

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

ROGÉRIO MERCÊS FERREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA, DO VIGOR
VEGETATIVO E DE POLIMORFISMOS EM MICROSSATÉLITES NA POPULAÇÃO
DE CACAUEIROS DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE OS CLONES TSH 1188
E CCN 51**

ILHÉUS – BAHIA

2007

ROGÉRIO MERCÊS FERREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA, DO VIGOR
VEGETATIVO E DE POLIMORFISMOS EM MICROSSATÉLITES NA POPULAÇÃO
DE CACAUEIROS DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE OS CLONES TSH 1188
E CCN 51**

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

Orientador: Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Janeiro de 2007

ROGÉRIO MERCÊS FERREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA, DO VIGOR
VEGETATIVO E DE POLIMORFISMOS EM MICROSSATÉLITES NA POPULAÇÃO
DE CACAUEIROS DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE OS CLONES TSH 1188
E CCN 51**

Ilhéus-BA, 25/01/07

Ronan Xavier Corrêa - DS
UESC / DCB

Ioná Santos Araújo - DS
UESC / DCB

Regina Celle Machado Rebouças - PhD
Almirante Cacau

Dedicatória

Aos meus pais, minhas irmãs e cunhados, que são o alicerce da minha vida, pelo carinho, lições de vida e esforços, dedico.

Aos amigos e à Camille, que me deram forças em muitos momentos desta caminhada, ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade da realização do curso.

À FAPESB, pela concessão da minha bolsa.

Ao Banco do Nordeste e CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

À Almirante Cacau M&MMars, CEPLAC e UESC, pela infra-estrutura laboratorial, disponibilidade de pessoal e condução dos experimentos em campo.

Ao Prof. Ronan Xavier Corrêa, pela orientação, confiança depositada e amizade durante a realização do curso de mestrado.

Ao Dr. Dário Ahnert, pela sua colaboração e pelo seu apoio na execução do projeto.

À Dra. Regina Celle Machado Rebouças, pela orientação e colaboração na obtenção dos dados fenotípicos.

Ao Dr. Uilson Vanderlei Lopes, pela colaboração e pelos ensinamentos que me foram prestados.

À amiga e colega de mestrado Cássia Bahia, pelo companheirismo e pela ajuda em todo o andamento do curso.

Aos Professores Dr. Leandro Lopes Loguércio, Dra. Edna Dora Martins Newman Luz e Dr. José Luiz Bezerra, pela dedicação e competência no exercício da docência.

Ao amigo Reinaldo Figueiredo a quem devo muito, pela sua dedicação e ajuda nos trabalhos desta Dissertação.

Aos colegas mestrandos, Eline, Alberto, Bruna, Charles, Cilene, Carlile, Marcos, Sândalo, pela amizade e colaboração.

Às meus amigos Rodrigo, Brenno, Marcelo, Honney, Alisson, pelo incentivo e pela força.

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

À coordenação e aos funcionários do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelo imprescindível apoio.

Aos funcionários da Almirante Cacau, Valdivino e Marcos, pela ajuda incondicional nos trabalhos em campo.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia do CEPEC/CEPLAC, Alfredo Dantas e Brena, pelo companheirismo e pela ajuda.

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

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O cacauero	3
2.2. Aspectos econômicos do cacau	4
2.3. Melhoramento genético do cacauero.....	6
2.4. Melhoramento do cacauero para resistência à vassoura-de-bruxa	7
2.5. Marcadores, mapeamento e análise de grupos segregantes.....	10
2.6. Seleção precoce e medidas de vigor em cacauero	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material vegetal	17
3.2. Avaliação da resistência à vassoura-de-bruxa	18
3.2.1. Resistência em campo por infecção natural	18
3.2.2. Inoculação artificial com suspensão de basidiósporos	18
3.2.3. Análise estatística	20
3.3. Avaliação do vigor vegetativo	20
3.3.1. Altura do fuste e diâmetro do caule	20
3.3.2. Análise estatística	21
3.4. Avaliação molecular	21
3.4.1. Extração de DNA	21
3.4.2. Amplificação de DNA com <i>primers</i> microssatélites.....	22
3.4.3. Análises estatísticas	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Resistência da progênie à vassoura-de-bruxa	26

4.2. Vigor vegetativo das progênies	30
4.4. Marcadores potencialmente ligados à resistência	33
4.4.1. Amplificação do DNA	33
4.4.2. Avaliação da viabilidade dos <i>primers</i> microssatélites	34
4.3.3. Identificação dos locos candidatos a marcadores genéticos	36
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA, DO VIGOR VEGETATIVO E DE POLIMORFISMOS EM MICROSSATÉLITES NA POPULAÇÃO DE CACAUEIROS DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE OS CLONES TSH 1188 E CCN 51

RESUMO

A vassoura-de-bruxa é a doença mais importante da cultura do cacaueteiro, nos países onde ela ocorre. Esta doença vem dizimando cacauetes da América Latina, trazendo graves problemas econômicos, sociais e ecológicos. A principal forma de controle é por meio da resistência genética. Além disso, por se tratar de uma planta perene, o número de anos para se completar um ciclo de seleção é o principal entrave dos programas de melhoramento. Por isso, alternativas que visem diminuir o tempo necessário para completar um ciclo de seleção, ampliam a possibilidade de ganho genético. Nesse sentido, objetivou-se caracterizar a resistência à vassoura-de-bruxa e o vigor vegetativo em 300 plantas da população derivada do cruzamento entre os clones de cacaueteiro TSH 1188 e CCN 51 e identificar marcadores microssatélites contrastantes entre grupos de plantas resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa nessa população. Constatou-se pelas estimativas dos parâmetros fenotípicos de vigor vegetativo, que uma seleção precoce para altura de plantas visando melhoramento genético não seria bem sucedida. A correlação da altura com diâmetro é alta e significativa. Os coeficientes de repetibilidade do número de vassouras vegetativas foram altos e quando ajustados por medidas de vigor foram levemente aumentados, demonstrando que o ajuste deveria ser utilizado em estudos de mapeamento genético. As distribuições de frequências para altura do fuste e diâmetro do caule foram aproximadamente normais, indicando que vários genes estão controlando essas características. Para o número de vassouras, a distribuição foi distorcida no sentido de maior resistência, indicando que pode haver um grupo de genes oriundos de diferentes fontes de resistência, e esse grupo de genes possa estar atuando em conjunto, determinado a distorção da curva. Amostras de DNA genômico de dezesseis plantas (dois genitores, sete progênies resistentes à vassoura-de-bruxa e sete suscetíveis) foram amplificadas com 18 *primers* marcados com fluorescência, e os produtos detectados em seqüenciador

automático de DNA ABI 377. Demonstrou-se que existe polimorfismo em nível molecular nos indivíduos estudados, sendo parte deles com tendência de associação à resistência a vassoura-de-bruxa. Dos 18 *primers* SSR amplificados, 15 foram polimórficos entre os genitores e sete podem estar potencialmente ligados à resistência à vassoura-de-bruxa. Esses resultados, especialmente o caráter segregante das características fenotípicas observadas e os polimorfismos detectados confirmaram que esta população é adequada à construção de um mapa genético. Tal mapa genético, devidamente saturado, vai permitir a identificação não só de novos genes de resistência, mas também a identificação de QTLs para outras características agrônômicas de interesse, contribuindo para os programas de melhoramento genético do cacaueteiro.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, altura do fuste, diâmetro do caule, genes de resistência, mapeamento genético.

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA, DO VIGOR VEGETATIVO E DE POLIMORFISMOS EM MICROSSATÉLITES NA POPULAÇÃO DE CACAUEIROS DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE OS CLONES TSH 1188 E CCN 51

ABSTRACT

The witches' broom (WB) is the most important cocoa disease in countries where it occurs. This disease has damaged cocoa plantations in several countries from Latin America causing serious economic, social and ecological problems. The genetic resistance is the main way for controlling this disease. As a perennial plant, cocoa needs several years to complete a selection cycle, which represents a restraint for breeding programs. So, search for alternative ways to reduce the long time need to complete a selection cycle may mean genetic gain. In this sense, this study was concerned in characterizing 300 trees in the population derived from a crossing between the clones TSH 1188 and CCN 51 respect vegetative vigor and resistance to witches' broom. In addition, we aim identify microsatellite markers contrasting between groups of WB resistant plants and susceptible ones. It was evidenced that an early selection for plant height aiming a genetic improvement would not be successful by estimating phenotypic parameters for vegetative vigor. It was observed a positive and significant correlation between plant height and stem girth. The repeatability coefficients for number of vegetative brooms became higher when adjusted by vigor measurements indicating that such adjustment should be used in studies of genetic mapping. The distribution frequency for jorquette height and stem girth was approximately normal, which indicates that several genes are controlling these traits. Already the distribution for number of vegetative brooms was distorted in direction to higher disease resistance indicating that a group of genes from different resistance sources may be defining the curve distortion. Samples of genomic DNA from a set of sixteen trees (two parents, seven WB resistant progenies and seven susceptible ones) were amplified using 18 primer markers with fluorescence. The resulting products were detected in an automatic sequencer of DNA ABI 377. Polymorphism, at molecular level, was detected for all the individuals studied, being several of them associated to WB resistance. From the 18 amplified primers SSR, 15 were

polymorphisms between the genitors and seven may be potentially linked to WB resistance. This results, specially its segregating character for diverse traits such as resistance to WB and vegetative vigor, and molecular polymorphisms, demonstrated this population as appropriate for creating a genetic map. Such genetic map duly saturated will allow to identify not only new genes of resistance, but also QTLs for other agronomic traits of interest which will contribute for programs of genetic cocoa breeding.

Key-words: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, plant height, stem girth, resistance genes, genetic mapping.

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo a cultura do cacau (*Theobroma cacao* L.) envolve aproximadamente dois milhões de produtores em mais de 50 países (KNIGHT, 2000). A produção mundial de cacau em 2004/2005 foi de três milhões de toneladas, sendo 70% desta produção oriunda de países do continente Africano e 30% do Sudoeste da Ásia e Américas do Sul e Central (GUYTON, 2006). Com uma produção aproximada de 1.275 mil ton, Costa do Marfim é o principal produtor mundial, seguido de Gana (530 mil ton), Indonésia (415 mil ton), Nigéria (170 mil ton) e Brasil (164 mil ton).

No Brasil, 70% da produção de amêndoas de cacau se concentra na Bahia, enquanto que os outros 30% são produzidos principalmente nos estados do Pará, Espírito Santo e Rondônia (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 2003). Além de representar uma importante fonte de renda para os produtores, a cultura do cacau possui um caráter conservacionista, porque seu plantio é realizado com árvores nativas nas regiões da Mata Atlântica.

A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (*Moniliophthora pernicioso*, AIME e PHILLIPS-MORA, 2005), é a principal enfermidade que afeta a cacauicultura no Brasil, encontrando-se disseminada em todos estados produtores. A vassoura-de-bruxa, juntamente com fatores estruturais e conjunturais (preço baixo no mercado interno, custo de produção elevado, defasagem do câmbio e falta de financiamento), reduziu a contribuição da produção de cacau brasileira no mercado mundial de 15% para 4,3%, entre os anos de 1989 e 1998 (PERES FILHO, 1998), transformando o Brasil, um país tipicamente exportador, em importador de cacau.

Obstáculos como o longo período de geração do cacaueteiro, o porte das plantas e o tempo necessário para produção de frutos em quantidade suficiente para a identificação de indivíduos resistentes, tornam o melhoramento visando resistência um processo extremamente lento. No entanto, nos últimos anos, técnicas moleculares têm sido utilizadas para identificação de progenitores e estudos de diversidade genética e origem dos materiais genéticos.

A obtenção de novas fontes de resistência a *M. pernicioso* tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do cacaueteiro. Atualmente, a base genética dos clones utilizados pelos agricultores no Brasil é estreita. Na região Sul da Bahia, também tem-se verificado um aumento da suscetibilidade ao *M. pernicioso* de progênies de cacaueteiro oriundas de cruzamentos com Sca 6. Em função disto, faz-se necessária a obtenção de novos genes de resistência a *M. pernicioso* em outros genótipos, diferentes da série 'Scavina', para produzir variedades que tenham maior estabilidade para resistência. A localização de QTLs ligados à resistência nos mapas de ligação destes genótipos permitirá a realização de seleções assistidas e a utilização da estratégia de piramidização de genes associados à resistência à vassoura-de-bruxa nos programas de melhoramento genético, diminuindo o tempo e o custo na obtenção de novas variedades de cacaueteiro.

Nesta perspectiva, foi plantada uma progênie oriunda do cruzamento interclonal entre TSH-1188 e CCN-51, que segrega para diversas características, dentre elas a resistência à vassoura-de-bruxa e o vigor vegetativo. Os cerca de 400 indivíduos dessa progênie foram analisados com base em quatro anos de avaliações fenotípicas no campo. Tal avaliação foi utilizada para subsidiar a escolha desta população para a construção de um mapa genético, com base em marcadores moleculares. Com base nesta população e no mapa genético a ser construído, espera-se identificar QTLs de resistência à vassoura-de-bruxa e de outras características agrônômicas de interesse.

