

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC**

**ELINE MATOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, RESISTÊNCIA À VASSOURA-  
DE-BRUXA E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CACAUEIROS EM ITAGIBÁ, BA**

**ILHÉUS – BAHIA  
2007**

**ELINE MATOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, RESISTÊNCIA À VASSOURA-  
DE-BRUXA E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CACAUZEIROS EM ITAGIBÁ, BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Profa. Norma Eliane Pereira

**ILHÉUS – BAHIA  
2007**

**ELINE MATOS LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, RESISTÊNCIA À VASSOURA-  
DE-BRUXA E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE  
CACAUEIROS EM ITAGIBÁ, BA**

Ilhéus-BA, 12/01/2007

---

Norma Eliane Pereira - DS  
UESC/DCAA  
(Orientadora)

---

Ronan Xavier Corrêa - DS  
UESC/DCB

---

José Luis Pires – DS  
CEPLAC/CEPEC

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai Edílson Oliveira Lima, à minha mãe Rosane Maria Brito Matos, aos meus irmãos Lino Matos Lima e Lucas Matos Lima, dedico.

## AGRADECIMENTO

A DEUS.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela oportunidade concedida para que eu pudesse realizar esse curso.

À CAPES, pela concessão da minha bolsa de estudo.

À FAPESB, pelo financiamento dos experimentos laboratoriais.

Ao Proprietário da Fazenda Oceania, Sr. José Mendonça, pelo consentimento de coleta dos dados, e aos funcionários desta empresa, em especial a Francisco Barbosa, pelo trabalho de apoio no campo, e ao Professor José Olímpio Júnior por ter nos apresentado essa oportunidade de pesquisa.

Ao Engenheiro Agrônomo Frank Lima Pires e à Bióloga Jeiza Botelho Leal, pela colaboração na execução deste trabalho e troca de experiências.

Aos mestrandos do curso de Produção Vegetal, pela convivência e troca de ensinamentos que conseguiram até amenizar as horas menos favoráveis.

À equipe do Laboratório Genética e Biologia molecular, pela ajuda durante a obtenção dos dados moleculares.

À Profa. Dra. Norma Eliane Pereira, pela orientação e pelo apoio, e aos meus co-orientadores Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dra. Antônia Marlene Magalhães Barbosa, pela orientação, generosidade, ensinamentos e incentivo durante o curso.

Ao Dr. José Luis Pires, pelo auxílio e pelas sugestões apresentadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelos ensinamentos.

Ao meu namorado Almir, pelo imprescindível apoio e a todos os amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Aspectos botânicos e econômicos do cacauero .....	4
2.2 O cultivo de cacau no Brasil.....	5
2.3 Etiologia e controle da vassoura-de-bruxa.....	7
2.4 Recuperação da lavoura cacauera baiana.....	11
2.5 Marcadores microssatélites e diversidade genética.....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Material genético vegetal e condições de cultivo.....	18
3.2 Extração e amplificação do DNA.....	19
3.3 Análises genético-estatísticas.....	22
3.4 Comparação de médias fenotípicas.....	24
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1 Extração e amplificação do DNA.....	25
4.2 Níveis de polimorfismos obtidos com SSR.....	27
4.3 Distâncias genéticas obtidas com o marcador SSR.....	31
4.4 Análises de agrupamento.....	32
4.5 Análise dos dados fenotípicos.....	35
4.6 Seleção de plantas quanto à produção, resistência e preservação da diversidade genética.....	38
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>APÊNDICE</b> .....	51

## CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA E DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR DE CACAUEIROS EM ITAGIBÁ, BA

### RESUMO

A vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthota perniciosa*, é a doença mais importante da cacauicultura no sul da Bahia. Sua principal forma de controle é o emprego de variedades resistentes. Neste estudo, objetivou-se analisar a diversidade genética de 32 plantas de *Theobroma cacao*, selecionadas na Fazenda Oceania (FO), em Itagibá, BA, com base em marcadores microssatélites (SSR), e caracterizá-las quanto à resistência à VB e produção. Para a análise da diversidade, foram utilizados 13 *primers* SSR para amplificar amostras de DNA das plantas selecionadas e nove acessos do banco de germoplasma. Cálculos de distâncias genéticas, níveis de heterozigose e análises de agrupamento foram realizados. Foram realizadas avaliações dos dados fenotípicos das 32 plantas que são: número de frutos (NFRUTOS), produção (PROD), vassoura no total (VT), vassoura vegetativa (VV), vassoura na almofada (VA) e porcentagem de vassoura no fruto (PORCVF). Foi observada alta variabilidade genética entre as plantas estudadas, resultando em um elevado número de alelos por *loco*, um baixo nível de heterozigidade e existência de ampla divergência entre as plantas. As distâncias genéticas entre os acessos analisados variaram entre 0,25 e 1, indicando a alta variabilidade genética. Com base na análise de agrupamento, as plantas foram alocadas em dois grandes grupos os da FO e as testemunhas. Dentro do grupo formado por materiais da FO foram formados 11 grupos, sendo dois grandes grupos e nove grupos individuais. Para os 32 materiais analisados houve diferença significativa entre tratamentos para os caracteres NFRUTOS, PROD, VT, VV, VA, e para o caráter PORCVF não houve diferença significativa. Foram selecionadas oito plantas dentro dos agrupamentos formados através da classificação das mais produtivas e resistentes em cada grupo escolhido. O material selecionado será parte de uma coleção nuclear que poderá integrar futuros programas de melhoramento do cacauero ou serem recomendadas para avaliações como clones.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, marcadores microssatélites, seleção em fazendas, melhoramento genético.



## CHARACTERIZATION OF THE PRODUCTION, RESISTANCE TO THE WITCHES' BROOM AND MOLECULAR GENETIC DIVERSITY OF COCOA TREES IN ITAGIBÁ, BA

### ABSTRACT

The witches' broom (VB), caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa* is the most important disease of the cocoa in the south of Bahia. The main method control of this disease is the use of resistant cultivars. The aim of present research was to study the genetic diversity of 32 plants of *Theobroma cacao*, selected in Farmer Oceania (FO), in Itagibá, Bahia, based in markers microsatellites (SSR), and to characterize them to the resistance to the VB and production. For the analysis of the diversity, 13 *primers* SSR were used to amplify samples of DNA of the selected plants and nine accesses of the germoplasm bank. Genetic distances, heterozigose levels and grouping analyses were accomplished. Evaluations of the were accomplished to compare the means of the phenotypic characters of the 32 plants evaluated were: number of fruits (NFRUTOS), production (PROD), broom total (VT), vegetative broom (VV), broom cushion (VA) and broom percentage in the fruit (PORCVF). High genetic variability was observed between the studied plants, resulting in a high number of alleles for loco, a low heterozygosis level and divergence existence between the plants. The genetic distances between the analyzed accesses varied of 0,25 to 1, indicating the high genetic variability. Using the grouping analysis, the plants were allocated in two larges groups: FO and the witness. Within of the group formed by materials of Farm Oceania 11 groups were formed, being two larges groups and nine groups with one plant. For the 32 analyzed materials there was significant difference among treatments for the characters NFRUTOS, PROD, VT, VV, VA, and no significant difference were observed for the character PORCVF. Eight plants were selected within the groups formed through the classification of the most productive and resistant in each chosen group. The selected material will be part of a nuclear collection that can integrate futures improvements programs of the cocoa tree or they will be recommended for evaluations as clones.

Key words: *Theobroma cacao*, microsatellites markers, farm selections, breeding.

## 1 INTRODUÇÃO

A região cacaeira da Bahia, depois de 15 anos de convivência com a doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), vem aos poucos se recuperando por meio do plantio de variedades clonais resistentes. Em toda a região, foram identificadas e selecionadas plantas resistentes ao ataque da doença, tanto por agricultores como pesquisadores, e acredita-se que muitas delas sejam derivadas do clone Scavina 6 (Sca 6). Paralelamente, o programa de melhoramento do cacaeiro na região vem buscando fontes de resistência diferentes de Scavina, como forma de incluir fatores de resistência distintos dos até então encontrados, para dificultar a evolução do patógeno e conseqüentes danos.

O sul da Bahia é a principal região produtora de cacau do Brasil, onde praticamente 100 municípios possuíam suas economias baseadas no cacau, que chegou a ser cultivado em 29 mil propriedades, em área superior a 700 mil hectares (SOUZA; DIAS, 2001). Essa espécie (*Theobroma cacao* L.) é suscetível a diversas doenças, sendo que, no Brasil, notadamente na região sul da Bahia, a podridão-parda, causada por *Phytophthora* spp., juntamente com a vassoura-de-bruxa, se constituem nos principais problemas fitopatológicos do cacaeiro (PEREIRA et al., 1991).

As quedas de produção ao longo dos anos têm sido atribuídas às crises

econômicas, características fisiológicas associadas ao potencial produtivo da planta e a fatores climáticos, principalmente períodos de estiagem e, ou, excessos de chuva, esses excessos, via de regra, levam à elevada incidência da doença podridão-parda (CAZORLA et al., 1993). As perdas de produção decorrente da podridão-parda variam a cada ano. Entretanto, o surgimento da vassoura-de-bruxa na região causou perdas de até 100% da produção em algumas propriedades rurais. Por causa da severidade da doença o Brasil teve sua produção anual reduzida, diminuindo sua participação no mercado internacional. Em consequência disto, o produtor de cacau derrubou árvores remanescentes de Mata Atlântica usadas para sombrear o cacau e utilizou a madeira como fonte de renda. Algumas das áreas foram substituídas por plantações de café, fruteiras e pastagens.

Várias formas de controle da vassoura-de-bruxa têm sido utilizadas como o manejo integrado, que consiste num conjunto de práticas culturais, tratos fitossanitários, controle biológico, controle químico e utilização de variedades melhoradas para reduzir a incidência da vassoura-de-bruxa, aumentar a produtividade e recuperar a lavoura do cacau. As variedades melhoradas de alta produtividade, desenvolvidas em programas de melhoramento genético do cacauero têm sido clonadas, reduzindo assim potencialmente a fonte de inóculo, sendo acessível a pequenos, médios e grandes produtores (PINTO; PIRES, 1998).

Após a introdução da vassoura-de-bruxa na Bahia, o Centro de Pesquisas do Cacau da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPEC/CEPLAC) re-orientou o seu programa de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares resistentes, e passou a enfatizar métodos de seleção recorrente, visando acumular genes de resistência e de outros caracteres de interesse agrônomo em um material para posteriormente disponibilizá-lo como clone (PEREIRA, 2001).

A partir de 1995, com base na avaliação da resistência de vários acessos de cacauero, de diferentes origens, o CEPEC passou a recomendar clones selecionados de cruzamentos envolvendo os acessos IMC 67, ICS 1 e Sca 6, codificados como TSA, TSH, CEPEC e EET.

Marcadores moleculares baseados no reconhecimento de polimorfismos por enzimas de restrição como RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), bem como em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e SSR (*Simple sequence repeats*) ou microssatélites são bastante úteis em estudos de diversidade genética de acessos de cacauero. Os marcadores microssatélites se consistem de seqüências de nucleotídeos de pequeno comprimento, repetidas em *tandem*. Tendo em vista a expressão de co-dominância e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de polimorfismo. Os SSR são muito freqüentes, permitindo ampla cobertura de qualquer genoma eucariótico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os materiais selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa em plantações comerciais por extensionistas e por produtores têm apresentado boas características de resistência e produção, merecendo atenção especial dos pesquisadores. Trinta e duas plantas, assim selecionadas, na Fazenda Oceania, foram analisadas quanto à produção e à resistência a vassoura-de-bruxa, em condições de campo e genotipadas com marcadores microssatélites, na UESC, visando o refinamento da seleção para a obtenção de um conjunto de plantas com grande potencial para produção e resistência, preservando a diversidade genética. Isto com o propósito final de indicar o conjunto re-selecionado para a utilização em programas de melhoramento e avaliação para plantio de clones.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos botânicos e econômicos do cacauero

O cacauero (*Theobroma cacao* L.), descrito por Lineu em 1737, pertence à ordem malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma* (SOUNIGO et al., 2003). É nativo da floresta tropical úmida americana, com principal origem nas nascentes dos rios Amazonas e Orinoco (GRAMACHO et al., 1992).

Há aproximadamente 2000 anos atrás, frutos de cacau foram levados da América do Sul para a América Central e, mediante o cultivo e processo evolutivo, se formou um novo grupo de cacau, o cacau Crioulo da América Central (YOUNG, 1994). Outro grupo, o cacau Forasteiro evoluiu na região Amazônica. Hoje é encontrado, em seu estado silvestre, do Peru até o México. Dispersou-se para o lado leste ao longo do rio Amazonas, dando origem ao tipo denominado Forasteiro ou Amelonado e para o norte e oeste, cruzando os Andes, e avançando pela América Central até o sul do México, dando origem ao tipo Crioulo (BASTOS, 1987). Cheesman (1944) reconhece apenas estes dois grupos principais de cacaueros: os Forasteiros e os Crioulos, que se subdividem conforme a origem geográfica. Assim, têm-se os Crioulos da América Central e da América do Sul, e os Forasteiros do Alto e do Baixo Amazonas. Os Trinitários representam uma categoria à parte e são considerados híbridos naturais entre os cacaueros dos grupos Crioulos e

Forasteiros Amazônicos, apresentando portanto, características intermediárias.

Os astecas, no México, os maias, na América Central, e outros povos da Bacia Amazônica cultivavam o cacau antes dos colonizadores espanhóis. Entre os astecas, o cacauzeiro chamado “cacaualt”, era tido como sagrado, de origem divina, uma planta nobre, de grande beleza decorativa e seu cultivo acompanhado de solenes liturgias. A planta chega a atingir 20 metros de altura em condições silvestres, mas em condições de cultivo normalmente atingem altura ao redor de 4 metros (LORENZI; MATOS, 2002).

Trata-se de uma espécie diplóide, com 20 cromossomos em suas células somáticas ( $2n = 20$ ) e um genoma haplóide de dimensões em torno de 0,43 picogramas de DNA. Requer a presença de agentes polinizadores, normalmente moscas *Forcipomya*. Possui ampla variabilidade genética para a maioria dos caracteres, especialmente para o tamanho, forma e cor dos frutos e das sementes. A forma dos frutos pode variar de arredondada a alongada, e há amplas variações no comprimento e no peso. As cores das sementes variam desde brancas a roxas, conforme a intensidade de antocianina (NETTANCOURT, 2000).

