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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS (*Theobroma cacao* L.) RESISTENTES À VASSOURA-DE-BRUXA COM BASE EM MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

Jeiza Botelho Leal

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Agosto de 2004

JEIZA BOTELHO LEAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS (*Theobroma cacao* L.) RESISTENTES À VASSOURA-DE-BRUXA COM BASE EM MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

AGOSTO de 2004

JEIZA BOTELHO LEAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS (*Theobroma cacao* L.) RESISTENTES À VASSOURA-DE-BRUXA COM BASE EM MARCADORES RAPD E MICROSSATÉLITES

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

APROVADA: 13 de agosto de 2004

Prof. Dr. Dário Ahnert
UESC

Prof. Dr. Everaldo Gonçalves de Barros
UFV

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

Dedicatória

Aos meus pais e a toda a minha família que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e, ao meu namorado, que me deu força nos momentos de tristeza e desânimo, dedico.

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES, pela concessão da minha bolsa.

À FAPESB, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Prof. Ronan Xavier Corrêa, pela ótima orientação, amizade e compreensão.

Aos professores Fernanda Amato Gaiotto e Dário Ahnert, por comporem minha comissão de orientação.

Ao meu namorado Júnior, por tornar minha vida mais alegre.

Aos colegas e amigos de turma, Joci, Geruza, Ronaldo, Patrícia, Bianca, Alfredo, Cristiane, Adriana e Lívia pelo apoio e pela ajuda nos momentos de dificuldades.

Aos colegas mestrandos, Sônia e Stênio e ao técnico do laboratório, Robson, pela amizade e colaboração.

Às minhas amigas Tatiana, Pollyana, Flávia, Ivana, Jamille, Cristiana e Gilvanéia, pelo incentivo e força.

Ao bolsista de iniciação científica Isamire Andrade, pela ajuda na execução das atividades laboratoriais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Curso de Mestrado, pelos ensinamentos.

À coordenação e aos funcionários do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo imprescindível apoio.

ÍNDICE

EXTRATO ..... **vii**
ABSTRACT ..... **ix**
1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **3**
2.1. Cacauicultura na Bahia 3
2.2. Abordagem Sócio-econômica 5
2.3. A Doença Vassoura-de-bruxa e a Base Genética da Resistência 6
2.4. Caracterização de Banco de Germoplasma Vegetal 7
2.5. Variedades Clonais e Seleções em Fazendas 9
2.6. Estudo da Diversidade Genética Utilizando Marcadores Moleculares 10
3. CAPÍTULO 1 ..... **14**
VARIABILIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS RESISTENTES À VASSOURA-DE-BRUXA SELECIONADOS EM FAZENDAS DO SUL DA BAHIA E DE SEUS POTENCIAIS PROGENITORES UTILIZANDO MARCADORES RAPD **14**
RESUMO 14
ABSTRACT 15
3.1. INTRODUÇÃO 16
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 18
3.2.1. Material Vegetal 18
3.2.2. Análises Moleculares 18
3.2.3. Determinação de Distâncias Genéticas e Análise de Agrupamento 19
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 19
3.4. AGRADECIMENTOS 22
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 22
4. CAPÍTULO 2 ..... **29**

VARIABILIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS PROVENIENTES DE FAZENDAS DO SUL DA BAHIA E DO BANCO DE GERMOPLASMA DA CEPLAC UTILIZANDO MARCADORES SSR 29
RESUMO 29
4.1. INTRODUÇÃO 30
4.2. MATERIAL E MÉTODOS 31
4.2.1. Coleta de Material Genético e Extração de DNA 31
4.2.2. Padronização das Condições de Amplificação e Obtenção de Dados Moleculares 32
4.2.3. Análises Genético-estatísticas dos Dados Moleculares 33
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.3.1. Extração e Amplificação de DNA 33
4.3.2. Análises de Diversidade 36
4.3.3. Análises de Agrupamento 37
4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40
5. CONCLUSÕES GERAIS 45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 46
7. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES 47

EXTRATO

LEAL, Jeiza Botelho, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Diversidade genética de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites**. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientador: Fernanda Amato Gaiotto. Colaborador: Dário Ahnert.

