel que permitiram a compreensão da hereditariedade, tendo em vista o melhoramento e a obtenção de novas variedades. As técnicas modernas envolvem o desenvolvimento de progênies, avaliação e recombinação dos melhores genótipos para iniciar cada ciclo de melhoramento (BORÉM e MIRANDA, 2000).

O melhoramento genético convencional faz uso da associação entre a genética mendeliana e a genética quantitativa, atrelada aos métodos estatísticos. No entanto, este processo é moroso, principalmente em plantas perenes que possui um ciclo vegetativo longo, pois os ganhos genéticos são cada vez mais difíceis de serem obtidos. O sucesso depende da capacidade de se distinguir fatores genéticos herdáveis, dissociados daqueles puramente ambientais. Em acréscimo a isto, a natureza poligênica das características de importância agrônômica dificulta e torna lentos os programas de melhoramento de plantas. Muitos desses entraves começaram a ser superados com o advento da genética molecular (MILLACH, 1998).

Os marcadores moleculares, ou marcadores de DNA, podem ser entendidos como características particulares de cada indivíduo de uma espécie, que discriminam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (MILLACH, 1998). Referem-se a um sítio de variação neutra de DNA. Este sítio é um ponto de referência útil para detectar regiões genômicas de interesse. Ao serem mapeados por análise de ligação, os marcadores moleculares, abundantes no genoma, preenchem os espaços entre as seqüências gênicas, cujo fenótipo é conhecido

(GRIFFITHS et al., 2000). Logo, de acordo com Borém e Caixeta (2006), marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes.

A partir da década de 1970 os descritores enzimáticos e aqueles baseados em proteínas foram intensivamente utilizados na identificação e caracterização de cultivares. Uma listagem ampla de cultivares caracterizados com base nesses descritores, em maior número para as culturas do trigo e milho, pode ser encontrada no trabalho de Smith e Smith (1992). O uso desses descritores promoveu um considerável benefício ao progresso do melhoramento de plantas, uma vez que permitiu as estimativas das distâncias genéticas entre genótipos e, o acesso à variabilidade disponível.

As isoenzimas, também chamadas de isozimas, foram primeiramente descritas por Markert e Moller (1959) para designar formas moleculares múltiplas de enzimas com a mesma especificidade enzimática. Elas podem ser distinguidas por carga ou tamanho, são controladas geneticamente por um ou vários genes em locos diferentes.

Dez anos após a aplicação dos descritores de enzimas e proteínas surgiram outros mais eficazes, baseados em DNA. A principal vantagem desta nova tecnologia foi a possibilidade de se acessar diretamente o genoma de um indivíduo, descartando a necessidade da expressão fenotípica e a influência do ambiente sobre o genótipo. Enquanto os descritores de proteína amostram apenas regiões ativas de expressão gênica, os marcadores moleculares realizam a amostragem ampla do genoma, estendendo-se as regiões não-codificadoras passíveis de mutações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; MILLACH, 1998). Vários são os tipos de marcadores disponíveis, a particularidade de cada um deles recai sobre a

habilidade em detectar polimorfismos. São divididos em dois grupos conforme a metodologia de identificação: hibridização e amplificação. Os principais marcadores identificados por hibridização são RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locus VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Os demais, como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), SSR (Simple Sequence Repeat”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions) e STS (“Sequence Tagged Sites”) são revelados por amplificação, via PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995, MILLACH, 1998; WILKINSON, 2000). A técnica de PCR causou grande impacto nas pesquisas subseqüentes ao ano de sua criação por Mullis et al. (1987), principalmente, por ter contribuído para o desenvolvimento e aprimoramento dos marcadores de DNA.

Os primeiros marcadores de DNA a serem utilizados foram fragmentos produzidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição. A esta primeira técnica, descrita em humanos para mapeamento de genes associados a anomalias cromossômicas, deu-se o nome de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (BOTSTEIN, 1980). Os marcadores RFLP, que foram os primeiros a serem utilizados para estudos genéticos em plantas, para mapeamento e para análise de diversidade (RISTERUCCI et al., 2000b) e tiveram seu o primeiro registro em cacau na década de 1980 (FRITZ et al., 1986 citado por ARAÚJO, 2002).

O tipo de marcador a ser usado e o propósito para o qual este é aplicado, define todo o rumo e o planejamento adequado de um programa de melhoramento (WILKINSON, 2000). Eles variam quanto a alguns atributos de importância relevante para o melhoramento como consistência, tempo para resultados, custo e repetibilidade.

No melhoramento de plantas, onde se busca aumento da eficiência de seleção, melhor conhecimento e caracterização de germoplasma, e maximização dos ganhos genéticos, a aplicabilidade dos marcadores moleculares ajuda a reduzir, consideravelmente, os ciclos necessários à obtenção de novos cultivares, diminuindo o número de cruzamentos testes e posteriores combinações híbridas (MILLACH, 1998; DIAS, 2001), porque podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento vegetal (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995); e podem gerar uma maior quantidade de informações genéticas por locos.

As diversas aplicações dos marcadores moleculares estão distribuídas de acordo com os resultados a curto, médio e longo prazo. A curto prazo abrangem a caracterização e discriminação de genótipos em bancos de germoplasma, discriminando acessos duplicados ou relacionados; identificação de cultivares; seleção de genitores para programas de cruzamento; caracterização da diversidade genética de populações, por meio da análise de coleções de germoplasma e estabelecimento de *core collection*; avaliação do sistema de coleta visando a identificação de regiões geográficas de maior diversidade; estudos básicos de taxonomia e filogenia; caracterização da diversidade dos principais patógenos e pragas de diversas culturas; *fingerprinting*; análises de pureza genética de sementes; melhoramento assistido; isolamento de genes; certificação de cruzamentos; clonagem posicional; estudo de pedigree e diagnose; predição de fenótipos; genealogia, entre outros (BORÉM e CAIXETA, 2006; DIAS, 2001; MILLACH, 1998). A longo e médio prazo ajudam no mapeamento genético de espécies alógamas e autógamias (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; RISTERUCCI, et al., 2000a; FALEIRO, et al., 2003a).

2.3 Marcadores microssatélites (SSR)

Atualmente o uso de microssatélites é a técnica mais preconizada na análise de polimorfismos. A origem do termo microssatélite relaciona-se com o termo astronômico “DNA satélite”. Ao serem analisadas por ultracentrifugação em gradiente com cloreto de cério, as amostras de DNA compõem frações semelhantes a órbitas. Essas frações são bem definidas em bandas que se dispõem ao longo de um gradiente de concentração. Na década de 1960, o uso de experimentos de dissociação-reassociação de DNA ou cinética de reassociação (BRITTEN e KOHNE, 1968), constatou que se tratava de DNA repetitivo.

Segundo Matioli (2001) existem três classes de DNA repetitivo definidas conforme o tamanho das seqüências. Seguindo uma ordem decrescente tem-se DNA altamente repetitivo, moderadamente repetitivo e de cópias únicas. As seqüências que têm trechos longos repetidos são chamadas de DNA satélite, as de trechos médios repetidos são minissatélites e as seqüências curtas repetidas são microssatélites. Para Charlesworth et al. (1994), as seqüências ou *motifs* minissatélites e microssatélites seriam moderadamente repetidas. Tais autores propuseram ainda a classificação dos transposons (*transposable elements* – TEs) como moderadamente repetitivos, móveis e dispersos ao longo do genoma de muitos eucariotos.

Os marcadores microssatélites são conhecidos como “short tandem DNA repeats” (WANG et al., 1994; EDWARDS et al., 1991) ou apenas como “short runs of tandemly repeated” (STR), “sequence tagged microsatellite sites” (STMS) (BECKMANN e SOLLER, 1990), “microsatellites” (LITT e LUTY, 1989), “simple

sequence length polymorphism” (SSLP) (TAUTZ, 1989) e “simple sequence repeats” (SSR) (WEBER e MAY, 1989).

O genoma de todos os eucariotos contém regiões repetidas que variam de uma única base simples a um pequeno número de bases dispostas em tandem. Os locos microssatélites são constituídos por sequências curtas de 2 a 5 nucleotídeos (CHARLESWORTH et al., 1994) ou de 1 a 6 (GUPTA et al., 1996) repetidos de 10 a 60 vezes, com alta frequência e ampla distribuição. Os mais comuns no reino vegetal são os di-nucleotídeos $(AT/TA)_n$, $(A/T)_n$ e $(AG/CT)_n$ (MORGANTE e OLIVIERI, 1993), e $(GT/CA)_{10-30}$ (STRAND et al., 1993) sendo $(AT)_n$ a sequência mais frequente. Os polimorfismos de tetranucleotídeos repetidos são facilmente observados em gel de agarose, mais prático e simples de ser usado. Os níveis de trinucleotídeos também se encontram largamente distribuídos pelo genoma de muitas espécies vegetais, prevalecendo o *motif* $(ATA)_n$.

A distribuição dos microssatélites pelo genoma dos eucariotos é acentuadamente variável entre as diferentes espécies (CHARLESWORTH et al., 1994). Várias pesquisas feitas em vegetais, como grão-de-bico, cevada (WEISING et al., 1989), árvores tropicais (CONDIT e HUBBELL, 1991), soja (CORRÊA, 1999), milho (BARBOSA, 2003), arroz (KANTETY et al. 2002; BADAN, 2003), mostram que os “motifs” são altamente informativos, polimórficos, com distribuição aleatória e com padrão de herança mendeliana. (WANG et al., 1994). Em dicotiledôneas e monocotiledôneas a frequência média de ocorrência dos microssatélites é de 1 a cada 64,4 kb e de 1 a cada 21.2 kb de DNA. As sequências mais abundantes encontradas por estes autores foram $(A)_n$, $(T)_n$, $(AG)_n$, $(CT)_n$, $(AAT)_n$, $(ATT)_n$, $(AAC)_n$, $(GTT)_n$, $(AGC)_n$, $(GCT)_n$, $(AAG)_n$, $(CTT)_n$, $(AATT)_n$, $(TTAA)_n$, $(AAAT)_n$, $(ATTT)_n$ e $(AC)_n$, $(GT)_n$. Os motivos mono, di, tetranucleotídeos repetidos e tri, ricos em A-T

foram localizados em regiões não codificadoras, enquanto 57% dos trinucleotídeos contendo G-C foram encontrados em regiões codificadoras (WANG et al., 1994).

A variação das diferentes repetições de microssatélites é dividida em (i) repetições perfeitas, quando não possuem interrupções; (ii) repetições imperfeitas, são interrompidas por seqüências nucleotídicas não repetidas; e (iii) repetições compostas, quando duas ou mais seqüências diferentes de microssatélites estão dispostas adjacentes (WEBER, 1989). Esta estimativa permite separar os microssatélites por unidades repetidas, ou por tamanho da seqüência. Quando se considera todas as classes variando de 1-6 pb repetidos, predomina uma discrepância entre diversos trabalhos. Caixeta et al. (2006) destacaram alguns desses, que comprovam essas diferenças e, também, afirma que não há uma definição universal de quantas repetições são ideais para que uma seqüência seja considerada como microssatélite.

Os níveis de polimorfismos dos marcadores microssatélites (HOSBINO et al., 2002; GUPTA et al., 1996) são conseqüência da variação numérica das seqüências nucleotídicas nos locos, e são tomados como ferramenta inerente nos estudos de diversidade genética. Diversos trabalhos têm comprovado que o loco microssatélite amplificado é o marcador que possui alto polimorfismo, uma vez que tem expressão co-dominante e multialelismo. Segundo Gupta et al. (1996), há uma relação linear entre o número de alelos detectado para um dado loco e o comprimento do microssatélite. Quanto maior o número de *motifs* repetidos, maior o número de alelos detectados. Para McCouch et al. (1997), a freqüência das diferentes classes de microssatélites diminui à medida que se toma como parâmetro uma unidade repetitiva com um maior número de bases. Assim sendo, quanto maior o número de nucleotídeos na unidade repetitiva do microssatélite, menor é a sua freqüência

dentro do genoma. Ao considerar seis repetições com um a quatro nucleotídeos de microssatélites, Lagercrantz et al. (1993) encontraram uma seqüência repetida a cada 7 kb. Considerando repetições maiores que 20 pb, a freqüência caiu para um microssatélite a cada 28 kb.

A origem de toda essa variabilidade dos *motifs* de microssatélites não é completamente entendida, especula-se que esteja associada à ocorrência de “crossing-over” desigual, como observado em feijão (METAIS et al., 2002) e em leveduras (STRAND et al., 1993). Um outro fenômeno observado em estudos *in vitro* (CHARLESWORTH et al., 1994) sugere a ocorrência de erros durante a replicação do DNA, mecanismo também conhecido como “slipagge”, ou derrapamento, escorregamento, pareamento desigual, acompanhado de falha no sistema de reparo da DNA polimerase (CHARLESWORTH et al., 1994; STRAND et al., 1993; LEVINSON e GUTMAN, 1987). Alelos nulos podem ser causados por inserções e deleções nas regiões que flanqueiam os microssatélites. Parece existir uma relação entre erros na replicação e mutações de genes envolvidos no reparo do DNA. Se os erros resultam de “slippage” geram instabilidade na região e permanecem irreparáveis, chegando a aumentar o número de trinucleotídeos repetidos.

2.4 Marcadores RAPD

A descoberta da reação em cadeia da DNA polimerase possibilitou a visualização de fragmentos específicos de DNA, entretanto o desenvolvimento de

marcadores, por sua vez espalhados pelo genoma, não foi muito fácil devido à exigência do conhecimento prévio da seqüência-alvo para construção de *primers* que as flanqueassem. Isso requeria a clonagem e o seqüenciamento do DNA, o que acabou limitando o uso rotineiro da PCR em estudos de genética e melhoramento (BORÉM e CAIXETA, 2006).

A praticidade e rapidez da PCR provocaram novo impulso com a geração de dados moleculares para várias espécies, tanto animais quanto vegetais. Dois grupos de pesquisadores descreveram independentemente uma nova análise de polimorfismo. Um grupo de Du Pont Co a descreveu para aplicação no mapeamento genético e a chamou de RAPD, ou *Random Amplified Polymorphic DNA*. O outro grupo do Instituto Biológico de Pesquisa da Califórnia, trabalhando com *fingerprinting*, denominaram a nova técnica de AP-PCR (*Arbitrarily-Primed*) (WILLIAMS et al., 1990). Ambos os grupos observaram a distribuição ao acaso de seqüências pequenas de oligodesoxirribonucleotídeos. A reação dos produtos foi separada e visualizada com brometo de etídio em gel de agarose. A natureza dos fragmentos amplificados é altamente dependente do *primer* utilizado. *Primers* que diferem por apenas um nucleotídeo fornecem um padrão de bandas diferentes, logo diferentes polimorfismos. Assim, a amplificação de seqüências de DNA ao acaso é um método muito sensível para analisar polimorfismos, pois, apesar de ser baseada na amplificação não requer conhecimento da seqüência-alvo de DNA. Um *primer*, construído de forma arbitrária, normalmente amplifica várias bandas de diferentes regiões do genoma. Aqueles com até 10 nucleotídeos devem conter preferencialmente pelo menos 50% de GC, algo em torno de seis de cada um deles. Conforme esse princípio de aplicação, isso garante que haja hibridação, caso a composição dos *primers* seja perfeitamente complementar às seqüências

flanqueadas no genoma em análise. (RAFALSKI et al., 1994; MATIOLE, 2001; POWELL et al., 1992). Para que um fragmento de DNA seja amplificado por essa técnica, duas regiões do genoma complementares ao *primer* devem estar separadas por até 4.000 pb e em orientações opostas. Dessa forma, os fragmentos de DNA são amplificados ao acaso sem que seja necessário o conhecimento prévio da seqüência. Por ser determinada de modo aleatório, cada seqüência equivalente a um *primer* é capaz de detectar várias regiões complementares a sua ao longo de todo o genoma, revelando muitas bandas no zimograma. A técnica de RAPD também começou a ser aplicada em gel de poliacrilamida em 1991, fazendo uso de *primers* que continham apenas cinco nucleotídeos, técnica denominada de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (CAETANO-ANOLLES et al., 1991). O protocolo de obtenção de marcadores RAPD, bem como sua otimização, pode ser consultado para maiores detalhes em Levi et al. (1993).