## **2.2 O cultivo de cacau no Brasil**

Das 22 espécies que compõem o gênero *Theobroma* apenas o cacau e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) são explorados comercialmente no Brasil. Oficialmente o cultivo do cacau no Brasil começou em 1679, através da Carta Régia que autorizava os colonizadores a plantá-lo em suas terras. Em 1746, o cacauzeiro foi introduzido na Bahia, com sementes provenientes do Pará, pelo francês Luiz

Frederico Warneau e plantadas por Annio Dias Ribeiro na Fazenda Cubículo, à margem direita do Rio Pardo, no atual município de Canavieiras, como planta ornamental (BASTOS, 1987).

Com a expansão da lavoura cacaeira, na Bahia, esta chegou a ser cultivada em 29 mil propriedades rurais, em uma área superior a 700 mil hectares, distribuídos em 106 municípios (SOUZA; DIAS, 2001).

De acordo com CNPC (2001) o cacau no Brasil é importante fonte de divisas agrícolas nos estados de Rondônia, Amazonas, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo e Bahia, sendo esse último o responsável pela maior produção do país. Para o Brasil o cacau é uma importante fonte de receitas públicas, renda e emprego, movimentando, em amêndoas e derivados, cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais.

As exportações brasileiras tiveram o auge em 1979 quando foram exportadas US\$ 922 milhões. No ano de 2000 as exportações chegaram ao menor valor das últimas décadas, US\$ 161 milhões. A partir daí iniciou-se uma recuperação, e em 2004 a exportação de cacau somou US\$ 317 milhões. A produtividade dos cacauais na Bahia foi muito próxima à média nacional, apesar da produtividade nacional ter estado acima da produtividade baiana. Isto pode ser explicado pela doença vassoura-de-bruxa que atacou de forma impiedosa os cacauais baianos. Enquanto a produtividade brasileira se encontra em 19 arrobas/hectare, a produtividade baiana se encontra em 15 arrobas/hectare em 2004 (IBGE, 2004). A participação brasileira na produção mundial vem caindo, apesar de já ter iniciado um processo de recuperação na sua produção, quando obteve em 2003/04: 163,8 mil toneladas, e participação na produção mundial de 4,75%. Atualmente, cerca de 70% da produção mundial provém dos cinco maiores países produtores de cacau: Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Brasil. Os principais países consumidores de cacau são

os Estados Unidos, com 689 mil toneladas, seguidos pela Alemanha, França e Reino Unido. O Brasil consome 98 mil toneladas de cacau por ano (ICCO, 2004).

### 2.3 Etiologia e controle da vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa, inicialmente, teve o seu agente etiológico descrito por Stahel, em 1915, como *Marasmius perniciosus*. Mais tarde, no ano de 1942, Singer reclassificou esse patógeno como pertencente ao gênero *Crinipellis*, sendo que, por ocasião da revisão da sua sistemática, esse fungo passou a ser identificado como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Recentemente, Aime e Phillips-Mora (2005), sugeriram que este seja re-classificado como *Moniliophthora perniciosa* a partir de análises filogenéticas do agente causal da vassoura-de-bruxa e do fungo *Moniliophthora roreri*. Esse fungo é um basidiomiceto, hemibiotrófico, da ordem Agaricales e família Tricholomataceae (PEGLER, 1978).

O centro de origem do *M. perniciosa* é a planície Amazônica. A espécie é subdividida em quatro biótipos de acordo com o hospedeiro que ataca: 1) biótipo-C que infecta predominantemente *Theobroma* spp. e *Herrania* spp.; 2) biótipo-S que infecta as espécies da família Solanaceae; 3) biótipo-L que é predominantemente saprofítico e coloniza diversos substratos; e 4) biótipo-B que infecta *Bixa orellana* (BASTOS; EVANS, 1985). O biótipo-C (patogênico para o cacau) é hemibiotrófico, ou seja, se desenvolve durante a primeira fase do ciclo de vida em tecido vivo (fase biotrófica) e na segunda fase em tecido morto (fase necrotrófica) (LUZ et al., 1997).

O fungo *M. perniciosa* diferencia-se em dois grupos de patótipos: o grupo A, com os isolados do Equador, Colômbia e Bolívia; e o grupo B, com os isolados do



Brasil, Venezuela e Trinidad (WHEELER; MEPSTED, 1988). Após o primeiro registro da doença no Suriname, em 1895, ela foi reportada na Guiana Inglesa em 1906, na Colômbia em 1917 e no Equador em 1918 (HOLLIDAY, 1952). Stahel, em 1920, encontrou a enfermidade no rio Cutari nas fronteiras com o Brasil, Guiana Inglesa e o Suriname. Na mesma expedição este pesquisador detectou a doença na região do rio Amazonas, na Amazônia brasileira.

No ano de 1989, a vassoura-de-bruxa foi detectada pela primeira vez na região cacauera baiana (PEREIRA et al., 1991) e, apesar das medidas de erradicação executadas em 12 hectares, no município de Uruçuca, novos focos foram descobertos no mesmo ano, no município de Camacan. Desta forma, a doença instalou-se nos dois maiores agrossistemas cacaueros do sul da Bahia: o do Almada e o de Camacan (SILVA et al., 2002). Com base na distribuição geográfica dos isolados, sugere-se que duas introduções distintas ocorreram na região cacauera da Bahia, verificando-se uma tendência de regionalização (MELO, 2000). Doze anos após, em fevereiro de 2001, a doença foi constatada em duas fazendas no Espírito Santo, no município de Linhares.

Os danos severos causados pela doença aliados aos baixos preços do cacau no mercado internacional, à baixa produtividade das lavouras e aos fatores climáticos adversos, desencadearam um processo de empobrecimento da região, provocado pela redução de até 100% na produção de cacau em diversas propriedades rurais. Esta doença é considerada um dos principais e dos mais sérios problemas que atingem o cacauero, podendo ocasionar grandes perdas na produção de cacau (RUDGARD et al., 1993).

Os basidiósporos, únicos propágulos comprovadamente infectivos de *M. perniciosa*, têm habilidade para invadir e infectar principalmente os tecidos meristemáticos de qualquer parte da planta (SILVA et al., 2002).

De acordo com Evans (1981), os sintomas variam dependendo da cultivar, do tipo de tecido envolvido e do seu estágio de desenvolvimento. A infecção na almofada floral pode se dar por meio da flor, que necrosada, permanece aderida à almofada, ou pelo ovário fecundado.

As almofadas florais, quando infectadas, podem produzir brotos vegetativos, sendo chamadas vassouras vegetativas de almofadas florais; flores anormais e ou frutos partenocárpicos abortivos (“morangos” e “cenouras”). Em alguns casos, vassouras compostas podem apresentar todas estas características em ramos, a penetração do fungo ocorre na base da gema ou por um nó ou entrenó em crescimento. O fungo estimula a formação de um broto hipertrofiado ortotrópico (vassoura terminal) ou plagiotrópico (vassoura axilar). Em alguns casos, a resposta do tecido à infecção é severa e resulta na morte da gema terminal (LUZ et al., 1997).

Nos frutos desenvolvidos, com no mínimo 8 cm de comprimento, a vassoura apresenta, externamente, uma lesão negra, dura e irregular (SILVA et al., 2002).

Os basidiósporos são liberados à noite ou nas primeiras horas da manhã, e disseminados pela chuva, dentro da copa da planta ou para plantas vizinhas; ou pelo vento, a distâncias que podem cobrir até 300 metros, sendo, as infecções mais freqüentes nos 100 metros de distância da fonte (BAKER et al., 1941). Este ciclo ocorre uma vez por ano na Amazônia, mas na Bahia pode ocorrer até duas vezes por ano: uma na safra temporã (1º semestre) e outro na safra principal (2º semestre). Medidas quarentenárias são primordiais para o controle desta e de outras

enfermidades do cacaveiro, pois os primeiros sintomas de infecção da vassoura-de-bruxa podem ser expressos de 20 a 30 dias após a penetração (LUZ et al., 1997).

A alternância de chuvas com dias de sol, noites com temperaturas entre 15 e 24°C e umidade relativa do ar alta, acima de 90%, são condições altamente favoráveis ao patógeno (LUZ et al., 1997). A sobrevivência do patógeno ocorre durante sua fase saprofítica, sendo as vassouras secas e os frutos mumificados as principais fontes de inóculo primário que dão início aos surtos epidêmicos. Na Bahia, vassouras penduradas na copa de cacaveiros no campo mantiveram-se produtivas durante 27 meses, enquanto frutos secos, deixados na serrapilheira que cobre o solo, dentro das plantações esporularam em média por 86 semanas (21,5 meses) (LUZ et al., 1994).

Esta enfermidade é considerada, atualmente, o principal problema para a expansão e manutenção da cultura de cacau no sul da Bahia. Afeta a planta inteira desequilibrando sua fisiologia, e reduzindo a sua produção. Após esta epidemia, a lavoura cacaveira, encontra-se em situação dramática em função da severidade e do alastramento progressivo, baixa produtividade do cultivo, preços baixos do produto, desvalorização das propriedades e descapitalização dos produtores. Os danos provocados são significativos, levando muitos produtores a abandonarem suas lavouras e, conseqüentemente, afetando a situação sócio-econômica da região (RAM, 1993).

As quatro principais estratégias adotadas para o manejo da vassoura-de-bruxa são: práticas fitossanitárias, controle químico, uso de genótipos resistentes e de agentes de biocontrole, para reduzir a incidência da vassoura-de-bruxa, aumentar a produtividade e recuperar a lavoura cacaveira (WHEELER; SUÁREZ, 1993). O

sucesso do manejo integrado depende da realização dessas estratégias de maneira correta e na época adequada (RAM, 1993).

#### **2.4 Recuperação da lavoura cacaueteira baiana**

Os principais problemas agrônômicos passíveis de solução na cultura do cacau, via melhoramento genético são: auto-incompatibilidade, aspectos qualitativos relacionados com a amêndoa de cacau, tamanho de frutos, uniformidade das árvores, produtividade e resistência às pragas e doenças. Com relação às doenças, para conter o avanço da vassoura-de-bruxa, o emprego de variedades resistentes e de alta produtividade tem sido a opção adequada. Essa medida de controle se justifica pelo fato de que o controle químico e cultural são ineficazes quando não são executados rigorosamente de acordo com as recomendações técnicas da pesquisa, e antieconômicos em se tratando de lavouras formadas por variedades de alta susceptibilidade e com baixa produtividade (PINTO; PIRES, 1998).

Pound em 1942/43 em busca de materiais resistentes à doença vassoura-de-bruxa coletou borbulhas de plantas de cacaueteiros no Vale Amazônico Peruano e nas margens do Rio Napo. Deste trabalho, duas plantas de uma mesma família se destacaram por apresentarem consistentemente livres de infecção. Esta família foi designada SCA ou "Scavina" e as duas plantas selecionadas foram denominadas de SCA 6 e SCA 12 (BAKER; HOLLIDAY, 1957).

O Centro de Pesquisas do Cacau, utilizando-se do clone Sca 6 distribuiu a variedade seminal Theobahia (Sca 6 x ICS 1), a partir de 1995, e cinco variedades clonais (TSH 516, TSH 565, TSH 1188, CEPEC 42 e EET 397), a partir de 1997, para a modernização da lavoura através da enxertia. Este clone tinha sido incluído

nas combinações híbridas distribuídas pela CEPLAC, notadamente nas décadas de 60 e 70. O clone Sca 6 possui porte, frutos e sementes pequenos, esgalhamento tendente para baixo, apresentando, em cruzamento, boa capacidade geral de combinação para o caráter número de frutos por planta. Em relação a outros caracteres relacionados com produção, exceto em alguns casos, sua influência nos cruzamentos é negativa gerando plantas com frutos e sementes pequenos (PINTO; PIRES, 1998).

A origem destes clones recomendados envolve também trabalhos de seleção que foram iniciados em Trinidad, na década de 30, tendo como base áreas de cultivo de Crioulos e Trinitários. Estes procedimentos resultaram na série ICS, proveniente de Trinidad, sendo os melhores clones multiplicados por enraizamento de estacas e distribuídos aos agricultores. Alguns destes genótipos foram cruzados com clones resistentes à vassoura-de-bruxa: Sca 6 e Sca 12, e a seleção dentro das progênie deu origem à série TSH (Sca X clones Amazônicos geraram, ainda, a série TSA) (BARTLEY, 1994).

Clones descendentes dos Scavina em primeira, segunda ou terceira geração continuam a serem recomendados para substituir plantas suscetíveis à vassoura-de-bruxa, por haverem se destacado nos ensaios regionais conduzidos pelo CEPEC (PIRES et al., 1999).

Os primeiros trabalhos dirigidos ao melhoramento da espécie, na Bahia, tiveram início na década de 1940, sob a condução do Instituto de Cacau da Bahia, na Estação Experimental de Uruçuca, com a seleção de plantas individuais dentro da população de cacaueiros comuns da Bahia. Esta seleção feita em fazendas, com base na avaliação da produção, deu origem às seleções da série SIC (Seleção Instituto do Cacau) (DIAS, 2001). Foram identificadas algumas plantas de semente

branca e folhas tenras em cacauzeiros da variedade Comum denominados Catongo, nome da fazenda onde foram identificados, na antiga localidade de Pirangi, hoje município de Itajuípe-BA (BONDAR, 1958).

Nas fazendas de cacau durante, aproximadamente, dois séculos foram cultivadas e multiplicadas as plantas pelos produtores locais, que ao longo desses anos selecionaram de forma massal suas variedades comuns, constituídas das conhecidas variedades Comum, Pará, Parazinho e Maranhão. Na década de 1950, foi realizado nas Estações Experimentais de Jussari (Jussari, BA) e Goitacazes (Linhares, ES), seleções que deram origem às séries SIAL (Estação Instituto Agrônomo do Leste) e EEG (Estação Experimental de Goitacazes) (NETTANCOURT, 2000). Como representantes do tipo Forasteiro Alto Amazonas podem ser citadas as séries P, IMC, Na, e PA do Peru e as séries EET e Sca do Equador, dentre outras. Os clones das séries SIC e SIAL, autênticos representantes das variedades Comum, Maranhão, Pará e Parazinho, cultivadas na Bahia, foram selecionados pelo do Instituto de Cacau da Bahia e pelo Instituto Agrônomo do Leste nas décadas de 1930 e 50, respectivamente (PEREIRA et al., 1987).

Já a CEPLAC usou variedades competitivas e agronomicamente superiores, introduzidas de outros países, principalmente de Trinidad e da Costa Rica, para serem utilizados diretamente como cultivares ou em cruzamentos, especialmente com as seleções locais, dando início ao programa de desenvolvimento de cultivares híbridas buscando variedades com boas características de qualidade, produção e resistência (PEREIRA, 2001).