As doenças do cacaueiro constituem o principal fator limitante à produção de cacau, especialmente a vassoura-de-bruxa (VB), que ocasionou queda na produção na Bahia a partir de 1990. A mais importante medida de controle de doenças tem sido o uso de genótipos resistentes, por ser a estratégia mais econômica, estável e ambientalmente desejável. Nos últimos anos, vários acessos foram identificados como fontes de resistência. No presente estudo, objetivou-se analisar a diversidade genética das seleções de cacaueiros resistentes à VB (indivíduos provenientes das fazendas) e a inter-relação delas com os seus potenciais progenitores (acessos oriundos do banco de germoplasma), utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA) e SSR (microssatélites ou *simple sequence repeats*).

As amostras de DNA de um grupo de 120 plantas (18 considerados potenciais progenitores e 102 seleções resistentes à VB) foram amplificadas por PCR/RAPD, utilizando 13 *primers* decâmeros. As amostras de DNA de 50 das 120 plantas (23 acessos provenientes do banco de germoplasma e 27 seleções das fazendas) foram amplificadas por PCR/microssatélites, utilizando nove *primers*.

A diversidade genética do grupo de 120 plantas foi inferida com base nos coeficientes de dissimilaridade genética, calculados a partir da análise de 91 bandas RAPD, sendo 61 monomórficas e 30 polimórficas e do grupo de 50 plantas, a partir de nove locos microssatélites que apresentaram 58 alelos diferentes.

Observou-se que grande parte das 102 seleções encontradas nas fazendas apresenta uma ampla variação genética, indicando que algumas das seleções devem ter-se originado de progenitores não considerados nesta análise. A análise de dispersão dos 50 indivíduos confirma a existência de clones dissimilares daqueles relacionados com o SCAVINA 06 e resistentes à VB, o que confirma essa mesma tendência, observada na análise com os marcadores RAPD.

Os dados de genotipagem com os marcadores microssatélites e outras informações genéticas dos diferentes indivíduos analisados serão depositados no banco de dados genotípicos sobre o cacau, em desenvolvimento pela UESC e CEPLAC. As informações obtidas neste trabalho poderão ser utilizadas como subsídios à recomendação de clones aos agricultores e às estratégias de aumento da diversidade de materiais nos programas de melhoramento.

ABSTRACT

LEAL, Jeiza Botelho, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Genetic diversity of resistant cacao (*Theobroma cacao* L.) to witche's broom using RAPD and microsatellite markers**. Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Advisory Committee Members: Fernanda Amato Gaiotto and Dário Ahnert.

The diseases became the main factor limiting cacao production, especially the witche's broom (WB) that caused fall in the production starting from 1990. The most important measure of control of them has been the search of resistant genotypes for being the most economic, stable strategy and environmentally desirable. In the last years, several accesses were identified as resistance sources. In the present study, it was objectified to analyze the genetic diversity of the selections of resistant cacao to WB (farmers selections) and their interrelation with its potential progenitors (germplasm bank accesses), using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers and SSR (microsatellites or simple sequence repeats).

The DNA samples of a group of 120 plants (18 considered potential progenitors and 102 VB resistant farmers selections) were amplified by PCR / RAPD, using 13 decamers primers. The DNA samples of 50 plants (23 accesses from germplasm bank and 27 farmers selections) were amplified by PCR/microsatellites, using nine primers.

The genetic diversity of the group of 120 plants was inferred based on the coefficients of genetic dissimilarities, calculated from the analysis of 91 bands

RAPD, being 61 monomorphic and 30 polymorphic and of the group of 50 plants, from nine microsatellites loci that presented 58 different allelic genes.

It was observed that great part of the 102 farmers selections presents wide genetic variation while the possible progenitors were less diverse than the selections, indicating that some of the selections could not have being originated from progenitors considered in this analysis. The bidimensional dispersion of 50 individuals confirms the existence of clones dissimilar of those related with SCA 06 and resistant to VB, similar to the observed before in the analysis with the RAPD markers.

The genotypic data obtaid from the microsatellites markers and other genetic information of the different analyzed individuals will be deposited in the cacao genetic database development by UESC and CEPLAC. The information can be used to recommend for farmers and to increase the diversity of materials in the breeding programs.