A análise de diferentes espécies de vegetais revelam que os locos RAPD estão dispersos por todo o genoma. Os fragmentos amplificados incluem desde DNA de cópia única até altamente repetitivo (BORÉM e CAIXETA, 2006; GRATTAPAGLIA et al., 1992). A probabilidade de encontrar esses marcadores no genoma pode ser estimada facilmente (WILLIAMS et al., 1990), assim como predizer a média do número de bandas por *primer*. Existe uma relação linear entre a complexidade do genoma e a média do número de bandas observadas. Entretanto, o número de bandas independe da complexidade do material genético estudado. O produto final da reação parece ser determinado pela competição entre os substratos utilizados na amplificação do DNA (RAFALSKI et al., 1994). O uso de *primers* curtos possui uma razão probabilística na técnica de RAPD. Levando-se em consideração que existem 4^{10} (100.000.000) de seqüências diferentes com 10 nucleotídeos, e sabendo-se da

aleatoriedade dos marcadores RAPD, é possível que, em média, existam no genoma cerca de 100 fragmentos complementares ao *primer*. Se o tamanho, ou quantidade de oligonucleotídeos for maior, ou seja, o desenho tiver cerca de quinze nucleotídeos, a probabilidade de encontrar marcadores RAPD no genoma com 100 milhões de pb é de 1/10 (MATIOLE, 2001), conseqüentemente mais raros. Isto mostra que o número de fragmentos amplificados é diretamente proporcional ao tamanho do *primer*. Em muitas espécies vegetais, segundo Powell et al. (1992) e Waugh e Powell (1992), oligonucleotídeos cujo comprimento varia de 9 a 10 pb, em média, costuma gerar de 2 a 10 produtos de amplificação. Para Tingey et al. (1992) a média de bandas em *Arabidopsis thaliana* foi de 0.3 por *primer*, 0.5 em soja, 1 para milho, 2.5 por *primer* em *Neurospora. crassa*.

Os marcadores RAPD identificam polimorfismos que são herdados como marcadores Mendelianos dominantes, ao contrário de marcadores microsatélites, de caráter codominante. Este tipo de marcador não permite separar indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos numa população. A natureza molecular desses polimorfismos pode ter como causas as mutações de ponto no sítio de pareamento do primer, que impedem a amplificação, deleções ou inserções entre dois sítios de flaqueamento, também conhecido como *indels*, é outra fonte de polimorfismos. Caso ocorram estes dois fenômenos, as bandas apresentarão um comportamento de herança típico de marcadores codominantes, onde dois fragmentos de tamanhos diferentes serão interpretados como um indivíduo heterozigoto. Isto é esperado em análises de progênies segregantes com o objetivo de testar a segregação de alelos dos genitores usados como parentais (SKROTCH et al., 1992; RAFALSKI et al., 1994; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; MATIOLI, 2001; BORÉM e CAIXETA, 2006)

Muitas são as vantagens atribuídas ao emprego da técnica RAPD, como a simplicidade, rapidez na obtenção de dados e o baixo custo. Em comparação com outras técnicas moleculares, dispensa o uso de mão-de-obra especializada, não emprega radioatividade, aspecto intrínseco para marcadores RFLP, assim como independe de *primers* marcados com fluorescência. Não requer desenvolvimento prévio de bibliotecas de sondas específicas, seqüenciamento de nucleotídeos, nem desenho de *primers*. Por se tratar de marcadores baseados em PCR, uma quantidade mínima de DNA é suficiente para análise genômica de um indivíduo (MICHELMORE et al., 1991; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; MATIOLI, 2001; BORÉM e CAIXETA, 2006) . Além disso, uma vez que são usados *primers* arbitrários regiões de seqüências repetidas podem ser amostradas, até então inacessíveis sem o conhecimento prévio da seqüência-alvo.

A técnica de RAPD é extremamente sensível a pequenas variações na concentração dos componentes da reação (LEVI et al., 1993), por isso, exige cuidados no preparo de soluções-estoque, componentes de reação, manipulação de equipamentos, programação de termocicladores e otimização (BORÉM e CAIXETA, 2006). Mesmo que seja uma técnica mais acessível e constantemente utilizada, tem como principal desvantagem a baixa reprodutibilidade entre laboratórios (SMITH e CHIN, 1992; PENNER et al., 1993; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; JONES et al., 1997; BORÉM e CAIXETA, 2006). Em acréscimo a esta desvantagem sabe-se também que os marcadores RAPD geram baixo conteúdo de informação genética por locos já que não discriminam homozigotos e heterozigotos. O mesmo *primer*, utilizado em indivíduos diferentes, não amplifica, necessariamente, segmentos de DNA correspondentes aos mesmos locos. Um *primer* faz a amostragem de apenas

20 pb nas extremidades de um loco, amplificando apenas um dos alelos daquele sítio (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

2.5 Diversidade Genética obtida por Marcadores Moleculares em *Theobroma cacao* e associação com performance de híbrido.

Na cultura do cacau, a prática de introdução de material estrangeiro visando aumentar a base genética estreita foi marcada pela expansão para outros países. No início da primeira década do século XX foi o Dr. A. Fredholm o responsável por conduzir o primeiro programa de melhoramento iniciado em Trinidad. Fredholm publicou o primeiro artigo intitulado “Breeding of Cacao”, em 1911. Este programa baseava-se no ciclo de seleção de progênies e na avaliação subsequente, tendo o devido cuidado de ter como objetivo principal adquirir indivíduos com características desejáveis. Sabendo que não era possível encontrar todas as características desejáveis numa única planta, Fredholm sabia que era necessário cruzar algumas plantas e selecionar as progênies melhores, então, começava a surgir aí o primeiro caso de hibridização artificial feita em cacauero. Um ponto notório quanto a este aspecto foi que o melhoramento levaria vários anos para atingir seus objetivos, mas a propagação vegetativa poderia amenizar este tempo concomitantemente com a condução em larga escala de um grande número de progênies. Entretanto antes disto, no ano de 1894, J. H. Hart já havia proposto que o cacau poderia ser cultivado por meio da germinação de sementes (*budding*) ou por meio do arqueamento (propagação de ramos plagiotrópicos). Essas técnicas, primeiramente implantadas em Trinidad, depois foram adotadas pelas ilhas do oeste indiano. Em 1932, o sistema de avaliação de progênies também foi adotado em Java por Van Hall, que

se preocupou em discriminar qual seria a melhor estratégia: o uso de cruzamentos e propagação via seminal ou assexuada (BARTLEY, 1994).

Os primeiros programas de melhoramento descritos para cacau empreenderam o uso de sementes. Não obstante, em algumas regiões as variedades cultivadas derivaram de uma única semente retirada de uma árvore. Em tais casos isolados, os cultivares locais seriam linhagens endêmicas de várias gerações de melhoramento, como apontado para o cacau Amelonado do oeste africano e o cacau do Equador. Este último foi mantido aparentemente em estado uniforme por apresentar auto-incompatibilidade. A partir de 1948 o uso de híbridos tornou-se mais freqüente, mas se tratava de uma técnica já bastante utilizada (BARTLEY, 1994).

Híbridos produzidos a partir de parentais ou progenitores altamente heterozigotos para características agrônômicas desejáveis são heterogêneos, e a média dos seus componentes de produção são inferiores a dos seus parentais. Desse modo, pouco ou nenhum sucesso é esperado para híbridos heterogêneos quando comparados com outros cultivares. Esta foi provavelmente a principal razão do baixo progresso dos primeiros híbridos de cacau. O mesmo acontece com híbridos oriundos de parentais selecionados em populações homogêneas. Nesse caso, os híbridos obtidos não diferem significativamente dos seus parentais e nem sobressaem em características. Genótipos heterozigotos podem ser boas fontes de parentais, apenas quando é possível isolar das progênies indivíduos que são homozigotos para gametas que conferem características de interesse (ALMEIDA, 1991)

Vários pesquisadores propõem que os maiores ganhos de seleção em híbridos são obtidos através de cruzamentos entre parentais distantes

geneticamente, maximizando assim a heterose (BARTLEY, 1994; BORÉM e CAIXETA 2006; MOLL et al., 1962; GHADERI et al., 1984; SHAMSUDDIN, 1985; CRUZ, 1990; ALI et al., 1995).

As primeiras tentativas da aplicabilidade dos híbridos de cacau entre Crioulos e espécies Amazônicas foram frustrantes, pois as progênes apresentaram autocompatibilidade e incompatibilidade somadas a outras complicações, como tamanho reduzido das sementes, herança dos parentais SCA. Os primeiros programas para produção de híbridos lançaram mão dos melhores parentais quanto às características de produção e mesmo assim não apresentaram heterose. Quando outros clones de características inferiores foram combinados, os resultados mostraram o aparecimento dos melhores componentes de produção. Embora muitos clones sejam corriqueiramente usados como excelentes parentais em atributos de produção, o uso de indivíduos de diferentes regiões de diversidade demonstrou que a performance de tais genótipos como clones não é necessariamente um critério para a escolha de parentais (BARTLEY, 1994).

No cultivo de cacau diversos autores relataram sobre a presença de heterose para diversas características em cruzamentos entre clones de diversas origens. A divergência genética entre genitores a serem cruzados para a produção de híbridos é um fator primordial uma vez que existe correlação entre divergência genética de genitores e híbridos (RUSSEL, 1952; SORIA, 1964, OPEKE e JACOB, 1969; ATANDA e TOXOPEUS, 1971; REYS e PEREZ, 1971; ATANDA, 1973).

Os descritores morfológicos ou marcadores morfo-agronômicos tradicionais foram os primeiros tipos de marcadores empregados para avaliação e caracterização de germoplasma vegetal. Dois importantes marcadores genéticos simples foram identificados no cacau: mancha axilar (HARLAND e FRECHVILLE,

1927) e cor dos colitédones (WELLENSIEK, 1931). Os principais descritores morfológicos foram agrupados com base nas partes vegetativas (QUEROL, 1993). Logo se tem descritores para planta (altura, forma, hábito de crescimento e ramificações); folha (forma, largura, comprimento, cor, tipo de borda e nervuras); flor (forma, cor e tipo de cálice); fruto (forma, cor, volume e número de sementes por fruto) e sementes (tamanho, forma e cor). Os caracteres morfológicos relacionados a frutos e flores são tradicionalmente utilizados para se avaliar a variabilidade entre clones.

Bekele e Bekele (1994a), pioneiros em descritores morfológicos do cacauero, avaliaram com 54 descritores 100 acessos do banco de germoplasma de Trinidad coletados no Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Brasil, Granada, Costa Rica e Trinidad. Uma outra análise pode ser vista em Bekele et al (1994b), que proporam uma lista menor do que a recomendada pelo *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR). O número de descritores foi novamente reduzido de 65 para 26 (BEKELE et al., 1998) considerando 15 descritores quantitativos e 11 qualitativos para folha, flor, fruto e semente.

A difícil padronização desses descritores, tendo em vista as diferentes considerações tomadas pelos pesquisadores nas análises da diversidade fenética e estrutura populacional do cacauero (BEKELE e BEKELE, 1994a), geraram grandes listas de dados criteriosos. Uma quantidade elevada de descritores torna o acesso à diversidade genética oneroso e lento. Em acréscimo, estes marcadores possuem limitações desvantajosas tais como, dominância, baixo polimorfismo e influência ambiental. Sendo as características de interesse econômico controladas por muitos genes (poligênicas), os efeitos edafoclimáticos reduzem a confiabilidade e reproducibilidade dos dados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; ALMEIDA e

DIAS, 2001). Outros fatores, relativos à botânica do cacaueteiro, como a presença de sistemas de auto-incompatibilidade, a necessidade de grandes áreas experimentais para a manutenção de populações segregantes, o estágio juvenil e ciclo longo de seleção dificultam os programas de melhoramento (FIGUEIRA e CASCARDO, 2001).

Os marcadores isoenzimáticos foram utilizados em cacaueteiros para caracterização de germoplasma e identificação de cultivares, contudo, no mapeamento genético seu uso foi restrito devido ao baixo polimorfismo que se consegue detectar com esse sistema. Outros trabalhos foram realizados com isoenzimas para testes de paternidade (YAMADA et al., 1998), determinação sistema de cruzamentos (YAMADA et al., 1999), variabilidade genética (WARREN, 1994) visando o estabelecimento de uma *core collection* (MARITA, 1998; SOUNIGO, et al., 2005). Yamada et al. (2001) estudaram a variabilidade genética de 21 clones do Banco de Germoplasma da CEPLAC/CEPEC, utilizados como genitores de híbridos, através de marcadores isoenzimáticos e marcadores RAPD. Sounigo et al. 2005 utilizaram isoenzimas e RAPD para acessar a variabilidade genética em uma população de cacaueteiros pertencentes ao ICTA (Imperial College of Tropical Agriculture) visando à instalação de uma “core collection”. Marcadores moleculares e isoenzimáticos foram eficientes em discriminar Trinitários originários do Caribe de outros originados da América do Sul e Central. Porém, marcadores RFLP e RAPD não foram eficientes em discriminar clones de cacaueteiros pertencentes a diferentes grupos morfológicos provenientes de diferentes regiões geográficas (LERCETEAU et al., 1997b).

Além de isoenzimas, os marcadores moleculares como o RAPD foram utilizados em estudos de cacaueteiros (BEKELE et al, 1998). O estudo da diversidade

genética em *T. cacao* tem alcançado êxito por meio dos marcadores moleculares, que vêm sendo aplicados, essencialmente, para análise de coleções de germoplasma (RUSSEL et al., 1993; WARREN, 1994; RISTERUCCI et al., 2000b; N'GORAN et al., 2000; SOUNIGO et al., 2005; MARCANO et al., 2007; FALEIRO et al., 2002c), demarcação de regiões geográficas de maior diversidade genética para coleta de germoplasma (FIGUEIRA e CASCARDO, 2001); classificação de variedades (MOTILAL e BUTLER, 2003) e caracterização da diversidade de pragas e patógenos (WILKINSON, 2000; MARITA et al., 2001; FALEIRO et al., 2002a, 2004b; OLIVEIRA e LUZ, 2005) que causam grandes danos a esta cultura, de forma a propiciar estratégias para o melhoramento genético (FIGUEIRA e CASCARDO, 2001).

Yamada et al (2001) conseguiram discriminar o clone SIC-19, em relação aos genitores de variedades recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC, como SCA-6 e ICS-1 utilizando três sistemas isoenzimáticos e 11 *primers* RAPD. Os clones SCA 6 e SCA 12 tiveram 93% de similaridade genética, o que já era esperado porque descendem de sementes de um único fruto, coletado no Peru.

Motamayor (2002) analisou genótipos do grupo racial dos Crioulos, coletados em várias regiões do mundo, visando comparar a estrutura genética desse grupo com outras populações. Para tanto, foram utilizadas 17 sondas de cDNA e 8 sondas de DNA genômico para identificar marcadores RFLP em 283 acessos. Outros 102 acessos foram analisados com marcadores microssatélites. Esses dois marcadores foram eficientes em separar claramente dois grupos de Crioulos, um chamado de Crioulo Ancestral e o outro de Crioulo Moderno foram comparados. O autor também encontrou baixa variabilidade e baixa heterozigose quando comparou todos os materiais coletados, com acessos de coleções de germoplasma identificados como

Crioulos tradicionais. Conforme verificado por Motamayor et al. (2002), grande parte dos clones considerados Crioulos podem ser híbridos naturais entre os Forasteiros e o Crioulo Ancestral, podendo tratar-se, até mesmo, de genótipos Trinitários.

Em 2003, Motamayor et al. realizaram um outro estudo com o objetivo de caracterizar populações de cultivares tradicionais do grupo Trinitário e identificar prováveis parentescos destes com os Forasteiros. Genotiparam 27 clones classificados como trinitários e nove crioulos de Madagascar com marcadores microssatélites e RFLP. A dispersão gráfica utilizada evidenciou a distribuição do material Trinitário ao longo de uma linha contínua entre os Crioulos e os Forasteiros do Baixo Amazonas, exceto os clones que possuíam introgressões de alelos Alto Amazônicos, conforme já previamente comprovado por Motamayor et al. (2002). Os resultados mostraram que os Trinitários têm como provável genitor os indivíduos Baixo Amazônicos, cuja diversidade genética é baixa. Os híbridos com pelo menos um parental Alto Amazônico mostraram diversidade acentuada. A diversidade genética baixa encontrada na relação de parentesco entre Trinitários e Amelonados Baixo Amazônicos é resultado de poucos genótipos Baixo Amazônicos envolvidos na genealogia dos Trinitários (Motamayor et al., 2003)

Marcadores RAPD, AFLP e microssatélites foram utilizados por Faleiro et al. (2001b) para caracterizar a diversidade genética das variedades clonais cultivadas e recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC. Neste trabalho o clone SCA-6, usado como padrão de resistência à vassoura-de-bruxa, e outros nove, TSH-516, TSH-565, TSH-1188, CEPEC-42, EET-397, TSA-654, TSA-656, TSA-792 e TSG-774, foram genotipados com esses dois marcadores. As distâncias genéticas e a análise de agrupamento foram calculadas com base no método UPGMA e o coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979). Foram usados 3 *primers* AFLP, 11 microssatélites e

18 RAPD. A combinação de três marcadores gerou um total de 604 bandas, das quais 570 foram polimórficas. Os resultados mostraram que as variedades recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC possuem alto interralacionamento genético, o que exige a necessidade de se buscar novas fontes de resistência para ampliar a base genética do programa de melhoramento do cacauero.