Atualmente um amplo conjunto de novas fontes de resistência foi identificado incluindo: os clones das séries Cruzeiro do Sul e RB, originárias do Acre; o clone Ma, do Amazonas; os clones CCN, do Equador. Pelas análises de distâncias

genéticas entre estas fontes, avaliadas em nível de DNA, vêm sendo efetuados cruzamentos visando à associação de genes de resistência.

Hoje, para os agricultores baianos, por meio do Instituto Biofábrica de Cacau (Organização social vinculada ao Governo da Bahia), está sendo disponibilizado material genético de cacau tolerante à vassoura-de-bruxa e de alta produtividade, tendo como finalidade básica o apoio complementar ao programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira Baiana. Alguns destes materiais são: TSH 516, 565, 774, 1188; TSA 654, 656, 792; CCN 51; EET 397; CEPEC 42, 2001, 2002, 2003; LCTEEN 37 A; SJ 02.

## **2.5 Marcadores microssatélites e diversidade genética**

Os microssatélites são abundantes nos genomas vegetais, altamente polimórficos, co-dominantes e não sofrem influência ambiental, revelando diretamente o polimorfismo das seqüências de DNA. Esses marcadores podem ser empregados na caracterização do germoplasma, identificação dos acessos duplicados ou relacionados, identificação de regiões geográficas de maior diversidade, identificação de cultivares e escolha de cruzamentos mais adequados ao programa de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

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

Os marcadores microssatélites são também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) e constituem uma subclasse de DNA repetitivo formado por pequenas seqüências (dois a cinco nucleotídeos) em *tandem*, sendo as seqüências de pares de bases mais repetidas AT e CA. A variação alélica em locos microssatélites pode ser facilmente detectada por PCR usando *primers* flanqueadores específicos, tendo assim uma distribuição dos locos por todo o genoma (HANCOCK, 2000).

Um problema fundamental inerente ao desenvolvimento de marcadores microssatélites é o grande volume de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos microssatélites de cada espécie. Foram desenvolvidas técnicas de enriquecimento de bibliotecas genômicas para microssatélites, por meio do aproveitamento de *primers* que foram desenvolvidos para uma espécie e o emprego destes para espécies do mesmo gênero (PATERSON, 1998). Portanto, a transferência de informações de locos comuns entre espécies proximalmente selecionadas torna possível otimizar *primers* específicos de uma espécie para outras relacionadas.

É de fundamental importância em um programa de melhoramento que se realize uma seleção precisa de materiais promissores, com um menor gasto de tempo para a seleção. Em culturas perenes, como o cacaueteiro, o tempo necessário para se completar um ciclo de seleção é o principal entrave dos programas de melhoramento (PEREIRA; MONTEIRO, 1997). Para suprir estas limitações, muitos marcadores moleculares vêm sendo desenvolvidos e, especificamente os marcadores microssatélites são considerados uma importante ferramenta em estudos genéticos de plantas.



Na espécie *Theobroma cacao* L., os marcadores microssatélites têm sido empregados para: entender sua origem e domesticação; elaborar mapas genéticos (LANAUD et al., 1999; RISTERUCCI et al., 2000) e caracterizar mais acuradamente a diversidade dessa espécie (MOTAMAYOR et al., 2001). Avaliações com marcadores moleculares têm demonstrado que cacaueiros do tipo dos Forasteiros Alto Amazônicos, Forasteiros Baixo Amazônicos, Trinitários e Crioulos apresentam diferenças. Vários estudos mostram ser possível separar Crioulos e Forasteiros por análises de isoenzimas e de marcadores moleculares, mas a grande heterogeneidade dentro dos grupos e o grande número de híbridos existentes limitam a separação destes materiais (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001).

Marcadores microssatélites permitem analisar a diversidade genética, heterozigosidade, e a formação de agrupamentos em populações estudadas. A diversidade genética tem sido referida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e o nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população (NEI, 1973), que pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do equilíbrio independente de efeitos de migração, seleção, mutação, ou sistema reprodutivo. WEIR (1996) concorda que a heterozigosidade é uma medida adequada para quantificar a variação, porém também considera a frequência de heterozigotos como um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes.

A análise de agrupamento é uma técnica multivariada amplamente utilizada para diversos fins em ciência, como para estudar a diversidade genética entre as espécies. Tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, as unidades amostrais em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Vários são os tipos de técnicas de agrupamento

encontradas na literatura, dos quais o pesquisador tem de decidir qual o mais adequado ao seu propósito (CRUZ e REGAZZI, 1994; CORRÊA et al., 1999; FALEIRO, 2001b).

Estudos realizados com marcadores SSR vêm evidenciando informações sobre a diversidade e caracterização da espécie *Theobroma cacao*. Lanaud et al. (1999) desenvolveu *primers* SSR específicos para cacau, sendo estes bastante polimórficos. Risterucci et al. (2000) estudaram a construção de mapas de ligação de cacau. Faleiro (2003) estudaram a diversidade de acessos de cacauzeiros da Amazônia Brasileira, Equatoriana e Peruana baseada em marcadores RAPD e microssatélites a fim de estabelecer informações gerada por cada tipo de marcador. Dantas (2004) avaliou a associação de marcas moleculares com genes de resistência. Leal (2004) analisou a diversidade genética de *T. cacao* provenientes de seleções identificadas como resistentes em plantações comerciais. Santos (2004) investigou a validação de marcadores moleculares associados a QTL para resistência a vassoura-de-bruxa no cacauzeiro. Sereno et al. (2006) utilizaram microssatélites para analisar a estrutura e diversidade genética de acessos da série CAB, considerando o grupo morfogeográfico dos Forasteiros coletados em 19 rios da bacia Amazônica.

Há, então, fortes indicativos da existência da possibilidade de alcançar a associação de diferentes genes de resistência e de ampliar a diversidade em cultivo. Deste modo é vital a identificação de genótipos que carregam as maiores possibilidades de portarem estes fatores distintos. Sendo assim, para barrar a evolução do patógeno, os agricultores devem ser instruídos a efetuar um controle minucioso de vassouras nas áreas cultivadas com os materiais resistentes, evitando que estas venham a esporular (PIRES, 2003).

O melhoramento para resistência em cacau deve visar níveis adequados de resistência durável, e os estudos realizados indicam que a espécie tem ampla variabilidade para resistência poligênica (RIOS-RUIZ, 2001). Então, a busca por uma maior diversidade genética entre as plantas no cultivo deve ser buscada para que se alcance uma maior durabilidade da resistência, dificultando a constante evolução do patógeno.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material genético vegetal e condições de cultivo

As plantas utilizadas foram previamente selecionadas por apresentarem elevada produção e resistência à vassoura-de-bruxa. As avaliações, em campo foram realizadas por técnicos da Fazenda Oceania, no município de Itagibá, na Bahia, por 10 anos (1994 a 2004). Foram escolhidas para análise 32 plantas de cacauzeiros, em condições de alta incidência de vassoura-de-bruxa (Quadro 1).

Quadro 1 – Identificação e compatibilidade das plantas

Número	Planta	Compatibilidade*	Número	Planta	Compatibilidade*
1	FO 25-09	Autoincompatível	17	FO 34-09	Autocompatível
2	FO 36-10	Autoincompatível	18	FO 85-09	Autoincompatível
3	FO 25-08	Autocompatível	19	FO 61-10	Autoincompatível
4	FO 30-08	Autoincompatível	20	FO 95-09	Autoincompatível
5	FO 36-11	Autoincompatível	21	FO 55-10	Autoincompatível
6	FO 32-10	Autoincompatível	22	FO 88-09	Autoincompatível
7	FO 34-03	Autocompatível	23	FO 48-08	Autocompatível
8	FO 36-01	Autoincompatível	24	FO 51-06	Autoincompatível
9	FO 36-02	Autocompatível	25	FO 52-05	Autoincompatível
10	FO 37-09	Autoincompatível	26	FO 59-12	Autoincompatível
11	FO 30-09	Autocompatível	27	FO 86-09	Autoincompatível
12	FO 25-11	Autoincompatível	28	FO 21-05	Autocompatível
13	FO 29-09	Autoincompatível	29	FO 58-09	Autoincompatível
14	FO 36-13	Autoincompatível	30	FO 52-09	Autoincompatível
15	FO 35-09	Autoincompatível	31	FO 61-11	Autoincompatível
16	FO 40-07	Autoincompatível	32	FO 55-09	Autoincompatível

\* Fonte: Informação pessoal do administrador da Fazenda Oceania (Francisco Barbosa, 2006).

A Fazenda Oceania apresenta relevo com áreas planas, onduladas e outras montanhosas. Possui clima quente e úmido. Os solos apresentam fertilidade média e alta, com boa aptidão para pastagens e cacauicultura, existindo solos com baixa profundidade em alguns locais. A vegetação natural é representada pela mata hidrófila sul Baiana (Floresta Perenifólia Latifoliada Hidrófila Hileana) (SANTANA; MENDONÇA, 1995).

As árvores de cacau possuem idade média de 25 anos, estando plantadas no espaçamento de 3 x 3 metros, separadas em quadras diferentes. A precipitação média durante os anos da coleta foi de 1.242 milímetros e a umidade em torno de 80% (Informação cedida pelo administrador da Fazenda).

Quadro 2 – Identificação e procedência

Número	Acesso	Procedência
33	TSH 1188	Trinidad/Tobago
34	CCN 51	Equador
35	IMC 67	Peru - Amazônia
36	SCA 6	Peru - Amazônia
37	EET 397	Equador
38	PA 30	Peru - Amazônia
39	PA 300	Peru - Amazônia
40	SIC 328	Bahia
41	SIC 329	Bahia

\* Fonte: <http://www.icgd.rdg.ac.uk>.

### 3.2 Extração e amplificação do DNA

Além dos indivíduos selecionados na Fazenda Oceania, foram analisados nove clones do banco de germoplasma do CEPEC, estudados por Leal (2004), buscando materiais promissores para introdução em programas de melhoramento do cacauero. Estes materiais foram incluídos para comparar os materiais da Fazenda Oceania com fontes de resistência à vassoura-de-bruxa já identificadas e

estudadas e para dimensionar comparativamente a diversidade das plantas selecionadas. Os acessos incluem clones híbridos Trinitários e Forasteiros alto amazônicos (Sca 6, IMC 67, PA 30, PA 300, TSH 1188, CCN 51, EET 397) e baixo amazônicos (SIC 328 e SIC 329).

A extração do DNA de folhas de cada uma das plantas foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC, a partir de folhas em estágio intermediário de maturação e sadias. O protocolo utilizado foi o método de CTAB de Doyle e Doyle (1990), com modificações (CORRÊA et al., 1999; FALEIRO et al., 2001a). Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido foliar foram maceradas em cadinhos de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, e acondicionado em tubos Eppendorf de dois mL, aos quais foram adicionados 800  $\mu$ L de tampão de extração de DNA. Após uma hora em banho-maria, a 65 °C, foram acrescentados 700  $\mu$ L de clorofórmio-isoamílico (24:1) e as amostras submetidas à centrifugação por 10 min, a 14.000 rpm, em microcentrifuga eppendorf a 4 °C e os sobrenadantes retirados para novos tubos. Aos sobrenadantes foram acrescentados 55  $\mu$ L de CTAB 7 % e novamente submetido à centrifugação. Terminada a centrifugação foram, novamente, retirados os sobrenadantes e acrescentado 700  $\mu$ L de isopropanol gelado misturado e colocado a -20 °C por duas horas e centrifugado por 10 min, a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 300  $\mu$ L de etanol 70 % por duas vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos ao ar por duas horas e ressuspensos em 150  $\mu$ L de água deionizada contendo RNase na concentração de 40  $\mu$ g/mL e colocado em banho-maria a 37 °C para dissolver o “pellet”.

A análise da integridade e pureza das amostras de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídio 1 ng/ $\mu$ L, e

comparado com padrões de pesos específicos (DNA fago lambda,  $\lambda$ ). A pureza e as quantidades foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (SAMBROOK et al., 1989). As amostras de trabalho tiveram suas concentrações ajustadas para 10 ng DNA/ $\mu$ L e foram conservadas a -20 °C.

Para amplificação do DNA, as amostras foram submetidas às reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com a utilização de *primers* específicos para microssatélites ou SSR (LITT; LUTY, 1989). Os treze pares de *primers* utilizados nas amplificações foram selecionados através da sua distribuição nos grupos de ligação do cacau, em estudos desenvolvidos pela comunidade científica internacional (CROUZILLAT et al., 1996; LANAUD et al., 1995; RISTERUCCI et al., 2000) (Quadro 3), bem como, utilizados por Leal (2004), da qual foram extraídas partes das informações de genotipagem dos nove clones testemunhas. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 13  $\mu$ L de mistura, contendo: água desionizada; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; tampão 10X; dNTP 2,5 mM, *primer* 10  $\mu$ M; BSA 2,5 mg/ml; Taq polimerase 5 u/ $\mu$ L e DNA 10 ng/ $\mu$ L.

As amplificações foram realizadas em termociclador, conforme o seguinte programa: 2 min a 94 °C + 35 ciclos (1 min a 94 °C + 1 min a temperatura de anelamento específica para cada *primer* + 1 min a 72 °C) + 7 min a 72 °C, sendo que após a amplificação a temperatura das amostras foi reduzida para 4 °C, até o momento da eletroforese (Quadro 3).

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 5 % [TAMPÃO (Uréia; água desionizada; TBE 10X; LONG RANGER); TEMED; APS 10 %] no seqüenciador automático ABI 377. O volume total de solução para correr no gel é de 20  $\mu$ L, sendo composto do produto da amplificação, 2  $\mu$ L de DNA e ROX 500 e corado LB (load buffer) com

formaldeído. Foram utilizados 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 377. Calculou-se o tamanho de cada fragmento amplificado, em número de pares de bases, tendo como base o marcador ROX 500.