1. INTRODUÇÃO

A região cacaueira da Bahia, depois de uma década de convivência com a doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, vem aos poucos se recuperando por meio do plantio de cultivares resistentes a essa enfermidade. Pereira et al. (1989) relata que essa doença apareceu primeiramente em Camacã e mais tarde em Uruçuca. Nesses anos de convivência com a doença, em toda a região cacaueira da Bahia, foram identificadas e selecionadas plantas resistentes a esse patógeno, tanto por agricultores como pesquisadores e, acredita-se que muitas delas sejam derivadas do clone Scavina, principal fonte de resistência (Dias, 2001).

A CEPLAC, a partir da década de 60, vem distribuindo aos agricultores as sementes geneticamente melhoradas, dos chamados cacaueiros híbridos, provenientes de cruzamentos de clones de diferentes origens geográficas. Alguns destes híbridos possuem uma resistência de média a alta, como a variedade Theobahia. Em muitos casos, sementes destes híbridos, obtidos por polinização aberta, foram utilizadas pelos agricultores em suas fazendas ou coletadas em fazendas de vizinhos para o plantio. Isso propiciou que a região cacaueira baiana viesse a ter uma mistura de genótipos, com uma grande variabilidade de cacaueiros que segregam para diferentes características, especialmente resistência à vassoura-de-bruxa. Em outras palavras, um grande campo de observação para os melhoristas que merece ser investigado tanto para a obtenção de novos cultivares como de germoplasma promissor.

Os bancos de germoplasma do cacau da CEPLAC (em Ilhéus, BA, e Pará) e de outros grupos como da Almirante Cacau (Itajuípe, BA), representados por diferentes acessos de cacaueiro, constituem a matéria-prima necessária para a

criação de novas variedades mais produtivas, mais adaptadas às regiões de cultivo e mais resistentes a pragas e doenças de importância econômica. O banco de germoplasma ou banco de genes é a infra-estrutura física onde se processa a conservação *ex situ* dos acessos, ou seja, a conservação fora de seus habitats, quer seja na forma de coleções permanentes de pólen, sementes, culturas de tecidos ou de coleções de plantas mantidas em campo, dentre outras. No caso do cacaueiro, a recalcitrância de suas sementes exige que seus recursos genéticos sejam mantidos em coleções de campo de plantas vivas (Dias, 2001).

A existência de muitos materiais selecionados nas fazendas como resistentes à vassoura-de-bruxa e das coleções dos bancos de germoplasma do cacau, justifica a realização de pesquisas na busca de soluções para o problema da vassoura-de-bruxa e de outras doenças que afetam o cacaueiro. Não há registros sobre a genealogia exata dos materiais selecionados pelos agricultores. Nesse trabalho, objetivou-se analisar a diversidade genética entre as seleções resistentes à VB e as suas inter-relações com os possíveis progenitores (acessos do banco de germoplasma), utilizando marcadores moleculares RAPD e microssatélites. Os dados e as informações sobre os materiais analisados neste trabalho, baseadas em microssatélites, serão depositadas no banco de dados genotípicos da UESC/CEPLAC, em desenvolvimento. Pretende-se obter conhecimentos que possibilitem a definição de estratégias de utilização desses materiais no melhoramento genético e na recomendação aos agricultores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cacauicultura na Bahia

Theobroma cacao L. é uma planta diplóide 2n = 20, preferencialmente alógama, antes classificada como da família Sterculiaceae, hoje reclassificada como Malvaceae, nativa do continente Americano, onde possui grande diversidade nas populações selvagens que vão desde a Amazônia Brasileira ao México (Sounigo et al., 2003). Com base nas características morfológicas e na distribuição geográfica, a espécie *T. cacao* foi subdividida em três grupos denominados Forasteiro, Criolo e Trinitário (N'goran et al., 1994). O tipo Criolo tem sido cultivado há longo tempo na América Central e no norte da América do Sul. O primeiro Forasteiro cultivado foi do Baixo Amazonas, sendo cultivado principalmente no Brasil e na Venezuela (Sounigo et al., 2003). O grupo Forasteiro predomina em 85% das plantações mundiais (Dias, 2001). O cacau foi introduzido na Bahia em 1746, procedente do estado do Pará, passando a ser plantado em vários municípios do sul do estado, onde esses materiais genéticos receberam a denominação de "cacau comum da Bahia". Posteriormente, novas introduções foram realizadas, inclusive com os programas de distribuição de híbridos aos agricultores, iniciados na década de 1960 (Cepec, 1971) e com novos lançamentos de outros materiais na década de 1990 (Pinto e Pires, 1998).