Faleiro et al. (2004a), empregando marcadores microssatélites em outros 30 acessos de cacauero incluindo clones da série ICS (ICS-1), IMC (IMC-67) e também o SCA-6, objetivaram acessar a variabilidade genética desse material com enfoque na resistência à vassoura-de-bruxa e verificar a inter-relação entre eles com base no método UPGMA e análise das distâncias genéticas via coeficiente de Nei e Li (1979). Os resultados mostraram que o polimorfismo variou de 0.112 a 0.751. As distâncias entre os acessos avaliados variaram de 0.13 a 0.71, indicando uma alta variabilidade genética. Faleiro et al. (2004c) também mostraram, em estudos de diversidade genética com marcadores RAPD, em 59 acessos de cacauero selecionados em fazendas do Sul da Bahia, que existia uma alta variabilidade nesta região. Outros trabalhos também foram feitos por Faleiro et al. (2003b) visando à confirmação da fecundação cruzada *entre T. cacao* e *T. grandiflorum*. Dos 12 *primers* RAPD utilizados, 75% deles geraram pelo menos uma banda informativa, enquanto para os 23 *primers* microssatélites, 40% deles foram suficientes para se obter informações. Segundo esses pesquisadores os cruzamentos interespecíficos são uma alternativa na busca de genes de interesse, diversidade genética e heterose e que o melhoramento do cacauero com *T. grandiflorum* tem grande potencial de complementaridade gênica, pois, apresenta, entre outros fatores, resistência a doenças.

Faleiro et al. (2002c) utilizaram marcadores RAPD para discriminar a similaridade genética entre 18 acessos duplicados, mantidos em 37 linhas, do Banco Ativo de Germoplasma da CEPLAC/CEPEC. A similaridade genética entre clones de mesmo acesso foi acentuada para os clones RB 29, Ca 1 e C. Sul 4, sendo respectivamente 0.70, 0.94, e 0.96 considerando como ponto de corte a similaridade de 0,97. Entretanto, Figueira et al. (1997), utilizando o mesmo marcador para determinar a similaridade entre acessos do BAG da CEPLAC/CEPEC/Brasil e de coleções da Malásia, consideraram como não idênticos os acessos que apresentaram valores de similaridade inferiores a 0,95.

Pires (2003) correlacionou distâncias genéticas através de marcadores RAPD, e caracteres fenotípicos em cacauero (peso de semente úmida; peso de semente seca; peso de sementes úmidas por fruto; peso total de fruto; relação semente seca, semente úmida; e peso de semente seca por fruto). e encontrou resultados significativos.

Faleiro et al. (2004a) usaram o coeficiente de correlação de Pearson para comparar as distâncias genéticas e a coincidência do posicionamento de 19 acessos de diferentes regiões geográficas: Brasil, Equador e acessos trinitários e Amazônia Peruana. A correlação entre os marcadores RAPD e microssatélites foi baixa ($r = 0.27$, $P < 0.01$). Apesar desta baixa correlação a análise de agrupamento para os dois marcadores teve um coeficiente de 74% de coincidência para os quatro grupos formados. Em outros trabalhos Faleiro et al. (2001b) encontraram uma correlação de 68,3% entre marcadores RAPD e microssatélites, utilizando 10 variedades clonais recomendadas pela CEPLAC/CEPEC.

Whitkus et al. (1998) compararam a diversidade genética de populações de cacauero do sul do México com populações do norte da América do Sul, fez uso de

13 *primers* RAPD e verificaram baixos níveis de polimorfismos para as coleções de Yucatan e um índice relativamente alto para as populações localizadas no Alto Amazonas. A alta diversidade genética encontrada na região do Alto Amazonas tem sido relacionada com a resistência do cacauero a doenças e a diversidade morfológica, o que sustenta a hipótese deste ser o provável centro de origem desta espécie. Diferenças morfológicas e a identificação de 12 alelos únicos no grupo mexicano comprovaram a diferenciação que ocorreu ao longo do tempo entre os Crioulos e os Forasteiros. Os autores recomendaram estudos detalhados na região Mesoamericana para melhor acesso a novas fontes de diversidade.

Marita et al. (2001) avaliaram a diversidade genética de 270 acessos de *T. cacao* do BAG da CEPLAC/CEPEC/BRASIL. *A priori*, Marita et al. (2001) avaliaram 180 acessos para tentar identificar marcadores RAPD e uma possível relação entre diversidade genética e resistência à vassoura-de-bruxa. A análise dos 270 acessos foi considerada como um ponto crucial para uma maior compreensão das relações genéticas entre os acessos que compõem o BAG da CEPLAC/CEPEC. Não foram observadas diferenças genéticas entre o grupo original (acessos 1-180) e a nova amostra acrescentada à análise (acessos 181-270). Segundo esses pesquisadores a incorporação desses novos acessos não aumentou, em magnitude, a diversidade genética presente na amostra do grupo original, porque os outros 90 acessos podem ter como local de coleta as mesmas regiões geográficas já representadas no primeiro grupo. Muitos acessos exibiram tolerância à vassoura-de-bruxa pertenciam ao grupo dos Alto Amazônicos, como SCA 6, SCA 12, C SUL 4, C SUL 7 e o CCN 10, junto com híbridos do SCA 6 e SCA 12. Outro acesso originário da Guatemala (SGU 26) exibiu alta tolerância à vassoura-de-bruxa, demonstrando que a região do Alto Amazonas não é a única que abriga material resistente.

A seleção de progenitores *a priori* para obtenção de híbridos e sua correlação com a sua performance foram realizadas por Dias e Kageyama (1997). Os pesquisadores utilizaram 20 híbridos obtidos de um dialelo completo (5 X 5), cujos genitores foram CC 41 (Trinitário), SIAL 169 (Forasteiro Baixo Amazônico), CEPEC 1 (Forasteiro Baixo Amazônico), ICS 1 (Trinitário) e o SIC 19 (Forasteiro Baixo Amazônico). Os resultados obtidos mostraram que houve uma correlação positiva entre as maiores distâncias genéticas de Mahalanobis e a média da performance de híbridos para peso de semente seca por planta e peso de semente seca por fruto. Em outro trabalho de Dias et al. (2003) detectaram uma média alta para a performance dos híbridos de cacaueteiro, em relação aos seus genitores, para os mesmos componentes de produção (peso seco de sementes por planta e por fruto). Considerando este último trabalho, as correlações foram feitas com dados de marcadores RAPD e componentes de produção, para posterior comparação com as distâncias genéticas de Mahalanobis. As duas distâncias apresentaram coeficiente de correlação moderado, no entanto, os dois métodos foram suficientemente consistentes para serem usados em programas de geração de híbridos em cacaueteiro, visando à identificação de combinações heteróticas superiores. Dessa forma, as distâncias mensuradas por marcadores RAPD e componentes de produção podem ser usados como ferramenta para escolha e seleção de cruzamentos superiores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição dos genitores e dos híbridos

Neste estudo foram utilizados 11 clones do jardim clonal da Empresa Almirante Cacau, sendo os seguintes clones TSH 1188, CCN 51, AMAZ 15, H 56, LCTEEN 37 A, LCTEEN 162/1010, COCA 3370/5, SCA 24, GU 261, IMC 47 e ICS 95 de origens diferentes. As características gerais destes clones estão detalhadas na Tabela 1. Também foram utilizados os híbridos obtidos em um dialelo parcial sem os recíprocos e autofecundações.

3.2 Delineamento Genético e Experimental

Os 11 genitores foram inter cruzados num esquema dialélico parcial, sem os recíprocos, e as sementes coletadas de cada cruzamento foram semeadas individualmente em sacos de polietileno e as mudas foram mantidas em condições de casa de vegetação por seis meses, sendo então transplantadas para o campo. Devido à dificuldade de obtenção de sementes, o experimento no campo foi instalado em diferentes épocas de plantio. As mudas foram delineadas no campo experimental em 4 blocos casualizados com 10 plantas por parcela, distribuídas em 4 repetições no espaçamento de 3,0 X 3,0 m. Os quatro blocos estão dispostos em áreas estratégicas da Empresa Almirante Cacau sob condições de sombreamento com bananeiras e algumas espécies da Floresta Atlântica recomendadas para consórcio com o cacauzeiro.

Alguns cruzamentos não foram obtidos ou não geraram sementes suficientes para instalação de todos os tratamentos (55 híbridos). Vinte e dois híbridos foram

transplantados, aos 6 meses de semeadura em viveiro, e avaliados em campo, quatro anos após o plantio, com relação aos seguintes caracteres: altura da planta (AP); altura do fuste (AF); largura e comprimento da copa (LC e CC, respectivamente) e circunferência do caule (DC). Foram utilizados apenas os híbridos pertencentes a dois blocos com mesma idade de plantio.

A AF foi medida da base do caule, a partir do solo, até a abertura da forquilha, com o auxílio de uma fita métrica. O DC foi medido a 30 cm do solo em plantas adultas, de acordo com o recomendado por Soria (1964) e Mariano (1966).

As demais medidas de AT, LC, CC foram feitas com hastes de madeira de 3 m, nas quais foram fixadas as fitas métricas. Para não ocorrer discrepâncias entre um observador e outro, foram utilizadas hastes secundárias como apoio para criar uma linha real no espaço de tal forma que, constituíssem um plano cartesiano tridimensional.

Considerou-se como AT, a medida do ramo mais alto a partir da base de cada planta. A LC foi medida na direção horizontal (eixo x) de acordo com a disposição das plantas em linha em cada um dos blocos, e o CC foi medido na direção vertical (eixo y) em relação a linha. Tanto para a LC quanto para o CC foram adotados como limites de medidas as extremidades dos ramos mais distantes do eixo central (caule).

3.3 Metodologia utilizada para obtenção dos dados moleculares

3.3. 1 Extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas frescas e sadias dos 11 clones, em idade intermediária de maturação. Aproximadamente 300 g de material foliar de cada um dos clones foram maceradas em nitrogênio líquido. O método de extração utilizado foi do CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). Uma alíquota de aproximadamente 0,8 mL do macerado foliar foi transferida para tubos microtubos de 2 mL e, adicionou-se 700 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM. L⁻¹, pH 8,0; EDTA 20 mM. L⁻¹, pH 8,0; NaCl 1,4 mM. L⁻¹; 1% de PVP; 0,2% de β -mercaptoetanol (solução final 14.3 mol. L⁻¹), 2% de CTAB e 0,1 mg/mL de proteinase K). As amostras foram agitadas no vórtex e incubadas em banho-maria a 55°C por 60 minutos e a cada 10 minutos,

para obter uma melhor superfície de contato do material foliar com o tampão, os tubos foram agitados suavemente. Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 2 mL, e adicionou-se 700 µL de clorofórmio álcool-isoamílico diluído na proporção 24:1. As alíquotas foram agitadas suavemente até adquirirem um aspecto homogêneo. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes, sendo que a quantidade de clorofórmio adicionado foi diretamente proporcional a quantidade de material ressuspendido. Retirou-se os tubos do banho-maria e deixou-os esfriar a temperatura ambiente. Em seguida acrescentou-se 700 µL de isopropanol e agitou-se o tubo por inversões até a homogeneização e, em seguida centrifugou-se por 4 minutos a 12.000 rpm. Centrifugou-se para precipitar o DNA, a 12.000 rpm por 4 minutos e um precipitado branco (pelete) formou-se no fundo do tubo. Logo em seguida foram feitas duas lavagens sucessivas com etanol. Os tubos com os peletes permaneceram cerca de 1,30 h ao ar livre para evaporação de todo o álcool. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE, contendo RNase na concentração final de 10 µg/mL. Colocou-se o DNA em banho-maria por 5 minutos a 37 °C. Todas as amostras de DNA foram purificadas com o Kit Prep-A-Gene-Mapris da BIO RAD de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação foi feita em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio (2,5 µL/mL), onde aplicou-se uma alíquota de 3 µL de DNA mais 2 µL de corante tipo IV. Como padrão de quantificação, foi aplicado junto com as amostras o DNA λ nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/µL. Em seguida o gel foi submetido à eletroforese entre 80 a 97 volts por 1 hora, utilizando como tampão de corrida o TBE 1X (EDTA 2 mol. L⁻¹; Tris-borato 9 mol. L⁻¹). As bandas visualizadas em luz ultravioleta (UV), no transluminador foram fotodocumentadas, e a concentração de DNA foi estimada por comparação com o DNA λ. Assim pôde-se diluir as amostras para a concentração de 10 ng/µL.

Tabela 1 - Identificação e principais características dos 11 clones de *T. cacao*.

Clone*	Nome completo	Origem	Tipo morfológico	Histórico	Principais características**	Fonte***
AMAZ 15	Rio Amazonas	Peru/Equador	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio e resistente a VB	1
IMC 47	Iquitos Maraño Calabacilo/Iquitos Mixed Calabacilo	Peru - Amazônia	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio a alto e resistente a Ceratocystis	2
SCA 24	Scavina	Peru	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, baixo porte e resistente a VB	3
LCT EEN 37 A	London Cocoa Trade Estação Experimental Napo	Equador	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio e resistente a VB	4
LCT EEN 162/1010	London Cocoa Trade Estação Experimental Napo	Equador	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio e resistente a VB	5
CCN 51	Collección Castro Naranjal	Equador	Trinitário	Cultivado	Produtivo, porte médio e resistente a VB	6
ICS 95	Imperial College Selection	Trinidad	Trinitário	Cultivado	Produtivo, porte pequeno a médio e resistente a Monília	7
TSH 1188	Trinidad Selection Hybrid	Trinidad	Trinitário	Cultivado	Produtivo, porte alto e resistente a VB e Podridão-parda	8
COCA 3370/5	Rio Coca	Equador	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio a alto e resistente a VB	9
GU 261	French Guyanese	Guiana Francesa	Baixo Amazônico	Cultivado	Produtivo, porte médio a alto e resistente a VB	10
H 56	Huallaga	Peru	Alto Amazônico	Silvestre	Produtivo, porte médio a alto e resistente a Monília	11

***1 – Sounigo et al., 2005; Bekele e Bekele, 1994a; ICGD, 2007; Dias, 2001; Pires, 2003

7 - Dias, 2001; Sounigo et al., 2005; Bartley, 1994; ICGD, 2007;

2 - Dias, 2001; Crouzillat et al, 2000; ICGD, 2007; Pires, 2003

8 - Bartley, 1994, Dias, 2001; ICGD, 2007;

3 - Bartley, 1994; Dias, 2001; Sounigo et al, 2005; ICGD, 2007; Pires, 2003

9 - Faleiro et al., 2004a; Bartley, 1994; ICGD, 2007; Dias, 2001

4 - Sounigo et al., 2005; Lanaud et al, 2000a; ICGD, 2007; Dias, 2001; Pires, 2003

10 - Lecerteau, 1997a; ICGD, 2007; Dias, 2001; Pires, 2003

5 – Sounigo et al., 2005; Lanaud et al, 2000a; ICGD, 2007; Dias, 2001; Pires, 2003

11 - ICGD, 2007; Dias, 2001; Pires, 2003

6 - Neto et al., 2005; ICGD, 2007; Dias, 2001

3.3.2 Amplificação de DNA com *primers* microssatélites

As amplificações foram feitas em um volume final de 13 μL de solução contendo: 5,25 μL de H_2O Mili-Q, 0,39 μL de MgCl_2 50 mmol.L^{-1} , 1,3 μL de tampão 10x, 1,3 μL de dNTP 2,5 mmol.L^{-1} , 0,26 μL de *primer* 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ marcados com fluorescência, 1,3 μL de BSA 2,5 $\text{mg}/\mu\text{L}$, 0,2 μL de *taq* polimerase 5U/ μL e 3,0 μL de DNA. Os fragmentos foram amplificados por 35 ciclos conforme o seguinte programa; 94°C por 2 minutos para desnaturação do DNA, 46 °C ou 51°C (temperatura específica para cada *primer*) por 1 minuto para anelamento do *primer* O, 72°C por 1 minuto para extensão da molécula de DNA pela Taq DNA-polimerase, e 72°C por 7 minutos para um passo único de extensão final após os 35 ciclos. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 5%, no seqüenciador automático ABI Prism. 377 por 2 horas. Nas amplificações foram utilizados 15 pares de *primers* específicos para microssatélite, isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) conforme descritos na Tabela 2.