No presente estudo, foram avaliados o vigor vegetativo e a resistência à vassoura-de-bruxa de 300 plantas dessa população. Além disso, as plantas dos extremos da distribuição de resistência foram genotipadas com *primers* microsatélites, visando identificar *primers* polimórficos com potencial de estarem associados aos genes de resistência à vassoura-de-bruxa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O cacauero

O cacauero é uma planta alógama, diplóide ($2n=20$), de pequeno genoma (genoma haplóide de 0,43 pg) (FIGUEIRA et al., 1992), nativa das florestas tropicais úmidas das Américas Central e do Sul, anteriormente classificada na família Sterculiaceae e gênero *Theobroma*, sendo que, recentemente, foi incorporado na ordem Malvales, família Malvaceae (ALVERSON et. al, 1999; APG II, 2003). Esta espécie é a mais importante economicamente dentre as 22 que compreendem o gênero *Theobroma* (COPE, 1976). Foi citado pela primeira vez em 1605 por Charles de L'Écluse que o denominou *Cacao fructus*. Em 1737, foi descrito por Carl Linnaeus como *Theobroma fructus*, sendo que essa classificação permaneceu até 1753, quando foi definitivamente designado como *Theobroma cacao* L.

Do seu provável centro de origem, na região do alto Amazonas (CHEESMAN, 1944), espalhou-se em duas principais direções, o que resultou nos dois principais grupos raciais: o Criollo, cultivado na Venezuela, na Colômbia, no Equador, no norte da América Central e no México; e o Forastero, no norte do Brasil e nas Guianas. Um terceiro grupo, denominado Trinitário, também é apresentado por alguns autores como originário de um cruzamento natural entre Criollo e Forastero. A maior parte (85%) da produção mundial de cacau provém do grupo Forastero, sendo este predominante também nas plantações brasileiras.

Cheesman citado por Cope (1976), localizou o centro de origem do *T. cacao* no leste equatorial declivoso dos Andes. Esta área da América do Sul parece admitir a mais ampla variabilidade, como reportado por Pound (1938) na sua expedição de coleta no baixo Amazonas. Entretanto, o local de cultivo mais antigo,

indubitavelmente é a América Central, pois a espécie tem sido ali cultivada por mais de 2000 anos.

Segundo Hardi (1960) o gênero *Theobroma* se originou na América do Sul, possivelmente na bacia amazônica. Este mesmo autor admite um centro de especiação nas montanhas do Pacífico, nos Andes Colombianos, onde recentemente tem-se encontrado novas espécies do gênero, sendo provável que este centro tenha sido estendido a costa atlântica da América Central.

2.2. Aspectos econômicos do cacau

O cacauero era uma árvore conhecida e cultivada pelos nativos americanos, principalmente Maias e Astecas, muito antes de Cristóvão Colombo descobrir a América. Suas amêndoas já circularam como moeda corrente em alguns países americanos (VELLO; 1972). Do México, os espanhóis levaram o cacau para outras terras conquistadas, dentre elas, os países da América Central, a Colômbia, a Venezuela e as ilhas do Caribe. Na América do Sul, a Venezuela foi um dos primeiros países a cultivar cacau. O México permaneceu como maior produtor de cacau do mundo até o século XVII. Da mesma forma que aumentou a demanda, o cultivo se estendeu, rapidamente, para outras regiões, inclusive no Brasil, sendo levado para o Estado da Bahia, em 1746. Após aproximadamente um século, em 1822, o cacau foi levado do Brasil para o oeste africano pelos portugueses. As sementes das cultivares tradicionais da Bahia foram levadas para a ilha de Príncipe, a partir das quais foram gerados os cacaueros que passaram a ser conhecidos como Amelonados do oeste africano. Passados alguns anos, o cacauero foi levado também para a ilha de Fernando Pó, depois para Gana, Nigéria, Costa do Marfim e Togo. Na República dos Camarões, o cacau foi introduzido pelos alemães, e daí saíram as sementes que originaram as plantações do sudeste asiático e da Oceania (WOOD,1985).

As principais regiões produtoras de cacau no mundo situam-se entre 15° N e 20° S de latitude, embora existam pequenas áreas de produção em latitudes subtropical (23° S), como é o caso do Estado de São Paulo. No entanto, a maior concentração de plantios está localizada entre as latitudes de 10° acima e abaixo do equador. Em verdade, os maiores plantios se concentram em regiões onde a

temperatura média gira em torno de 22 a 25° C e a precipitação pluvial é elevada e bem distribuída ao longo do ano, algo em torno de 1200 a 2000 mm, com um mínimo mensal variando entre 100 a 130 mm. A base geográfica da produção mundial compreende três áreas bem distintas, uma em cada continente. Na América, com ênfase para o Brasil, mais precisamente para o Estado da Bahia; na costa oeste africana, destacando-se Costa do Marfim, Nigéria, Gana e Camarões; e, ultimamente, no sudeste asiático, uma nova região produtora liderada por Malásia e Indonésia (DIAS, 2001).

De acordo com Dias (2001), a cadeia produtiva do cacau no Brasil envolve, atualmente, investimento da ordem de 2,3 bilhões de reais, sendo 1,7 bilhão no setor primário (terra, árvores e benfeitorias). A cultura é responsável por aproximadamente 300 mil empregos diretos, mas, do cacau, dependem mais de três milhões de pessoas. Praticamente 100 municípios da Bahia têm suas economias baseadas no cacau, o qual é cultivado em vinte e nove mil propriedades, em área superior a 700 mil ha.

A Costa do Marfim lidera, desde a década de 60, a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida, na ordem, por Gana, Indonésia, Brasil, Nigéria, Camarões, Malásia e Equador. Este rol de oito países concentra mais de 90% da oferta mundial. O Brasil, que até a década de 80 ocupava o 2º lugar desse ranking, caiu para o 5º lugar, em razão da progressiva redução da área plantada e do padrão tecnológico adotado, como resposta à queda dos preços internacionais, e do alastramento da doença vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia, o principal Estado produtor. Estima-se que doenças nos cacauais ocasionem perdas globais da ordem de 40%, alcançando, em determinados locais, até 90 ou 100% (ANDEBRHAN et al., 1998; RIOS-RUIZ et al., 2001). Como decorrência, na década de 1990 o Brasil transformou-se de exportador de cacau em amêndoas em importador desse produto, o que desencadeou um processo de empobrecimento da região sul baiana, provocado pela redução de até 100% na produção de cacau em diversas propriedades rurais. Esse fato resultou na falência de inúmeros produtores, no desemprego de milhares de trabalhadores rurais que migraram para outras regiões, na erradicação de lavouras em declínio para substituição por pastagens e café, na depreciação da infra-estrutura e desvalorização das propriedades rurais e, ainda mais, na exploração descontrolada de espécies arbóreas de valor ecológico e

econômico como alternativa de complementação da renda dos produtores descapitalizados pela crise.

No contexto do ecossistema do cacau, tem-se a reserva da biosfera da mata Atlântica, uma das maiores do mundo e que está entre as cinco áreas naturais do planeta mais ameaçadas de extinção. Sua importância é grande, seja pela extensão das áreas, seja pelas peculiaridades dos seus indivíduos. Trata-se da maior reserva de biodiversidade vegetal, com o maior índice de espécies por hectare e elevado percentual de plantas endêmicas. Na Bahia, os fragmentos florestais da mata Atlântica não se restringem apenas às áreas de declividade acentuada. Pelo contrário, atingem boa parte do litoral sulbaiano. Nessa região, a mata possui os seus mais significativos remanescentes, os quais fornecem sombra à grande maioria dos 700 mil ha de cacauzeiros, preservando o solo e a água. O cultivo do cacauzeiro nessa região foi, na sua maioria, implantado sob mata raleada, no sistema cabruca, e sua preservação deve ser perseguida a qualquer custo (SILVA, 1997).

2.3. Melhoramento genético do cacauzeiro

Inquestionavelmente, o melhoramento de plantas tem desempenhado papel fundamental no desenvolvimento da agricultura nas últimas décadas, gerando novas variedades em diversas espécies de interesse agrônomo. Apesar de ganhos genéticos significativos terem sido obtidos na seleção de várias características de interesse, a expectativa de progresso genético e obtenção de indivíduos ainda melhores persiste. Por esta razão, têm-se buscado sempre formas de continuar obtendo ganhos genéticos, tornando cada vez mais eficiente cada uma das etapas dos programas de melhoramento. Entretanto, é sabido que a essência deste progresso está na proporção do fenótipo de um indivíduo que expressa o seu genótipo. Sabe-se, ainda, que tradicionalmente a seleção é feita apenas com base no fenótipo e que, esta estratégia, tem tido sucesso para características de alta herdabilidade, mas nem sempre para aquelas de baixa herdabilidade. Isto, pelo fato de que a maioria das características selecionadas no melhoramento de plantas é de natureza quantitativa, ou seja, governada por vários genes. Embora estratégias como testes de progênies e seleção em gerações avançadas têm sido utilizadas

para minimizar as dificuldades da seleção, estas, não contornam os efeitos da interação entre genótipo e ambiente, que pode mascarar o fenótipo (DIAS, 2001).

Segundo Pereira et al (1999), no Brasil, o melhoramento genético do cacaueteiro teve início na década de 50, com as prospecções realizadas dentro das populações de Forastero do Baixo Amazonas, originalmente introduzidas na Bahia, e que, durante gerações, foram submetidas a uma seleção massal, praticada pelos próprios produtores da região. Entretanto, o grande desafio do melhoramento atual é produzir amêndoas secas de alta qualidade em cultivares precoces, de alta produção, temporalmente estáveis, que facilitem os tratos culturais e dotadas de resistência à doenças ou pragas de importância local e a um custo final mais baixo possível. Trata-se de colocar a nova tecnologia de produção a serviço do produtor, de modo que ele possa oferecer mais produto de alta qualidade todos os anos, a preço final mais competitivo. Os novos cultivares têm que oferecer, concomitantemente, todos esses atributos.

De acordo com Dias (2001), há consenso entre os melhoristas de cacauete de que a busca da máxima produção não basta. É necessário associá-la a fatores de resistência a pragas e doenças, de boa adaptabilidade local e temporal e de melhoria de qualidade.

2.4. Melhoramento do cacaueteiro para resistência à vassoura-de-bruxa

O primeiro programa de melhoramento do cacaueteiro visando a obtenção de genótipos resistentes a *M. pernicioso* foi iniciado no Equador a partir de 1918, através de seleção massal de plântulas originadas de árvores selecionadas sem sintomas conhecidas como 'refractarias' (BARTLEY, 1986). A resistência também, foi avaliada em cultivos comerciais em Trindade na década de 1930, mas apenas pequenas variações na reação à infecção foram detectadas (BAKER e HOLLIDAY, 1957). Na busca de materiais com resistência, cacaueteiros silvestres foram coletados no vale Amazônico por via seminal em 1938, e por via clonal em 1942 (POUND, 1938). Esses materiais foram enviados para Trindade, onde foram avaliados para resistência à *M. pernicioso*.

Os clones 'Scavina 6' (Sca 6) e 'Scavina 12' (Sca 12) destacaram-se como altamente resistentes, enquanto o genótipo 'IMC 67' foi considerado como

moderadamente resistente (BARTLEY, 1986). O clone 'SCA 12' era aparentemente heterozigoto para resistência, enquanto 'SCA 6' foi considerado homozigoto, mas devido à suas características agrônômicas inferiores, principalmente peso de sementes e autoincompatibilidade, esses genótipos não foram utilizados diretamente como clones, mas empregados como genitores de combinações híbridas.

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

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

Estudos de similaridade genética realizados com marcadores moleculares têm demonstrado uma alta similaridade entre estes genótipos e também entre seus descendentes. Uma similaridade genética de 93% entre SCA 6 e SCA 12 foi observada por Yamada et al. (2001), usando as análises combinadas de três sistemas de isoenzimas e 11 *primers* de RAPD. A alta similaridade destes genótipos decorre do fato de serem derivados de sementes do mesmo fruto (YAMADA et al., 2001). Santos et al. (2005) utilizando marcadores do tipo RAPD avaliaram a diversidade genética de trinta clones da série 'CEPEC' selecionados como resistentes a *M. pernicioso*. Vinte destes clones foram selecionados a partir de

descendentes do clone TSA 644, originado do cruzamento entre Sca 6 x IMC 67, e outros dez foram originados de cruzamentos entre clones do grupo forasteiro, alto e baixo amazônicos e trinitários. Os autores concluíram existir uma estreita base genética nos acessos avaliados.

No período de 1995 a 2002, vinte clones resistentes a *M. pernicioso* foram lançados pela CEPLAC, sendo a maioria destes genótipos descendentes de 'Scavina' ou 'IMC 67', como o híbrido Theobahia e os clones das séries EET, TSA e TSH.

Observações mais recentes têm revelado a quebra de resistência de alguns destes clones em condição de campo na região Sul da Bahia (ALBUQUERQUE et al., 2005).