Na Bahia a partir de 1998 as variedades clonais resistentes à vassoura-de-bruxa (VB) assumem especial importância nesta cultura. Espera-se aumento de produtividade e a redução dos custos, uma vez que o menor porte das plantas e sua resistência propiciarão menor utilização de mão-de-obra para as remoções

das vassouras e menor gastos com fungicidas. Utilizando-se as variedades clonais por meio da enxertia, as lavouras decadentes pelo ataque intenso da VB vêm sendo recuperadas. Nesta recuperação, são utilizadas as mudas enxertadas em mudas seminais (repovoamento ou adensamento de plantas) bem como a substituição de copas suscetíveis pela enxertia dos cacaueiros safreiros. Neste sentido há três opções para o agricultor: uso de variedades clonais selecionadas e recomendadas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira CEPLAC/CEPEC uso de propágulos obtidos por variedade seminal e a seleção de cacaueiros resistentes na própria fazenda ou em fazendas vizinhas.

Na seleção de cacaueiros resistentes, buscou-se atender aos requisitos básicos de produtividade e resistência à VB. Uma tentativa nesta busca foi uma seleção de cacaueiros realizada na própria fazenda. Baseado nesses requisitos principais inicia-se a seleção pela avaliação de sua resistência, por ser um caráter de menor complexidade, de maior herdabilidade e de menor possibilidade de erro no processo. A possibilidade de sucesso deste empreendimento baseia-se no fato de que muitas progênies foram distribuídas para o plantio, utilizando-se os mais diversos clones como progenitores em combinações com os clones SCA 6 e seus parentes, IMC 67 e outros que apresentam boa resistência à VB. Como resultado destes cruzamentos, há a possibilidade de surgirem plantas heteróticas e produtivas que apresentem características de resistência, devido à capacidade geral ou específica de combinações entre estes progenitores. Desta forma, a seleção adequada destas plantas pode resultar em clones com resistência e produtividade satisfatórias (Pinto e Pires, 1998). A seleção de plantas resistentes envolvia vários aspectos como: (1) seleção para a resistência à VB que leva em consideração a escolha do local e fatores ambientais influenciadores, escolha do material genético e resistência nos lançamentos, almofadas e nos frutos; (2) seleção para produtividade é necessário considerar a possibilidade de ocorrência de condições privilegiadas no processo de seleção de plantas mais produtivas tais como menor competição entre plantas (plantas mais isoladas), maior disponibilidade de luz, de água etc. Assim, é importante considerar a produção de plantas vizinhas com características e porte semelhantes, selecionando aquelas que mais se destaquem em relação à sua vizinha específica; (3) a incompatibilidade sexual das plantas selecionadas, devendo a maioria das plantas

selecionadas ser auto-incompatível, e havendo a possibilidade de formação de dois ou mais grupos quanto à compatibilidade; (4) cartão de identificação para a seleção de plantas resistentes e produtivas (Pinto e Pires, 1998).

A CEPLAC conduziu uma coleta sistemática de cacaueiros silvestres ou semi-silvestres de 1965 a 1991 em parte da Amazônia brasileira (Sereno et al., 2003), iniciando-se o programa de produção e distribuição de híbridos inter-clonais pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) na CEPLAC (Yamada et al., 2003).

2.2. Abordagem Sócio-econômica

A importância sócio-econômica do cultivo de cacau é muito grande para os países produtores, em particular para o Brasil. O país é o quarto produtor mundial de cacau e tem o quinto maior parque industrial chocolateiro do mundo. A cadeia produtiva do cacau envolve, atualmente investimentos da ordem de 2 bilhões de reais, sendo 1,7 bilhão no setor primário (terra, árvores e benfeitorias). É responsável por aproximadamente 300 mil empregos diretos, mas do cacau dependem mais de três milhões de pessoas (Dias, 2001).