Quadro 3 - *Primers* microssatélites, suas seqüências flanqueadoras, temperatura de anelamento, cor da fluorescência (TET = verde, HEX = amarelo e FAM = azul), estrutura repetida e comprimento do fragmento alélico

Loco	Primer	Seqüência (5'-3')	Temp. anel. (°C)	Cor	Estrutura Repetida	Com. (Pb)
mTcCIR9	Y16983	ACCATGCTTCCTCCTTCA ACATTTATACCCAACCA	51	TET	(CT) <sub>8</sub> N <sub>15</sub> (CT) <sub>5</sub> N <sub>9</sub> (TC) <sub>10</sub>	274
mTcCIR13	Y16987	CAGTCTAACACAAAGGTGAG TGCCCCACTTGACAACCTA	46	HEX	(AG) <sub>13</sub>	258
mTcCIR43	AJ271945	TCATGAGAATGCATGTG CTGGACATGAAGAAGTTAT	46	HEX	(GT) <sub>11</sub>	206
mTcCIR1	Y16883	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGGCA TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	HEX	(CT) <sub>14</sub>	143
mTcCIR10	Y16984	ACAGATGGCCTACACACT CAAGCAAGCCTCATACTC	46	HEX	(TG) <sub>13</sub>	208
mTcCIR35	AJ271827	TTTCCTTGATTGACCTA ATATAAACACACTTCAGAGAT	46	FAM	(GT) <sub>11</sub>	235
mTcCIR42	AJ271944	TTGCTGAAGTATCTTTTGAC GCTCCACCCCTATTTG	46	FAM	(GT) <sub>15</sub>	232
mTcCIR44	AJ271946	CCCATCAAAAGTATTAGAAG ATCAAGCAATGGTCAAC	51	FAM	(GT) <sub>15</sub>	178
mTcCIR54	AJ271953	AACCTCTTGTCACGTTA GAAGGCATACTTACTACTGT	46	TET	(CA) <sub>15</sub>	165
mTcCIR6	Y16980	TTCCCTCTAACTACCCTAAAT TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	TET	(TG) <sub>7</sub> (GA) <sub>13</sub>	231
mTcCIR57	AJ271956	GGAGGGATAAGAAGCAG AGAGCAACCATCACTAATCA	46	TET	(AC) <sub>13</sub>	253
mTcCIR7	Y16981	ATGCGAATGACAACCTGGT GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	TET	(GA) <sub>11</sub>	160
mTcCIR2	Y16978	CAGGGAGCTGTGTTATTGGTCA AGTTATTGTCGGCAAGGAGGAT	51	TET	(GA) <sub>3</sub> N <sub>5</sub> (AG) <sub>2</sub> GG(AG) <sub>4</sub>	254

Fonte: Lanaud et al., 1999; Risterucci et al., 2000; www.ncbi.nlm.nih.gov.

### 3.3 Análises genético-estatísticas

Os padrões de comprimento de fragmentos de DNA de cada indivíduo foram transformados em uma planilha eletrônica com os códigos 0 (ausência do alelo), 2 (presença de um alelo, indicando que o indivíduo é homocigoto) e 1 (presença de dois alelos para o indivíduo heterocigoto), verificado em cada um dos treze locos microssatélites utilizados.



Foi calculado o nível de heterozigose observada com base na relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

Com a tabela originária dos marcadores microssatélites foi calculada a matriz de distância genética entre as 41 plantas, estudados através do seguinte procedimento, usado por Faleiro et al. (2001b):

$$DG_{ij} = 1 - ((\sum k PLC_{ijk}) / NTL_{ij})$$

sendo:

$DG_{ij}$  = distância genética entre os acessos i e j;

$PLC_{ijk}$  = proporção de alelos coincidentes de cada loco analisado (k), com os valores: 1 para 2 alelos coincidentes (em homozigose ou heterozigose); 0,5 para um alelo coincidente e zero para nenhum, dos genótipos i e j.

$NTL_{ij}$  = número total de locos sem dados perdidos em i ou j.

Definida a matriz de distâncias, o espaço multidimensional foi reduzido a tridimensional pelo método *Multidimensional Scaling* – MDS SAS e este apresentado em representações gráficas, obtidas por SAS G3D (SAS, 1988).

As análises de agrupamento foram realizadas pelo método centróide – SAS, com definição do número de agrupamentos por picos de pseudo F, combinados com baixos valores de pseudo  $t^2$ , seguido de alto  $t^2$ , para a fusão do ‘cluster’ seguinte (SAS, 1988).

Com a finalidade de selecionar 25 % (8 de 32) das plantas estudadas na Fazenda Oceania foi criado um índice de seleção formado da soma dos postos (Ranks), relativos ao número total de vassouras e produção, e foram considerados os agrupamentos formados (CRUZ; REGAZZI, 1997).

### 3.4 Comparação de médias fenotípicas

Foram realizadas avaliações de dados fenotípicos nos anos agrícolas 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2003 e 2004, de 32 plantas de cacau da Fazenda Oceania, quanto ao número de frutos (NFRUTOS) e a produção em peso de semente seca (PROD). A característica resistência à vassoura-de-bruxa foi medida pela quantidade de vassoura no total (VT), vassoura vegetativa (VV), vassoura na almofada (VA) e porcentagem de vassoura no fruto. Como a produção foi tomada em um número reduzido de repetições gerou-se uma nova variável de produção como sendo igual ao produto do número de frutos sadios pelo peso médio de fruto, este último obtido pela relação entre produção de semente seca e número de frutos, para as vezes que foram tomados os dois tipos de dados.

O teste de Tukey foi utilizado na comparação de médias ajustadas para o efeito de ano, sendo o desvio mínimo significativo obtido a partir das médias harmônicas do número de repetições (ano) em que foram coletados os resultados, pois em alguns anos não ocorreram coletas de dados para algumas características, sendo observada no mínimo três observações por característica. Os materiais foram submetidos à análise em que ano e clone foram considerados de efeitos fixos GLM - SAS (SAS, 1988).

Para verificação do nível de inóculo de vassoura no local onde estavam localizadas as plantas selecionadas, foram contadas as quantidades de vassouras existentes na copa, em quatro plantas tomadas ao acaso, ao redor de cada planta em estudo foram também verificadas as freqüências e o tempo de retirada das vassouras. Com estes valores foi estimada a média de vassouras existentes ao redor das plantas em estudo e a verificação in loco da presença da doença.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração e amplificação do DNA

O padrão eletroforético obtido das amostras de DNA (Figura 1) indicou que as amostras estavam ricas em DNA não fragmentado. A relação entre a absorbância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e a 280 ( $A_{280}$ ) variou entre 1,7 e 2,7, indicando não haver contaminação com proteínas em níveis prejudiciais às análises. Portanto, o método de extração adotado permitiu obter amostras de DNA em quantidade e qualidade adequadas às análises moleculares.

Não foram realizadas reações com três pares de *primers* simultaneamente (triplex), pois os *primers* marcados com fluorocromo amarelo (HEX) não foram distinguidos na eletroforese automática. Foram separados adequadamente apenas os produtos amplificados com duplex, ou seja, *primers* marcados com fluorocromo verde (TET) e azul (FAM). Desta forma, as reações com os *primers* marcados com o fluorocromo amarelo foram realizadas separadamente e os produtos da amplificação foram misturados àqueles obtidos nos duplex, antes de proceder à corrida eletroforética no gel do seqüenciamento. Os treze *primers* que amplificaram adequadamente foram utilizados para amplificar as amostras de DNA dos indivíduos (Figura 2).

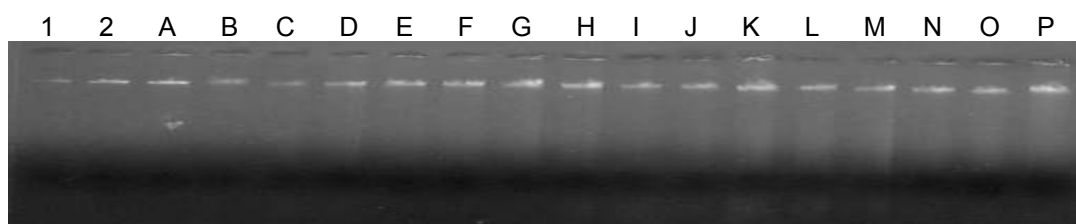


Figura 1 - Padrão eletroforético da integridade das amostras de DNA. Colunas 1 e 2 correspondem a 100 e 200 ng de DNA  $\lambda$ , respectivamente (marcador). Colunas A a P correspondem a 5  $\mu$ l de DNA de cacau: A – FO 25-09; B – FO 36-10; C – FO 25-08; D – FO 30-08; E – FO 36-11; F – FO 32-10; G – FO 34-03; H – FO 36-010; I – FO 36-02; J – FO 37-09; K - FO 30-09; L - FO 25-11; M - FO 29-09; N - FO 36-13; O - FO 35-09; P - FO 40-07.

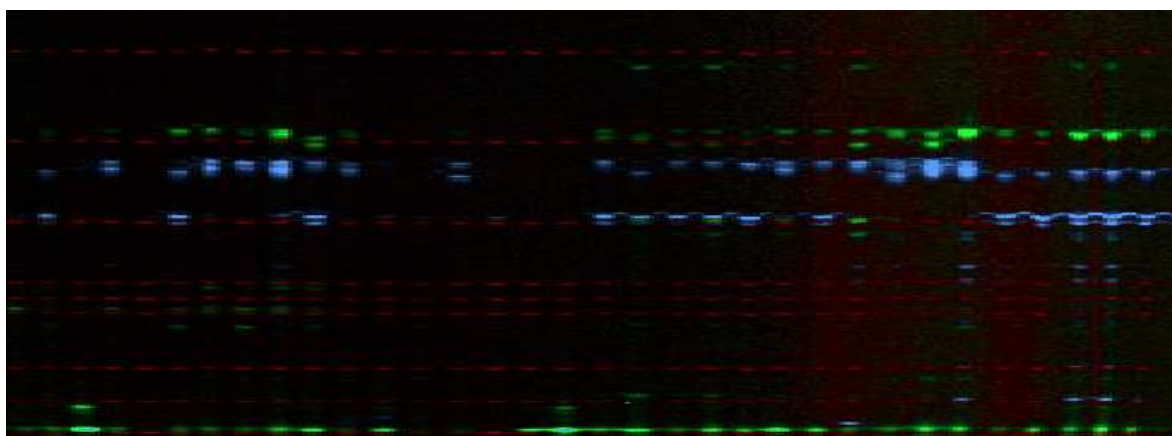


Figura 2 - Produtos de amplificação das 32 amostras de DNA de cacau da Fazenda Oceania com primers microssatélites AJ271944 (azul) e Y16981 (verde), separados em gel de poliacrilamida 5 %. O tamanho do fragmento do marcador encontra-se em vermelho (ROX 500).

A alta resolução dos géis de poliacrilamida utilizados nas análises com marcadores permite uma maior precisão na identificação dos alelos e, desta forma, uma estimativa mais precisa das distâncias genéticas entre as plantas, sendo a detecção feita de forma semi-automática no seqüenciador ABI 377.

## 4.2 Níveis de polimorfismos obtidos com SSR

As 41 plantas foram avaliadas com treze marcadores microssatélites e os produtos das amplificações apresentaram um grande número de alelos por loco (04 a 22), com uma média de 11,69 alelos por loco (Quadro 4). O maior número de alelos foi observado com o *primer* Y 16981. Essa média é superior àquela encontrada por Leal (2004), que foi de 6,4 alelos por loco com nove *primers*, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida a 5 % para a separação dos produtos eletroforéticos. É também superior à encontrada por Faleiro (2003), que foi de 4 alelos por loco utilizando 16 pares de *primers*, utilizando eletroforese em gel de agarose a 3 %. Risterucci et al. (2000) utilizaram 20 locos microssatélites para caracterizar 28 acessos de cacauero e obtiveram uma média de 5,6 alelos por loco, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida. Segundo esses autores, a utilização de 8 locos microssatélites seria suficiente para uma caracterização inicial de acessos de cacauero, entretanto o uso de 15 locos seria necessário para a diferenciação de acessos quanto a diversidade genética. O alto número de alelos por loco identificado deve-se provavelmente a dois fatores principais, a diversidade do material estudado e a pré-seleção dos *primers* polimórficos para a análise.

Na Tabela 4 encontram-se os números de bandas monomórficas e polimórficas, obtidas nas amplificações com os marcadores SSR. O número de fragmentos polimórficos amplificados para cada par de *primer* nas 41 plantas foram bastante variados. As treze combinações de *primers* analisadas geraram 435 bandas, sendo 285 monomórficas e 150 polimórficas. O número de fragmentos totais amplificados variou de 26 (Y 16987) a 41 (AJ 271944) com uma média de 33,38 fragmentos por *primer*. Dos 150 fragmentos polimórficos, nove foram

amplificados nas duas populações, 110 exclusivamente na FO e 31 exclusivamente nas testemunhas. Esta quantidade de fragmentos polimórficos existentes nos acessos da Fazenda Oceania indica que estes são diferentes dos clones descendentes do material Sca 6 mostrando que os acessos estudados possuem potencial para introdução em programas de melhoramento..

O *primer* Y16981 apresentou o maior número de fragmentos amplificados, comuns as duas populações. O *primer* com menor número de fragmentos polimórficos amplificados foi o Y 16984.

Quadro 4 - Padrão de amplificação em amostras de DNA dos 41 indivíduos de cacau por *primer* microssatélite, número de alelos e do tamanho dos alelos em pares de bases amplificados

Loco	Padrão*	Nº	Alelos (pb)
Y 16983	274	10	275, 277, 279, 281, 283, 285,287, 289, 293, 295
Y 16987	258	07	253, 255, 257, 259, 261, 263, 265
AJ271945	206	15	156, 204, 206, 208, 210, 214, 216, 218, 220, 222, 226, 230, 232, 234, 236
Y 16 883	143	15	127, 129, 133, 139, 141, 143, 159, 161, 165, 169, 171, 173, 175, 181, 199
Y 16984	208	04	205, 207, 209, 211
AJ271827	235	12	224, 228, 230, 232, 234, 236, 240, 258, 260, 262, 264, 270
AJ 271944	232	15	193, 197, 201, 203, 205, 213, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 265
AJ 271946	178	05	175, 177, 183, 185, 187
AJ271953	165	13	140, 142, 144, 150, 152, 154, 156, 158, 162, 164, 166, 170, 188
Y16980	231	09	219, 221, 225, 227, 229, 231,233, 235, 239
AJ 271956	253	13	200, 228, 232, 242, 244, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 288, 294
Y 16981	160	22	127, 129, 131, 141, 145, 155, 157, 159, 161, 163, 171, 175, 181, 185, 189, 191, 193, 195, 199, 201, 203, 205
Y 16978	254	12	242, 244, 256, 258, 260, 262, 274, 278, 290, 292, 294, 296
Total		152	
Média		11,69	

\*Padrão: tamanho do fragmento clonado que foi utilizado por Lanaud et al. (1999) para desenhar o par de *primers*.