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

Leal (2004), avaliando a similaridade genética por meio de marcadores moleculares de 102 acessos de cacauero selecionados como resistentes a *M. pernicioso* em plantios comerciais do Sul da Bahia, concluiu que 92 destes eram muito próximos geneticamente tendo como possíveis genitores clones das séries Scavina, TSH e EET. Por outro lado, Monteiro (2006, dados não publicados) identificou que 32 seleções resistentes à vassoura-de-bruxa em condição de fazenda foram diferentes de 'Scavina' e outros materiais típicos derivados deste.

Uma grande diversidade genética foi encontrada por Marita et al. (2001) ao avaliarem a variabilidade dos clones de cacauero que apresentaram baixa incidência de vassoura-de-bruxa nos bancos de germoplasma do CEPEC. De 270 clones avaliados, 180 foram classificados como resistentes por apresentarem baixa incidência da doença. Dos clones resistentes, 67% pertenciam a série brasileira Cruzeiro do Sul ou eram descendentes de Sca 6 ou Sca 12. Paim (2005), objetivando selecionar novas fontes de resistência a *M. pernicioso*, avaliou o comportamento de 40 famílias de clones da série CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) nas condições do Sul da Bahia. Após seis anos de avaliações em campo,

as famílias dos CAB 0066, CAB 0194 e CAB 0195 foram as que apresentaram maiores níveis de resistência ao patógeno, sendo inclusive superiores as famílias de Sca 6.

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

Para a identificação de novas fontes de resistência e a identificação dos genes de interesse, é necessário selecionar genótipos resistentes e avaliar progênies que possuem um pool gênico complementar para a resistência e outras características agronômicas diferente daqueles que foram identificados nos mapas genéticos atuais.

2.5. Marcadores, mapeamento e análise de grupos segregantes

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Os marcadores moleculares são abundantes nos genomas vegetais e não sofrem influências ambientais, revelando diretamente os polimorfismos de seqüências de DNA. Marcadores moleculares, baseados ou não na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido largamente empregados nos programas de melhoramento de plantas, como na caracterização de populações, construções de mapas de ligação e detecção de QTL entre outras aplicações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

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

microssatélites; RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição obtidos por cortes aleatórios da fita dupla de DNA).

As características desejáveis para os marcadores moleculares são: alto nível de polimorfismo; distribuição em todo o genoma; sem efeito seletivo; herança co-dominante. Assim, as análises serão isentas de interferências ambientais e todos os possíveis genótipos tendem a ser identificados. Além disso, devem ser preferencialmente de baixo custo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

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

Microssatélites têm sido amplamente utilizados em muitas espécies de plantas por serem abundantes, com freqüência média de um a cada 50 mil pares de bases, possuírem alto grau de polimorfismo, serem loco-específicos, apresentarem reprodutibilidade dos resultados, baixa quantidade de DNA requerida nas análises, serem detectados facilmente utilizando gel de agarose, poliacrilamida ou através de seqüenciamento automático (PUGH et al., 2004). Atualmente existem muitos locos de microssatélites para o cacaueteiro, os quais foram mapeados e estão distribuídos ao longo dos 10 cromossomos (LANAUD et al., 1999; PUGH et al., 2004; BROWN et al., 2005).

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

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

O desenvolvimento de mapas genômicos envolve a seleção da população mais apropriada para mapear; o cálculo das freqüências de recombinação em pares, usando esta população; o estabelecimento de grupos de ligação; a estimativa das distâncias no mapa entre marcas e a determinação da ordem linear por marcadores, de forma a minimizar os eventos de recombinação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A escolha de genitores para desenvolvimento de mapas genômicos é crítica em plantas perenes arbóreas e o tipo de marcador a ser utilizado deve ser considerado. Os genitores devem ser importantes no programa de melhoramento, apresentar nível satisfatório de polimorfismo para o tipo de marcador a ser usado, além de segregar para várias características qualitativas e quantitativas de importância (componentes de produção e resistência à doença, etc.) e de qualidade do produto, para maximizar a obtenção de informações (FIGUEIRA e CASCARDO, 2001).

Em geral, os mapas genéticos do cacauero vêm sendo gerados a partir de progênes F_1 , derivadas de cruzamentos entre genitores heterozigotos. Para construções destes mapas utilizam-se marcadores dominantes, explorando a configuração de *pseudo-testcross* e marcadores co-dominantes (LANAUD et al., 1995; RISTERUCCI et al., 2000; FLAMENT et al., 2001; CLÉMENT et al., 2003; PUGH et al. 2004; BROWN et al., 2005). Para o *pseudo-testcross* são construídos dois mapas, sendo um para cada genitor, baseado na segregação de marcadores co-dominantes, como RFLPs, microssatélites e isoenzimas, que permitem a fusão dos diversos mapas, ou ainda a comparação direta com o mapa de referência estabelecido para o cacauero (PUGH et al. 2004). Os marcadores dominantes

(RAPDs e AFLPs), mais abundantes, foram usados para saturar esses mapas genéticos. Para o cacaueteiro, comumente um genótipo altamente heterozigótico é cruzado com um genótipo mais homozigoto, tal como o mutante albino 'Catongo'. Alternativamente, já foi utilizada para mapeamento uma população de retrocruzamento, derivada de uma única planta F₁ retrocruzada com o genitor mais homozigoto (CROUZILLAT et al., 1996), enquanto que em outros casos específicos, populações F₂ foram especialmente geradas e usadas para a identificação de regiões genômicas associadas com sabor de chocolate e qualidade da semente (CROUZILLAT et al., 2001; ARAÚJO, 2002) e resistência à *M. pernicioso* (QUEIROZ et al., 2003; BROWN et al. 2005; FALEIRO et al., 2006).

O primeiro mapa de ligação do cacaueteiro foi desenvolvido para a população F₁ de 100 indivíduos do cruzamento entre os clones UPA 402 x UF 676 (LANAUD et al., 1995). Foram formados dez grupos de ligação, cobrindo 759 cM e contendo 193 locos, incluindo cinco de isoenzimas, 160 de RFLPs, sendo 101 de cDNA, 55 de sondas genômicas e quatro de genes de funções conhecidas e 28 locos de RAPD. Este mapa foi posteriormente saturado com marcadores adicionais, tendo sido incluídos mais 18 locos de RFLP (três sondas de cDNA, dez genômicos, dois genes de funções conhecidas, e três sondas teloméricas); dois locos de RAPD; 191 locos de AFLP e 20 de microssatélites, totalizando 424 marcadores, englobando 885,4 cM com espaçamento médio entre marcadores de 2,1 cM (RISTERUCCI et al., 2000). Pugh et al. (2004) realizaram a mais recente saturação do mapa consensual do cacaueteiro acrescentando mais 35 indivíduos à população F₁ originalmente utilizada por Lanaud et al. (1995). A versão mais atualizada do mapa consensual do cacaueteiro conta com dez grupos de ligação, cobrindo 782,8 cM e contendo 465 locos, dos quais 268 são de microssatélites, 176 de RFLPs, cinco de isoenzimas e 16 de Rgenes-RFLP. A média de distância entre cada marcador é de 1,7 cM. Pelo menos 13 outros mapas de ligação já foram desenvolvidos e utilizados principalmente para identificar regiões genômicas associadas com componentes de produção, vigor e resistência à várias espécies e isolados de *Phytophthora* que atacam o cacaueteiro em todas as partes do mundo e também para resistência a *M. pernicioso* (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001; FIGUEIRA; ALLEMANO, 2005).

Para identificação de regiões genômicas associadas à resistência a *M. pernicioso*, um mapa genético foi desenvolvido no Brasil para uma população de 82

indivíduos F_2 derivados da autofecundação do genótipo 'TSH 516', um híbrido selecionado do cruzamento de 'ICS1' x 'Scavina 6' (QUEIROZ et al., 2003). O mapa genético continha 124 marcadores RAPD e 69 AFLP em 25 grupos de ligação, cobrindo 1.713 cM, e permitiu a identificação de um loco principal de QTL, responsável por cerca de 35% da variância fenotípica para resistência a *C. perniciosus*, avaliada sob condições de campo por dois anos. Esse mapa genético foi recentemente saturado para um total de 343 marcadores (232 RAPD; 77 AFLP; e 33 microssatélites), perfazendo 19 grupos de ligação com um total de 670 cM (FALEIRO et al., 2006). Novas avaliações de resistência foram conduzidas num período de seis anos, permitindo a confirmação do QTL descrito por QUEIROZ et al. (2003). Na saturação do mapa, três locos de microssatélites (*mTcCIR35*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24*) foram mapeados nessa mesma região do QTL sendo que esses locos já haviam sido mapeados no cromossomo IX do mapa consensual (RISTERUCCI et al., 2000; KUHN et al., 2003). Um novo mapa para a população F_2 de autofecundação de 'TSH 516' foi recentemente construído por Brown et al. (2005). Neste mapa 146 indivíduos foram genotipados com 182 marcadores sendo 170 microssatélites, oito genes homólogos de resistência (RGH) e quatro genes candidatos relacionados a estresse (WRKY). O comprimento total do mapa foi estabelecido em 671,9 cM. Dois QTLs foram encontrados, um no grupo de ligação IX, como já descrito por Queiroz et al. (2003) e Faleiro et al. (2006) e outro no grupo I, com porcentagem de variação fenotípica de 51% e 6%, respectivamente. O QTL do grupo de ligação I foi localizado próximo das marcas *mTcCIR22*, *mTcCIR264* e *RGH11*, enquanto que o QTL do grupo IX foi próximo das *mTcCIR24*, *mTcCIR35* e *mTcCIR157*. Ambos os QTLs tiveram efeito de dominância para resistência a *M. perniciosus*, sendo que o QTL de maior efeito do grupo IX foi originário do 'SCA 6' e o de menor efeito do grupo I foi herdado de 'ICS 1'.

Albuquerque (2006) detectou três QTLs associados à resistência à vassoura-de-bruxa, um no grupo de ligação VIII de ICS 39 x CAB 0208 e dois no mapa de ICS 39 x CAB 0214, sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo IX. A relação genética entre os dois clones CAB genitores das populações contrastantes e 81 genótipos de cacauero utilizados como fontes de resistência a *M. perniciosus* foram baseadas nas frequências alélicas de 20 locos de microssatélites. A não existência de relação de parentesco e a alta dissimilaridade genética encontrada entre o clone

Sca 6 e os CAB 0208 e CAB 0214 reforça a possibilidade destes acessos possuírem diferentes genes de resistência a *M. perniciosa*.

Para um ou poucos genes (oligogenes) controlando um caráter tal como resistência à dada doença, marcadores moleculares ligados a eles podem ser identificados rapidamente pela metodologia de análise de grupos segregantes (BSA – bulked segregant analysis) (MICHELMORE et al., 1991). Conforme Ferreira e Grattapaglia (1998), a análise de grupos segregantes é um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma. O método envolve a comparação de dois conjuntos de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada conjunto, os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois grupos contrastantes para uma característica (por exemplo: resistência ou suscetibilidade a uma doença particular) são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Marcadores que são polimórficos entre os grupos serão geneticamente ligados ao loco que determina a característica usada para construir os grupos. A viabilidade da aplicação de BSA visando a seleção precoce de marcadores RAPD ligados a genes de suscetibilidade a *Verticillium dahliae* em cacau foi demonstrada (CASCARDO et al., 1995). A resistência a *V. dahliae* apresentou herança monogênica, condicionada por um gene recessivo e a suscetibilidade pelo alelo dominante.

2.6. Seleção precoce e medidas de vigor em cacauero

Qualquer processo seletivo demanda tempo e recurso e por essa razão deve ser o mais eficiente possível. Existem vários fatores que interferem no processo seletivo visando obtenção de cultivares melhorados, e o conhecimento dos mesmos é primordial para se obter o máximo de sucesso com a seleção. Em se tratando de plantas perenes, como é o caso do cacauero, o número de anos para se completar um ciclo de seleção é o principal entrave dos programas de seleção recorrente.

Dessa forma, a contribuição do número de anos para se completar um ciclo seletivo na expressão do ganho com a seleção é expressiva. Devem-se utilizar alternativas que visem diminuir o tempo necessário para completar um ciclo de seleção, ou seja, promover a seleção na idade mais juvenil possível. Algumas

metodologias têm sido propostas com o objetivo de avaliar a eficácia da seleção precoce, tais como: o estudo da flutuação de parâmetros genéticos e fenotípicos no decorrer das idades (OTEGBEYE, 1991); a estimativa da interação genótipo x idade (REZENDE, 1994; BERTOLUCCI e RAMALHO, 1994); as estimativas da resposta correlacionada com a seleção (RIEMENSCHNEIDER, 1988; BORRALHO, COTTERILL E KANOWSKI, 1992; VARGAS-HERNANDEZ e ADAMS, 1992; GURGEL GARRIDO e KAGEYAMA, 1993; LI et al., 1992; MARQUES JR., 1995); a estimativa do coeficiente de determinação (R^2) (WAKELEY, 1971; SQUILLACE e GANSEL, 1974; MOURA, MELO e SILVA, 1993; MARQUES JR., 1995). Para avaliar a eficácia da seleção precoce, como citado acima, várias metodologias são empregadas, dentre elas, a estimativa da correlação nas diferentes idades (LAMBETH, 1980; KAGEYAMA e VENCOVSKY, 1983) é bastante utilizada.