A região cacaueira da Bahia é composta por 71 municípios (IBGE, Censo demográfico, 2000) subdivididos em três microrregiões, abrangendo 1.966.894 habitantes. As perdas de produtividade do cacau causadas pela VB associada aos baixos preços do produto no mercado internacional contribuíram para descapitalização dos agricultores ocasionando um descaso e abandono das lavouras. Estes fatores levaram a uma redução da produtividade, afetando toda a região cacaueira. Os mais afetados foram produtores mais pobres e trabalhadores rurais que abandonaram as propriedades e migraram para favelas das cidades da região, aumentando a miséria e as diferenças sócio-econômicas.

No entanto, com o advento de cultivares de cacau resistentes à VB, propagação vegetativa via enxertia e a melhoria dos preços do produto, a cacauicultura no sul da Bahia começa novamente a dar sinais de recuperação.

2.3. A Doença Vassoura-de-bruxa e a Base Genética da Resistência

A vassoura-de-bruxa (VB) foi primeiro descrita em 1785 por Ferreira, como uma grande lagarta, “lagartão”, devido as malformações por ele observada (Silva,1987). Desde a primeira investigação científica da “vassoura-de-bruxa” do cacau no Suriname em 1895, o patógeno foi nomeado *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915). Foi renomeado para *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, este último revisou o gênero Marasmius. *C. perniciosa* é da ordem Agaricales, família Tricholomataceae, e é endêmica na Bacia Amazônia na região da América do Sul (Holiday, 1952). A VB do cacaueiro ocorre em alguns países como: Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela, Suriname (1895), Guyana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trinidad (1928), Tobago (1939), Grenada (1948), St. Vicent (1988), Panamá (1989) e Brasil, o estado da Bahia (1989) (Purdy, et al., 1996).

Stell (1933) e Pound (1938) foram os primeiros a buscar novas fontes de resistência à *C. perniciosa* em populações de cacau (Pinto e Pires, 1998). Estes trabalhos tiveram início no Equador, onde várias plantas oriundas de tipos de cacau diferentes das populações nativas do cacau do país, denominado cacau Nacional, foram encontradas livres de doenças. Foram coletadas sementes de polinização aberta de plantas selecionadas, desta seleção, cerca de 1,5 milhões de mudas, genótipos foram plantados em 1933 e observados durante anos subseqüentes, observando uma baixa incidência de doenças, sendo inferior à encontrada nas plantações antigas. Similarmente, outro trabalho foi desenvolvido em Trinidad por Pound (1938) nas plantações locais de cacau. As pesquisas visando o melhoramento genético foram dirigidas para a produção de clones imunes, por propagação vegetativa. A busca de plantas imunes não obteve o sucesso desejado, motivando Pound a realizar coletas de material no Equador, nos locais antes reportados por Stell, nos quais haviam sido encontrados plantas com baixo nível de infecção. Destes trabalhos, duas plantas de uma família se destacaram por apresentar consistentemente livres de infecção, designada SCA ou “Scavina” e as duas plantas selecionadas foram denominadas SCA 6 e SCA 12 (Pinto e Pires, 1998).

A doença VB endêmico da região amazônica, foi detectada pela primeira vez na Bahia em maio de 1989, no município de Uruçuca (Pereira et al., 1989).

Seguiu-se uma segunda observação seis meses depois no município de Camacã, 120 km ao sul de Uruçuca. No entanto, a área com plantas infectadas em Camacã era maior que a encontrada em Uruçuca, sugerindo que esta introdução se deu anteriormente à de Uruçuca. O aparecimento da doença em dois sítios distantes e distintos, bem no meio da região cacaueira, sugere que ocorreu mais de uma introdução do patógeno, provavelmente a partir da região amazônica e, possivelmente por intervenção humana (Pereira et al., 1996). A região sulbaiana compreendia a maior região produtora de cacau em área contínua do mundo. No entanto, em razão de grande parte das plantações ser constituída de material do tipo comum da Bahia, sendo estes suscetíveis e uniformes, em muitas áreas nas quais não houve controle cultural da vassoura-de-bruxa, as plantas perderam completamente a sua capacidade produtiva.