Após a obtenção do gel, os dados foram submetidos à análise utilizando-se os programas Genescan e Genotyper, na caracterização dos microssatélites amplificados a partir de *primers* marcados com fluorocromos, e analisados por meio do sistema de detecção de fluorescência no seqüenciador de DNA ABI Prism 377. As informações geradas pelo Genescan foram armazenadas e posteriormente analisadas pelo Genotyper.

Tabela 2. *Primers* microssatélites utilizados nas reações de PCR dos 11 clones de *T. cacao*.

Nº de acesso	Nome do marcador	T (°C) de Anelamento	Tamanho (pb)	Motif
AJ271827	mTcCIR 35	46 °C	235 pb	(GT) ₁₁
AJ271842	mTcCIR 37	46 °C	150 pb	(GT) ₁₅
AJ271945	mTcCIR 43	46 °C	206 pb	(TG) ₅ (TA)
AJ271946	mTcCIR 44	51 °C	178 pb	(GT) ₁₀
AJ271953	mTcCIR 54	46 °C	165 pb	(CA) ₁₅
AJ271956	mTcCIR 57	46 °C	253 pb	(AC) ₁₃
Y16977	mTcCIR 3	46 °C	249 pb	(CT) ₂₀
Y16978	mTcCIR 2	51 °C	254 pb	(GA) ₃ N ₅ (AG)
Y16980	mTcCIR 6	46 °C	231 pb	(TG) (GA)
Y16982	mTcCIR 8	46 °C	301 pb	(TC) ₅
Y16983	mTcCIR 9	51 °C	274 pb	(CT) ₈ N ₁₅ (CT) ₅ N ₉ (TG) ₁₀
Y16984	mTcCIR 10	46 °C	208 pb	(TG) ₁₃
Y16985	mTcCIR 11	46 °C	598 pb	(TC) ₁₃
Y16986	mTcCIR 12	46 °C	188 pb	(CATA) ₄
Y16987	mTcCIR 13	46 °C	258 pb	(AG) ₁₃

3.3.3 Amplificação de DNA com RAPD

As reações de amplificação foram feitas segundo Williams et al. (1990) com algumas modificações, em um volume total de 25 µL, contendo: tampão 10x (com sulfato de amônia), 2,5µL; 2,5 µL MgCl₂ 25 mmol. L⁻¹; 1,25 µL dNTP 2,5 mmol. L⁻¹; 2 µL Primer 10 mmol. L⁻¹; 0,2 µL Taq 5U/µl e 3 µL de DNA na concentração de 10 ng/µL e H₂O Mili-Q autoclavada). O protocolo de amplificação foi reajustado a fim de amplificar as amostras da seguinte maneira: tampão 10x (com KCl e sem MgCl₂) 2,5µL; 3,0 µL MgCl₂ 25 mmol. L⁻¹; 1,5 µL dNTP 2,5 mmol.L⁻¹; 2,0 µL *Primer* 10 mmol.L⁻¹; 0,2 µL *taq* polimerase 5U/µL e 3,0 µL de DNA na concentração de 10 ng/µL completando o volume de 25 µL com H₂O Mili-Q autoclavada. As amplificações foram efetuadas em termociclador modelo PTC 200 (MJ Research) programado para quatro passos a 94 °C por 1 minuto, 35 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 40 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, e um passo final a 72 °C por 7 minutos. Foram testados 31 *primers* RAPD, dos quais apenas 13 forneceram produtos de amplificação. Os 13 iniciadores

decâmeros, cujas seqüências podem ser encontradas em OPERON (2005), foram: OPA03, OPA05, OPA10, OPB11, OPB17, OPD01, OPD04, OPD05, OPD08, OPD10, OPD11, OPD20 e OPE01.

Após a amplificação, foram adicionados 3,0 µL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água a cada uma das amostras. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2 % para separação das bandas respectivamente. O gel foi corado com brometo de etídio e submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de aproximadamente 2 horas a 95 Volts. Ao término da corrida o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e documentado para leitura visual.

3.4 Análises genético-estatísticas de dados moleculares

3.4. 1 Cálculo das distâncias genéticas utilizando o marcador SSR

Os dados genotípicos gerados pelos programas Genescan e Genotyper (ABI Prism 377) foram codificados em matrizes numéricas. A partir dessas matrizes foram calculados os coeficientes de distância genética, [distância modificada de Rogers (GOODMAN e STUBER, 1983)] de acordo com a equação 01, entre os genitores e a análise de agrupamento UPGMA (Unweinghted Pair Group Method Averages). Para a entrada de dados no pacote estatístico TFPGA, versão 1.3 (MILLE, 1997) ponderou-se como padrão o tamanho do *motif*. Feito isto, após discriminar se o tamanho do *motif* equivalia a um número par ou ímpar, fez-se o ajuste do tamanho dos fragmentos amplificados para par ou ímpar com base no maior percentual. Foram ajustados para a casa decimal mais próxima considerando-se se entre todos os fragmentos avaliados uma proporção de pares ou ímpares.

Equação 01. Matriz de coeficientes de similaridade genética de Rogers modificada (GOODMAN e STUBER, 1983):

$$MRD_{(IJ)} = \left[\sum_{K=1}^I (p_{ik} - p_{jk})^2 \right]^{-1/2} 2n, \text{ sendo:}$$

$MDR_{(i,j)}$ = distância modificada de Rogers;

p_{ik} e p_{jk} = freqüências do k-ésimo alelos para as linhagens i e j, respectivamente;

n = número de locos;

I = número total de alelos considerando todos os locos.

A matriz de coeficientes de distância genética foi usada para gerar o agrupamento para os marcadores microssatélites. O nível de heterozigose foi calculado baseado na relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

3.4. 2 Cálculo das distâncias genéticas utilizando o marcador RAPD

Os resultados das amplificações foram transformados em dados binários (0, para ausência de bandas, e 1 para presença de bandas) e submetidos à análise genética no programa NTSYS-pc versão 2.0 (ROHLF, 1997). Para o cálculo de distância genética foi utilizado o coeficiente de Jaccard (1908) conforme:

$$D_{(ij)} = 1 - \frac{N_{ij}}{N_i + N_j + N_{ij}}, \text{ onde:}$$

$D_{(ij)}$ = distância genética entre as linhagens i e j;

N_{ij} = número total de bandas comuns às linhagens i e j;

N_i = número de bandas presentes somente na linhagem i;

N_j = número de bandas presentes somente na linhagem j.

A análise de agrupamento foi feita conforme o mesmo procedimento utilizado para os marcadores microssatélites, pelo método UPGMA.

3.5 Análise descritiva dos dados fenotípicos.

Foram calculadas estatísticas descritivas das características morfológicas AF, AT, LC, CC e DC, com base nos valores máximo e mínimo, no desvio padrão (DP) e na média, considerando duas repetições (Bloco 1 e Bloco 2), com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2003.

Foi feita análise de correlação linear de Pearson entre as distâncias genéticas e as variáveis morfológicas estudadas, e, também, entre as variáveis morfológicas.

3.5.1 Correlações entre dados de distância genética obtidas por SSR e RAPD e dados fenotípicos.

As correlações entre os dados de distâncias genéticas dos genitores e os dados morfológicos dos híbridos F₁ foram feitas pela correlação linear de Pearson, de acordo com Falconer (1981).

$$r = \frac{\text{COV}_{xy}}{\sqrt{\text{var}_x} \sqrt{\text{var}_y}}, \text{ em que:}$$

X e Y são as duas características em questão;

r = correlação linear de Pearson;

cov_{XY} = covariância entre as duas características x e y;

var_x = variância da característica x;

var_y = variância da característica y.

3.6 Agrupamento dos clones e análises de coordenadas principais

As distâncias genéticas dos marcadores RAPD e SSR foram utilizadas para fazer os agrupamentos dos clones pelo método UPGMA. A dispersão gráfica dos dados foi feita pelo método de coordenadas principais (PCO, GOWER, 1996) com o programa NTSYS-pc versão 2.0 (ROHLF, 1997). Para cada dendrograma foi calculado o valor de correlação cofenética entre a matriz de distâncias genéticas e a matriz dos valores cofenéticos.

3.6.1 Correlação entre os marcadores RAPD e SSR

As correlações entre as distâncias dos marcadores foram feitas utilizando o teste de Mantel (1967). O teste de aleatorização de Mantel associa elementos de duas matrizes fazendo a correlação (correlação dos produtos dos momentos, r). A significância dessa correlação é determinada pela comparação das distribuições das correlações encontradas a partir da aleatorização dos elementos de uma das matrizes. Assim, a correlação original é comparada com as sucessivas correlações obtidas de matrizes com elementos aleatorizados dentro de cada uma delas. A matriz original é chamada de matriz M , a matriz a ser aleatorizadas é chamada de matriz E , em seguida, a matriz E aleatorizada passa a ser chamada de matriz E_R . A correlação é feita entre M e E , gerando um valor Z , e entre M e as matrizes E_{R_s} , produzindo uma distribuição aleatorizada de Z . É possível observar então se o valor original de Z é um valor da distribuição aleatorizada de Z . O teste de Mantel numericamente é expressado da seguinte forma:

$$Z = \sum_{1,j}^n x_{ij}y_{ij} \quad , \text{ em que:}$$

Z = valor da estatística de Mantel,

X_{ij} e Y_{ij} = elementos da matriz M e E , com exceção dos elementos da diagonal.

A correlação entre cada distância e as médias de AF, AT, LC, CC e DC foram feitas através do coeficiente de correlação de Pearson. Nos dados de RAPD foram excluídos os cruzamentos com o clone SCA 24, pois havia muitos dados perdidos na genotipagem para esse clone.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração do DNA

O DNA extraído de folhas frescas e sadias dos 11 genitores, em idade intermediária de maturação, apresentou-se de boa qualidade e íntegro. As amostras dos clones ICS 95, AMAZ 15, SCA 24, LCT EEN 37 A, CCN 51 e COCA 3370/5 apresentaram uma concentração de DNA em torno de 80 ng, enquanto os clones TSH 1188, IMC 47, GU 261 e LCT EEN 162/1010 tiveram uma concentração de 100 nanogramas. A integridade do DNA foi considerada boa, isso isto é importante porque a boa reproducibilidade dos produtos de amplificação via PCR segundo FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995, dependem da integridade do DNA.

4.2 Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites foram informativos (Tabela 3) geraram alelos polimórficas que variaram de 3 para o *primer* AJ27182 (H_0 de 0,5413) a 9 para o

primer Y16977 (H_0 0,8750). A média de bandas por *primer* foi de 5,53. Os 15 pares de *primers*, específicos para microssatélites em cacau (LANAUD et al., 1999) geraram um total de 83 alelos.

As distâncias genéticas (Tabela 4) tiveram valores mínimo de 0.56 e máximo de 0.89 para os cruzamentos entre COCA 3370/5 x AMAZ 15 e ICS 95 x SCA 24, respectivamente, com média de 0,75 para todas as combinações. A variação entre as distâncias foi pequena, com desvio padrão de 0,08.

Tabela 3 - Heterozigosidade observada (H_0) e comprimento dos alelos amplificados em 15 locos microssatélites a partir de 11 clones de cacau.

Loco	Padrão*	A**	H_0	Comprimento dos alelos (pb)
AJ271827	235	3	0,5413	222, 232, 238
AJ271842	210	5	0,7500	198, 203, 204, 205, 206
AJ271945	206	4	0,7107	248, 256, 258, 260
AJ271946	178	4	0,6016	149, 175, 183, 185
AJ271953	165	7	0,8395	229, 233, 235, 241, 243, 251, 255
AJ271956	253	7	0,8223	209, 211, 215, 217, 219, 227, 229
Y16977	249	9	0,8750	141, 147, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165
Y16978	254	4	0,6563	240, 250, 254, 256
Y16980	231	4	0,5826	248, 252, 254, 256
Y16982	301	5	0,6777	283, 291, 293, 295, 307
Y16983	143	7	0,8140	273, 275, 277, 285, 287, 289, 295
Y16984	208	7	0,7603	198, 200, 202, 204, 206, 208, 210
Y16985	298	5	0,7521	292, 304, 306, 308, 318
Y16986	188	7	0,8182	188, 202, 204, 206, 212, 214, 210
Y16987	258	5	0,6983	142, 148, 156, 160, 164
Média		5,53		

*:Corresponde ao tamanho do fragmento amplificado no desenvolvimento dos *primers*: série Y (LANAUD et al., 1999); Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov

A** :Corresponde ao número de alelos por loco

H_0 : heterozigosidade observada.

Os cruzamentos que tiveram as maiores distâncias, em torno de 0.8, foram IMC 47 x LCT EEN 162/1010; SCA 24 x LCT EEN 162/1010; H 56 x LCT EEN 162/1010; IMC 47 x AMAZ 15; H 56 x AMAZ 15; GU 261 x AMAZ 15; SCA 24 x LCT

EEN 37 A; GU 261 x LCT EEN 37 A; CCN 51 x SCA 24; H 56 x SCA 24; GU 261 x SCA 24; ICS 95 x SCA 24; H 56 x IMC 47; COCA 3370/5 x IMC 47; COCA 3370/5 X H 56; ICS 95 x H56. As demais distâncias para os cruzamentos tiveram valores que variaram entre 0.60 a 0.79. Observou-se que as distâncias entre todos os clones Trinitários variaram de 0.60 a 0.66 e as distâncias entre todos os forasteiros variaram de 0,56 a 0,88 indicando uma maior variabilidade entre estes quando comparado com a variação nos Trinitários. Lecerteau et al. (1997ab) também encontraram uma maior variabilidade dentro de Forasteiros em comparação com Trinitários igualmente ao que foi encontrado nesse estudo.

Quando se calcula as distâncias dentro dos genitores pertencentes aos dois grupos raciais, observa-se que a média dos clones Trinitários é menor que dos forasteiros. Quando se considera as distâncias genéticas entre clones pertencentes aos dois grupos (intergrupos) observa-se que a média é semelhante a do forasteiro. Os desvios padrões decrescem dos Forasteiros, seguido dos Forasteiros x Trinitários e nos Trinitários (Tabela 5).

Tabela 4 - Distâncias genéticas, entre 11 genitores de híbridos de *T. cacao*, estimadas com 15 locos microssatélites com base no coeficiente de Rogers (GOODMAN e STUBER, 1983) modificado.

	LCT 162/ 1010	AMAZ 15	LCT 37 A	SCA 24	IMC 47	H 56	GU 261	COCA 3370/5	CCN 51	TSH 1188	ICS 95
LCT 162/1010	0.0000										
AMAZ 15	0.6055	0.0000									
LCT 37 A	0.7853	0.6325	0.0000								
SCA 24	0.8466	0.7528	0.8062	0.0000							
IMC 47	0.8756	0.8266	0.7303	0.6583	0.0000						
H 56	0.8165	0.8165	0.7853	0.8466	0.8266	0.0000					
GU 261	0.8660	0.8292	0.8036	0.8036	0.7773	0.7906	0.0000				
COCA 3370/5	0.6292	0.5590	0.6614	0.7500	0.8165	0.8416	0.7538	0.0000			
CCN 51	0.7416	0.7416	0.7071	0.8756	0.7638	0.7638	0.7638	0.6922	0.0000		
TSH 1188	0.6831	0.5916	0.6325	0.7416	0.6831	0.7188	0.7638	0.6922	0.6055	0.0000	
ICS 95	0.7538	0.7230	0.7687	0.8919	0.7385	0.8118	0.7977	0.6892	0.6571	0.6030	0.0000

■ Forasteiros x Trinitários

Tabela 5 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores microssatélites entre e dentro de genitores pertencentes a dois grupos raciais.

Híbridos	Valores de distâncias genéticas para marcadores SSR				
	Nº de Híbridos	Média	Máximo	Mínimo	DP
Trinitários	3	0,62	0,66	0,60	0,03
Trinitários x Forasteiros	24	0,75	0,89	0,59	0,07
Forasteiro	28	0,74	0,88	0,56	0,09

As maiores médias obtidas com marcadores microssatélites foram verificadas entre as regiões geográficas Equador com Peru e Peru com Trinitários. Médias semelhantes a esses dois grupos de cruzamentos foram verificadas entre os clones peruanos. O maior desvio padrão (DP) foi detectado para os clones equatorianos e menor DP para os Trinitários (Tabela 6).