O cacauero, a exemplo de outras espécies arbóreas perenes, apresenta aspectos fisiológicos, biológicos reprodutivos e fitotécnicos muito peculiares. Os ciclos produtivos e reprodutivos longos, a sobreposição de gerações, a presença de auto-incompatibilidade genética em muitas das populações, a expressão fenotípica de diversos caracteres ao longo do tempo com mudanças temporal no controle genético deles e a possibilidade da reprodução sexuada e assexuada diferenciam o melhoramento de espécies arbóreas perenes como o cacauero. Ademais, as exigências de grandes áreas experimentais e de avaliações ao longo do tempo expõem as árvores às adversidades climáticas e ao ataque de pragas e patógenos, comprometendo a taxa de sobrevivência dos indivíduos. Estes aspectos dificultam a estimação de parâmetros genéticos tão freqüentemente obtidos no melhoramento das espécies anuais. Em conseqüência, o melhoramento de espécies perenes como o cacauero exige a utilização de métodos de seleção mais acurados (DIAS e RESENDE, 2002; RESENDE, 1999; RESENDE e DIAS, 2000) que considerem a necessidade das avaliações sucessivas e consecutivas no tempo feitas no mesmo indivíduo, a comparação de indivíduos de diferentes gerações sob diferentes condições ambientais, a seleção visando à propagação seminal, a seleção visando a propagação vegetativa e a seleção que priorize a árvore em detrimento da média do grupo delas, por meio da predição do seu valor genético aditivo e não aditivo. Por último, o uso de métodos de seleção acurados ganha relevância no trato de dados desbalanceados, comuns na experimentação com o cacauero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas cerca de 400 plantas da progênie originária do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51. O cruzamento foi realizado através de polinização manual protegendo-se os botões florais, no dia anterior e por 24 horas após a polinização, com um segmento de tubo plástico transparente vedado por uma borracha para evitar qualquer tipo de contaminação por pólen estranho, no Centro de Estudos Almirante Cacau, no ano 2000. Os frutos foram colhidos, após seis meses de polinização, as sementes separadas, identificadas e pesadas por fruto. Cada semente recebeu uma identificação referente ao número do fruto e da semente, o que identifica cada planta em campo, sempre no sentido de evitar misturas. As mudas tiveram os tratamentos culturais recomendados para cacau, com adubação, irrigação e controle de doenças e pragas. O diâmetro e a altura de cada planta foi medido aos três e aos nove meses antes de serem plantadas no campo. Aos nove meses as plantas foram transplantadas para o campo em covas de 40 x 40 x 40 cm, no espaçamento de 3,0 x 3,0 m. A área em que foram plantadas as mudas estava sombreada, com bananeiras e com algumas espécies da Mata Atlântica. Após o plantio as mudas receberam todos os tratamentos culturais preconizados para a cultura do cacau pela CEPLAC para região sul da Bahia.

O clone TSH 1188 ("Trinidad Selected Hybrids") originou-se de cruzamentos envolvendo os clones IMC 67, ICS 1, Sca 6 e P 18, produz frutos vermelhos e com rugosidade áspera (CEPEC, 1987), e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa (LUZ et al., 1997).

O CCN 51 ("Colección Castro Naranjal") é oriundo de uma planta F₁ do cruzamento entre ICS 95 x IMC 67, cruzada com um clone nativo do oriente equatoriano denominado "Canelos" (BARTLEY, 1986). Esse clone produz frutos vermelho-arroxeados quando imaturos, passando a amarelo-alaranjados quando maduros, com casca levemente enrugada e sementes com coloração interna púrpura clara, apresentando resistência mediana à vassoura-de-bruxa e alta produtividade (CAMPO; ANDÍA, 1997).

3.2. Avaliação da resistência à vassoura-de-bruxa

3.2.1. Resistência em campo por infecção natural

O experimento foi implantado em uma área com alguns cacauzeiros adultos, suscetíveis e próximo a lavouras de cacau infectadas com vassoura-de-bruxa que funcionou como fonte natural de inóculo. A incidência de vassouras nas 300 plantas da progênie, pais e no controle para suscetibilidade (cacau comum) foram realizadas durante o período de janeiro de 2000 a abril de 2004, contando e etiquetando as vassouras por planta. A variável observada foi o número de vassouras vegetativas por planta por ano. Após cada contagem, as vassouras vegetativas eram retiradas e penduradas na própria planta.

3.2.2. Inoculação artificial com suspensão de basidiósporos

Frutos e ramos com sintomas da doença vassoura-de-bruxa foram coletados ao acaso de plantas de cacauzeiro de outra população e, após a secagem, os materiais infectados foram mantidos em gabinetes (em laboratório), ou em telados (no campo) denominados de "vassouzeiros" para produção dos basidiocarpos de *M. perniciosus*. Nos vassouzeiros do tipo gabinete, as condições de luz, temperatura e umidade foram controladas, seguindo metodologia descrita por Rocha e Wheeler (1985). Os materiais infectados foram submetidos a um regime de molhamento de 8 h seguidos de secagem por 16 h (SILVA, 1997). Nos vassouzeiros do tipo telado,

procurou-se estabelecer um regime de 12 h de molhamento, seguido de 12 h de secagem.

Os basidiocarpos produzidos nos vassoureiros foram lavados em água destilada e posteriormente imersos por alguns segundos em solução de 1% cloranfenicol. Após a imersão na solução, os basidiocarpos foram lavados mais duas vezes em água destilada. Os basidiocarpos tiveram seus estipes removidos, e somente os píleos foram colocados no interior de tampas de placas de Petri, contendo gel de silicone para aderência dos mesmos. As tampas com os basidiocarpos foram colocadas sobre béqueres contendo solução de 16% glicerol sob agitação constante à temperatura ambiente, para liberação dos basidiósporos (Figura 1A). Decorridas 12 h de liberação, os basidiocarpos foram descartados e a suspensão de esporos foi filtrada em membrana tipo Millipore® (0,45 µm). Os basidiósporos retidos na membrana foram ressuspensos novamente em suspensão de 16% glicerol, posteriormente distribuída em tubos plásticos de 2 mL e congeladas em nitrogênio líquido, onde permaneceram em bujões até o momento das inoculações das plântulas.



Figura 1. Inoculação artificial. (A) Obtenção de basidiósporos de *M. perniciosus*; (B) inoculação de ramos novos de cacaueiros em campo; (C) ensacamento dos ramos inoculados.

Com o auxílio de uma micropipeta, cada planta foi inoculada com 30 µL de uma suspensão de 1×10^5 basidiósporos/mL contendo 25% de agar-agar, em 4 ramos diferentes. A suspensão foi distribuída nos lançamentos novos na região das axilas das folhas de 50 plantas (Figura 1B). Após as inoculações, cada um dos quatro ramos foi ensacado com saco plástico transparente, embebido em água

destilada, com o intuito de formar uma câmara úmida com aproximadamente 100% de umidade relativa durante 24 horas (Figura 1C). Após esse período, os sacos plásticos foram retirados, procedendo-se à identificação de cada ramo inoculado.

Como padrão de suscetibilidade foram utilizadas progênies de polinização aberta de cacau comum. As avaliações dos níveis de resistência das famílias foram realizadas 60 dias após as inoculações, contando o número de vassouras vegetativas de cada ramo inoculado.

3.2.3. Análise estatística

Para os dados provenientes de plantas submetidas à inoculação natural, foram realizadas as seguintes análises: cálculo da distribuição de frequência da característica número de vassouras vegetativas (NVV); cálculo da repetibilidade; e teste de médias. Além disso, foi realizada uma análise de variância para testar se houve efeito do fruto nas características altura do fuste (AF), diâmetro do caule (DC) e NVV, considerando as progênies de cada fruto como uma repetição.

Para os dados provenientes de plantas submetidas à inoculação artificial, foram calculadas as médias do número de vassouras vegetativas por ramo.

Todas estas análises foram realizadas com o auxílio do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS, 1989).

3.3. Avaliação do vigor vegetativo

3.3.1. Altura do fuste e diâmetro do caule

A AF foi medida do solo até a primeira forquilha lançada utilizando-se uma fita métrica. O DC foi medido na base da planta, em uma posição marcada com tinta amarela ainda em viveiro, para manter a uniformidade de medição após o crescimento, utilizando-se um paquímetro. As medidas foram tomadas aos 3, 9, 24 e 48 meses, em 300 plantas.

3.3.2. Análise estatística

Foram calculadas estatísticas descritivas das características altura do fuste e diâmetro do caule, com base nos valores máximo e mínimo, no desvio padrão, na distribuição da frequência e nas medidas de correlação em diferentes estágios de crescimento, com auxílio do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS, 1989).

3.4. Avaliação molecular

3.4.1. Extração de DNA

Um total de 16 indivíduos, sendo os dois progenitores, CCN 51 e TSH 1188, foram utilizados neste estudo. As 14 progênies foram escolhidas de acordo com o nível de resistência à vassoura-de-bruxa por inoculação natural e, posteriormente, confirmadas por inoculação artificial em campo, sendo selecionados sete plantas resistentes (pois nos dois tipos de avaliação da resistência não apresentaram infecção por VB) e sete plantas suscetíveis (pois apresentaram um número de vassouras vegetativas que variaram de 3 a 5 vassouras por planta). Esta estratégia derivou da metodologia de análise de bulks segregantes (MICHELMORE et al, 1991), aqui modificada para adequar-se à análise de microssatélites. A adaptação consistiu em amplificar individualmente as amostras de DNA de cada planta integrante dos grupos resistentes e suscetíveis, em vez de misturá-los em grupos coma na técnica de análise de grupos segregantes (BSA) originalmente desenvolvida para marcadores RAPD.

As extrações de DNA das 16 plantas foram realizadas a partir de folhas jovens e saudáveis. O protocolo de extração utilizado foi o de Doyle e Doyle (1990), considerando-se as modificações previamente estabelecidas para outras plantas e que vêm sendo utilizadas com sucesso na extração de DNA de espécies como o cacau, jacarandá, pau-brasil (CORRÊA et al., 1999; ALMEIDA, 2001; FALEIRO et al., 2001). Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido de folha de cada indivíduo foram maceradas em presença de nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidas para tubos Ependorff® de 2 mL, adicionando-se aos mesmos 800 µL de

tampão [tris-HCl 100 mmol.L⁻¹, pH 8,0; EDTA 20 mmol.L⁻¹, pH 8,0; NaCl 1,4 mol.L⁻¹; 0,2% (v/v) β- mercaptoetanol, 2% CTAB, 1% polivinilpirrolidona e 0,1 mg de proteinase K]. Após 60 min em banho-maria a 65 °C, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Aos sobrenadantes adicionaram-se 800 µL de 24:1 clorofórmio: álcool isoamílico, agitando por cinco min, seguindo de centrifugação a 10.000 g por dez min. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Os sobrenadantes transferidos para novos tubos, receberam isopropanol gelado, na proporção de 1:1 (isopropanol: sobrenadante), e centrifugados a 10.000 g por cinco min. Descartaram-se os sobrenadantes e os precipitados foram lavados com 1 mL de solução 70% de etanol por 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos ao ar por 12 h e ressuspensos em solução de TE (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, EDTA 1 mmol.L⁻¹, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 40 µg e incubados em banho-maria a 37° C por 60 min. As amostras de DNA foram purificadas com Kit Prep-A-Gene-Mapris da BIO RAD.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 3 µL de cada amostra, adicionada de 3 µL do corante tipo IV (Bromofenol Blue a 0,25 %, sacarose 40 %) aplicada em gel de agarose a 0,8 %, utilizando como tampão de corrida o TBE 1X (EDTA 2 mol.L⁻¹; Tris-borato 9 mol.L⁻¹).

A corrida eletroforética foi realizada com 80 V, durante 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídio a 10mg/mL, fotodocumentados sob luz ultra violeta (UV) com o sistema da VILBER LOURMAT. A concentração do DNA de cada amostra foi estimada pelo espectrofotômetro a 260 nm Cary Winv 50, utilizando-se o software RNA&DNA (SAMBROOK et al., 1989) e, em seguida diluída para 10ng/µL.

3.4.2. Amplificação de DNA com *primers* microssatélites

Os *primers* microssatélites utilizados foram isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999) (Tabela 1). Além disso, foram incluídos *primers* que geraram marcadores associados a genes de resistência a vassoura-de-bruxa (FALEIRO et al., 2006; BROWN et al., 2005).