O método mais eficaz de controle da vassoura-de-bruxa, embora em longo prazo, consiste na utilização de genótipos resistentes. Até o momento, o clone SCA 6 tem sido a fonte de resistência mais utilizada, apesar de se comportar como suscetível nas condições do Equador, Colômbia e Bolívia. Estudos baseados em inoculações dom fungo em progênies de SCA 6 (Figueira e Cascardo, 2001).

Entretanto, em áreas de híbridos, onde ocorria maior diversidade e heterozigose, foi possível identificar plantas apresentando resistência. Essas seleções foram iniciadas pelos pesquisadores da CEPLAC, com a participação dos produtores (Yamada et al., 2003).

2.4. Caracterização de Banco de Germoplasma Vegetal

Os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor comprovado ou mesmo potencial. A manutenção desses recursos realiza-se por meio do estabelecimento de áreas de proteção ambientais e pela coleta e manutenção desses materiais *ex situ* os quais passam a ser denominados germoplasma. Esta avaliação contribui para prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as

multiplicações dos acessos coletados e possibilitam o estabelecimento dos sítios ou áreas de coletas que contenham maior variabilidade, auxiliando assim na planificação de novas coletas. A avaliação da variabilidade genética em germoplasma depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Nesse sentido, avaliações de variabilidade genética em germoplasma de plantas realiza-se utilizando vários marcadores baseados na análise direta do DNA (Hosbiano et al., 2003). O conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética no germoplasma de uma espécie é de grande importância, pois permite acompanhar a manutenção desta variabilidade durante a multiplicação dos acessos e contribui com informações que possam ampliar a amostragem (Hosbiano et al., 2003).

A caracterização das coleções de cacau têm sido basicamente morfo-agronômica ou baseada em características econômicas. Embora essa caracterização permita uma razoável distinção entre os acessos, as comparações entre grupamentos gênicos ficam impossibilitadas, uma vez que a maioria dos descritores está mais relacionada às características de frutos e sementes. Assim, torna-se necessário à utilização de técnicas mais rápidas, eficazes e confiáveis para auxiliar na caracterização, avaliação e triagem dos genótipos nas coleções como, por exemplo, a aplicação das técnicas de marcadores moleculares (Hosbiano et al., 2003).

É de fundamental importância, portanto, a realização da caracterização e avaliação dos acessos que compõem as coleções visando conhecer as potencialidades das mesmas, identificando assim a variabilidade entre e dentre as populações. Essas são as ferramentas indispensáveis ao programa de melhoramento do cacaueiro que através da variabilidade genética promoverá a criação de novos cultivares. A presença de erros na identificação de acessos em vários bancos de germoplasma parece ser mais comum do que se espera e, nesse sentido, visto a grande importância dos bancos de germoplasma, um esforço internacional é necessário para a caracterização de todas as importantes coleções de germoplasma de cacaueiro do mundo (Faleiro et al., 2002a).

2.5. Variedades Clonais e Seleções em Fazendas

Cerca de 529 clones da coleção de germoplasma do CEPEC foram avaliados para resistência a partir de infecção natural. Os clones Amazoon 21, EET 45, TSA 654, TSH 1188, CEPEC 40, UF 36, TSH 565, CEPEC 541 e PA 300 foram identificados como tendo alto potencial de resistência (Pinto e Pires, 1998). Dessa forma, foram selecionadas as séries PA, P, NA, EET, CJ, RB, MA, CA, e TSA (Pinto e Pires, 1998). Desse grupo, foram selecionados como promissores PA 30 e PA 150 para produção de híbridos (Luz et al., 1999).

A CEPLAC, utilizando-se do clone Scavina 6 (SCA 6), tem distribuído a variedade seminal proveniente do cruzamento de (Scavina 6 x ICS 1), a partir de 1995, e cinco variedades clonais a partir de 1997, para a modernização da lavoura por meio da enxertia, não obstante o SCA 6 tenha participado das combinações híbridas distribuídas pela CEPLAC, notadamente nas décadas de 60 e 70 (Pinto e Pires, 1998). Uma outra fonte de resistência, também utilizada pela CEPLAC para a produção das variedades híbridas distribuídas aos agricultores, é o clone IMC 67, originário do Peru. Além destes dois clones, muitos outros com níveis de resistência variados participaram do programa de distribuição de sementes e tem suas progênies distribuídas nos plantios na região Sul-bahiana (Pinto e Pires, 1998).