A heterozigose observada variou de 11% na planta 28 (FO 21-05) a 67% nas plantas 19 (FO 61-10) e 33 (TSH 1188) (Figura 3). O clone Sca 6, principal fonte de resistência à vassoura-de-bruxa, apresentou uma heterozigose de 30% e abaixo desta porcentagem estão 18 das 32 plantas coletadas na Fazenda Oceania. É importante ressaltar que o clone TSH 1188, o qual apresenta maior heteroziguidade, é um material que está sendo comercializado com boas

características de produção, resistência a doenças e adaptabilidade a região cacauera baiana. Sereno et al. (2006), estudando a diversidade genética de cacaueros da Amazônia com base em marcadores microssatélites, obtiveram na população de cacaueros do Acre uma heterozigozidade observada de 28,5%, sendo que desta a maior observada foi com materiais do Alto Amazonas com  $H_o$  de 44,5%. Os materiais com genitores com maior porcentagem de heterozigotos comportam-se melhor para programas de melhoramento que visem à introdução destes materiais como clones e os materiais com pais homozigotos são importantes para produção de híbridos uniformes (RISTERUCCI et al., 2000).

Tabela 4 - Número de bandas monomórficas e polimórficas totais dentro das plantas da Fazenda Oceania e das testemunhas obtidas com o marcador SSR

Combinações de primers	Polimórficas			Monomórficas	Total
	FO	Testemunhas	Total		
Y16983	1	0	1	31	32
Y 16987	10	0	10	16	26
AJ271945	4	3	9	22	31
Y 16 883	0	7	7	26	33
Y 16984	0	1	1	30	31
AJ271827	12	3	15	18	33
AJ 271944	17	4	24	18	41
AJ 271946	7	2	13	26	39
AJ271953	8	0	8	25	33
Y16980	9	0	9	22	31
AJ 271956	10	1	11	24	35
Y16981	13	8	21	15	36
Y 16978	19	2	21	12	33
Total	110	31	150	285	435
Média	8,5	2,06	11,53	21,9	33,38

Espera-se que seleções em variedades locais, da Bahia, apresentem níveis baixos de heterozigose, como resultado da associação de genitores geneticamente mais próximos (Faleiro et al, 2001a). Isto não foi confirmado nas análises realizadas neste trabalho, pois os clones SIC (seleções da Bahia) mostraram elevada heterozigose. Os Scavinas, padrão de resistência à vassoura-de-bruxa, apresentam

um nível muito baixo de heterozigose, o que condiz com a sua alta capacidade combinatória, apesar do seu baixo desempenho como clone.

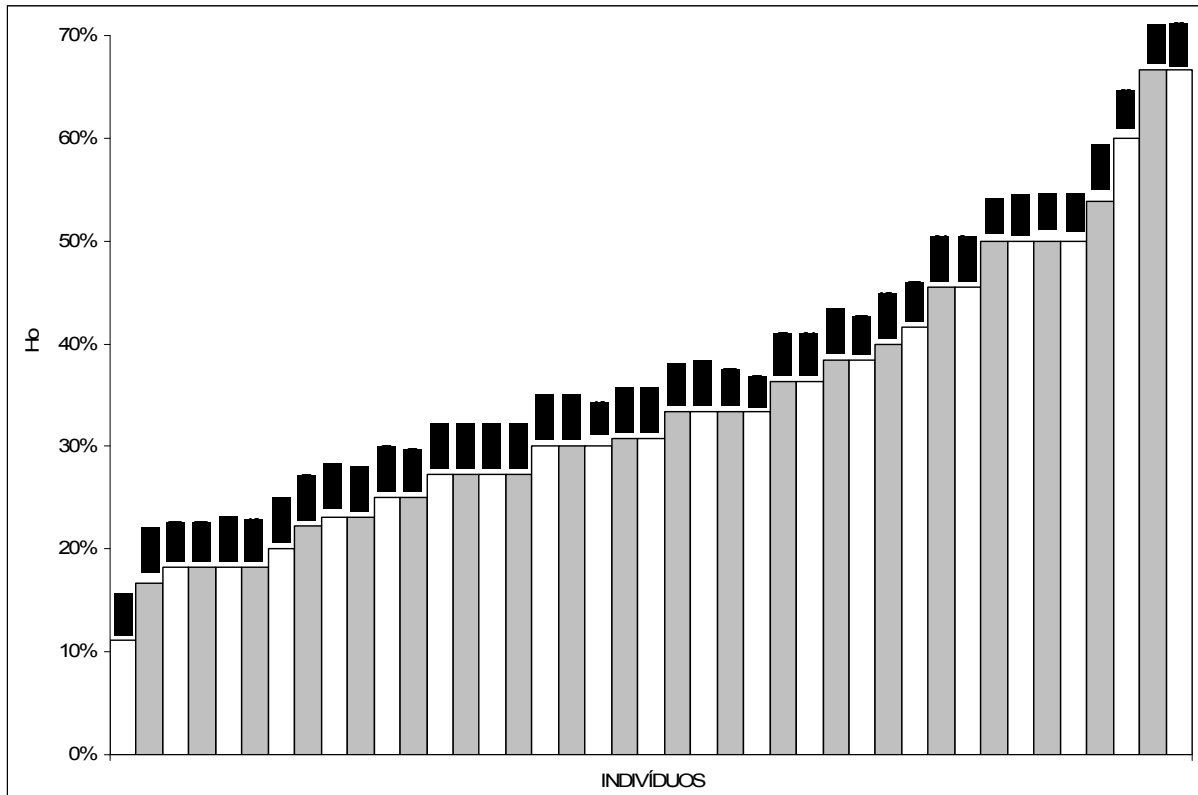


Figura 3 - Heterozigose observada nas 32 plantas de cacau selecionadas para resistência à vassoura-de-bruxa e nove testemunhas, calculada com base em 13 locos microssatélites.

Loor e Amores (2003) observaram em estudo de duas propriedades produtoras de cacau Nacional, no Equador, e outros clones como EET, ICS-95, IMC-67 e CCN-51, que os níveis de heterozigose observados nos materiais provenientes das duas propriedades selecionadas foram elevados, o que não se observou nos outros materiais (clones) utilizados. Isso indica que o cacau Nacional do Equador, na sua origem e antes da introdução de cacauzeiros do tipo forasteiros, era altamente homozigóticos, observando-se ainda, uma boa variabilidade entre os materiais nacionais utilizados.



### 4.3 Distâncias genéticas obtidas com o marcador SSR

A matriz da distância genética gerada com o marcador SSR apresentou valores na amplitude de 0,25 a 1,00 (Tabela 5). As maiores distâncias foram obtidas com todos os grupos em estudo e a menor com as plantas testemunhas. A maior média foi encontrada entre todas as combinações. Já o desvio padrão foi maior para as testemunhas.

As distâncias genéticas obtidas com os marcadores microssatélite encontram-se no Apêndice A. Onze plantas da Fazenda Oceania apresentaram maior distância genética que o padrão (Sca 6). Entre as plantas da Oceania, as maiores distâncias genéticas foram encontradas entre a planta FO 61-10 e as demais. Há maior diversidade genética dentro da seleção realizada na Fazenda Oceania que dentro do grupo das testemunhas apesar destas serem de diferentes origens. Para o melhoramento do cacaueteiro esta diversidade genética entre as plantas é muito importante, pois pode indicar a possibilidade da ocorrência de diferentes genes de resistência, possivelmente de origem distinta.

Tabela 5 - Números de distâncias das plantas, média, máximo, mínimo e desvio padrão obtido das distâncias genéticas com o marcador microssatélite

Plantas	N	Média	Máximo	Mínimo	Desvio Padrão
F. Oceania	496	0,731	1,00	0,35	0,1299
Testemunhas	36	0,592	1,00	0,25	0,1422
Entre todos	288	0,916	1,00	0,57	0,0841

Faleiro et al. (2001a) observaram resultados de distância genética superior ao clone Sca 6 na série CEPEC (CEPEC 42), e a menor distância observada foi do clone EET 397 (0,35), o que seria esperado, considerando que este material é descendente do Sca 6 (PINTO; PIRES, 1998).

#### 4.4 Análises de agrupamento

Na dispersão gráfica produzida por MDS-SAS a partir da matriz das distâncias genéticas baseadas em SSR (Figura 4), acompanhadas de análise de agrupamento, modelo centróide - SAS, pode-se observar que as plantas foram alocadas em dois grandes grupos: um formado por todos os acessos da Fazenda Oceania (1 a 32) e outro com as plantas testemunhas (33 a 41). Os resultados foram surpreendentes. As seleções da Fazenda Oceania além de terem maior variabilidade (maior média de distâncias genéticas) que os clones testemunhas mostraram grande distinção em relação a estes, sendo estes responsáveis por grande parte da variabilidade da espécie (auto e baixo amazônicos; híbridos) e importantes fontes de resistência (Sca e CCN). As seleções da Fazenda, em média, divergem mais do Scavina que clones que são seus descendentes: TSH 1188 e EET 397; auto amazônicos: IMC 67, PA 30, PA 300 e baixo amazônicos (SIC 328, SIC 329), além do híbrido CCN 51. Sendo assim, estes materiais devem ser mais bem estudados sobre a possibilidade de portarem genes de resistência diferentes do clone Scavina, e a seleção dentro deles deve ser feita de forma a preservar o máximo possível de variabilidade.

Os materiais SIC 328 (40) e SIC 329 (41) deveriam estar próximos das plantas da Fazenda Oceania caso estes materiais fossem do tipo comum, mostrando haver variabilidade no material em estudo. Sendo assim, estes materiais devem ser mais bem estudados sobre a possibilidade de portarem genes de resistência diferentes do Sca. E a seleção realizada dentro destas plantas deve ser feita de modo a preservar o máximo possível de variabilidade. Outros estudos com plantas selecionadas em fazendas conseguiram mostrar que estas se distanciam

geneticamente dos padrões de resistência já encontrados (FALEIRO et al., 2004; LEAL, 2004; MARITA et al., 2001 ;YAMADA et al., 2001).

Dentro do grupo formado por materiais da Fazenda Oceania foram formados 11 novos grupos sendo dois grandes grupos e nove grupos individuais (Figura 5, Tabela 6).

Tabela 06 – Formação dos agrupamentos através do método centróide de 32 plantas da Fazenda Oceania e 9 plantas testemunhas com base em marcadores microssatélites, cujos grupos encontram-se individualizados na Figura 5

Agrupamento	Plantas
Grupo 1	CCN51, EET397, IMC67, PA30, PA300, SCA6, SIC328, SIC329, TSH1188
Grupo 2	FO 25-08, FO 30-08, FO 30-09, FO 34-03 FO 35-09, FO 36-10, FO 36-11, FO 36-13, FO 40-07, FO 55-09, FO 55-10, FO 58-09, FO 61-11, FO 86-09, FO 95-09
Grupo 3	FO 25-09, FO 32-10, FO 34-09, FO 36-02, FO 48-08, FO 51-06, FO 52-05, FO 85-09
Grupo 4	FO 25-11
Grupo 5	FO 59-12
Grupo 6	FO 88-09
Grupo 7	FO 36-01
Grupo 8	FO 52-09
Grupo 9	FO 29-09
Grupo 10	FO 37-09
Grupo 11	FO 61-10
Grupo 12	FO 21-05

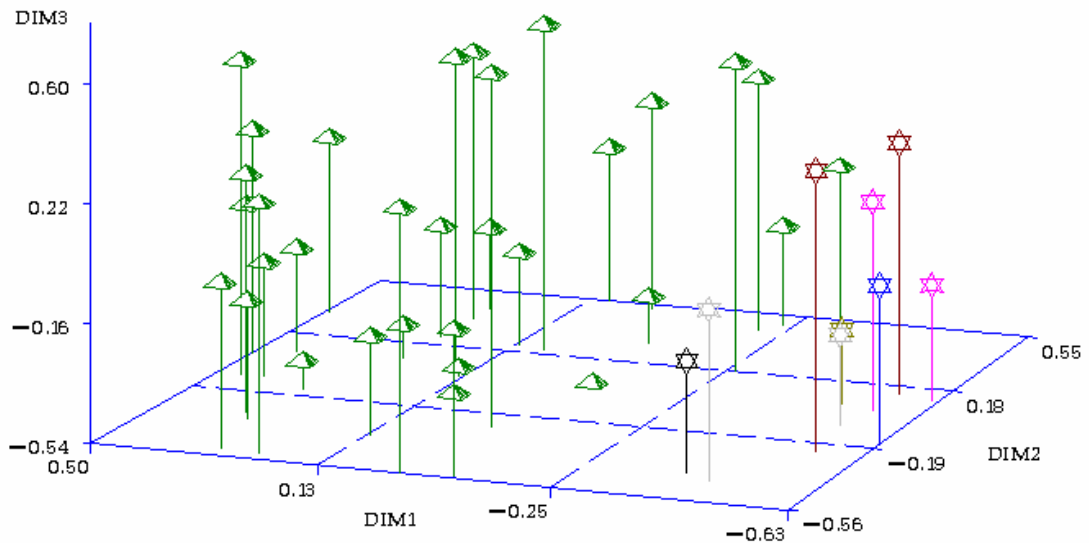


Figura 4 - Dispersão gráfica de acessos da Fazenda Oceania (piâmide) e clones testemunhas (TSH 1188 e EET 397 – estrela cinza, SCA 6 – estrela preta, CCN 51 – estrela azul, IMC 67 – estrela marrom, PA 30 e PA 300 – estrela rosa, SIC 328 e SIC 329 – vermelho) conforme MDS-SAS obtido a partir da matriz de distancias baseadas em marcadores microssatélites.

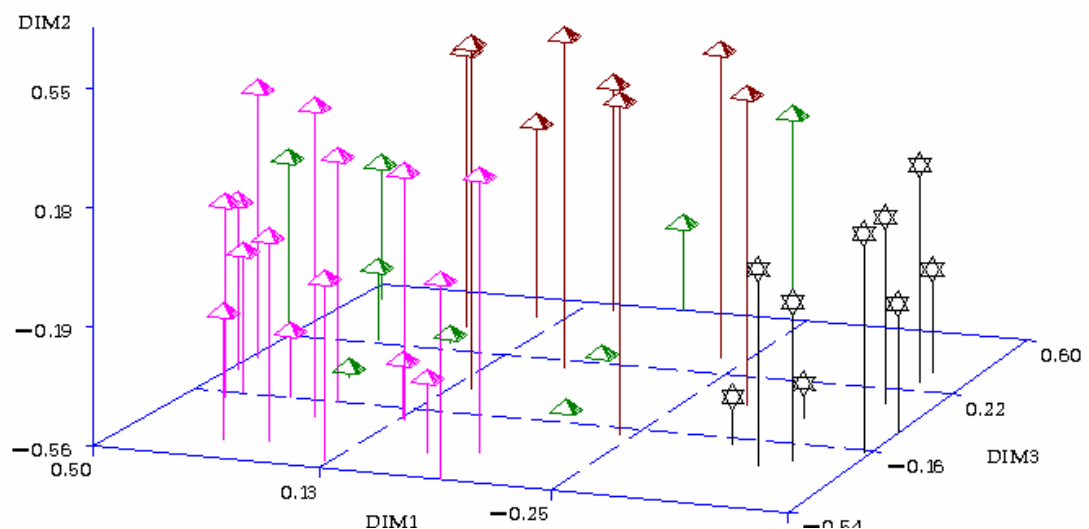


Figura 5 - Dispersão gráfica de acessos da Fazenda Oceania e clones testemunhas separados em agrupamentos (grupo 1 – estrela preta, grupo 2 – pirâmide rosa, grupo 3 – pirâmide vermelha e grupos individuais – pirâmide verde) através de agrupamento realizado pelo método centróide - SAS.