Tabela 1. *Primers* microssatélites utilizados nas reações de PCR dos indivíduos selecionados e progenitores

<i>Primer</i>	Loco	Seqüência do <i>primer</i>		T (°C)	C	COR	Estrutura da Repetição
		<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>				
Y16978	mTcCIR2	CAG GGA GCT GTG TTA TTG GTC A	AGT TAT TGT CGG CAA GGA GGA T	51	254	FAM	(GA) ³ N ⁵ (AG) ² GG (AG) ⁴
Y16984	mTcCIR10	ACA GAT GGC CTA CAC ACT	CAA GCA AGC CTC ATA CTC	46	208	FAM	(TG) ¹³
Y16985	mTcCIR11	TTT GGT GAT TAT TAG CAG	GAT TCG ATT TGA TGT GAG	46	298	NED	(TC) ¹³
Y16989	mTcCIR16	ACC TTC ACC AGC TCA CC	TAA ATT CTA CTA GCA AAT TAC C	46	308	FAM	(TC) ⁹ N ³⁷ (TC) ¹³
Y16990	mTcCIR17	AAG GAT GAA GGA TGT AAG AGA G	CCC ATA CGA GCT GTG AGT	51	271	NED	(GT) ⁷ N ⁴ (GA) ¹²
Y16991	mTcCIR18	GAT AGC TAA GGG GAT TGA GGA	GGT AAT TCA ATC ATT TGA GGA TA	51	345	VIC	(GA) ¹²
Y16994	mTcCIR21	GTC GTT GTT GAT GTC GGT	GGT GAG TGT GTG TGT TTG TCT	46	157	NED	(TC) ¹¹ N ⁵ (CA) ¹²
Y16996	mTcCIR24	TTT GGG GTG ATT TCT TCT GA	TCT GTC TCG TCT TTT GGT GA	46	198	VIC	(AG) ¹³
Y16997	mTcCIR25	CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG	TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT	46	153	VIC	(CT) ²¹
AJ271822	mTcCIR29	CGA CAT TTC GAC TTT CAT C	TTT TGT TTC TTT CTT TTT CAT T	46	172	VIC	(CA) ¹⁰
AJ271823	mTcCIR30	TGA AGA TCC TAC TGT TGA G	TGA TAA TAA CTG CTT AGT GG	46	182	NED	(CA) ¹¹
AJ271824	mTcCIR31	GCA TGC TTC TTT ACT CCA	TTA CCT GCC AAT GAC TTA C	46	338	NED	(GT) ¹²
AJ271826	mTcCIR33	TGG GTT GAA GAT TTG GT	CAA CAA TGA AAA TAG GCA	51	285	NED	(TG) ¹¹
AJ271828	mTcCIR35	TTT CCT TGT ATT GAC CTA	ATA TAA ACA CAC TTC AGA GAT	46	235	FAM	(GT) ¹¹
AJ271944	mTcCIR42	TTG CTG AAG TAT CTT TTG AC	GCT CCA CCC CTA TTT G	46	232	NED	(GT) ¹⁵
AJ271945	mTcCIR43	TCA TGA GAA TGC ATG TG	CTG GAC ATG AAG AAG TTA T	46	206	NED	(GT) ¹¹
AJ171951	mTcCIR49	GTA AAG CAC ATA TAC TAA ATG TCA	TTT AAC CTT TGT AAG AAG TAT TCA	46	197	FAM	(TG) ⁸
AJ271953	mTcCIR54	AAC CTC TTG TCA CGT TA	GAA GGC ATA CTT ACT ACT GT	46	165	FAM	(CA) ¹⁵

(T °C) temperatura de pareamento do *primer*, em °C; e (C) tamanho esperado do alelo, em pares de bases. (LANAUD et al., 1999); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; (COR) NED = fluorescência amarela; VIC = fluorescência verde; FAM = fluorescência azul

Para análise dos fragmentos amplificados, foram utilizados géis de agarose corados com brometo de etídio e géis de poliacrilamida utilizando o seqüenciador automático ABI 377. Após as amplificações, 15 *primers* foram testados em gel de agarose segundo o procedimento descrito a seguir: adicionou-se 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água às amostras dos produtos de PCR dos genitores, que foram aplicadas em gel de agarose 3%. O gel foi submerso em tampão TBE 1 X (Tris-Borato 90 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, três horas e meia, a 100 volts. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta.

Trinta e dois *primers* marcados com fluorescência azul (FAM), verde (VIC) e amarelo (NED), foram utilizados para amplificar DNA de 16 amostras vegetais selecionadas e aplicados em gel de poliacrilamida, no seqüenciador automático 377 da ABI Prism. Essas amplificações ocorreram em um volume final de 15,5 µL de mistura contendo: Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ (pH 8,3), KCl 50 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 2,4 mmol.L⁻¹, 0,15 mmol.L⁻¹ de cada um dos desoxirribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pmol de cada um dos dois *primers* (*forward and reverse*), meia unidade da enzima *Taq* polimerase (CENBIOT) e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador da PTC-100 MJ Research, InM, conforme o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 60 °C –1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos à temperatura específica para cada *primer* + 60 segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C, sendo que após a amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4°C. Um volume de 2,0µL da amplificação final de três fluorencências diferentes foram adicionadas a 2,0µL de formamida desionizada da marca USB a 1 %, *Loading Buffer Part No: 360974*, constituída com Blue Dextran/EDTA e o padrão de peso molecular ROX500, ambos da Applied Biosystems. As amostras foram desnaturadas no termociclador por 4 minutos a 94°C. As reações concentradas foram diluídas numa proporção de 1/10 para as três fluorescências FAM, VIC e NED e os pares de *primers* foram agrupados em triplex conforme especificação do filtro GS 36A 2400, utilizado no seqüenciador automático de DNA ABI 377. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, no seqüenciador numa voltagem constante de 2400 V, por um período de três horas e meia.

Após a obtenção dos géis, os dados foram analisados utilizando-se os programas GENESCAN e GENOTYPER. O Genescan foi utilizado na elaboração dos projetos para análise de dados, extraíndo os eletroesferogramas dos géis e determinando o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, utilizando-se padrão de peso molecular (ROX500). As informações armazenadas nesse projeto foram analisadas, por meio do programa Genotyper, com base na presença ou ausência de fragmentos, gerando-se, assim, uma matriz de dados binários.

3.4.3. Análises estatísticas

Os dados genotípicos obtidos com os 18 *primers* selecionados pela sua viabilidade, foram convertidos em planilhas de dados binários, foram utilizados para classificar os locos quanto à origem dos fragmentos e identificar, visualmente, os padrões de alelos típicos dos grupos de plantas resistentes e suscetíveis. Além disso, os indivíduos foram plotados no plano fatorial a partir das porcentagens de variação genética obtida com auxílio do programa *Genetix* v.4.05.2 (BELKHIR et al., 1999).

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

Foram feitas análises de variância para todas as combinações de marcadores polimórficos e número de vassouras vegetativas. A existência de ligação entre um loco marcador e um carácter quantitativo foi admitida quando houve diferença altamente significativa ($p \leq 0,005$) entre o valor fenotípico e o marcador. A identificação de marcadores moleculares associados à NVV foi feita pela análise de regressão simples. A proporção da variação fenotípica explicada pela associação carácter-marcador, foi estimada pelo coeficiente de determinação (R^2) (EDWARDS et al., 1987). Foi ainda realizado um teste de comparação de médias entre as classes genotípicas apresentadas. Todas as análises foram feitas utilizando o programa computacional SAS (SAS Institute, 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resistência da progênie à vassoura-de-bruxa

A curva da distribuição de frequência do NVV está distorcida no sentido da maior resistência, sugerindo a existência de genes de efeito dominante no controle deste caráter (Figura 2). A resistência para *M. perniciosa* tem uma herança poligênica (PIRES et al, 1999), mas em progênies que possuem o QTL para a resistência a vassoura-de-bruxa proveniente do clone Sca 6, como é o caso da progênie em estudo, cujo QTL do Sca 6 originou-se do clone TSH 1188, ele tem um efeito maior no controle da resistência (AHNERT, 2000; BARTLEY 1977; PIRES et al, 1999). Por outro lado, o clone CCN 51 possui fontes alternativas para resistência à vassoura-de-bruxa, também poderia estar contribuindo para a distorção da curva no sentido de maior resistência. Uma provável piramidação de genes provenientes do Sca 6 e de fontes de resistência oriundas do CCN 51, poderá ser confirmada com estudos posteriores de mapeamento genético desta população.

No histograma de frequência para NVV, observa-se segregação da característica resistência à vassoura-de-bruxa, notando-se que a maioria das plantas possuem um nível alto de resistência, variando desde nenhuma vassoura por planta até mais de quatro vassouras por planta, indicando que a população é apta para mapeamento genético (Figura 2). Na Tabela 2 observa-se as médias do número de vassouras nos diferentes tipos de indivíduos analisados (cacau comum, progênie, progenitores), onde a média dos indivíduos 'cacau comum' foi bem superior as da progênie e progenitores, confirmando que existe infecção na área do experimento.

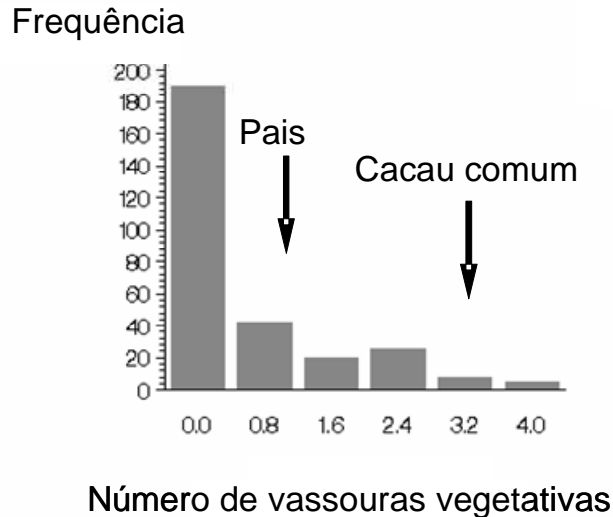


Figura 2. Histograma de freqüência de 300 plantas do cruzamento TSH 1188 x CCN 51, relativa ao número médio de vassouras vegetativas por planta de cacau (*Theobroma cacao*), médias dos pais e Catongo baseadas em 12 e 25 indivíduos, respectivamente.

Tabela 2. Comparação de médias dos genitores e dos grupos progênie e Catongo,

Material vegetal	Médias
Cacau comum (Controle suscetível)	3,188 ^a
Progênie	0,757 ^b
CCN 51	0,167 ^b
TSH 1188	0,111 ^b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Ducan a 5% de probabilidade.

Os resultados das análises de variância das características altura do fuste, diâmetro do caule e número de vassouras vegetativas encontram-se na Tabela 3. Para verificar se sementes originárias de diferentes frutos produziam efeitos nas características avaliadas realizou-se uma ANOVA entre os frutos que originaram as plantas segregantes. Para todos os caracteres não houve diferença estatística (teste F, $\alpha = 0.05$) entre os frutos dos quais as progênies foram obtidas. Portanto, nas análises de co-segregação (mapeamento), pode-se ignorar o efeito de fruto, i.e.,

pode-se analisar os dados conjuntamente, demonstrando que os controles efetuados durante a polinização foram suficientes para evitar problemas na mesma.

Tabela 3. Análise de variância das variáveis número de vassouras vegetativas (NVV), altura do fuste (AF) e diâmetro do caule (DC) de 300 plantas da progênie do cruzamento TSH 1188 X CCN 51

Variável	GLFruto	QMfruto	Glerro	QMerro	F	p-value
NVV	24	0,77	249	0,94	0,82	0,71
AF3	23	17,35	139	21,91	0,79	0,74
AF24	23	844,14	139	716,53	1,18	0,27
DC3	23	0,00	139	0,00	0,71	0,83
DC24	23	0,09	139	0,13	0,68	0,85
AF9	24	86,64	304	62,58	1,38	0,11
AF48	24	1450,05	304	1186,87	1,22	0,22
DC9	24	0,01	304	0,01	0,88	0,62
DC48	24	0,92	304	0,87	1,05	0,40

O número após AF e DC corresponde à idade da planta em número de meses.; (GL) grau de liberdade; (QM) quadrado médio.

As estimativas da repetibilidade foram altas ($rep = 0,85$) para a característica número de vassouras vegetativas (Tabela 4), indicando que a variável em estudo possui um controle predominantemente genético.

Sabe-se que a repetibilidade é uma estimativa do valor máximo da herdabilidade, onde expressa a proporção da variância fenotípica que é atribuída às diferenças genéticas confundidas com os efeitos ambientais permanentes que atuam nos genótipos (FALCONER, 1981), ou nível de controle genético de uma característica. O conhecimento do valor da repetibilidade, no caso de culturas perenes como o cacaueteiro, é fundamental, pois é grande o intervalo de tempo que vai do início da experimentação, passando pelas avaliações realizadas por meio de

medições sucessivas no mesmo indivíduo, até a seleção de materiais genéticos promissores.