A avaliação do germoplasma existente no CEPEC evidenciou baixos níveis de infecção nas progênies de Scavinas, e níveis intermediários nas progênies híbridas derivadas deles, tais como as séries TSH e TSA, materiais gerados e reportados como resistentes em Trinidad. (Pinto e Pires, 1998). O CEPEC então vêm confirmando, nas condições da Bahia, os resultados encontrados em Trinidad. Estas avaliações permitiram ao CEPEC lançamento dos clones TSH 565, TSH 516, TSH 1188, EET 397 e CEPEC 42 e, mais recentemente, dos clones TSA 792, TSA 654, TSH 774 e TSH 656. Apesar de não serem imunes à doença, nas condições ambientais do sul da Bahia, apresentam elevada resistência, além de excelente produtividade (Pinto e Pires, 1998).

Porém, o melhoramento genético e a geração de novos clones devem ser processos contínuos para disponibilizar ao agricultor novos materiais de plantio, ampliando assim a base genética do cultivo e reduzindo o risco de vulnerabilidade

genética dos plantios clonais, em decorrência da base genética estreita dos atuais clones em uso (Perreira 2001).

Os agricultores impossibilitados de terem suas necessidades atendidas a respeito do número de variedades clonais tolerantes à VB, têm como alternativa a utilização de plantas resistentes selecionadas em sua propriedade ou em propriedades vizinhas. O sucesso desta seleção baseia-se no fato de que muitas progênies foram distribuídas para o plantio, utilizando-se os mais diversos clones como progenitores em combinações com os clones SCA 6 e seus parentes, IMC 67 e outros clones que apresentam boa resistência à VB. Como resultado destes cruzamentos, há a possibilidade de surgirem plantas heteróticas e produtivas que apresentem características de resistência. Podendo desta forma, identificar plantas resistentes à VB e com alta produtividade (Pinto e Pires, 1998).

Após o estabelecimento do fungo *C. perniciosa* nos cacauais, os agricultores verificaram que em suas lavouras existiam plantas que eram pouco ou quase nunca atacadas pela doença. Essas plantas foram acompanhadas por períodos de um a três anos pelos agricultores e, recentemente, foram avaliadas em relação a diferentes características agronômicas por instituições locais de pesquisa. Inclusive, o Centro de Pesquisa do Cacau, em Ilhéus, registrou cerca de 1.000 plantas selecionados pelos produtores e pesquisadores, que foram clonadas por enxertia e multiplicadas para avaliações, utilizando-se delineamentos experimentais (Faleiro et al., 2003).

2.6. Estudo da Diversidade Genética Utilizando Marcadores Moleculares

A análise da diversidade genética de populações por meio de marcadores moleculares tem sido utilizada principalmente na análise de coleções de germoplasma, identificando duplicações, otimizando o estabelecimento de coleções nucleares (*core collection*); na avaliação do sistema de coleta e manutenção através da identificação de regiões geográficas de maior diversidade; em estudos básicos de taxonomia e evolução; e caracterização da diversidade dos principais patógenos e pragas que afetam a cultura, de forma a estabelecer

estratégias adequadas para a seleção de cultivares de cacau resistentes (Figueira e Cascardo, 2001).

Na tentativa de categorizar e estudar genótipos de cacau com base em marcadores moleculares tem-se demonstrado que Forasteiros alto Amazônicos, Forasteiros Baixo Amazônicos, Trinitários e Criolos apresentam diferenças genéticas. Porém, alguns autores demonstram dificuldade de separar claramente esses tipos, apesar da distribuição dos vários genótipos nas coordenadas indicarem separação congruente com a classificação tradicional dos tipos.(Figueira e Cascardo, 2001). Com esse tipo de distribuição, a classificação inequívoca de dado genótipo desconhecido não é possível e os vários tipos de marcadores moleculares não servem como critério único de classificação, devido a essa dificuldade de classificação dos genótipos quanto ao tipo propuseram classificar os cacaueiros em dois grandes grupos, considerados silvestres e domesticados (Figueira e Cascardo, 2001).