Tabela 6 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores microssatélites entre e dentro de genitores de diferentes origens geográficas.

Híbridos	Nº de Híbridos	Média	Máximo	Mínimo	DP
Equador x Equador	6	0,65	0,79	0,56	0,08
Peru x Peru	3	0,78	0,85	0,66	0,10
Trinitários x Trinitários	3	0,62	0,66	0,60	0,03
Equador x Peru	12	0,79	0,83	0,73	0,04
Peru x Trinitários	9	0,78	0,89	0,68	0,07
Equador x Trinitários	12	0,70	0,77	0,59	0,06

O dendrograma (Figura 1) foi gerado a partir da matriz de distâncias genéticas e, a partir do dendrograma foi gerada uma nova matriz de distâncias (matriz com valores cofenéticos). A correlação entre as duas matrizes, de distância e a de valores cofenéticos, gerou o valor de correlação cofenética (r) que apresentou um

valor de 0,80, indicando a alta correspondência entre o dendrograma e as distâncias genéticas.

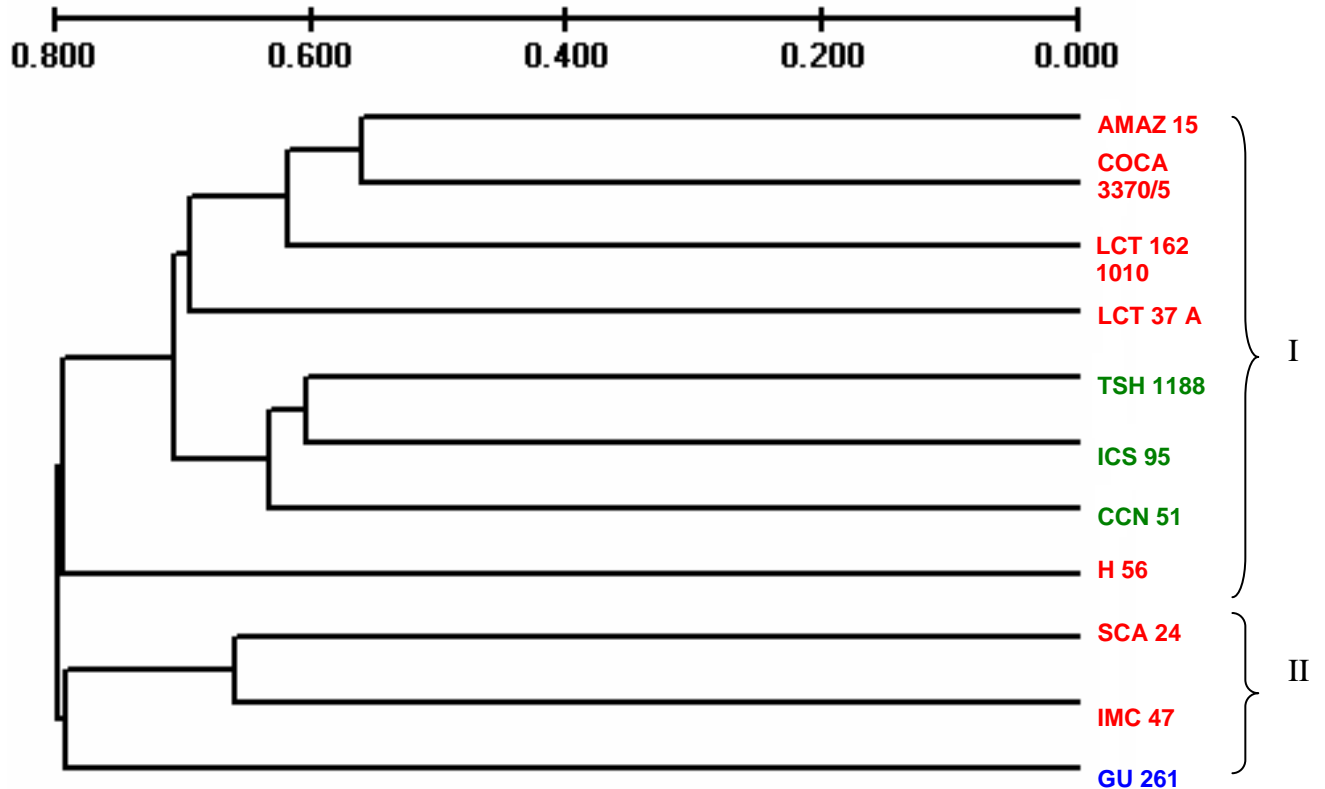


Figura 1 - Análise de agrupamento dos 11 clones de *T. cacao*, baseado na distância de Rogers modificada (GOODMAN e STUBER, 1983), utilizando o método UPGMA, a partir de dados obtidos da amplificação de 15 locos microssatélites. Cofenético (r) = 0.809

- Forasteiro Alto Amazônico
- Trinitário
- Forasteiro Baixo Amazônico

■ Na análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas observaram-se dois grupos de genitores. O primeiro grupo se dividiu em três subgrupos, sendo formado pelos clones AMAZ 15, COCA 3370/5, LCT EEN 162/1010, LCT EEN 37 A,

TSH 1188, CCN 51, ICS 95 e H 56. Os clones AMAZ 15, COCA 3370/5, LCTEEN 162/10, LCTEEN 37 A, CCN 51 têm origem no Equador; o clone H 56 é originário do Peru e os clones TSH 1188 e ICS95 são de Trinidad. O segundo grupo ficou composto pelos clones SCA 24 e IMC 47 originários do PERU e GU 261 da Guiana Francesa. Dessa forma, os clones não foram agrupados por origem geográfica.

Os clones originários do Equador ficaram agrupados com dois outros clones de Trinidad (ICS 95 e TSH 1188) e o clone do Peru (H 56). As populações cultivadas no Equador são descendentes de genitores conhecidos como “Refratário”, por sua vez derivados de eventos de hibridização entre genótipos de três possíveis diferentes regiões, e depois selecionados de acordo com a resistência à vassoura-de-bruxa. Assim sendo, a estrutura genética da população equatoriana, conforme Pound (1943) e Bartley (2001) pode ser atribuída a (i) cruzamentos entre genótipos de Trinidad, Venezuela ou Colômbia, que foram introduzidos no Equador no final do século XIX; (ii) cacau Nacional; e (iii) genótipos Forasteiros de parte da Amazônia equatoriana ou peruana, das mediações do Rio Napo. Com base no agrupamento, empregando microssatélites, o AMAZ 15 ficou no grupo I onde ficaram alocados os demais clones equatorianos. Os genótipos classificados com a sigla AMAZ também podem ser classificados como material peruano (SOUNIGO et al., 2005; LANAUD et al., 2000b) e equatoriano (ICGD, 2007). Nos trabalhos de Sounigo et al. (2005) e Lanaud et al. (2000a) foram utilizados genótipos pertencentes à série AMAZ, sendo classificados como peruanos, ficaram visivelmente agrupados a outros genótipos da mesma região de coleta (SCA e IMC). No segundo grupo ficaram dois clones do Peru (SCA 24 e IMC 47) e um clone Baixo Amazônico da Guiana Francesa (GU 261).

Lecerteau et al. (1997ab) compararam vários grupos de cacau por origem geográfica (Equador, México, Venezuela, Trinidad, Peru e Costa Rica) e não encontraram concordância entre a classificação baseada em grupos morfológicos, por origem geográfica e a nível molecular. Segundo esses autores esse fato é consequência do sistema reprodutivo da espécie.

Quando se observa o dendrograma verifica-se que todos os genitores pertencentes ao grupo racial trinitário (TSH 1188, ICS 95 e CCN 51) ficaram agrupados e intercalados entre os genitores pertencentes ao grupo dos forasteiros. Resultados semelhantes foram obtidos por LECERTEAU et al. (1997ab), em grupos como Forasteiros, e Trinitários com marcadores RAPD e RFLP.

Para Lecerteau et al. (1997a, 1993) e Figueira et al. (1994) a separação de grupos em Forasteiros, Crioulos e Trinitários não é possível, devido à sobreposição dos genótipos, heterogeneidade dentro dos grupos e o grande número de híbridos. Ainda segundo Lecerteau et al. (1997a, 1993) e Figueira et al. (1994) os marcadores moleculares por si só não servem como única garantia de classificação.

As dificuldades de relacionar os grupos raciais do cacau e de classificá-los levaram Figueira et al. (1994) a proporem uma nova classificação em dois grandes grupos denominados de silvestres e domesticados. O grupo dos silvestres envolveria os Forasteiros Alto Amazônicos, enquanto todos os demais comporiam os domesticados, visto que tiveram ampla manipulação antrópica. Porém, neste estudo, os silvestres (AMAZ 15, LCT EEN 162/1010, LCT EEN37 A, SCA 24, IMC 47, COCA 3370/5, H 56) não se distinguiram dos domesticados (TSH 1188, ICS 95, CCN 51).

A distância entre o SCA 24 e o IMC 47 revela a tendência natural, e já esperada para estes dois clones, pois foram coletados na região amazônica da floresta peruana (Pound, 1938), também são classificados como Alto Amazônicos ou

Silvestres. Esses dois progenitores são importantes fontes de resistência à vassoura de bruxa, caracterizados e manipulados em importantes trabalhos (LANAUD et al., 2000b; BARTLEY; LERCETEAU et al., 1997; SOUNIGO et al., 2005).

A distância genética entre clones do equador variou de 0,60 a 0,78. A maior distância foi obtida entre os dois clones LCT EENs, podendo ser devido a variabilidade genética entre as sementes obtidas de um mesmo clone ou está classificado de forma errônea no Banco de Germoplasma. Lanaud et al. (2000a) observaram alta diversidade entre populações equatorianas de LCT EENs, e pouca entre populações de NA (Peru) e GU (Guiana Francesa). Lanaud et al. (2000b) concluíram que os clones GU são diferentes de outros Forasteiros, quando comparados em trabalhos que lançam mão de marcadores moleculares. No entanto, a análise do DNA cloroplastídico dos clones da série GU revela alta semelhança com grupo racial dos Forasteiros. Mas o DNA ribossômico é considerado único ao ser comparado com o DNAr de outros grupos, como os Forasteiros. Sounigo et al. (1996) e Lecerteau et al. (1997a), utilizando marcadores RAPD também já haviam comprovado esta particularidade.

Em trabalhos com RFLP, N'Goran et al. (1994) encontraram níveis baixos de polimorfismos, um indicativo de maior similaridade entre os clones GU e o material Alto Amazônico. Sounigo et al. (2005), usando isoenzimas e marcadores RAPD, constataram, na análise de agrupamento do vizinho mais próximo (*Neighbour Joining*), que os genótipos da Guiana Francesa (CAM e ELP) ficaram mais próximos de materiais oriundos de populações peruanas. O mesmo pode ser observado neste trabalho, onde, através de marcadores microssatélites, ficou evidente a composição do grupo II por dois clones do Peru (SCA 24 e IMC 47) e o GU 261 da Guiana Francesa.

O CCN 51 é oriundo de uma planta da geração F₁ do cruzamento entre ICS-95 X IMC-67 cruzado com um clone do Equador, conhecido como “Canelos”. Ao ser comparado com outros clones da região oriental equatoriana, tem demonstrado resistência à vassoura-de-bruxa e baixa suscetibilidade à podridão-parda. Pires (2003) também confirmou a resistência à vassoura-de-bruxa desse clone no Brasil. Clones da série CCN, de acordo com Lecerteau et al. (1997) em estudos com RFLP, são altamente homocigotos. As variedades híbridas que resultaram de cruzamentos entre o CCN e material Trinitário, tem uma base genética estreita (Lanaud et al., 2000a).

O TSH 1188, resultante do cruzamento entre SCA 6 x ICS 1 x IMC 67 e é um dos clones mais resistentes à vassoura-de-bruxa na Bahia, provavelmente devido à presença de um QTL (locos que controlam características quantitativas) do SCA 6 mais alguns genes menores do ICS 1 (AHNERT, 2000). Faleiro et al. (2002b) descreveram o TSH 1188 como clone com nível intermediário de resistência à vassoura-de-bruxa. No dendrograma observou-se que o TSH 1188 ficou mais próximo do seu genitor ICS 95 quando comparado com o SCA 24. Todo genótipo que compõe a série ICS é resultado de várias introduções recentes em Trinidad (ICGD, 2007). Esta série é composta por germoplasma Crioulo da Nicarágua, Venezuela e clones de plantas coletadas nas mediações do Rio Orinoco (Amazônia). Dessa forma, é provável que a diversidade existente em Trinidad, observada por Pound quando iniciou suas coletas, seja devido às várias introduções destes materiais. O material genético classificado de 1 a 100 foi selecionado em Trinidad, de 101 a 107 são descendentes de Crioulos selecionados em fazendas, aqueles enumerados a partir de 111 são materiais obtidos em programas experimentais (BARTLEY, 1993).

Para auxiliar na interpretação do dendrograma foi feita a análise de coordenadas principais (FIGURA 2), sendo que os valores acumulados para os componentes 1, 2 e 3 explicam, respectivamente, 15.14%, 28.50%, 40.18% da variação genética total. A análise de coordenadas principais, a partir das distâncias genéticas obtidas com os marcadores SSR, confirma a grande variabilidade genética entre os clones e também o agrupamento formado pelos clones 2 (AMAZ 15), 11 (COCA 3370/5) e 1 (LCT EEN 162/1010), 4 (TSH 1188), 7 (CCN 51) e 10 (ICS 95). Embora as três coordenadas principais tenham explicado apenas 40,18% da variância total, refletiram o mesmo padrão de agrupamento observado no dendrograma.

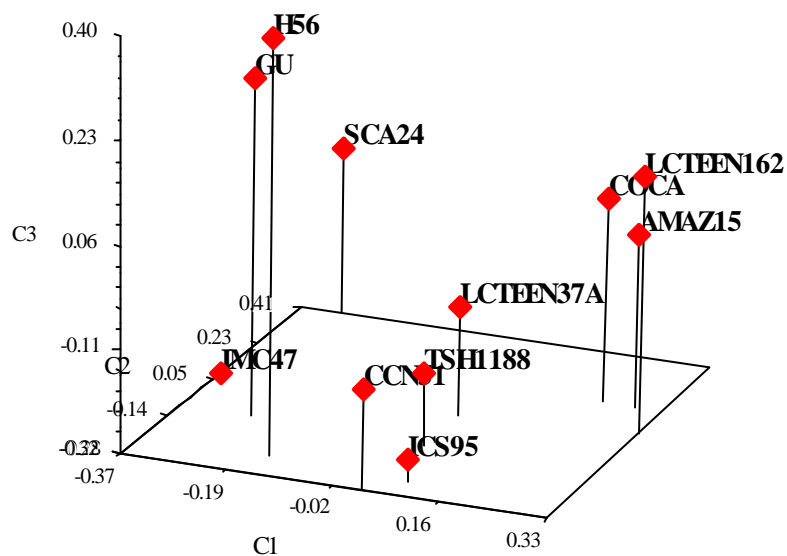


Figura 2 - Análise de coordenadas principais de 11 clones de *T. cacao* baseada na matriz de distâncias, a partir dos dados de marcadores SSR.

4.3 Marcadores RAPD

Foram utilizados 31 *primers*, dos quais 13 forneceram 51 produtos de amplificação. Os *primers* mais informativos foram OPB11, OPD10, OPD01, OPD11, OPD20, OPA05, OPA10, OPB17, OPD08, OPD05. O total de bandas polimórficas foi de 28 com média de 2,5 por *primer*. Pela leitura do gel os *primers* OPB11 e OPD10 apresentaram uma banda polimórfica, enquanto os *primers* OPA03 e OPD04 apresentaram apenas bandas monomórficas.

As distâncias genéticas (Tabela 7) entre os diferentes clones tiveram valores mínimo e máximo de 0.90 a 0.94 entre IMC 47 e TSH 1188 e entre IMC 47 e SCA 24, respectivamente. O agrupamento dos clones pela técnica RAPD a partir das distâncias genéticas gerou dois grupos (Figura 3). O primeiro grupo ficou composto pelos clones ICS 95, IMC 47, AMAZ 15, LCT EEN 162/1010, COCA 3370/5, TSH 1188, H 56, CCN 51 e, o segundo grupo ficou formado por LCT EEN 37 A e GU 261.

Quando se considera os genitores pertencentes, somente ao grupo racial Forasteiro ou Trinitário, nota-se que a distância média dos clones Trinitários é menor que àquela observada para o grupo racial dos Forasteiros (Tabela 8). A distância média intergrupos bem como a amplitude de variação apresentou valores semelhantes aos do grupo dos Forasteiros e ambas foram superiores em relação ao grupo dos Trinitários.