Tabela 4. Componentes de variância entre plantas e do resíduo e coeficiente de repetibilidade para o número de vassouras vegetativas (NVV) durante três anos e para o número de vassouras ajustado pelo diâmetro do caule (DC) ou pela altura do fuste (AF), em diferentes idades (VVAF24 = NVV/AF24; VVAF48 = NVV/AF48; VVDC24 = NVV/DC24; VVDC48 = NVV/DC48)

Variável	Componente de variância		
	Planta	Resíduo	Repetibilidade
NVV	0,77170	0,13650	0,85
VVAF24	0,00013	0,00003	0,84
VVAF48	0,00006	0,00001	0,88
VVDC24	0,34280	0,07024	0,83
VVDC48	0,04058	0,00620	0,87

O coeficiente de repetibilidade de uma característica pode ser conceituado, estatisticamente, como sendo a correlação entre as medidas consecutivas em um mesmo indivíduo (LUSH, 1964; ABEYWARDENA, 1972; KEMPTHORNE, 1973; CRUZ; REGAZZI, 1997). Segundo Falconer (1981), quando várias medidas de uma mesma característica puderem ser feitas em um indivíduo, a variância fenotípica poderá ser parcelada, servindo para quantificar o ganho em precisão, pela repetição das medidas, e também para esclarecer a natureza da variação causada pelo ambiente. Torna-se possível, por meio das estimativas dos coeficientes de repetibilidade determinar quantas medições devem ser feitas em cada indivíduo, para que a seleção fenotípica entre os genótipos seja realizada com eficiência e com um mínimo custo e mão-de-obra (CORNACCHIA et al., 1995; CRUZ e REGAZZI, 1997; PEREIRA et al., 1998; FERREIRA et al., 1999).

O coeficiente de repetibilidade tem sido estimado por meio de vários métodos, como o da análise de variância, tradicionalmente utilizado na estimação da repetibilidade, dos componentes principais (ABEYWARDENA, 1972; RUTLEDGE,

1974), e o da análise estrutural (MANSOUR et al., 1981). Esses métodos foram aplicados em várias culturas, dentre elas pinheiro (CORNACCHIA et al., 1995), cacau (DIAS e KAGEYAMA, 1998; CARVALHO, 1999) e alfafa (PEREIRA et al., 1998; FERREIRA et al., 1999), as quais foram avaliadas para uma determinada característica, mais de uma vez, no mesmo indivíduo, durante sua vida.

O conhecimento do valor da repetibilidade, no caso de culturas perenes como o cacauzeiro, é fundamental, pois é grande o intervalo de tempo que vai do início da experimentação, passando pelas avaliações realizadas por meio de medições sucessivas no mesmo indivíduo, até a seleção de materiais genéticos promissores.

As avaliações da característica estudada foi realizada a partir de plantas individuais, de modo que as distinções foram inflacionadas pelas diferenças ambientais relativas às suas posições. Por outro lado, as medidas foram repetidas no tempo e a análise de repetibilidade proporcionou um dimensionamento da confiabilidade dos dados.

O ajuste do número de vassouras vegetativas (NVV) pela altura do fuste ou diâmetro do tronco (Tabela 4), resulta num aumento da repetibilidade (0,87 e 0,88). Embora o aumento tenha sido pequeno, a variável ajustada deve ser usada nos estudos de mapeamento. Incremento na repetibilidade similar a este foi observado por Faleiro et al (2006), numa população de mapeamento de 82 indivíduos F_2 derivados da autofecundação do genótipo TSH 516.

Queiroz *et al.*, (2003) utilizaram o tamanho da copa para corrigir o número de vassouras vegetativas na construção de um mapa genético de ligação. O ajuste do número de vassouras por medidas de vigor permite a padronização da área vegetativa e, conseqüentemente, possibilita estimar indiretamente a freqüência dos pontos de infecção entre os indivíduos.

4.2. Vigor vegetativo das progênies

Os coeficientes de correlação das medidas de vigor (altura do fuste e diâmetro do tronco) em diferentes estágios (Tabela 5) foram de modo geral positivos e baixos ($r \leq 0,36$), indicando que seleção precoce com base nestes caracteres não seria bem sucedida nesta população. Entretanto, a correlação entre altura e diâmetro foi positiva e elevada ($r = 0,28^{**}$ a $0,72^{**}$) nos vários estágios (viveiro e

campo), indicando que o diâmetro do tronco pode ser um bom indicador da altura do fuste.

A forquilha ou fuste surge normalmente a 1,2 m do solo, quando a haste principal do cacaueteiro perde a dominância apical e as gemas “laterais” desenvolvem-se em uma coroa formada por quatro ou cinco ramos plagiotrópicos. Esse caráter é determinante da altura da planta e a presença de forquilha baixa facilita os tratamentos culturais. Por outro lado, a forquilha alta possibilita o trânsito de máquinas e tratores de pequeno porte na lavoura. Os clones UF 613, CC 42 e Catongo apresentam forquilha baixa e quando em cruzamento, transmitem essa característica às suas progênes, sugerindo algum grau de dominância da forquilha baixa sobre a alta (SORIA, 1964).

Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas de altura do fuste (AF) e diâmetro do caule (DC) nos diferentes estágios de crescimento das progênes derivadas do cruzamento TSH 1188 e CCN 51

	AF9	AF24	AF48	DC3	DC9	DC24	DC48
AF3	0,08	0,36	-0,07	0,57	0,05	0,37	-0,18
AF9		-0,04	0,28	-0,12	0,28	-0,06	0,14
AF24			0,05	0,26	0,09	0,72	0,09
AF48				-0,10	0,06	0,01	0,38
DC3					-0,02	0,39	-0,16
DC9						0,04	0,21
DC24							0,01

O número após AF e DC corresponde à idade da planta em número de meses.

Moses e Enriquez (1981) também observaram correlação alta e significativa entre diâmetro do caule e altura do fuste, e entre altura e o número de ramos chupões em cacaueteiro. A associação entre o diâmetro do tronco a 30 cm de solo, medido entre o segundo e o terceiro ano de campo, e a produção e seus componentes foi observada, embora essa associação se reduza com o avanço da idade dos cacaueteiros (SORIA, 1964; MARIANO, 1966).

Cacaueiros mais vigorosos nos primeiros quatro anos de campo, expresso pelo maior diâmetro do tronco e da área foliar, apresentam uma maior produção devido a maior taxa fotossintética (HADLEY, 1993). Além disso, cacaueiros com maior diâmetro são associados à produção precoce (PAULIN et al., 1993). As características altura da planta e diâmetro do caule vêm recebendo maior atenção tendo em vista a tendência de seleção de plantas de menor porte em programas de melhoramento, visando o aumento da densidade e facilidade de manejo, especialmente para o controle da vassoura-de-bruxa, que é feita através de remoção das vassouras vegetativas e de almofadas florais, assim como aplicação de fungicidas cúpricos nos frutos.

Para as medidas de altura do fuste e diâmetro do caule, o histograma de freqüência da população foi aproximadamente normal (Figura 4A e 4B), sugerindo a existência de vários genes controlando a expressão dessas características.



Figura 3. Histograma de freqüência de 300 plantas F_1 do cruzamento TSH-1188 x CCN-51, relativa a altura do fuste (A) e diâmetro do caule (B).

4.3. Avaliação fenotípica dos indivíduos contrastantes

As médias das características de resistência à vassoura-de-bruxa e medidas de vigor para os 14 indivíduos contrastantes e para os progenitores encontram-se na Tabela 6. Esses dados permitiram afirmar que existe variabilidade fenotípica na população para as características avaliadas e definir as plantas para formar os grupos de indivíduos contrastantes, definindo-se como: resistentes a vassoura-de-

bruxa as plantas: 23/22, 05/16, 02/05, 15/05, 20/29, 19/42 e 06/43; e suscetíveis as plantas: 19/44, 12/41, 06/21, 02/10, 21/16, 12/05 e 6/04.

Tabela 6. Número de vassouras vegetativas (VVV), altura do fuste (AF) e diâmetro do caule (DC) dos indivíduos selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa por inoculação natural e artificial

	TSH	CCN	19/14	12/41	06/21	02/10	21/16	12/05
NVV	0,11	0,17	3,00	3,25	3,25	5,25	5,00	3,25
AF	-	-	65,60	82,90	43,85	74,72	68,90	108,87
DC	-	-	1,73	1,76	1,66	2,07	2,06	2,39

	06/04	23/22	05/16	02/05	15/05	20/29	09/42	06/43
NVV	2,75	0	0	0	0	0	0	0
AF	71,35	86,30	82,10	87,00	81,75	64,15	64,42	91,05
DC	2,31	2,19	1,90	1,91	2,24	1,91	1,58	2,18

- = Dados perdidos

4.4. Marcadores potencialmente ligados à resistência

4.4.1. Amplificação do DNA

A Figura 4 ilustra que o DNA extraído apresentou-se íntegro e de boa qualidade para os genitores e os dois grupos de indivíduos (suscetíveis e resistentes) selecionados com base nas avaliações fenotípicas (Tabela 5). A relação entre absorvância a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}) variou de 1,3245 a 2,1147, com média de 1,8054, confirmando que o DNA é adequado para as análises moleculares. As amostras de DNA foram obtidas em quantidade satisfatória para as análises, variando de 765,5 a 1.215,0 ng/ μ L, com média de 856,6 ng/ μ L.

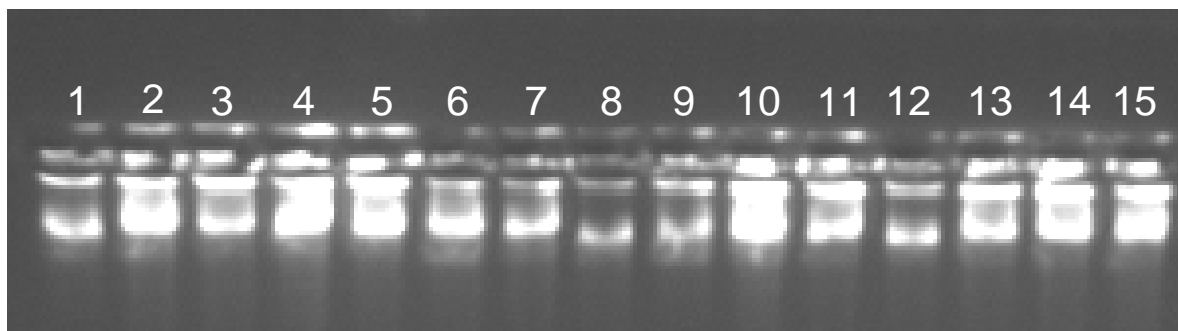


Figura 4. Amostra de padrões de bandas de DNA genômico das plantas selecionadas para a amplificação via marcador SSR, obtidas em gel de agarose a 0,8%.

4.4.2. Avaliação da viabilidade dos *primers* microsatélites

O resultado obtido no *screening* dos 32 *primers* para microsatélites em gel de agarose (Figura 5), permitiu avaliar a viabilidade dos *primers* SSR disponibilizados pela CEPLAC/CEPEC, onde se observou amplificação na maioria dos *primers*, mostrando polimorfismo entre os genitores, o que permitiu uma seleção desse *primers* polimórficos.

A Tabela 7 contém os comprimentos dos alelos dos genitores amplificados pelos 18 *primers* selecionados na etapa anterior. Esses resultados permitiram a correta identificação dos alelos de cada par de *primers* nas análises dos produtos PCR em triplex. Pode-se verificar que a maioria dos locos (72,22%) apresenta dois alelos em cada indivíduo, confirmando a natureza heterozigota dos genitores. Além disso, dos 18 *primers* para microsatélites selecionados, 15 apresentam polimorfismo entre os genitores em, pelo menos, um alelo por loco.

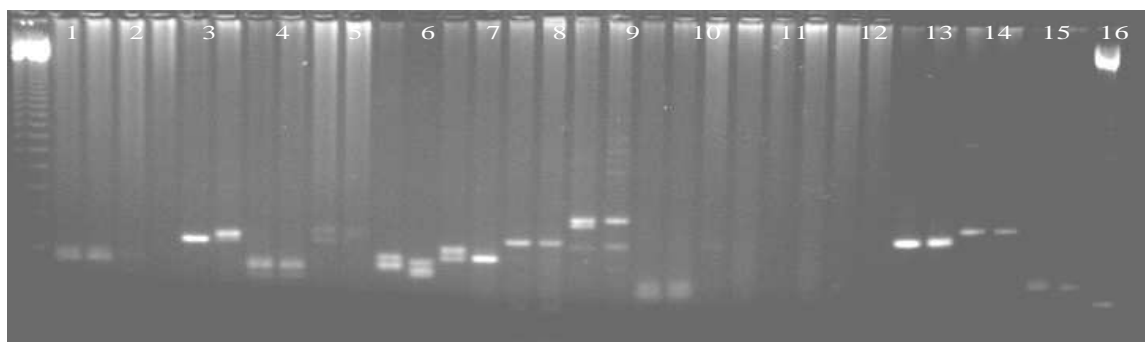


Figura 5. Padrões de bandas polimórficas em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, obtidas das ampliações dos genitores (TSH-1188 e CCN-51). A primeira canaleta corresponde ao padrão de tamanho de fragmento de 123 pb. A numeração corresponde aos seguintes *primers*: (1) mTcCIR43, (2) mTcCIR44, (3) mTcCIR35, (4) mTcCIR11, (5) mTcCIR17, (6)mTcCIR24, (7)mTcCIR49, (8) mTcCIR33, (9) mTcCIR30, (10) mTcCIR29, (11) mTcCIR55, (12) mTcCIR57, (13) mTcCIR42, (14) mTcCIR25, (15) mTcCIR21, (16) mTcCIR43.