#### 4.5 Análise dos dados fenotípicos

Nos 32 materiais analisados houve diferença significativa entre tratamentos para os caracteres fenotípicos número de frutos, produção, vassoura total, vassoura vegetativa e vassoura de almofada, com probabilidade (P) inferior a 0,01, e para o caráter porcentagem de vassoura no fruto o P foi de 0,0699. A planta que apresentou a maior média ajustada para a quantidade de frutos colhidos foi a FO 85-09 com 222 frutos não diferindo estatisticamente de 11 materiais (Tabela 7). A testemunha que apresentou menor distância genética com FO 85-09 foi o IMC 67, originário do Peru, sendo este um clone de produtividade média e boas características de fruto e semente, não apresentando, contudo, os mesmos padrões de resistência do clone Sca 6 (PINTO; PIRES, 1998). As plantas que apresentaram melhores médias foram: FO 32-10, FO 36-11, FO 25-08, FO 37-09, FO 52-05, FO 36-10, FO 48-08, FO 55-09, FO 30-08, FO 52-09, FO 51-06. O material que apresentou a menor média foi a FO 25-11 com 35 frutos. Com relação à produção, o material com maior média ajustada de produção foi o FO 25-08, com 9465 gramas, e o com menor desempenho foi o FO 59-12 com 1132 gramas. Para estes dois caracteres a média dos anos em que foram realizadas avaliações foi de 4,3 anos (maior do que a média total que foi de 3,89 anos).

A quantidade de vassoura total variou de zero a 7,5 vassouras em 15 materiais estudados da Fazenda, sendo o que apresentou a maior média de vassoura foi o FO 36-01. As médias de vassouras vegetativas variaram de 5,25 (FO 30-08) a nenhuma vassoura em mais da metade das plantas. A média geral da quantidade de vassouras vegetativas existentes nas plantas estudadas foi de 1,05.

Já plantas não selecionadas (quatro plantas ao redor de cada planta selecionada) mostraram uma média de 24,84 vassouras por copa em uma única verificação. Este valor é muito maior que o observado para a média anual das 32 plantas em consideração. Assim é notório e elevado o nível de resistência do conjunto de plantas considerado.

Tabela 7 - Médias e número de avaliações de plantas para os caracteres: número de frutos (NFRUTOS), produção (PROD), número total de vassoura (VT), número de vassouras de almofada (VA), número de vassouras vegetativas (VV) e porcentagem de vassoura no fruto (PORCVF)

Planta	NFRUTOS		PROD		VT		VV		VA		PORCVF	
	média	N	média	N	média	N	média	N	média	N	média	N
FO 21-05	91,25	4	4708	4	3,00	4	1,50	4	1,50	4	13,08	4
FO 25-08	159,00	4	9465	4	4,75	4	4,75	4	0,00	4	27,72	4
FO 25-09	84,60	5	3499	5	0,00	4	0,00	4	0,00	4	1,63	4
FO 25-11	35,00	5	1831	5	0,50	4	0,25	4	0,25	4	13,16	4
FO 29-09	91,33	3	3866	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	2,42	3
FO 30-08	100,25	4	4088	4	6,50	4	5,25	4	1,25	4	0,27	4
FO 30-09	46,50	6	2483	6	0,00	4	0,00	4	0,00	4	2,31	4
FO 32-10	189,17	6	6300	6	1,80	4	0,25	4	1,50	4	16,19	4
FO 34-03	70,00	4	3258	4	4,00	4	4,00	4	0,00	4	6,47	4
FO 34-09	84,50	4	3455	4	2,50	4	2,00	4	0,50	4	29,42	4
FO 35-09	96,75	4	4812	4	0,25	4	0,00	4	0,25	4	3,63	4
FO 36-01	63,25	4	3404	4	7,50	4	2,50	4	5,00	4	0,71	4
FO 36-02	60,00	4	3397	4	1,75	4	1,25	4	0,50	4	4,96	4
FO 36-10	145,60	5	4200	5	0,00	3	0,00	3	0,00	3	2,51	3
FO 36-11	172,50	6	2950	6	0,00	4	0,00	4	0,00	4	0,20	4
FO 36-13	57,75	4	3283	4	6,30	3	1,66	3	4,66	3	11,99	3
FO 37-09	150,00	4	6682	4	0,00	4	0,00	4	0,00	4	5,57	4
FO 40-07	38,50	4	1962	4	4,75	4	4,00	4	0,75	4	1,24	4
FO 48-08	121,00	4	5280	4	1,50	4	1,5	4	0,00	4	4,43	4
FO 51-06	97,40	5	3638	5	0,00	3	0,00	3	0,00	3	1,77	3
FO 52-05	145,75	4	5237	4	1,00	4	1,00	4	0,00	4	6,48	4
FO 52-09	100,25	4	3861	4	0,00	4	0,00	4	0,00	4	1,08	4
FO 55-09	106,75	4	3725	4	0,00	3	0,00	3	0,00	3	2,62	3
FO 55-10	91,50	4	3286	4	0,00	4	0,00	4	0,00	4	0,98	4
FO 58-09	44,50	4	1941	4	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3
FO 59-12	42,25	4	1132	4	0,00	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3
FO 61-10	54,33	3	2432	3	2,67	3	1,33	3	1,33	3	2,52	3
FO 61-11	60,67	3	2607	3	0,00	3	0,00	3	0,00	3	28,25	3
FO 85-09	222,00	6	5438	6	0,00	4	0,00	4	0,00	4	1,77	4
FO 86-09	50,25	4	3590	4	0,25	4	0,00	4	0,25	4	4,96	4
FO 88-09	96,75	4	3459	4	1,00	3	0,33	3	0,66	3	7,36	3
FO 95-09	59,25	4	2098	4	0,00	3	0,00	3	0,00	3	56,00	3
DMS	124,82		5104		7,89		6,53		4,00		55,08	
CV (%)	46,74		47,68		165,97		212,3		238,72		236,2	

DMS = Diferença Mínima Significativa para Tukey, a 5 % e CV (%), Coeficiente de Variação. Médias ajustadas encontram-se no APÊNDICE B.

Apesar de amplamente resistentes, no conjunto, estas plantas mostraram diferenças significativas entre si quanto ao número de vassouras. Ressalta-se no estudo que esta informação visa apenas ilustrar que há razões para a consideração

deste caráter para a seleção, tendo em vista as limitações em respeito aos pré-requisitos para a análise de variância: desvios da distribuição normal, dada pela alta frequência de valores zero; e a não homogeneidade entre as variâncias das plantas selecionadas. Segundo Pinto e Pires (1998), características de produção são muito influenciadas pelo ambiente, e devem ser cuidadosamente ponderadas. Podem-se considerar como indicadores de produção: mais que 50 frutos para plantas com porte baixo, para plantas de porte médio mais que 80 frutos, para plantas de porte grande mais que 130 frutos; número de sementes maior 40 sementes/fruto; peso de uma semente seca maior que 1 grama; tamanho do fruto de médio a grande; espessura da casca quanto mais fina, melhor.

As vassouras nas almofadas florais variaram entre a média de cinco vassouras para a planta FO 36-01 para nenhuma vassoura nas plantas FO 34-03, FO 29-09, FO 30-09, FO 37-09, FO 25-08, FO 25-09, FO 51-06, FO 52-05, FO 52-09, FO 55-09, FO 55-10, FO 58-09, FO 59-12, FO 48-08, FO 61-11, FO 85-09, FO 36-10, FO 36-11, FO 95-09.

A porcentagem de vassoura no fruto variou de zero a 56,08 (plantas FO 58-09 e FO 59-12 a FO 95-09, respectivamente), não havendo ocorrência de vassoura no fruto durante três anos de avaliações.

É importante ressaltar que a planta FO 85-09 foi a que apresentou a maior média em número de frutos totais, e como já observado, verificou-se a ausência de ocorrência de vassoura na almofada e vassoura vegetativa, durante o período analisado, mas apresentou média de cinco vassouras no fruto. Segundo Purdy (1996), a resistência em vassouras vegetativas pode não ser representativa da resistência em frutos, dependendo da pressão de inóculo no local de infecção da doença, indicando que as plantas em estudo são resistentes à vassoura.

As plantas que não apresentaram infecção em nenhuma das possíveis avaliações de vassoura foram as FO 58-09 e FO 59-12.

Dantas (2005), estudando uma progênie  $F_1$  de 67 plantas originada do cruzamento entre os clones SIC-864 (Catongo) e CCN-51, constatou em seu experimento uma maior suscetibilidade à incidência de vassouras vegetativas do que de vassouras de almofada floral, apesar de apresentar coeficientes de variação muito próximos.

#### **4.6 Seleção de plantas quanto à produção, resistência e preservação da diversidade genética**

Cruzando-se os dados de campo com os dados moleculares realizou-se a seleção de 25 % das plantas da Fazenda Oceania por meio da soma da posição dos materiais na classificação de médias obtidas pela análise de variância. Assim resultados de produção foram apresentados em ordem decrescente e os de número vassoura total em ordem crescente, e os mesmos classificados (1, 2, 3...32). Obteve-se então, a soma das características e pela nova classificação foi feita à seleção de oito plantas que agrupam produtividade e pouca incidência de vassoura (Figura 6). Uma segunda seleção foi realizada dentro dos agrupamentos formados, selecionando-se duas plantas no grupo 2, duas no grupo 3 e quatro nos grupos individuais. Esta escolha foi baseada na classificação das mais produtivas e resistentes em cada grupo escolhido dentro de cada *cluster* com base na diversidade genética, e a metodologia usada visa à preservação da diversidade genética das plantas estudadas (Figura 7).

Com o primeiro tipo de seleção, sem verificação do posicionamento nos grupos, as plantas mais promissoras formam: FO 37-09, FO 36-11, FO 85-09, FO



32-10, FO 36-10, FO 35-09, FO 51-06, e FO 29-09. A distância genética média verificada entre elas foi de 0,77651.

No segundo método de seleção por meio de *ranks* e dos grupos, observou-se que, no agrupamento dois, as plantas FO 36-11 e FO 36-10 foram mais promissoras em campo. No agrupamento três temos as plantas FO 32-10 e FO 85-09 e nos agrupamentos individuais foram selecionadas as plantas FO 88-09, FO 52-09, FO 29-09 e a FO 37-09. A distância genética média verificada entre elas foi de 0,78596, enquanto a distância genética média das 32 plantas foi de 0,731.

Seis plantas são comuns aos dois tipos de seleção: FO 37-09, FO 36-11, FO 85-09, FO 32-10, FO 36-10 e FO 29-09. As plantas FO 35-09 e FO 51-06, que somente se encontravam no primeiro método de seleção aplicado são autocompatíveis e possuem heterozigosidade de 27 % (FO 35-09) e 18 % (FO 51-06). As plantas selecionadas no segundo método de seleção são também autocompatíveis e possuem  $H_o$  de 22 % (FO 88-09) e 27 % (FO 52-09). Todos os materiais selecionados comuns aos dois métodos são autoincompatíveis, e o que possuiu maior heterozigosidade foi o FO 36-11 (42 %).

Para seleção de clones em uma população, uma estratégia seria escolher pelo nível de diversidade genética daquela população. Segundo Sounigo et al. (2005), populações como LCTEEN, MO, MOQ, CL, TRD, AMAZ e Sca deveriam ser representados por meio de um menor número de clones, porque apresentam menor diversidade genética, enquanto populações como CAM, DOM e MAR deveriam ser representados através de maiores números de clones, porque apresenta maior diversidade genética. Números intermediários de clones devem representar populações como PA, POUND, NA, GS e IMC.

Verifica-se então, que as médias de diversidade das seleções pelos dois métodos são semelhantes o que resulta na inexistência de tendência de agrupamento com maior parentesco para os mais resistentes e produtivos. A consideração de seleção por grupo é recomendável, de modo a melhor representar a maior diversidade genética para a situação em questão. Têm-se então estabelecido um conjunto de plantas com grande potencial para o uso em programas de melhoramento genético com ampla diversidade genética, grande distância em relação a plantas tradicionais de resistência, o Sca 6, com elevada produção e ampla resistência à vassoura-de-bruxa.

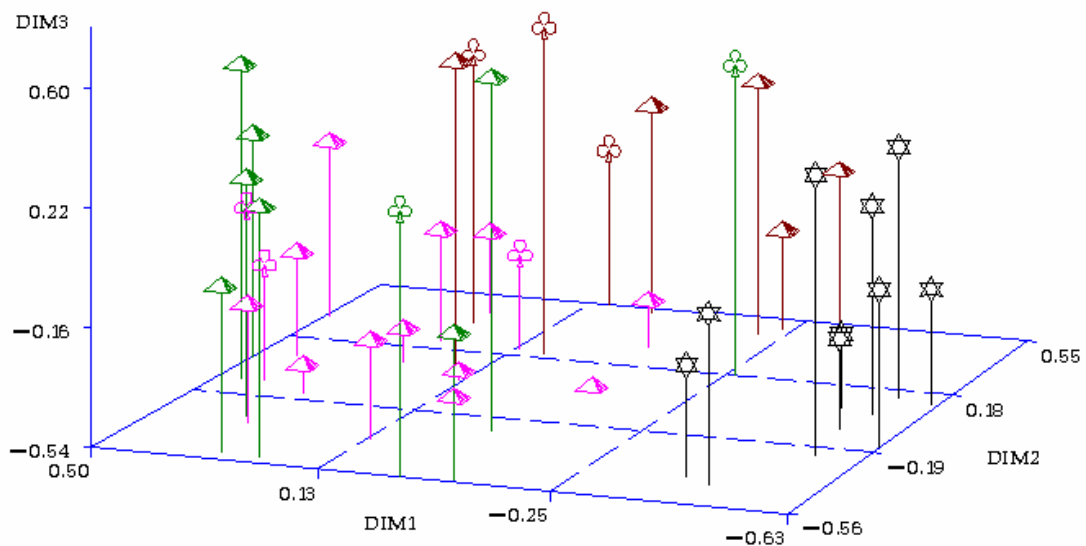


Figura 6 - Dispersão gráfica da seleção pelo do *rank* dos acessos da Fazenda Oceania (paus), os acessos em pirâmide são da Fazenda e em estrela as testemunhas, pelo MDS – SAS.