Tabela 7 - Distâncias genéticas, entre 10 genitores de híbridos de cacau, estimadas com 13 locos RAPD, com base no índice de Jacard (1908).

	LCT 162/ 1010	AMAZ 15	LCT 37 A	IMC 47	H 56	GU 261	COCA 3370/5	CCN 51	TSH 1188	ICS 95
LCT 162/1010	0.0000									
AMAZ 15	0.9073	0.0000								
LCT 37 A	0.9396	0.9333	0.0000							
IMC 47	0.9213	0.9188	0.9265	0.0000						
H 56	0.9244	0.9295	0.9302	0.9261	0.0000					
GU 261	0.9231	0.9286	0.9250	0.9326	0.9289	0.0000				
COCA 3370/5	0.9194	0.9111	0.9231	0.9200	0.9250	0.9206	0.0000			
CCN 51	0.9211	0.9225	0.9333	0.9273	0.9194	0.9297	0.9206	0.0000		
TSH 1188	0.9273	0.9283	0.9326	0.9256	0.9326	0.9275	0.9237	0.9300	0.0000	
ICS 95	0.9205	0.9217	0.9298	0.9187	0.9333	0.9286	0.9256	0.9286	0.9244	0.0000

■ Forasteiros x Trinitários

Tabela 8 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores RAPD entre e dentro de genitores pertencentes a dois grupos raciais.

Híbridos	Valores de distâncias genéticas para marcadores RAPD				
	Nº de Híbridos	Média	Máximo	Mínimo	DP
Trinitários	3	0,93	0,93	0,92	0,003
Trinitários x Forasteiros	21	0,93	0,93	0,92	0,005
Forasteiro	21	0,92	0,94	0,91	0,007

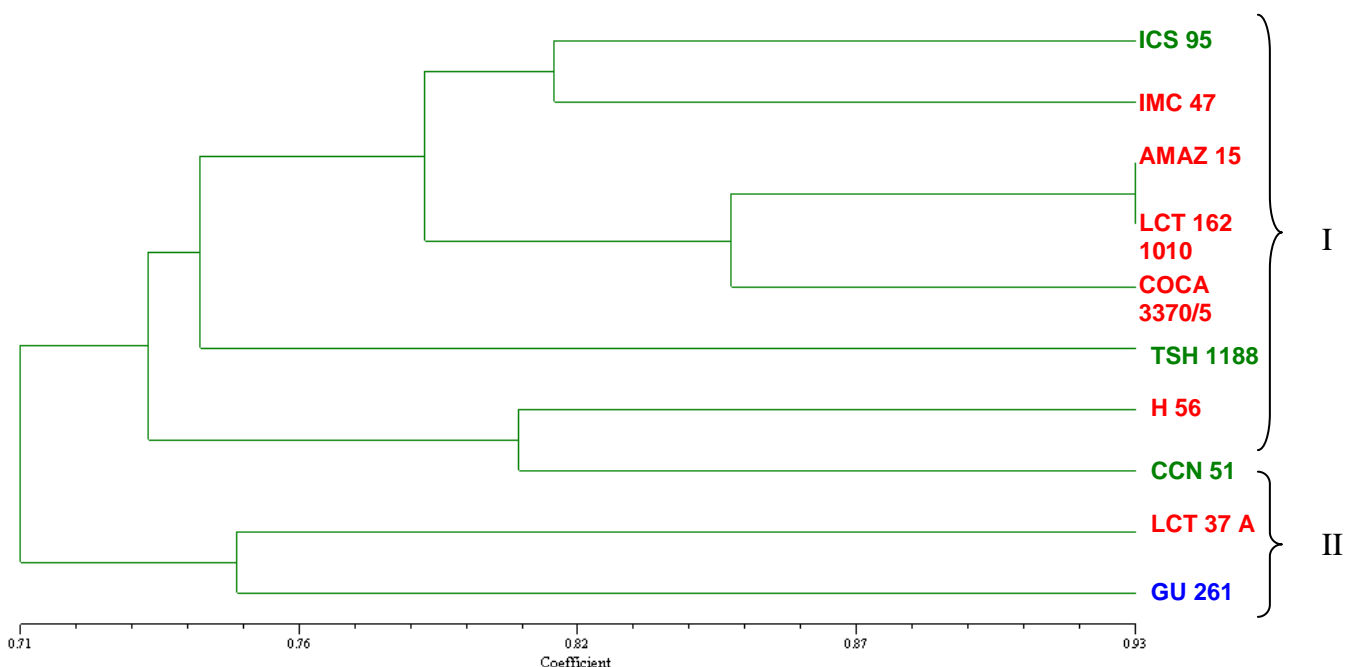
Em relação aos marcadores RAPD verificou-se em todos os cruzamentos, considerando a região geográfica de origem, que todos os clones tiveram medias altas e equivalente em torno de 0,93. Maior e menor DP foram observados, respectivamente, nos materiais oriundos do Equador e de Trinidad. A maior amplitude de variação foi detectada nos clones de origem equatoriana, enquanto a menores amplitudes foram detectadas para todos os outros grupos (Tabela 9).

Tabela 9 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão das distâncias genéticas obtidas com marcadores RAPD entre e dentro clones de genitores diferentes origens.

Híbridos	Nº de Híbridos	Média	Máximo	Mínimo	DP
Equador x Equador	6	0,92	0,94	0,91	0,012
Peru x Peru	1	0,93	-	-	-
Trinitários x Trinitários	3	0,93	0,93	0,92	0,003
Equador x Peru	8	0,93	0,93	0,92	0,004
Peru x Trinitários	6	0,93	0,93	0,92	0,006
Equador x Trinitários	12	0,93	0,93	0,92	0,005

Conforme observado no dendrograma (Figura 3) gerado a partir da matriz de dados RAPD, não houve separação precisa dos genótipos de acordo com o local de origem. No grupo I ficaram agrupados todos os genótipos de Trinidad, Peru e do Equador, neste último caso houve exceção para o clone LCT EEN 37 A, agrupado

no grupo II junto com o clone da Guiana Francesa (GU 261). Assim como discutido para a análise de agrupamento gerada com marcadores microssatélites, também não foi possível discriminar os grupos morfológicos com marcadores RAPD. Entretanto, os marcadores RAPD E SSR foram concordantes no subgrupo formado pelos clones AMAZ 15, COCA 3370/5 e LCT EEN 162/1010. Com base no agrupamento, empregando microssatélites, o AMAZ 15 ficou no grupo I onde ficaram alocados os demais clones equatorianos. O mesmo foi observado para a análise com RAPD, evidenciando que este clone trata-se de um material coletado na região do Equador.



- Alto Amazônico
- Trinitário
- Baixo Amazônico

Figura 3 - Análise de agrupamento dos 10 clones de *T. cacao*, baseada no coeficiente de Jacard (1908), utilizando o método UPGMA, a partir de 28 bandas amplificadas com 13 *primers* RAPD. Cofenético (r) = 0.29894

Na análise de coordenadas principais (Figura 4) para os marcadores RAPD, os valores acumulados para as componentes 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 29,28%, 19,28% e 14,28%. A análise de coordenadas principais, obtida com os marcadores RAPD, confirmou a similaridade genética entre os clones AMAZ 15 e LCT EEN 162/1010, bem como para os clones ICS 95 e IMC 47. As três coordenadas explicaram 86,34% da variância total.

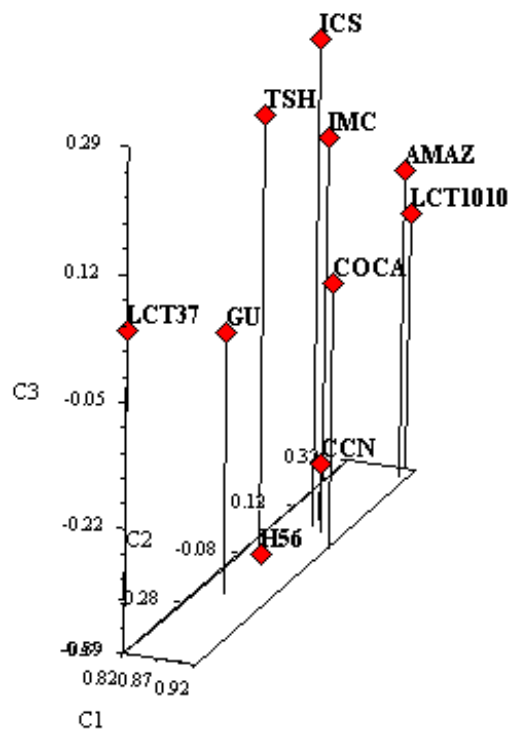


Figura 4 - Análise de coordenadas principais de 10 clones de *T. cacao* baseada na matriz de distâncias, a partir dos dados de marcadores RAPD.

4.4 Correlações entre as distâncias genéticas obtidas com marcadores SSR e RAPD.

A correlação entre os marcadores microssatélites e RAPD foi de 0,00092. Embora os marcadores microssatélites e RAPD tenham distribuição aleatória no genoma, os dois marcadores apresentaram um baixo coeficiente de correlação, indicando que as duas classes de marcadores podem ter amostrado diferentes partes do genoma. Muitos trabalhos compararam as informações geradas por diferentes marcadores (N'GORAN et al., 1994; ARNAU et al., 2001; BRIARD et al., 2001; GRZEBELEUS et al., 2001) através de correlações entre as distâncias genéticas. Entre os fatores que afetam a correlação entre distâncias genéticas obtidas a partir de diferentes marcadores, está o número e a reprodutibilidade das marcas moleculares analisadas. O número de marcadores necessários para diferenciar materiais genéticos depende da similaridade genética e da quantidade de material analisado (FALEIRO, et al., 2001a). Alguns clones utilizados neste trabalho apresentaram inter-relacionamento genético, sendo necessária maior quantidade de marcas para sua discriminação.

As distâncias genéticas obtidas com marcadores podem apresentar viés durante a geração dos dados moleculares. Dentre os problemas na geração dos dados podem ser devido à falta de distinção entre dois ou mais fragmentos amplificados por possuírem tamanhos semelhantes, erros na leitura dos géis e a utilização de marcadores sem consistência (GUMBER et al, 1999). Uma melhor estimativa de distância pode ser obtida quando se seleciona *a priori* marcas que estejam igualmente distribuídas por todo o genoma da planta. Quando ocorre uma concentração de marcas em determinadas regiões do que em outras e uma

quantidade pequenas de marcadores são utilizados pode ocorrer erros nas estimativas de distâncias genéticas (GUMBER et al, 1999). Isso pode ter ocorrido com o marcador RAPD que gerou apenas 28 marcadores com os 13 *primers* utilizados, além de 11 dados perdidos. Conseqüentemente a falta de correlação com o marcador SSR que amplificou 83 alelos com 15 *primers*.

4.5 Análise descritiva dos dados fenotípicos

Na análise descritiva da altura do fuste (AF) verificou-se (Tabela 10) que as maiores médias foram obtidas nos híbridos: H 56 X IMC 47, LCT EEN 37 A X IMC 47, TSH 1188 X LCT 37 A e a menor média foi obtida para os híbridos do cruzamento entre H 56 X ICS 95. A maior amplitude de variação foi notada para os clones TSH 1188 X LCT 37 A, LCT EEN 37 A X IMC 47, ICS 95 X SCA24 e GU261 X H56. Os híbridos do cruzamento entre LCT EEN 37 A X IMC 47 e TSH 1188 X LCT EEN 37 A tiveram as maiores amplitudes, sendo as menores amplitudes obtidas para os cruzamentos entre COCA 3370/5 X SCA 24 e GU 261 X LCT EEN 162/1010. Os maiores e menores DPs foram encontrados para os cruzamentos entre ICS 95 X SCA 24, TSH 1188 X LCT EEN 37 A e GU 261 X LCT EEN 162/1010.

Os híbridos dos cruzamentos entre LCT EEN 37 A X IMC 47, TSH 1188 X ICS 95, TSH 1188 X LCT EEN 37 A, COCA 3370/5 X ICS 95 e TSH 1188 X LCT EEN 162/1010, apresentaram as maiores médias para altura total (AT). As menores médias para AT foram detectadas para os cruzamentos entre H 56 X ICS 95. Os cruzamentos que apresentaram as maiores médias para AT (Tabela 11), coincidentes com AF, foram LCT EEN 37 A X IMC 47 e TSH 1188 X LCT 37 A. As

maiores amplitudes e menores amplitudes de variação para AF foram obtidas para os cruzamentos entre LCT EEN 37 A X IMC 47 e TSH 1188 X LCT EEN 37 A; COCA 3370/5 X SCA 24 e GU 261 X LCT EEN 162/1010. As maiores amplitudes coincidentes para AT e AF foram encontradas nos cruzamentos entre os clones TSH 1188 X LCT EEN 37 A. Os maiores e menores DPs foram detectados para os cruzamentos entre os clones COCA 3370/5 X SCA 24 e AMAZ 15 X H 56.

Os híbridos dos cruzamentos entre GU 261 X H 56 e GU 261 X LCT EEN 37 A tiveram as maiores médias para LC (Tabela 12), enquanto as menores médias foram obtidas nos cruzamentos entre AMAZ 15 X H 56, LCT EEN 162/1010 X H 56 e LCT 37 A X H 56. Amplitudes altas foram encontradas nos híbridos dos cruzamentos entre GU 261 X ICS 95, LCT EEN 162/1010 X SCA 24, TSH 1188 X LCT EEN 162/1010. As menores amplitudes obtidas foram para os cruzamentos entre LCT EEN 37 A X H 56 e TSH 1188 X IMC 47. Os maiores e menores DPs foram obtidos nos cruzamentos entre os clones GU 261 X ICS 95 e COCA X H 56.

As maiores médias para CC (Tabela 13) foram verificadas nos cruzamentos entre os clones LCT EEN 37 A X SCA 24 e GU 261 e LCT EEN 37 A. As menores médias foram obtidas para os cruzamentos entre AMAZ 15 X H 56, LCT EEN 37 A X H 56 e LCT EEN 162/1010 X H 56. Maior amplitude de variação foi verificada nos híbridos dos cruzamentos entre COCA 3370/5 X ICS 95 e GU 261 X ICS 95. Os híbridos dos cruzamentos entre LCT EEN 37 A X H 56 e LCT EEN 37 X SCA 24, apresentaram menores amplitudes de variação. As maiores amplitudes de variação para LC e CC foram coincidentes no cruzamento entre GU 261 X ICS 95, enquanto que, as menores amplitudes para LC e CC foram, também, coincidentes nos cruzamentos entre os clones LCT EEN 37 A X H 56. Os maiores e menores DP

foram obtidos para os cruzamentos entre os clones LCT EEN 37 A X H 56 e COCA 3370/5 X H 56.

As maiores médias para DC (Tabela 14) foram obtidas nos híbridos dos cruzamentos entre TSH 1188 X LCT EEN 162/1010, TSH 1188 X LCT EEN 37 A e GU 261 X LCT EEN 37 A. A menor média para DC foi encontrada para o cruzamento entre AMAZ 15 X H 56. As maiores amplitudes foram detectadas para os cruzamentos entre TSH 1188 X IMC 47 e H 56 X SCA 24, enquanto as menores amplitudes ocorreram para os cruzamentos entre AMAZ 15 X H 56 e TSH 1188 X IMC 47. O maior e menor DP foi obtido para os cruzamentos entre os clones LCT EEN 37 A X H 56 e LCT EEN 162/1010 X H 56, respectivamente.

4.6 Correlações de Pearson entre as distâncias genéticas dos genitores (RAPD e SSR) e média de características fenotípicas, e entre características fenotípicas.

Na Tabela 15 estão listadas todas as distâncias entre os pares de clones genitores e as médias das diferentes características fenotípicas avaliadas nos híbridos. Não houve correlação entre os marcadores microssatélites ou RAPD e as características fenotípicas (Tabela 16).

Nas análises de correlações fenotípicas com o coeficiente de Pearson, obtidas entre as diferentes características fenotípicas (Tabela 17) foram observadas correlações altas e significativas entre AF e LC, CC e LC, e moderadas entre AT e AF, AT e DC, LC e DC, CC e DC.

Tabela 16. Valores de correlação entre marcadores microssatélites e RAPD e médias das cinco variáveis fenotípicas analisadas.

	AF	AT	LC	CC	DC
SSR	-0,32	-0,48	-0,10	-0,03	-0,41
RAPD	0,16	-0,39	-0,09	-0,18	-0,16

Tabela 17 - Valores de correlação entre as médias das cinco variáveis fenotípicas analisadas.