Tabela 7. Comprimento dos alelos amplificados a partir de amostras de DNA dos genitores em cada loco

Loco	TSH-1188		CCN-51	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
mTcCIR2	242	242	256	256
mTcCIR10	152	210	206	214
mTcCIR11	292	330	292	330
mTcCIR16	310	318	318	324
mTcCIR17	285	285	275	275
mTcCIR18	335	340	331	337
mTcCIR21	157	173	195	195
mTcCIR24	196	196	188	188
mTcCIR25	133	135	135	137
mTcCIR29	174	174	168	174
mTcCIR30	174	186	186	194
mTcCIR31	330	334	330	334
mTcCIR33	275	275	293	293
mTcCIR35	235	239	239	239
mTcCIR42	228	230	234	238
mTcCIR43	162	168	168	168
mTcCIR49	185	193	185	193
mTcCIR54	159	165	159	165

4.3.3. Identificação dos locos candidatos a marcadores genéticos

Diante dos resultados obtidos, pode-se identificar alguns polimorfismos potencialmente ligados a genes de resistência à doença vassoura-de-bruxa (Tabela 8). Esta afirmativa precisa ser confirmada genotipando todos os indivíduos da população após acurada fenotipagem decorrente das inoculações controladas com o patógeno, em casa de vegetação ou em longas avaliações em campo. A sensibilidade da estratégia de análise de grupos extremos para características oligogênicas está em cerca de até 15 cM pra grupos com sete indivíduos e, quando todos os sete indivíduos de um grupo constatarem com os de outro quanto à presença da banda a distância do marcador para o gene será inferior a 25 cM (MICHELMORE et al., 1991).

Adicionalmente, pode-se afirmar que a seleção e caracterização desses *primers* poderão contribuir para futuros trabalhos envolvendo esta e outras populações com potencial para o mapeamento e melhoramento genético do cacauero. Pela análise qualitativa dos dados, pode-se inferir que os alelos marcados pelos locos mTcCIR10 e mTcCIR24 não estão associados a genes que não conferem resistência à vassoura-de-bruxa ao passo que os alelos marcados pelos locos mTcCIR35, mTcCIR33, mTcCIR21, mTcCIR29 e mTcCIR30 sugerem estar potencialmente ligados à resistência a VB (Tabela 8).

A distribuição dos indivíduos selecionados utilizados neste estudo encontra-se nos planos (eixos) fatoriais, com as respectivas porcentagens da variação genética (Figura 7). Os indivíduos formaram dois grupos distintos.

Tabela 8. Microsatélites potencialmente ligados a resistência a VB, 0= ausência do alelo, 1= presença de 1 alelo, 2= presença de 2 alelos

SSR	Alelos	TSH	CCN	Plantas suscetíveis							Plantas resistentes						
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
mTcCIR35	235	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR35	239	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2
mTcCIR33	275	2	0	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2
mTcCIR33	293	0	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
mTcCIR10	152	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mTcCIR10	206	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	2	2	2	2	2
mTcCIR10	208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
mTcCIR10	210	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
mTcCIR10	214	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
mTcCIR24	188	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	1	2	2	2
mTcCIR24	196	2	0	2	2	2	2	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0
mTcCIR21	147	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mTcCIR21	157	1	0	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0
mTcCIR21	173	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	2	2	2
mTcCIR21	195	0	2	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mTcCIR29	168	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
mTcCIR29	174	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2
mTcCIR30	174	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1
mTcCIR30	186	1	1	1	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0
mTcCIR30	194	0	1	1	1	1	2	1	2	0	1	1	0	1	0	0	1

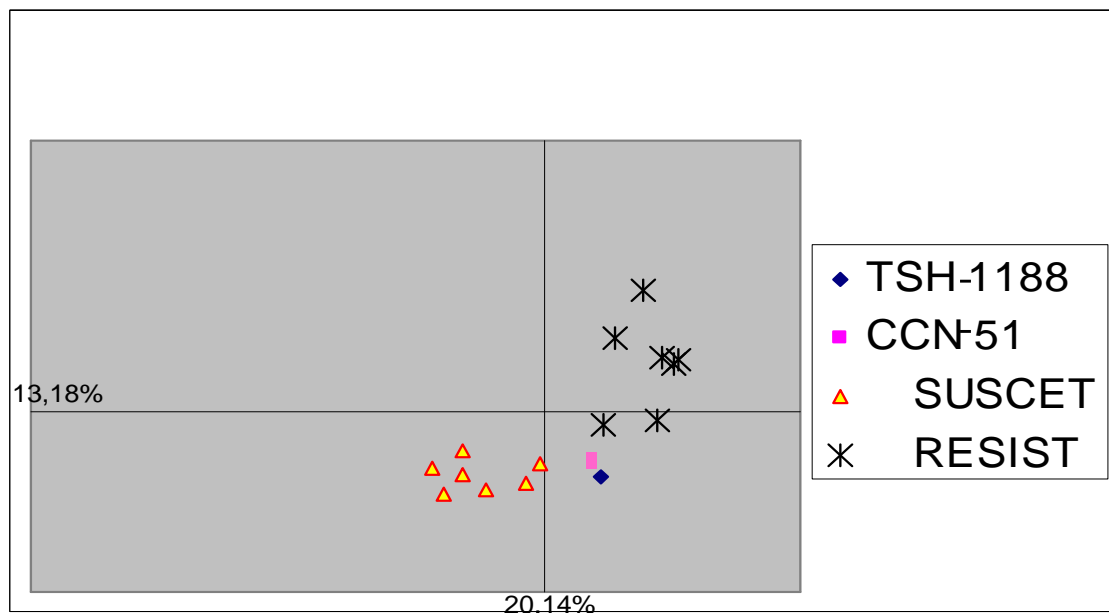


Figura 7. Análise de componente principal de 16 indivíduos selecionados com base na resistência a vassoura-de-bruxa usando marcadores SSR nos indivíduos selecionados para resistência e para os progenitores

Na Tabela 9 encontram-se os resultados das análises de variância entre os marcadores e o NVV. Os marcadores mTcCIR21, mTcCIR24, mTcCIR29, mTcCIR30, mTcCIR33, mTcCIR35 apresentaram-se altamente significativos ($p \leq 0,005$).

Desses seis marcadores microssatélites, três (*mTcCIR35*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24*) foram mapeados no grupo de ligação IX com base na população derivada do cruzamento entre os clones ICS 1 e Sca 6 (FALEIRO et al, 2006; QUEIROZ et al, 2003). Nota-se também que esses marcadores encontram-se relativamente próximos no mapa (Tabela 10). Desta forma, pode-se inferir que essa região genômica corresponda a um QTL com efeito também na população do presente trabalho.

O marcador mTcCIR33 está localizado no grupo de ligação IV (BROWN et al, 2005). Albuquerque (2006) detectou três QTLs associados à resistência à vassoura-de-bruxa, um no grupo de ligação VIII de ICS 39 x CAB 0208 e dois no mapa de ICS 39 x CAB 0214, sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo IX. Os marcadores mTcCIR20 e mTcCIR21 estão localizados nos grupos de ligação I e III, respectivamente.

A associação entre os marcadores *mTcCIR21*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24* e o QTL explicaram respectivamente 82,7%, 74,6% e 78,9% da variação fenotípica para resistência verificada entre as plantas extremas selecionadas. É importante ressaltar que apenas os marcadores que apresentaram três classes genotípicas foram utilizados na regressão linear.

Os locos mTcCIR21, mTcCIR29 e mTcCIR33 encontram-se nos grupos de ligação III, I (FALEIRO et al., 2006) e IV (BROWN et al., 2005), respectivamente. Porém, esses autores não detectaram associação significativa destes locos com a resistência à vassoura-de-bruxa. No presente trabalho, esses marcadores revelaram associação significativa com a resistência à vassoura-de-bruxa (Tabela 10), indicando que eles podem ser considerados como marcadores potencialmente ligados a genes diferentes daqueles analisados por Faleiro et al. (2006) em população distinta.

O marcador mTcCIR30 confere o maior efeito médio da marca, onde a presença de um alelo reduz 2,71 o número de vassouras vegetativas. Esses alelos

são interessantes no sentido do acúmulo de genes favoráveis ao melhoramento para resistência à vassoura-de-bruxa.

Pela análise de regressão linear, os efeitos médios das marcas (EMM) foram estimados para cada marcador (Tabela 10). O marcador que exibiu maior EMM foi o mTcCIR30, onde em média a presença de um alelo reduz em 2,71 o número de vassouras vegetativas. O marcador mTcCIR24 aumenta o número de vassouras em 1,88 a cada adição de alelo, permitindo inferir que esse marcador está relacionado à suscetibilidade na população em estudo.

Tabela 9. Análise de variância para a associação marca-QTL

SSR	Alelo	gl	SQ	QM	F	p-value
mTcCIR02	242	1	0,26	0,26	0,06	0,8137
mTcCIR02	256	1	0,26	0,26	0,06	0,8137
mTcCIR10	152	1	12,53	12,53	3,67	0,0794
mTcCIR10	206	2	30,24	15,12	7,17	0,0102
mTcCIR10	208	1	3,64	3,64	0,88	0,3673
mTcCIR10	210	2	26,16	13,08	5,27	0,0248
mTcCIR10	214	1	7,89	7,89	2,08	0,1749
mTcCIR11	292	1	0,14	0,14	0,03	0,8598
mTcCIR11	330	1	10,89	10,89	3,07	0,1052
mTcCIR16	310	1	0,14	0,14	0,03	0,8598
mTcCIR16	318	2	13,61	6,81	1,88	0,1986
mTcCIR16	324	2	11,53	5,76	1,51	0,2628
mTcCIR17	275	2	11,08	5,54	1,44	0,2786
mTcCIR17	285	2	11,08	5,54	1,44	0,2786
mTcCIR18	331	1	0,30	0,30	0,07	0,8013
mTcCIR18	333	2	10,76	5,38	1,38	0,2961
mTcCIR18	335	2	25,55	12,78	5,27	0,0274
mTcCIR18	337	1	0,90	0,90	0,20	0,6619
mTcCIR18	340	1	4,25	4,25	1,03	0,3328
mTcCIR18	342	1	4,25	4,25	1,03	0,3328
mTcCIR21	147	1	10,76	10,76	3,02	0,1076
mTcCIR21	157	2	5,17	2,58	0,59	0,5715
mTcCIR21	173	2	47,36	23,68	42,78	<.0001
mTcCIR21	195	2	17,14	8,57	2,60	0,1192
mTcCIR24	188	2	42,29	21,15	20,85	0,0002
mTcCIR24	196	2	42,29	21,15	20,85	0,0002
mTcCIR25	133	2	18,86	9,43	3,00	0,0913
mTcCIR25	135	2	22,43	11,22	3,98	0,0501
mTcCIR25	137	1	4,02	4,02	0,98	0,3425
mTcCIR25	145			Monomórfica		
mTcCIR25	147			Monomórfica		
mTcCIR29	168	1	35,52	35,52	23,77	0,0004
mTcCIR29	174	1	35,52	35,52	23,77	0,0004
mTcCIR30	174	2	47,36	23,68	42,78	<.0001
mTcCIR30	186	2	5,56	2,78	0,64	0,5463
mTcCIR30	194	2	16,94	8,47	2,55	0,1230
mTcCIR31	334	2	0,44	0,22	0,05	0,9555
mTcCIR33	275	1	26,47	26,47	11,77	0,0050
mTcCIR33	293	1	26,47	26,47	11,77	0,0050
mTcCIR35	235	1	35,52	35,52	23,77	0,0004
mTcCIR35	239	1	35,52	35,52	23,77	0,0004
mTcCIR42	228	1	0,64	0,64	0,15	0,7086
mTcCIR42	230	1	3,75	3,75	0,91	0,3598
mTcCIR42	234	1	1,01	1,01	0,23	0,6390
mTcCIR42	238	1	0,06	0,06	0,01	0,9073
mTcCIR43	162	1	7,89	7,89	2,08	0,1749
mTcCIR43	168	1	7,89	7,89	2,08	0,1749
mTcCIR49	185	1	0,30	0,30	0,07	0,8017
mTcCIR49	193	1	0,30	0,30	0,07	0,8017
mTcCIR54	159	2	8,92	4,46	1,10	0,3664
mTcCIR54	165	2	8,92	4,46	1,10	0,3664

Tabela 10. Locos marcadores associados à resistência a vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao* L.