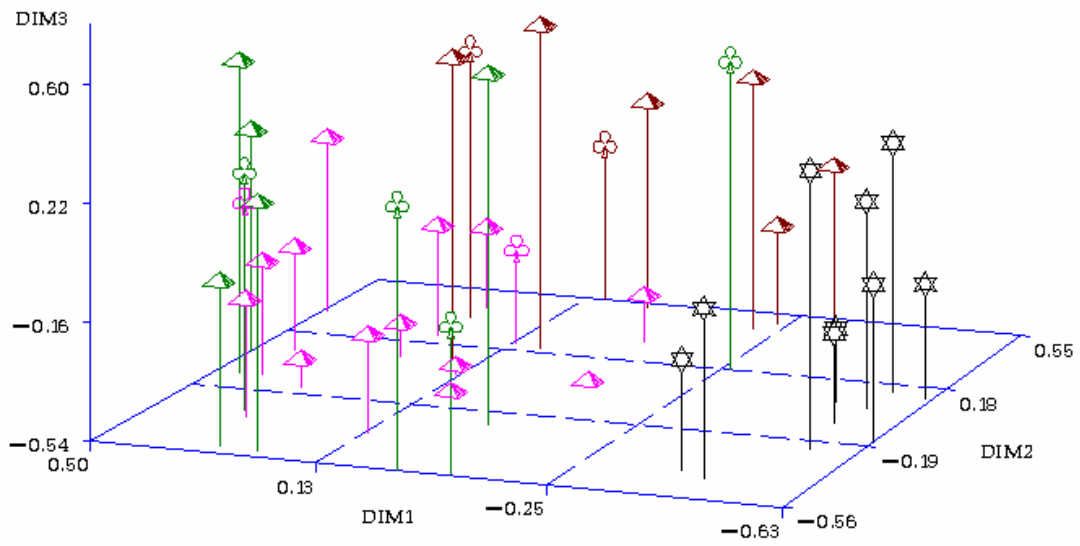


Figura 7 - Dispersão gráfica da seleção pelo agrupamento formados pelos acessos da Fazenda Oceania (paus), os acessos em pirâmide são da Fazenda e em estrela as testemunhas, pelo MDS – SAS, baseados em marcadores microsatélites.

## 5 CONCLUSÕES

O nível de heterozigose observada entre os indivíduos da Fazenda Oceania foi considerado baixo em comparação ao clone Sca 6 e as testemunhas. Estes estudos sobre grau de heterozigosidade não foram conclusivos, tendo havido resultados esperados como a baixa heterozigose do Sca 6 e alta do TSH 1188 e EET 397, e não esperados como a alta heterozigosidade dos clones SIC (resultados de seleções locais).

As plantas estudadas têm alto nível de resistência, o que foi comprovado pela comparação entre o número médio anual de vassouras destas plantas, com o número médio de vassouras de plantas circunvizinhas.

As distâncias genéticas obtidas entre os indivíduos da Fazenda Oceania e as testemunhas tiveram médias elevadas e em algumas plantas valores iguais a um (valor máximo), indicando que estes materiais são distantes geneticamente.

Não houve aproximação, de acordo com os dados microssatélites obtidos, entre as testemunhas e os plantas estudadas, formando-se dois grupos com cada um tipo de material.

As médias dos caracteres fenotípicos foram cruciais na seleção destes materiais, pois se obteve uma boa quantidade de avaliações anuais em campo, para que fossem realizados testes precisos já que a seleção é fundamentada em características que são amplamente influenciadas pelo ambiente.

As plantas selecionadas da Fazenda Oceania apresentaram grande diversidade genética em relação a padrões de resistência como Sca 6 e CCN 51. Isto sugere que este material possua grande potencial para programas de melhoramento em respeito à possibilidade de possuir genes de resistência diferentes das fontes citadas.

A seleção realizada por meio da classificação da performance dos materiais e da classificação com a consideração dos agrupamentos foi similar, mas para garantir ampla variabilidade genética entre o conjunto de acessos da Fazenda Oceania selecionou-se dentro dos agrupamentos, já que estes foram geneticamente distintos.

## REFERÊNCIAS

AIME, M. C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.

BAKER, R. E. D.; CROWDY, S. H.; THOROLD, C. A. Witches' broom disease investigations. I. – Seasonal variations in intensity of infection and their effect on control methods. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 18, n. 6, p. 107-116, 1941.

BARTLEY, B. G. A review of cacao improvement. Fundamental methods and results. In: **Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding Strategies**. Kuala Lumpur, Malaysia. 1994. 16p.

BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Richmond, Commonwealth Mycological Institute, **Phytopathology Paper**, v. 2. 1957, 42p.

BASTOS, E. **Cacau, a riqueza agrícola da América**. São Paulo: Ícone, 1987, 103p.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosus* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Cambridge, v. 34, p. 306-312, 1985.

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

CAZORLA, et al. Explanatory factors of cocoa harvest falls in Bahia, Brasil. In: International Conference on Cocoa Economy. Bali, Indonésia. **Papers**, p. 186-201, 1993.

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

CNPC - Conselho Nacional dos Produtores de Cacau. Coopercacau. Mercado do cacau, Ilhéus, 2001.

CORRÊA, R. X. et al. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**. Campinas: São Paulo, v. 58, n. 1, p.15-22, 1999.

CROUZILLAT, D. et al. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 93, n. 2, p. 205-214, 1996.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 394p.

DANTAS, A. N. **Mapeamento de novos genes de resistência do cacauzeiro à vassoura-de-bruxa e à podridão parda: caracterização quantitativa da população segregante e identificação de marcadores microssatélites**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2004.

DANTAS, A. N. et al. Caracterização de uma população de cacauzeiro para mapeamento de genes de resistência à Vassoura-de-bruxa e Podridão-parda. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 30, n. 4, p. 380-386, 2005.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento Genético do cacauzeiro**. Viçosa: UFV, 2001. 578p.

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

EVANS, H. C. Witches' broom disease – a case study. **Cocoa Growers' Bulletin**. n. 32, p. 5-19, 1981.

FALEIRO, G. F. et al. Comparação entre marcadores RAPD e microssatélites no estudo da diversidade genética no cacauero (*Theobroma cacao* L.). In: IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal. **Anais**. Goiânia, Goiás. 2001a. 161p.

FALEIRO, F.G., et al. Caracterização molecular de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC com base em marcadores moleculares RAPD, AFLP e microssatélites. In: Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal. **Resumos**. Goiânia, Goiás. 2001b. 160p.

FALEIRO, A S. G. **Diversidade Genética de Acessos de *Theobroma cacao* L. Selecionados por Produtores para Resistência à Vassoura-de-bruxa com base em Marcadores Microssatélites**. 2003. 19 f. Monografia (Curso de Especialização em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz. Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus, BA, 2003.

FALEIRO, F. G. et al. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 12-17, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: 3 ed., **Embrapa – Cernagen**, 1998. 220p.

FIGUEIRA, A. V. O.; CASCARDO, J. C. M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: DIAS, L. A. S. **Melhoramento Genético do cacauero**. Viçosa: Folha de Viçosa, p. 385-438, 2001.

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

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

HOLLIDAY, P. **Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel)**. London: H. M. Stationery Office. 1952. 8p.

ICCO (International Cocoa Organization). **Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao**, v. 30, n. 4, Año cacaotero, 2003/04.



**IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Produção agrícola municipal, Bahia. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

LANAUD, C. et al. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 4, p. 987-993, 1995.

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

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

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetic**, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

LOOR, R; AMORES, F. Comparación de los niveles de homocigosis y heterocigosis entre cacaos (*Theobroma cacao* L.) del genotipo Nacional y otros existentes en Ecuador, mediante el uso del marcador molecular denominado microssatélites (SSRs). In: 14th International Cocoa Research Conference. **Livro De Resumos.** Gana. P. 179-187. 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002. 528p.

LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, H. A.; MACHADO, R. C. R. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidiomas e atividade de *Crinipellis pernicioso* em ramos e frutos de cacauzeiro na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2. 1994. 341p.

LUZ, E. D. M. N. et al. Cacao (*Theobroma cacao* L.); controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F. X. e ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas.** Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, v. 2, p. 611-655, 1997.

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

- MELO, G. R. P. **Diversidade genética de isolados de *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer, coletados na região sul da Bahia, com base em marcadores moleculares RAPD**. 2000. Monografia (Especialização Biologia Molecular). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia, 2000.
- MOTAMAYOR J. C. et al. Domestication du cacaoyer cultivés par les Mayas. I. Preuve d'une origine Sud Américaine des cacaoyers cultivés par les Mayas. In **Theoretical and applied genetic research conference**. Lagos. v. 13, p. 54-68, 2001.
- NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin: Springer, 2000. 320p.
- PATERSON, A. H. **Molecular dissection of complex traits**. Texas: College Station, 1998. 305p.
- PEGLER, D. N. *Crinipellis pernicios* (Agaricales). **Kew Bulletin**. n. 32. p.731-736. 1978.
- PEREIRA, A. B. Melhoramento clonal. In: DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2001. p. 362-384.
- PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, W. R. Perspectivas do uso de marcadores moleculares em melhoramento genético do cacauero. In: **Marcadores moleculares em biodiversidade, genética e melhoramento**. Brasília: SPI-EMBRAPA. 1997.
- PEREIRA, J. L. M. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v. 1, n. 1, p. 79-81, 1991.
- PEREIRA, M. G.; CARLETTO, G. A.; CASTRO, G. C. T. A variabilidade de fruto e semente de cacau dos clones das séries SIC e SIAL. In: **Proceedings of 10th Internatinal Cocoa Research Conference**. República Dominicana, 1987.
- PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Boletim Técnico n. 181. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1998. 34p.

PIRES, J. L. et al.. Cocoa Breeding for Witches'broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. In: International Workshop on The Contribution of Disease Resistance To Cocoa Variety Improvement - INGENIC, 1996, Salvador. **Proceedings...** Reading, UK, INGENIC, p. 91-101, 1999.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueteiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. 2003. 220p. Tese Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

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

RAM. A. Manejo integrado para o controle da vassoura-de-bruxa e recuperação de cacaueteiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18. 1993. 260p.

RIOS-RUIZ, R.A. Melhoramento para resistência a doenças. In: DIAS, L.A.S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacaueteiro**. Viçosa: Folha de Viçosa. 2001. p. 289-324.

RISTERUCCI, A. M. et al. 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, 2000.

RUDGARD. S. A.; MADDISON. A. C.; ANDEBRHAN, T. Disease management in cocoa: comparative epidemiology of witches' broom. **Chapman and Hall**. London, 1993. 249p.

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

SANTANA, S. O.; MENDONÇA, J. R. **Solos da Fazenda Oceania, Itajibá-Bahia**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1995. 25p.

SANTOS, R. C. **Diversidade genética e validação de marcadores moleculares para resistência à vassoura-de-bruxa no cacaueteiro**. Ilhéus, 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, 2004.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.03. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1988.

SERENO, M. L. et al. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**. v. 7, p. 13-24, 2006.

SILVA, S. D. V. M. et al. Resistência do cacauzeiro a *Crinipellis pernicioso*: produção de basidiomas outra variável para avaliação. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza – Ceará, v. 27, 2002. 167p.

SOUNIGO, O. et al. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of general and applied microbiology**, v. 49, n. 3, 2003.

SOUNIGO; O. et al. Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG,T) using isozyme electrophoresis and RAPD. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 52, n. 8, p.1111–1120, 2005.

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

YAMADA, M. M. et al. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 377-383, 2001.

YOUNG, A. M. **The chocolate Tree. A natural history of cacao**. Smithsonian Institution Press. 1994. 200p.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Cambridge, v. 37, p. 475-488, 1988.

WHEELER, B. E. J.; SUÁREZ, C. The pathosystem. In: Rudgard, S. A., Maddison, A. C. and Anderbrhan, T. **Disease management in cocoa**. London: Chapman & Hall, p. 9-19, 1993.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discretetion genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates. 1996. 377p.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A - Matriz de distâncias genéticas entre 41 indivíduos, a partir de 13 locos microssatélites