	AF	AT	LC	CC	DC
AF	0,00				
AT	0,52 _{ns}	0,00			
LC	0,94*	0,38 _{ns}	0,00		
CC	0,26 _{ns}	0,36 _{ns}	0,93*	0,00	
DC	0,46 _{ns}	0,69*	0,69*	0,66*	0,00

* Médias significativas a 5% de probabilidade.

ns: médias não significativas.

As variáveis fenotípicas altura do fuste (AF) e circunferência do caule (DC) tiveram baixa correlação, diferente dos resultados encontrados por Soria (1964), Moses e Enriquez (1981), e Santos (2007). Santos (2007), analisando uma progênie derivada do cruzamento entre TSH 1188 e CCN 51 encontrou correlação positiva e elevada entre altura do fuste e diâmetro do caule. Moses e Enriquez (1981) já tinham observaram essa mesma correlação em estudos anteriores.

5. CONCLUSÕES

- O grupo dos Forasteiros apresentou maior variabilidade quando comparado com a variação nos Trinitários.
- As distâncias genéticas, com os dois marcadores de DNA, foram em média maiores entre os genitores dos dois grupos raciais: forasteiros e trinitários.
- Quando se considera as distâncias entre genitores de diferentes regiões geográficas observa-se que: as maiores médias, obtidas com o marcador microsatélite, foram verificadas entre os genitores originários do Equador e do Peru e entre Peru e Trinidad. Médias semelhantes a esses dois grupos de cruzamentos foram verificadas entre os clones genitores originários do Peru. Em relação aos marcadores RAPD verificou-se em todos os cruzamentos médias altas e equivalentes em torno de 0,93.
- As análises de agrupamentos agruparam os trinitários, porém não houve formação de grupos definidos e separados de trinitários e forasteiro.

- Os dados de distâncias genéticas entre os pares de clones, obtidas com os dois marcadores genéticos, não apresentaram correlação.
- A divergência genética entre os dois clones LCT EENs foi alta e semelhante a de outros genitores com maior grau de parentesco.
- Para os caracteres fenotípicos avaliados nos híbridos foram observadas correlações entre: altura do fuste (AF) e largura da copa (LC), altura total (AT) e diâmetro do coleto (DC), largura da copa (LC) e comprimento da copa (CC).
- Não foram observadas correlações entre os caracteres fenotípicos e distâncias genéticas obtidas com qualquer um dos dois marcadores utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNERT, D. Use of QTLs for witches's broom resistance in cocoa breeding. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p.120-123, 2000.
- ALI, M.; COPELAND, L.O.; ELIAS, S.G.; KELLY, J.D. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 118-121, 1995.
- ALMEIDA, C.M.V.C. **Correlações entre caracteres no estágio adulto e possibilidade de seleção precoce em híbridos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Piracicaba, SP, 1991, 194 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, C.M.V.C.; DIAS, L.A.S. Recursos Genéticos. DIAS, L.A.S. (Editor). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa, MG:FUNAPE, UFG, 2001. 578 p.
- ALVERSON, W.S., WHITLOCK, B.A., NYFFELER, R., BAYER, C e BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: Evidence form ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 67, p. 1474-1486, 1999.
- ARNAU, ARNAU, G., LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification? **Acta Horticulturae**, v. 546, p. 301-306, 2001.
- ARAÚJO, I.S. **Mapeamento genético e identificação de QTL associados ao teor de manteiga da amêndoa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.)**. Campos dos

Goytacazes, RJ, 2002. 61p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense.

ATANDA, O.A.; TOXOPEUS, H. A proved case of heterosis in *Theobroma cacao* L. **Proceedings International Cocoa Research Institute of Nigéria**, v. 3, p. 545-551, 1971.

ATANDA, O.A.; Heterosis in crosses of *Theobroma cacao* L. **Experimental Agriculture**, v. 9, p. 23-29, 1973.

BADAN, A.C.C. **Ganho com seleção e diversidade genética: medidas para monitorar o melhoramento populacional de arroz**. Campinas, SP, 2003, 117 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.

BAKER, R.E.D.; COPE, F.W.; HOLLIDAY, P.C.; BARTLEY, B. G.D. e TAYLOR, D.J. The Anglo-Colombian cacao collecting expedition. **Report on Cacao Research** (ICTA-Trinidad). p. 8-18. 1953.

BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; BENCHIMOL, L.L.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA JR, C.L.; SOUZA, A.P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, v. 130, p. 87-99, 2003.

BARTLEY, B.G.D., MACHADO, P.F.R.; AHNERT, D.; BARRIGA, J.P.; ALMEIDA, C.M.V.C. Descrição de populações de cacau da Amazônia brasileira I. Observações preliminares sobre populações de Alenquer, Pará. In: **International Cocoa Research Conference, 10, Proceedings. Cocoa Producer's Alliance**, London, p. 665-672, 1988.

BARTLEY, B.G.D. Notes on the meaning and origins of clone names. **Personal communication to Michelle End**, The University of Reading, UK. 1993.

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

BARTLEY, B.G.D. Refractario – An explanation of the meaning of the term and its relationship to the introductions from Ecuador in 1937. **Ingenic Newslett**, v. 6, p. 10-15, 2001.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Towards a unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. **BioTechnology**, v. 8, p. 930-932, 1990.

BEKELE, F.; BEKELE, I. Further studies on a concise list of morphological descriptors form cacao. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Kuala Lumpur, p. 155-165, 1994a.

BEKELE, F.; KENNEDY, A.J.; DAVID, C.Mc.; LAUCKENER, F.B.;BEKELE, I. Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. **Euphytica**, v. 75, p. 231-240, 1994b.

BEKELE, F.; BIDAISEE, G.; SOUNIGO, O. Morphological characterization in the International Cocoa Genebank Trinidad – an investment form the future. **CRU Report**, p. 15-18, 1998.

BERTOLDE, F.Z. **Respostas fisiológicas ao alagamento do substrato e diversidade genética molecular de clones de *Theobroma cacao* L.** Ilhéus, BA, 2007. 89 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. 4.ed. **Melhoramento de Plantas**. Minas Gerais: Folha de Viçosa, 2000. 525 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Minas Gerais: Folha de Viçosa, 2006. 374 p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331, 1980.

BRIARD, M.; LE CLERC, V.; MAUSSET, A.E.; VERET, A. A comparative study on the use of ISSR, microsatellites and RAPD markers for varietal identification of carrot genotypes. **Acta Horticulturae**, v. 546, p. 377-385, 2001.

BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. **Science**, v. 161, p. 529-540, 1968.

CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide *primers*. **Biotechnology**, v. p. 553-557, 1991.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds). **Marcadores moleculares**. Viçosa, Editora Folha de Viçosa. 2006. p. 9-78.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-219, 1994.

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

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean base on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 15-22, 1999.

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.

CROUZILLAT, D.; BELLANGER, L.; RIGOREAU, M. BUCHELI, P.; PÉTIARD, V. Genetic Structure , Characterisation and selection of Nacional Cocoa compared to other genetic groups. In: **Proceedings of the Internacional Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia. p. 48-66, 2000.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba, SP, 1990, 95 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz/USP.

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

DE LA CRUZ, M.; WHITKUS, R.; GÓMEZ-POMPA, A. e MOTA-BRAVO, L. Origins of cacao cultivation. **Nature**, v. 375, p. 542-543, 1995.

DIAS, L.A.S; KAGEYAMA, P.Y. Multivariate genetic divergence and hybrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n.1, p. 63-70, 1997.

DIAS, L. A. Contribuições do melhoramento. In: Dias, L. A. (Ed). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa, Editora Folha de Viçosa. 2001. p. 493-527.

DIAS, L. A. MARITA, J.; CRUZ, C. D.; BARROS, E. G.; SALOMÃO, T. M. F. Genetic distance and its association with heterosis in cacao. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 46, n. 3, p. 339-347, 2003.

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

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 746-756, 1991.

ENGELS, J.M.M. A systematic description of cacao clones. III Relationships between characteristics and consequences for the cacao breeding. **Euphytica**, v. 32, p. 719-733, 1983.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**, 2.ed. London: Logman, 438 p. 1981.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; YAMADA, M. M.; BURBANO, G.P.; GARDINI, H.A.; MOURA, A.S.; MARQUES, J.R.B.; MONTEIRO, W.R. Comparação entre marcadores RAPD e microssatélites no estudo da diversidade genética no cacauero (*Theobroma cacao* L.). In: Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal, 2001, Caracas. **Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal**. Caracas: Venezuela, 2001a. p. 161.

FALEIRO, F.G. LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALLE, R.R. Caracterização de variedade clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e Microssatélites. **Agrotrópica**, v. 13, n. 2, p. 79-86, 2001b.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. Causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, maio-jun, p. 312-315, 2002a.

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

FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; FALEIRO, A.S.G.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C.; SANTOS, R.C.; SANTOS, R.F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. Accessions Maintained in Duplicate at the Cacao Research Center Germplasm Collection, Based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p.439-444, 2002c.

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

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. *Agrotropica*, v. 15, n. 1, p. 41-46, 2003b.

FALEIRO, G. F.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A. D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.; GRAMACHO, K. P.; FALEIRO, A. S. G. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 227-233, 2004a.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S.; NETO, A.D.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.F. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 303-306, maio-jun, 2004b.

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**, v. 4, p. 12-17, 2004c.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220p.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. e GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal American from Society Horticultural Science**, v. 117, p. 673-677, 1992.

FIGUEIRA, A. V. O.; CASCARDO, J. C. M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: Dias, L. A. S. (Editor). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. 578p.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; LEVY, M. e GOLDSBROUGH, P. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. **Journal American from Society Horticultural Science**, 119, p. 1073-1082, 1994.

FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S.V.; CARPENTER, D.; PIRES, J.L.; CASCARDO, J.C.M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* from Brazil and Malaysia. **Tropical Agriculture**, v. 74, p. 132-139, 1997.

GHADERI, A.; ADAMS, M.W. NASSIB, A.M. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in dry edible bean and faba bean. **Crop Science**, v. 24, n. 37-42, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; MCCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; MCKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, ROSS, O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R. Mapping in woody plants with RAPD markers: Application to breeding in forestry and horticulture. In : **Join Plant Breeding Symposia Series. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, Minnesota, p. 31-36, 1992.

GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Races of maize. VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. **Maydica**, v. 28, p. 169-187, 1983.

GOWER, J.C. Some distant properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v. 53, p. 325-338, 1996.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Genética Moderna. In: **Genômica**. p. 335-364. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

GRZEBELUS, D. et al. Comparison of RAPD and AFLP techniques used for the evaluation of genetic diversity of carrot breeding materials. **Acta Horticulturae**, v. 546, p. 413-416, 2001.

GUMBER R.K., SCHILL B., LINK, W., KITTLITZ, E.V. MELCHINGER, A.E. Mean, genetic variance, and usefulness of selfing progenies from intra- and inter-pool crosses in faba beans (*Vicia faba* L.) and their prediction from parental parameters. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 569-580, 1999.

GUPTA, P. K.; BALYAN, J. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, p. 54-54, 1996.

HARLAND, S.C.; FRECHVILLE, G.E. Natural crossing and the genetics of axil spot in cacao. **Genética**, v. 9, p. 279-288, 1927.

HAYMES, K. M.; IBRAHIM, I. A.; MISCHKE, S.; SCOTT, D. L. SAUNDERS, J. Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5456-5462. 2004.

HOSBINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 146-150, 2002.

ICGD (Internation Cocoa Germoplasm Database). Disponível em : <
http://www.cgi.rdg.ac.uk:8081/cgi-bin/cgiwrap/wah2/cocoa5.ph.cgi?Search_Name=ICS%2095&search_type=exact>. Acesso em: 15 set. 2007.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletan de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S. ; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing RAPD, AFLP e SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KANTETY, R. V.; LA ROTA, M.; MATTHEWS, D. E.; SORRELLS, M. E. Data mining for simple sequence repeats ins expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 501-510, 2002.

LANA, T.G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. Piracicaba, SP, 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.

LANAUD, C.; SOUNIGO, O.; AMEFIA, Y. K.; PAULIN, D.; LACHENAUD, P.; CLEMENT, D. New data on the mechanism of incompatibility in cocoa and its consequences on breeding. **Café, Cacao, Thé**, v. 33, p. 267-277, 1987.

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**, v. 8, p. 2141-2152, 1999.

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

LANAUD, C. Use of Microsatellite Markers for Germplasm Identity Analysis in Cocoa. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p. 27-39, 2000b

LAGERCRANTZ, U.; ELLENGREN, H.; ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, 21, p. 1111-1115, 1993.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. **Heredity**, v. 71, p. 96-103, 1993a.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 81-88, 1993b.

LEAL, J. B. **Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. Ilhéus, BA, 2004, 61 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz.

LECERTEAU, E.; CROUZILLAT, D. e PETIARD, V. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction length polymorphism (RFLP) to evaluate genetic variability within the *Theobroma* genus. In: International Workshop on Conservation, Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources in the 21st Century, **Proceedings**. CRU/The University of the West Indies, St Augustine, p. 332-334, 1993.

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

LERCETEAU, E.; QUIROZ, J.; SORIA, J.; FLIPO, S.; PÉTIARD, V. e CROUZILLAT, D. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. **Euphytica**, v. 95, p. 77-87, 1997b.

LEVI, A.; ROWLAND, L.J.; HARTUNG, J. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. **Hortscience**, v. 28, n. 12, p. 1188-1190, 1993.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.

LITT, S. M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, v. 44, p. 397-401, 1989.

MACCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 89-99, 1997.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARCANO, M.; PUGH, T.; CROS, E.; MORALES, S.; PÁEZ, P.A.E.; CORUTOIS, B.; GLASZMANN, C.; ENGELS, J.M.M.; PHILLIPS, W.; ASTORGA, C.; RISTERUCCI, A.M.; FONET, O.; GONZÁLEZ, V.; ROSENBERG, K.; VALLAT, I.; DAGERT, M.; LANAUD, C. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 877-884, 2007.

MARIANO, A.H. **Relaciones entre algunas medidas de vigor y production en cacao**. Turrialba, Costa Rica, 1966, 41 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Costa Rica.

MARITA, J.M. **Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD-marker based estimates of distance genetic and recommendations for a core collection to maximize genetic diversity**, 1998. Thesis (Mestrado). University of Wisconsin, Madison.

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

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**, v. 41, p. 1305-1316, 2001.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 45, p. 753-762, 1959.

MATIOLI, S.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. (Editor). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2001. 200 p.

METAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1346-1352, 2002.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v., p. 14-17, 1998.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy Science**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MILLE, M. **TFPGA – Tool for population genetic analysis**, version 1.3. Northern Arizona University, 1997.

MOLL, R.H.; SALHUANA, W.S.; ROBINSON, H.F. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize. **Crop Science**, v. 2, p. 197-198. 1962.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.

MOSES D.D.; ENRIQUEZ, G.A. Calibrating variates for yield of cocoa, as well as the relationships of several cocoa features with the environment. In: *Conférence*

Internationale sur la Recherche Cacaoyère, 7, **Actes. J. de Lafforest and Transla-Inter**, London, p. 51-55. 1981.

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**, v. 89, p. 380-386, 2002.

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

MOTILAL, L.; BUTLER, D. Verification of identities in global cacao germplasm collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 799-807, 2003.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 55, p. 335-350, 1987.

N'AGORAN, J. A. K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M. e LANAUD, C. Comparative genetic studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, v. 115, p. 83-90, 1994.

N'AGORAN, J. A. K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M. e LANAUD, C. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. **Euphytica**, v. 115, p. 83-90, 2000.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

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

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p. 2005.
OPERON. Molecules for life [home page]. Disponível em: <[http:// www.operon.com](http://www.operon.com)>. Acesso em: 10 maio. 2008.

OPEKE, L.K.; JACOB, V.J. Preliminary observations on 106 crosses from a diallel crossing programme in *Theobroma cacao* L. **Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau**. 2. ed. Salvador/Itabuna, CEPLAC, p. 94-99. 1969.

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **Research**, v. 8, p. 341-345, 1993.

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

PIRES, J. L.; MARITA, J. M.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; AITKEN, W. M.; MELO, G. P.; MONTEIRO, W. R. e AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p.75-92, 2000.

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacau com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. (Tese de doutorado). Viçosa, MG, 2003. 321p. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

POUND, F.J. **Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America with notes on other species of *Theobroma***. Yuille's Printery, Port-of-Spain: 1938. 58 p.

POUND, F.J. **First report on the selection of cacao trees for resistance to Witches' Broom disease**. Unpublished report, Ministry of Agriculture, Trinidad. 1943.