Marcadores ¹					Anova ²	Regressão ³		Médias de Classes ⁴		
SSR	Alelo	GL	Posição	Pai origem	p-value	EMM	R ²	0	1	2
mTcCIR21	173	3	24	TSH	<.0001	-1,85	82,7	3,68 (7) a	0,00 (1) b	0,00 (6) b
mTcCIR24	188	9	31	TSH	0,0002	-1,88	78,9	3,75 (6) a	1,62 (2) b	0,00 (6) b
mTcCIR24	196	9	31	TSH	0,0002	1,88	78,9	0,00 (6) b	1,62 (2) b	3,75 (6) a
mTcCIR29	168	1	20	CCN	0,0004	-	-	3,22 (8) a	0,00 (6) b	-
mTcCIR29	174	1	20	CCN	0,0004	-	-	-	0,00 (6) b	3,22 (8) a
mTcCIR30	174	9	28	TSH	<.0001	-2,71	74,6	3,68 (7) a	0,00 (6) b	0,00 (1) b
mTcCIR33	275	4*	13	CCN	0,005	-	-	-	3,21 (7) a	0,46 (7) b
mTcCIR33	293	4*	13	CCN	0,005	-	-	0,46 (7) b	3,21 (7) a	-
mTcCIR35	235	9	23	TSH	0,0004	-	-	3,22 (8) a	0,00 (6) b	-
mTcCIR35	239	9	23	TSH	0,0004	-	-	-	0,00 (6) b	3,22 (8) a

¹ Marcadores SSR selecionados com base na análise de variância; (GL) Grupo de ligação segundo Faleiro et al, 2006 e Brown et al, 2005); (Posição) Posição do marcador no mapa genético em cM; (Pai origem) pai de origem do alelo

² Componentes da Análise de variância; (p-value) nível de probabilidade

³ Componentes da regressão linear; (EMM) Efeito Médio da Marca; R² Porcentagem da variação fenotípica do número de vassouras vegetativas pela associação do loco marcador e o gene

⁴ Média do número de vassouras vegetativas para cada classe genotípica, onde 0= ausência do marcador, 1= presença de uma cópia do alelo, e 2= presença de duas cópias do alelo. (N⁰) Número de indivíduos que apresentam a classe correspondente. Para cada marcador (dentro de cada linha nas colunas de médias de classes), as médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

5. CONCLUSÕES

Constatou-se pelas estimativas dos parâmetros fenotípicos das medidas de vigor, que uma seleção precoce para altura de plantas visando melhoramento genético não seria bem sucedida. Como a correlação altura com diâmetro foi alta e positiva, pode-se usar altura para seleção indireta e outros procedimentos visando inferir sobre o vigor.

Os coeficientes de repetibilidade do número de vassouras vegetativas foram altos e quando ajustados por medidas de vigor (altura do fuste ou diâmetro do caule) foram levemente aumentados, demonstrando que o ajuste deveria ser utilizado em estudos de mapeamento genético.

As distribuições de freqüências para altura do fuste e diâmetro do caule foram normais, indicando que vários há genes controlando as características estudadas. Para o número de vassouras, a distribuição foi distorcida no sentido de maior resistência, indicando que pode haver um grupo de genes oriundos de diferentes fontes de resistência, e esse grupo de genes possa estar atuando em conjunto.

A existência da segregação do número de vassouras vegetativas, altura do fuste e diâmetro do caule, bem como ausência do efeito de fruto nessas características, possibilitam que esta população seja utilizada em estudos de mapeamento genético e identificação de QTLs para essas características.

Dos 18 *primers* SSR amplificados, 15 foram polimórficos entre os genitores e seis podem estar potencialmente ligados com a resistência à vassoura-de-bruxa. Esses *primers* deverão ser usados para análise de todos os indivíduos da população segregante, visando estimar a distância genética entre marcadores e QTLs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYWARDENA, V. An application of principal component analysis in genetics. **Journal of Genetics**, v. 61, p. 27-51, 1972.

AHNERT, D. Use of QTLs for Witches'Broom Resistance in Cocoa Breeding. In: International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, 2001, Kota Kinaballu, Sabah, Malaysi. **Proceedings International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**. Londom: INGENIC, 2000. p. 116-119.

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, p.1012-1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P.S.B. **Mapas de ligação e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLS) associados à resistência a Crinipellis pernicioso em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**. 2006. 98p. Dissertação (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia)) – Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2006.

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

ALMEIDA, M.P. **Avaliação da diversidade genética em acessos *ex situ* de jacarandá-da-bahia *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão *ex Benth.* por meio de marcadores moleculares RAPD, como subsídio para sua conservação e utilização**. 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus. 2001.

ALVERSON, W. S., WHITLOCK, B.A., NYFFELER, R., BAYER, C. & BAUM, D. A. Phylogeny of the core *Malvales*: Evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 67, p. 1474-1486, 1999.

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

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

APG II 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The Linnean Society of London, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399 – 436, 2003.

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

BAKER, R.E.D.; HOLIDAY, P. Witches'broom disease of cocoa. **Phytopathological**

BARTLEY B.G.D. The status of genetic resistance in cocoa to *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer. In: Proceedings of The International Cocoa Research Conference, 1977. **Proceedings of The International Cocoa Research Conference**. Caracas: Venezuela, 1977. p. 57-69.

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

BELKHIR, K.; BOESA, P.; GOUDET, J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. **GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, 1999.

BORRALHO, N.M.G.; COTTERILL, P.P.; KANOWSKI, P.J. Genetic control of growth of *Eucalyptus globulus* in Portugal. II. Efficiencies of early selection. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.41, n.2, p.70-77, 1992.

BRAZIL – CEPEC. **List of clones in the CEPEC, Bahia, Brazil collection**. Computer printout from CEPEC. Supplied by B.G.D. Bartley, CEPEC, Brazil. 1987.

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

CAMPO, E. C. & ANDÍA, F. C. **Cultivo y beneficio del cacao CCN-51**. Quito: El Conejo, 1997. 136 p.

CARVALHO, C.G.P. **Repetibilidade e seleção de híbridos de cacauero**. Viçosa, 1999. 177p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. 1999.

CASCARDO J.C.M., LOPES U.V., FIGUERIA A. Identification of RAPD markers associated with *Verticillium dahliae* susceptibility in cacao. SourceIn: **Proceedings International Workshop on Cocoa Breeding Strategies**. Malaysian Cocoa Board, Kuala Lumpur, p. 139-145. 1995.

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

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

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

COPE, F.W. In: Simmonds, N.W., ed. **Evolution of crop plants**, London, Longman, p. 285-289. 1976.

CORNACCHIA, G.; CRUZ, C.D.; PIRES, I.E. Estimativa do coeficiente de repetibilidade para características fenotípicas de procedências de *Pinus tecunumanii* (Schw.) Eguluz e Perry e *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barret e Golfari. **Revista Árvore**, v.19, p.333-345, 1995.

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

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

CROUZILLAT, D.; RIGOREAU, M.; CABIGLIERA, M.; ALAREZ, M.; BUCHELI, P.; PÉTIARD, V. QTL studies carried out for agronomic, technological and quality traits of cocoa in Ecuador. In: 2000, Kota Kinabalu, **Proceedings International workshop on new technologies and cocoa breeding**, Kota Kinabalu: INGENIC, 2001. p. 120-126.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1997. 390p.

DIAS L.A.S., RESENDE M.D.V. Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values by mixed model in the cacao improvement. In: International Cocoa Research Conference, 13, **Proceedings**. Cocoa Producers' Alliance, Lagos. p. 189-194. 2002

DIAS, L.A.S. & KAGEYAMA, P.Y. Repeatability and minimum harvest period of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Southern Bahia. **Euphytica**, v.102, p. 29-35, 1998.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. 1 ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2001. 578 p.

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

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular marker facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1981. 279p.

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

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

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

FERREIRA, R.P.; BOTREL, M.A.; PEREIRA, A.V.; CRUZ, C.D. Avaliação de cultivares de alfafa e estimativas de repetibilidade de caracteres forrageiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.995-1002, 1999.

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

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

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

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

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

FONSECA, S.E.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In: International

cocoa research conference, 12., 1996, Salvador. **Proceedings International cocoa research conference**, Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 2000. p.149-153.

GURGEL GARRIDO; L.M. do A.; KAGEYAMA, P.Y. Evolução com a idade de parâmetros genéticos de *Pinus elliottii*, selecionados para produção de resina. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v.5, n.1, p.21-37, 1993.

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

HADLEY, P. AND YAPP, J.H.H. Measurement of physiological parameters with respect to yield. In: International Workshop on the Conservation Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources in 21st Century. 1993. Trinidad. **Proceedings International Workshop on the Conservation Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources in 21st Century**. Cocoa Research Unit, University of West Indies, 1993. pp. 121-138.

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

HARDI, F. **Cacao Manual**. Turrialba: I A. A. S, 1960. 110 p.

KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Variação genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. **IPEF**, Piracicaba, v.24, p.9-26, 1983.

KEMPTHORNE, O. **An introduction to genetic statistics**. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1973. 545p.

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

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

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

LAMBETH, C.C. Juvenile-mature correlations in Pinaceae and implications for early selection. **Forest Science**, Bethesda, v.26, n.4, p.571-580, 1980.

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

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

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

LI, P.; BEAULIEU, J.; CORRIVEAU, A.; BOUSQUET, J. Genetic variation in juvenile growth and phenology in a white spruce provenance-progeny test. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.42, n.1, p. 52- 60, 1992.

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

LUSH, J.L. **Melhoramento genético dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Missão Norte-Americana de Cooperação Econômica e Técnica no Brasil – USAID, 1964. 570p.

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

MANSOUR, H.; NORDHEIM, E.V.; RUTLEDGE, J.J. Estimators of repeatability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.151-156, 1981.

MARIANO A.H. **Relaciones entre algunas medidas de vigor y producción en cacao**. IICA, Turrialba (Tese MS). 1966.

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

MARQUES JR., O.G. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos e avaliação da eficiência da seleção precoce em *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.** Lavras: UFLA, 1995. 69p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). 1995.

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

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

MOSES D.D, ENRIQUEZ G.A. Calibrating variates for yield of cocoa, as well as the relationships of several cacao features with the environment. In: Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, 7, **Actes. J. de Lafforest and Transla-Inter**, London, p. 51-55. 1981.

MOURA, V.P.G.; MELO, J.T. de; SILVA, M.A. Comportamento de procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. aos nove e meio anos de idade, em Planaltina, DF., área de cerrado. **IPEF**, Piracicaba, v.46, p.52-62, 1993.

OTEGBEYE, G.O. Age trends in the genetic control of stem diameter of *Eucalyptus tereticornis* and the implication for selection. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.40, n.2, p.85-87, 1991.

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

Paper, London, n.2, 42p. 1957.

PAULIN, D., MOSSU G., LACHENEUD, P., AND CILAS C. La selection du cacaoyer en Côte d'Ivoire. Analyses du comportement de 62 hybrids dans quatre localities Café **Cacao Thé**, v.27, p. 3-19, 1993.

PEREIRA, A.V.; FERREIRA, R.P.; CRUZ, C.D.; FREITAS, V.P.; OLIVEIRA, P.T.A. de. Comportamento de alfafa cv. Crioula de diferentes origens e estimativas dos coeficientes de repetibilidade para caracteres forrageiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.686-690, 1998.

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

PERES FILHO, A.S. A cadeia produtiva do cacau. In: **Agronegócio brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade**. 2.ed. Brasília: CNPq, 1998.

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

POUND, F.J. Cocoa and witches broom disease. **Archives of Cocoa Research**, London, v. 1, p. 20-72. 1938.

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

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

RESENDE M.D.V. Avanços da genética biométrica florestal. In: Bandel, G.; Vello, N. A. e Miranda Filho, J. B. (eds.). **Genética biométrica vegetal/Encontro sobre temas de genética e melhoramento**, 14, ESALQ, Piracicaba, p. 20-46. 1999.

RESENDE M.D.V.; DIAS L.A.S. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de parâmetros genéticos e predição de valores genéticos e genotípicos em espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, p. 44-52, 2000.

RIEMENSCHNEIDER, D.E. Heritability, age-age correlations, and inferences regarding juvenile selection in Jack Pine. **Forest Science**, Bethesda, v.34, n.4, p.1076-1082, 1988.

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

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

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

RUTLEDGE, J.J. A scaling which removes bias of Abeywardena's estimator of repeatability. **Journal of Genetics**, v.61, p.247-250, 1974.

SAMBROOK, J; FRITSCH, , EF e MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**, 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY. Sereno, ML. 2001. Estimación de la diversidad genética de poblaciones. 1989.

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

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide: version 6**. 4th ed. Cary, Estados Unidos, 846p. 1989.

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

SORIA, J. El vigor híbrido y su uso en el mejoramiento genético de cacao. **Fitotecnia Latinoamericana**, v. 56, p. 59-78, 1964.

SQUILLACE, A.E.; GANSEL,C.R. Juvenile-mature correlations in slash pine. **Forest Science**, Bethesda, v.20, n.3, p.225-229, 1974.

VARGAS-HERNANDES, J.; ADAMS, W.T. Age-age correlation and early selection for wood density in young coastal Douglas-fir. **Forest Science**, Bethesda, v.38, n.2, p.467-478, 1992.

VELLO F.; GARCIA J.R.; MAGALHÃES W.S. Produção e seleção de cacauzeiros híbridos na Bahia. **Revista Theobroma**, v.2, p. 15-35, 1972.

WAKELEY, P.C. Relation of thirtieth-year to earlier dimensions of southern pines. **Forest Science**, Bethesda, v.17, n.2, p.200-209, 1971.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. **Evolution**, Lawrence, v.38, p.1358-1370, 1984.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. London: Longman, 1985. 620 p.

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

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