	FO25-09	FO36-10	FO25-08	FO30-08	FO36-11	FO32-10	FO34-03	FO36-01	FO36-02	FO37-09	FO30-09	FO25-11	FO29-09	FO36-13	FO35-09	FO40-07	FO34-09	FO85-09	FO61-10	FO95-09	
FO25-09	0,0000																				
FO36-10	0,6818	0,0000																			
FO25-08	0,8750	0,5500	0,0000																		
FO30-08	0,8636	0,6500	0,5000	0,0000																	
FO36-11	0,7083	0,5500	0,5000	0,3500	0,0000																
FO32-10	0,5833	0,8182	0,8182	0,8182	0,7273	0,0000															
FO34-03	0,7308	0,5909	0,5417	0,8182	0,5833	0,7500	0,0000														
FO36-01	0,7273	0,6667	0,5909	0,5000	0,6818	0,8000	0,5000	0,0000													
FO36-02	0,8182	0,9500	0,9091	0,7000	0,6818	0,8000	0,6818	0,9091	0,9000	0,0000											
FO37-09	0,8000	0,7778	0,9444	0,8750	0,8333	0,8889	0,9500	1,0000	0,7500	0,0000											
FO30-09	0,9500	0,7222	0,7000	0,7778	0,6500	0,9500	0,7500	0,8889	0,7000	0,7857	0,0000										
FO25-11	0,8182	0,7222	1,0000	0,8889	0,9091	0,8500	0,9091	0,8000	0,8500	1,0000	0,9444	0,0000									
FO29-09	0,9091	0,9444	0,9500	0,8333	0,9000	0,8000	0,9545	0,8333	0,8889	1,0000	0,8889	0,7778	0,0000								
FO36-13	0,8333	0,7000	0,7500	0,5500	0,5833	0,7273	0,7917	0,8182	0,5909	0,7778	0,5500	0,9545	0,7500	0,0000							
FO35-09	0,7273	0,3889	0,7000	0,6111	0,6500	0,8500	0,6364	0,7222	0,8889	0,7778	0,7500	0,8333	0,6500	0,0000							
FO40-07	0,9091	0,6000	0,6818	0,7222	0,7273	0,8500	0,8182	0,8000	0,8889	0,6111	0,7500	0,7222	0,7727	0,7222	0,0000						
FO34-09	0,7917	0,9091	0,7727	0,8182	0,7273	0,6667	0,8333	0,9500	0,7727	0,7222	0,9000	0,9000	0,9500	0,7727	0,8500	0,8000	0,0000				
FO85-09	0,7727	0,7778	0,6500	0,7000	0,7000	0,7000	0,9545	0,8333	0,7778	0,6250	0,7500	1,0000	0,9444	0,7000	0,7222	0,7778	0,7000	0,0000			
FO61-10	0,8333	0,8750	1,0000	0,8125	0,8750	1,0000	0,8889	1,0000	0,9375	0,7143	0,8750	1,0000	0,8889	0,9375	0,6429	1,0000	0,8333	0,9286	0,0000		
FO95-09	0,6923	0,5455	0,7083	0,5455	0,5417	0,7917	0,6923	0,6364	0,8636	0,9000	0,7000	0,8182	0,8636	0,6667	0,4545	0,7273	0,9167	0,6364	0,7778	0,0000	
FO55-10	0,7500	0,6500	0,7727	0,6500	0,5455	0,6818	0,6250	0,6500	0,7000	1,0000	0,5000	0,8182	0,8000	0,6364	0,5000	0,7000	0,8636	0,8500	1,0000	0,5417	
FO88-09	0,6667	0,5000	0,8333	0,6875	0,7778	0,8333	0,8333	0,5625	0,9444	0,7500	0,9375	0,6250	0,6429	0,8889	0,6250	0,7778	1,0000	0,8571	0,8333	0,6667	
FO48-08	0,7000	0,8750	0,6667	0,6111	0,5556	0,7222	0,7500	0,6250	0,6875	0,9286	0,9375	1,0000	0,7222	0,9375	0,8750	0,6111	0,5500	1,0000	0,6500		
FO51-06	0,5455	0,8000	0,9545	0,9444	0,8182	0,6500	0,7727	0,7500	0,7500	0,7778	0,8889	0,8500	0,8333	0,8636	0,7778	0,8636	0,8000	0,8889	0,8571	0,7273	
FO52-05	0,8000	0,7778	0,8889	0,8333	0,8333	0,9000	0,8500	0,8750	0,7222	0,7857	0,6875	0,9444	0,8750	0,6667	0,8889	0,7500	0,7500	0,7222	1,0000	0,8500	
FO59-12	0,7727	0,8889	0,8500	0,8889	0,9500	0,7000	0,8182	0,7222	0,9444	0,9375	0,7222	0,6111	0,8000	0,9000	0,7778	0,7222	0,8500	0,8000	0,8125	0,7273	
FO86-09	0,8462	0,7273	0,7500	0,6364	0,5417	0,9583	0,8077	0,6818	0,8636	0,8000	0,5500	0,7727	0,7727	0,7500	0,6818	0,5909	0,9583	0,7273	0,7222	0,6923	
FO21-05	0,8333	0,6429	0,8750	0,6429	0,9375	0,7500	0,8333	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6875	0,8750	1,0000	0,9375	1,0000	1,0000	0,8750	0,9286	0,7778	
FO58-09	0,8077	0,5909	0,7500	0,6818	0,5417	0,9167	0,8077	0,8182	0,9091	0,9000	0,7500	0,8636	0,9091	0,5833	0,5000	0,7727	0,8750	0,7273	0,7778	0,5385	
FO52-09	0,8636	0,8333	0,9500	0,7222	0,7500	0,8500	1,0000	0,7778	0,8333	0,8333	0,8750	0,7222	0,7778	0,9000	0,8333	0,6111	0,8500	0,9000	1,0000	0,8636	
FO61-11	0,8462	0,7273	0,7917	0,5909	0,6250	0,6667	0,7692	0,6818	0,8636	0,9500	0,6000	0,6818	0,6818	0,7083	0,6364	0,6364	0,9583	0,8182	0,6667	0,5385	
FO55-09	0,8846	0,6818	0,7500	0,6364	0,5833	0,7917	0,8077	0,8636	0,6818	0,8500	0,6500	0,8182	0,9091	0,5833	0,5909	0,6364	0,7083	0,6818	0,8333	0,5769	
TSH1188	0,9167	0,9167	0,7500	0,9000	0,7500	1,0000	0,8333	1,0000	0,9167	0,9000	0,8333	1,0000	1,0000	0,8333	0,9000	0,9167	0,8333	1,0000	1,0000	0,9167	
CCN51	0,9444	1,0000	0,8750	0,8750	0,8750	1,0000	1,0000	0,9375	0,7857	0,8333	0,8571	1,0000	1,0000	0,8750	1,0000	0,9286	0,9375	1,0000	1,0000	1,0000	
IMC67	0,9375	0,9286	0,7143	0,8571	0,7143	0,9375	0,8750	1,0000	0,8571	0,9167	0,8571	1,0000	1,0000	0,7143	0,9286	0,9167	0,8750	0,8333	1,0000	0,8125	
SCA6	0,9500	0,8750	0,9444	0,8750	0,8889	1,0000	1,0000	0,8889	1,0000	1,0000	1,0000	0,7500	0,8750	1,0000	0,8750	0,9444	1,0000	1,0000	1,0000	0,9000	
EET397	0,9500	0,9375	0,9444	0,9375	0,9444	1,0000	1,0000	0,8889	1,0000	1,0000	1,0000	0,8125	0,8750	1,0000	0,9375	0,8125	0,9444	1,0000	1,0000	0,9500	
PA30	0,8333	1,0000	0,8750	0,8750	0,8125	0,8750	1,0000	1,0000	0,7143	0,5714	0,8333	1,0000	1,0000	0,7500	0,8571	0,9286	0,8125	0,7500	0,9167	1,0000	
PA300	1,0000	0,9375	0,8333	0,8750	0,7778	1,0000	0,9000	1,0000	0,8750	0,8750	0,7857	1,0000	1,0000	0,8333	0,9444	0,9375	0,8889	1,0000	0,9167	0,9500	
SIC328	0,8500	1,0000	0,9444	0,9375	0,9444	0,8889	0,9000	1,0000	0,8125	0,8125	0,9286	0,9375	1,0000	0,8333	0,8889	0,9375	0,6667	0,8750	0,9167	1,0000	
SIC329	0,9000	1,0000	0,8889	0,9375	0,9444	1,0000	1,0000	1,0000	0,9375	0,9286	0,9375	0,9375	0,9444	0,9444	1,0000	0,8750	0,8889	1,0000	1,0000	1,0000	

Cont.

## APÊNDICE A – Continuação...

	FO55-10	FO88-09	FO48-08	FO51-06	FO52-05	FO59-12	FO86-09	FO21-05	FO58-09	FO52-09	FO61-11	FO55-09	TSH1188	CCN51	IMC67	SCA6	EET397	PA30	PA300	SIC328	SIC329
FO55-10	0,0000																				
FO88-09	0,8125	0,0000																			
FO48-08	0,7778	1,0000	0,0000																		
FO51-06	0,7500	0,7778	0,6250	0,0000																	
FO52-05	0,8500	0,9286	0,6875	0,6875	0,0000																
FO59-12	0,8500	0,6429	0,8889	0,8889	1,0000	0,0000															
FO86-09	0,7083	0,6667	0,8500	0,9091	0,9000	0,5455	0,0000														
FO21-05	0,9444	0,6000	0,8125	0,7857	0,8750	0,8889	0,8333	0,0000													
FO58-09	0,6667	0,7222	0,9500	0,9091	0,9000	0,7273	0,6923	1,0000	0,0000												
FO52-09	0,7500	0,7143	0,9000	0,8889	0,8333	0,7500	0,7273	0,9444	0,8636	0,0000											
FO61-11	0,7083	0,6111	0,9500	0,8636	0,9500	0,5000	0,5385	0,8333	0,5769	0,8182	0,0000										
FO55-09	0,5417	0,7778	0,7500	1,0000	0,9000	0,7273	0,7308	1,0000	0,5385	0,7727	0,6154	0,0000									
TSH1188	0,8000	1,0000	0,8333	0,9167	0,6250	1,0000	0,9167	1,0000	0,8333	0,8750	1,0000	0,9167	0,0000								
CCN51	1,0000	1,0000	0,9286	1,0000	0,9167	1,0000	0,8889	1,0000	1,0000	0,8571	1,0000	0,9444	0,4000	0,0000							
IMC67	0,8571	1,0000	0,7000	0,9167	0,7500	1,0000	0,9375	1,0000	0,8750	0,9167	0,9375	0,8125	0,2500	0,5000	0,0000						
SCA6	0,7778	0,6667	1,0000	1,0000	0,9286	0,8750	0,8000	1,0000	0,9000	0,7778	0,8000	0,9000	0,4000	0,5000	0,4286	0,0000					
EET397	0,8333	0,7500	1,0000	1,0000	0,9286	0,8750	0,8500	1,0000	0,9500	0,8333	0,8500	0,9500	0,6000	0,5625	0,5714	0,3500	0,0000				
PA30	1,0000	1,0000	0,8125	0,8571	0,7500	1,0000	0,7778	1,0000	0,9444	0,8750	0,9444	0,9444	0,6250	0,3750	0,5833	0,6667	0,6111	0,0000			
PA300	0,9444	1,0000	0,9286	0,9375	0,8571	1,0000	0,9000	1,0000	0,9000	0,8750	1,0000	0,9500	0,5000	0,5625	0,5000	0,7778	0,7222	0,5625	0,0000		
SIC328	0,9444	1,0000	0,7857	0,8750	0,7143	1,0000	0,9500	1,0000	1,0000	0,9375	1,0000	0,9500	0,6667	0,6250	0,6250	0,7778	0,7222	0,5000	0,6500	0,0000	
SIC329	1,0000	1,0000	0,9286	1,0000	0,8571	1,0000	0,9500	1,0000	1,0000	0,8750	1,0000	0,9500	0,7500	0,6111	0,8750	0,8333	0,7222	0,5625	0,7222	0,6111	0,0000

APÊNDICE B - Médias ajustadas e número de avaliações de plantas para os caracteres número de frutos (NFRUTOS), produção (PROD), número total de vassoura (VT), número de vassouras de almofada (VA), número de vassouras vegetativas (VV) e porcentagem de vassoura no fruto (PORCVF)

PLANTA	NFRUTOS		PROD		VT		VV		VA		PORCVF	
	MÉDIAS	N	MÉDIAS	N	MÉDIAS	N	MÉDIAS	N	MÉDIAS	N	MÉDIAS	N
FO21-05	73.393.790	4	393.518.674	4	425.126.263	4	228.914.141	4	196.212.121	4	144.549.027	4
FO25-08	141.143.790	4	869.251.817	4	600.126.263	4	553.914.141	4	0.46212121	4	290.960.680	4
FO25-09	84.599.410	5	369.861.974	5	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-37.253.436	4
FO25-11	34.999.410	5	203.066.357	5	-156.313.131	4	-120.707.071	4	-0.35606061	4	78.052.672	4
FO29-09	99.305.911	3	434.002.723	3	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-37.186.241	3
FO30-08	82.393.790	4	331.564.085	4	775.126.263	4	603.914.141	4	171.212.121	4	16.541.804	4
FO30-09	60.018.737	6	311.415.605	6	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-30.444.651	4
FO32-10	202.685.403	6	693.031.192	6	-0.31313131	4	-120.707.071	4	0.89393939	4	108.343.725	4
FO34-03	52.143.790	4	248.524.185	4	525.126.263	4	478.914.141	4	0.46212121	4	78.459.053	4
FO34-09	66.643.790	4	268.202.474	4	375.126.263	4	278.914.141	4	0.96212121	4	308.003.590	4
FO35-09	92.100.910	4	483.391.731	4	-181.313.131	4	-145.707.071	4	-0.35606061	4	-17.247.707	4
FO36-01	45.393.790	4	263.107.226	4	875.126.263	4	328.914.141	4	546.212.121	4	20.865.358	4
FO36-02	42.143.790	4	262.409.830	4	300.126.263	4	203.914.141	4	0.96212121	4	63.428.250	4
FO36-10	170.325.303	5	522.334.305	5	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-36.290.954	3
FO36-11	186.018.737	6	652.503.816	6	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-51.588.517	4
FO36-13	68.377.786	4	386.581.970	4	430.808.081	3	0.19444444	3	411.363.636	3	58.430.466	3
FO37-09	145.350.910	4	670.397.194	4	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	0.2177092	4
FO40-07	20.643.790	4	118.991.848	4	600.126.263	4	478.914.141	4	121.212.121	4	26.173.778	4
FO48-08	103.143.790	4	450.724.033	4	275.126.263	4	228.914.141	4	0.46212121	4	58.056.188	4
FO51-06	122.125.303	5	466.097.152	5	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-43.731.554	3
FO52-05	127.893.790	4	446.437.991	4	225.126.263	4	178.914.141	4	0.46212121	4	78.637.900	4
FO52-09	95.600.910	4	388.349.492	4	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-42.819.955	4
FO55-09	117.377.786	4	430.780.398	4	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-35.240.193	3
FO55-10	86.850.910	4	330.877.184	4	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-43.814.220	4
FO58-09	55.127.786	4	252.369.122	4	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-61.430.669	3
FO59-12	52.877.786	4	171.490.153	4	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	-61.430.669	3
FO61-10	62.305.911	3	290.530.130	3	0.64141414	3	-0.13888889	3	0.78030303	3	-36.199.188	3
FO61-11	68.639.244	3	308.090.130	3	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	221.075.241	3
FO85-09	235.518.737	6	606.828.961	6	-206.313.131	4	-145.707.071	4	-0.60606061	4	-35.900.818	4
FO86-09	45.600.910	4	361.202.986	4	-181.313.131	4	-145.707.071	4	-0.35606061	4	-0.4002721	4
FO88-09	103.377.786	4	404.197.231	4	-102.525.253	3	-113.888.889	3	0.11363636	3	12.168.555	3
FO95-09	69.877.786	4	268.077.362	4	-202.525.253	3	-147.222.222	3	-0.55303030	3	499.375.347	3
<b>CV(%)</b>	46.74		47.68		165.97		212.30		238.72		236.20	

CV (%), Coeficiente de Variação.