POWELL, W.; THOMAS, W.T.B.; THOMPSON, D.M.; SWANSTON, J.S.; WAUGH, R. Association between rDNA alleles and quantitative traits in doubled haploid populations of barley. **Genetics**, v. 130, p. 187-194, 1992.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem técnica e sócio-econômica**. AS-PTA, Rio de Janeiro. 1993.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; WILLIAMS, G.K.; RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. **Genome**, v. 37. p. 645-649, 1994.

REYES, E.H.; PEREZ, A. Resultado de un ensayo comparative de progenies híbridas entre cacao Amazônico por Criollo, Amazônico por Trinitário y Criollo por Trinitário. **Proceedings International Cocoa Research Institute of Nigéria**, v. 3, p. 590-599, 1971.

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**, v. 5-6, n. 101, p. 948-955, 2000a.

RISTERUCCI, A.M.; ESKES, B.; FARGEAS, D.; MOTAMAYOR, J.C.; LANAUD, C. Use of microsatellite markers for germplasm identity analysis in cocoa. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p. 25-33, 2000b.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0**. New York: Exerter Publications, p. 103, 1997

RONNING, C. M.; SCHNELL, R. J. Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao* L. **Journal of Heredity**, v. 85, p. 291-295, 1994.

RUSSEL, T.A. The vigour of some cacao hybrids. **Tropical Agriculture**. Trinidad and Tobago, n. 29, v. 4-6, p. 102-106, 1952.

RUSSEL, J.R.; HOSEIN, F.; JOHSON, E.; WAUGH, R. e POWELL, W. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 89-97, 1993.

SANTOS, O.P. **Caracterização cromossômica de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) Schum. (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia**. São Carlos, SP, 2003. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos.

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

SANTOS, R.M.F. **Caracterização da resistência à vassoura-de-bruxa, do vigore vegetativo e de polimorfismo em microssatélites na população de cacauzeiros derivada do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51**. Ilhéus, BA, 2007, 51p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz

SHAMSUDDIN, A.K.M. Genetic diversity in relation to heterosis and combining ability in spring wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, p. 306-308, 1985.

SKROTCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In : **Join Plant Breeding Symposia Series. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, Minnesota, p. 26-30, 1992.

SMITH, S.; CHIN, E. The utility of random primer-mediated profiles, RFLPs, and other technologies to provide useful data for varietal protection. In : **Join Plant Breeding Symposia Series. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, Minnesota, p. 46-49, 1992.

SORIA, J. El vigor híbrido y su uso en el mejoramiento genético de cacao. **Fitotecnia Latinoamericana**, v. 1, p. 59-78, 1964.

SOUNIGO, O.; CHRISTOPHER, Y.; RAMDAHIN, S.; UMAHARAN, R.; SANKAR, A. Evaluation and use of the genetic diversity present in the International Cocoa Genebank (ICG, T), in Trinidad. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p.67-74, 2000.

SOUNIGO, O; CHRISTOPHER, Y.; UMAHARAN, R. Genetic diversity assessment of *Theobroma cacao* L., using isoenzymes and RAPD analyses. . In : **Annual Report for the Cocoa Research Unit for 1996**, CRU, Port of Spain, Trinidad e Tobago. p. 35-51. 1996.

SOUNIGO, O.; UMAHARAN, R.; CHRISTOPHER, A.; SANKAR, A.; RAMDAHIN, S. Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG, T) using isozyme electrophoresis and RAPD. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 1111-1120, 2005.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 355, p. 274-276, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A.; WILLIAMS, G.K. Genetic Analysis with RAPD markers. In : **Join Plant Breeding Symposia Series. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, Minnesota, p. 3-8, 1992.

TOXOPEUS, H. Botany, types and populations. In: Wood, G.A.R. e LASS, R.A. (eds.) **Cocoa**. Longman, London, p. 11-37, 1985.

VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos, e processamento**. Belém: Ed. Governo do Estado do Pará, 1993. p. 108.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WARREN, J. M. Isozyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* L. obtained through various sampling regimes. **Euphytica**, v. 72, p. 121-126, 1994.

WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech**, v. 10, p. 186-191, 1992.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetic**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WELLENSIEK, S.J. The genetics of cotyledon-colour of cocoa as a basis for quality selection. **Archives of Cocoa Research**, v. 2, p. 245-261, 1931.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V.. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using random amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 871-877, 1992.

WILKINSON, M.J. The Application and Constraints of New Technologies in Plant Breeding. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p. 27-39, 2000.

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

YAMADA, M.M.; GURIES, R.P. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to Witches' broom in plantations of Bahia. **Agrotrópica**, v. 10, p. 165-176, 1998.

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

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

APÉNDICE

Tabela 10 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de *T. cacao* avaliados para característica altura do fuste (AF).

Tratamento	Nº de plantas	Altura do fuste (AF) (cm)			DP
		Média	Máximo	Mínimo	
AMAZ 15 X H 56	19	1,09	1,88	0,68	0,34
COCA 3370/5 X H56	20	1,11	1,81	0,69	0,32
COCA 3370/5 X SCA 24	20	1,10	1,60	0,67	0,28
COCA 3370/5 X ICS 95	19	1,20	2,15	0,55	0,40
GU 261 X H 56	20	1,31	2,44	0,73	0,47
GU 261 X LCT162	20	1,07	1,61	0,74	0,25
GU 261 X LCT 37 A	19	1,05	1,65	0,62	0,30
GU 261 X ICS 95	19	1,16	2,21	0,75	0,40
H 56 X SCA 24	17	1,08	1,74	0,62	0,31
H 56 X ICS 95	19	0,97	2,07	0,51	0,35
H 56 X IMC 47	19	1,41	2,35	0,54	0,38
ICS 95 X SCA 24	16	1,26	2,54	0,69	0,53
LCT 37 A X H56	19	1,20	1,77	0,56	0,42
LCT 37 A X IMC 47	20	1,43	2,90	0,67	0,51
LCT 37 A X SCA 24	20	1,30	1,97	0,68	0,27
LCT 162 /1010 X SCA 24	20	1,22	1,88	0,70	0,28
LCT 162 1010 X H 56	20	1,12	2,10	0,69	0,34
TSH 1188 X ICS 95	20	1,24	2,35	0,71	0,43
TSH 1188 X LCT 37 A	20	1,44	2,98	0,60	0,53
TSH 1188 X H 56	18	1,29	2,05	0,75	0,36
TSH 1188 X IMC 47	20	1,13	1,71	0,71	0,27
TSH 1188 X LCT 162/1010	20	1,15	1,76	0,40	0,36

Tabela 11 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de *T. cacao* avaliados para característica altura total (AT).

Tratamento	Nº de plantas	Altura total (AT) (cm)			DP
		Média	Máximo	Mínimo	
AMAZ 15 X H 56	19	1,77	2,30	0,90	0,31
COCA 3370/5 X H56	20	2,11	2,71	1,29	0,39
COCA 3370/5 X SCA 24	20	2,23	3,71	0,29	0,71
COCA 3370/5 X ICS 95	19	2,46	3,86	1,58	0,67
GU 261 X H 56	20	2,22	2,98	1,62	0,37
GU 261 X LCT162/1010	20	2,33	3,64	1,63	0,59
GU 261 X LCT 37 A	19	1,93	2,98	1,02	0,55
GU 261 X ICS 95	19	1,82	2,55	0,49	0,61
H 56 X SCA 24	17	1,88	2,35	1,21	0,34
H 56 X ICS 95	19	1,61	2,26	1,08	0,34
H 56 X IMC 47	19	2,16	2,79	1,74	0,33
ICS 95 X SCA 24	16	2,10	3,12	1,29	0,43
LCT 37 A X H56	19	1,75	2,56	1,15	0,40
LCT 37 A X IMC 47	20	2,42	3,60	1,72	0,51
LCT 162 /1010 X SCA 24	20	2,17	3,00	1,32	0,42
LCT 162 1010 X H 56	20	2,32	3,23	1,54	0,53
LCT 162 1010 X H 56	20	1,93	2,98	1,17	0,53
TSH 1188 X ICS 95	20	2,43	3,60	1,81	0,50
TSH 1188 X LCT 37 A	20	2,45	3,59	0,91	0,67
TSH 1188 X H 56	18	1,97	2,87	1,09	0,47
TSH 1188 X IMC 47	20	2,07	3,00	1,45	0,46
TSH 1188 X LCT 162/1010	20	2,46	3,00	1,54	0,38

Tabela 12 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir clones de *T. cacao* avaliados para característica largura da copa (LC).

Tratamento	Nº de plantas	Largura copa (LC) (cm)			DP
		Média	Máximo	Mínimo	
AMAZ 15 X H 56	19	0,88	1,87	0,23	0,41
COCA 3370/5 X H56	20	1,06	1,75	0,51	0,28
COCA 3370/5 X SCA 24	20	1,43	2,21	0,76	0,38
COCA 3370/5 X ICS 95	19	1,62	3,00	0,50	0,86
GU 261 X H 56	20	1,99	3,00	1,00	0,65
GU 261 X LCT162/1010	20	1,55	2,86	0,88	0,48
GU 261 X LCT 37 A	19	2,04	3,00	0,54	0,70
GU 261 X ICS 95	19	1,82	3,42	0,64	0,89
H 56 X SCA 24	17	1,18	2,54	0,34	0,68
H 56 X ICS 95	19	1,22	2,51	0,30	0,50
H 56 X IMC 47	19	1,42	2,78	0,52	0,55
ICS 95 X SCA 24	16	1,42	2,59	0,40	0,50
LCT 37 A X H56	19	0,97	1,51	0,22	0,39
LCT 37 A X IMC 47	20	1,65	2,87	0,86	0,62
LCT 37 A X SCA 24	20	1,84	2,87	0,98	0,49
LCT 162 /1010 X SCA 24	20	1,35	2,75	0,37	0,72
LCT 162 1010 X H 56	20	0,94	1,79	0,47	0,34
TSH 1188 X ICS 95	20	1,44	2,42	0,87	0,44
TSH 1188 X LCT 37 A	20	1,50	2,86	0,65	0,62
TSH 1188 X H 56	18	1,40	2,20	0,68	0,39
TSH 1188 X IMC 47	20	1,05	1,57	0,36	0,31
TSH 1188 X LCT 162/1010	20	1,50	2,97	0,34	0,62

Tabela 13 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de 20 clones de *T. cacao* avaliados para característica comprimento da copa (CC).

Tratamento	Nº de plantas	Comprimento da Copa (CC) (cm)			DP
		Média	Máximo	Mínimo	
AMAZ 15 X H 56	19	0,95	2,06	0,29	0,44
COCA 3370/5 X H56	20	1,07	2,01	0,63	0,32
COCA 3370/5 X SCA 24	20	1,40	2,18	0,75	0,43
COCA 3370/5 X ICS 95	19	1,36	2,99	0,43	0,80
GU 261 X H 56	20	1,89	3,00	0,89	0,64
GU 261 X LCT162/1010	20	1,73	3,00	0,84	0,66
GU 261 X LCT 37 A	19	2,24	3,20	1,33	0,59
GU 261 X ICS 95	19	1,59	3,31	0,62	0,89
H 56 X SCA 24	17	1,27	2,79	0,46	0,75
H 56 X ICS 95	19	1,22	2,15	0,46	0,51
H 56 X IMC 47	19	1,39	2,90	0,37	0,63
ICS 95 X SCA 24	16	1,61	3,18	0,77	0,78
LCT 37 A X H56	19	0,95	1,51	0,25	3,36
LCT 37 A X IMC 47	20	1,62	2,45	0,44	0,51
LCT 37 A X SCA 24	20	1,99	2,65	1,21	0,45
LCT 162 /1010 X SCA 24	20	1,43	3,00	0,46	0,68
LCT 162 1010 X H 56	20	0,99	2,00	0,28	0,51
TSH 1188 X ICS 95	20	1,59	2,75	0,69	0,51
TSH 1188 X LCT 37 A	20	1,59	3,20	0,48	0,65
TSH 1188 X H 56	18	1,41	2,33	0,59	0,42
TSH 1188 X IMC 47	20	1,20	1,98	0,39	0,43
TSH 1188 X LCT 162/1010	20	1,43	2,35	0,32	0,46

Tabela 14 - Média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido a partir de clones de *T. cacao* avaliados para característica circunferência do caule (DC).

Tratamento	Nº de plantas	Diâmetro do coleto (DC) (cm)			DP
		Média	Máximo	Mínimo	
AMAZ 15 X H 56	19	12,26	15,00	9,50	1,46
COCA 3370/5 X H56	20	17,65	21,70	14,30	2,56
COCA 3370/5 X SCA 24	20	16,24	21,50	8,60	3,54
COCA 3370/5 X ICS 95	19	18,53	24,00	13,50	3,20
GU 261 X H 56	20	18,36	22,30	16,10	1,76
GU 261 X LCT162/1010	20	17,80	23,40	13,40	2,89
GU 261 X LCT 37 A	19	18,66	25,20	14,00	3,50
GU 261 X ICS 95	19	15,97	19,80	10,00	2,79
H 56 X SCA 24	17	15,68	25,10	10,70	3,70
H 56 X ICS 95	19	13,68	18,50	7,50	2,79
H 56 X IMC 47	19	17,58	25,90	12,50	3,43
ICS 95 X SCA 24	16	16,70	20,40	11,30	2,82
LCT 37 A X H56	19	14,05	20,50	8,10	6,05
LCT 37 A X IMC 47	20	17,53	23,40	12,50	3,13
LCT 37 A X SCA 24	20	17,30	22,50	12,10	2,86
LCT 162 /1010 X SCA 24	20	14,27	16,00	11,00	1,34
LCT 162 1010 X H 56	20	12,72	15,90	9,80	1,27
TSH 1188 X ICS 95	20	17,92	24,00	10,30	3,54
TSH 1188 X LCT 37 A	20	19,95	26,70	12,20	3,97
TSH 1188 X H 56	18	17,46	22,40	11,10	3,38
TSH 1188 X IMC 47	20	15,19	24,60	8,50	3,70
TSH 1188 X LCT 162/1010	20	18,76	25,10	12,30	3,06

Tabela 15 - Distâncias genéticas obtidos com os marcadores RAPD e microssatélites (SSR) e médias para as cinco variáveis fenotípicas analisadas.

Tratamento	DISTANCIAS		MÉDIAS				
	SSR	RAPD	AF	AT	LC	CC	DC
TSH 1188 X LCT 37 A	0.6325	0.9326	1,24	2,43	1,44	1,59	17,92
TSH 1188 X LCT 162/1010	0.6831	0.9273	1,15	2,46	1,50	1,43	18,76
TSH 1188 X IMC 47	0.6831	0.0925	1,13	2,07	1,05	1,20	15,19
TSH 1188 X ICS 95	0.6030	0.9244	1,24	2,43	1,44	1,59	17,92
TSH 1188 X H 56	0.7188	0.9326	1,29	1,97	1,40	1,41	17,46
LCT 37 A X SCA 24	0.7416	*	1,30	2,17	1,84	1,99	17,30
LCT 37 A X IMC 47	0.7071	0.9265	1,43	2,42	1,65	1,62	17,53
LCT 37 A X H56	0.7853	0.9302	1,20	1,75	0,97	0,95	14,05
LCT 162 1010 X H 56	0.8165	0.9244	1,12	1,93	0,94	0,99	12,72
LCT 162 /1010 X SCA 24	0.8466	*	1,24	1,91	3,14	1,37	14,69
ICS 95 X SCA 24	0.8919	*	1,26	2,10	1,42	1,61	16,70
H 56 X SCA 24	0.8466	*	1,08	1,88	1,18	1,27	15,68
H 56 X IMC 47	0.8266	0.9261	1,41	2,16	1,42	1,39	17,58
H 56 X ICS 95	0.8118	0.9333	0,97	1,61	1,22	1,22	13,68
GU 261 X LCT 37 A	0.8036	0.9250	1,05	1,93	2,04	2,24	18,66
GU 261 X LCT 162/1010	0.8660	0.9231	1,07	2,33	1,55	1,73	17,80
GU 261 X H 56	0.7906	0.9289	1,45	1,72	6,61	1,24	11,59
GU 261 X ICS 95	0.7977	0.9286	1,16	1,82	1,82	1,59	15,97
COCA 3370/5 X SCA 24	0.7500	*	1,10	2,23	1,43	1,40	16,24
COCA 3370/5 X ICS 95	0.6892	0.9296	1,20	2,46	1,62	1,36	18,53
COCA 3370/5 X H56	0.8416	0.9250	1,11	2,11	1,06	1,07	17,65
AMAZ 15 X H 56	0.8165	0.9295	1,09	1,77	0,88	0,95	12,26