Marcadores microssatélites têm sido uma ferramenta valiosa para análise da variabilidade genética presente em germoplasma de espécies vegetais e consequentemente para a sua manutenção. Esses marcadores podem contribuir também para a conservação, já que permitem a obtenção de informações cruciais sobre a biologia de populações naturais, tais como, fluxo gênico, migração, tamanho efetivo, sistema de cruzamento, etc. Do mesmo modo que as isoenzimas, que foram utilizadas amplamente no estudo de populações naturais, locos de microssatélites possuem alelos codominantes, porém estes parecem sofrer menor pressão de seleção, por serem localizados, em geral, em regiões não codificantes. Portanto, microssatélites podem ser considerados marcadores moleculares de segunda geração no estudo de populações naturais (Hosbiano et al., 2003).

Os marcadores moleculares RAPD e RFLP foram utilizados para fazer uma avaliação do grau de variabilidade genética entre acessos *Theobroma cacao* L., determinando o relacionamento entre acessos na espécie *T. cacao* e para a organização de acessos de diversidade genética nesta espécie buscando elucidar relacionamento evolucionário entre grupos morfológicos (Lerceteau et al., 1997). Tendo em vista que cacaueiros não são uma exceção para este relato geral, a diversidade genética existe entre o tipo selvagem *Theobroma* sp. com o tipo atual

cultivado, os clones representam somente uma pequena parte do “pool” genético (Lerceteau et al.,1997).

Estudos voltados para o desenvolvimento de marcadores moleculares polimórficos ligados a locos que controlam a resistência a doenças em cacau são de suma importância. Em adição às análises de marcadores moleculares como SSR, RAPD e AFLP, têm-se desenvolvidos marcadores moleculares do tipo SSCP (*single-strand conformational polymorfism*) utilizando gene de resistência homólogo (RGH) (que é uma seqüência de DNA contendo um sítio de nucleotídeo obrigatório e seqüências repetidas ricas em leucinas), segregando para característica de resistência à VB. Processos similares em outras plantas estão sendo estudados (Kuhn et al., 2003).

Estudo evidenciando a diversidade genética de coleções de plantas da região neotropical, presume-se que seja influenciada pela combinação de atributos biológicos e pela interferência humana, que leva à seleção e à produção de pequenas populações. Além disso, as diversas localidades em que o cacau ocorre favorece esse possível isolamento geográfico e os sistemas de autocruzamento (Whitkus et al., 1998). Todos esses fenômenos podem afetar diretamente a variabilidade genética nas populações de cacau analisadas (Whitkus et al., 1998). Portanto, justificam-se os estudos sobre a diversidade genética dos materiais provenientes das diferentes regiões em que o cacau ocorre.

Vários estudos buscando informações sobre a diversidade genética do cacau cultivados na Bahia tem sido desenvolvidos na CEPLAC e na UESC, utilizando marcadores moleculares na tentativa de caracterizar e estudar a diversidade genética das atuais variedades clonais de *T. cacao* recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC (Faleiro et al., 2001), bem como, acessos de cacaueiro com diferentes níveis de resistência à vassoura-de-bruxa (Corrêa et al., 2000; Pires et al., 2001), análises de paternidade de seleções resistentes em plantações da Bahia (Lopes e Yamada, 1999), buscando de um modo geral a identificação de diferentes genótipos com alta resistência à vassoura-de-bruxa, etapa básica na busca de possibilidades de controle eficiente do patógeno que envolvem métodos integrados com especial ênfase à resistência, a qual deve ser eficiente e durável,

requerendo para isso a associação de diferentes genes ligados ao caráter (Pires et al., 2001).

Assim, um trabalho de identificação de fontes de resistência à vassoura-de-bruxa deve ser seguido da obtenção de informações sobre a variabilidade genética desses genótipos para o direcionamento e orientação de cruzamentos dentro do programa de melhoramento, no sentido de ampliar as possibilidades de junção de fatores de resistência, bem como relacionados a características de interesse agronômico (Pires et al., 2001).

3. CAPÍTULO 1

VARIABILIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS RESISTENTES À VASSOURA-DE-BRUXA SELECIONADOS EM FAZENDAS DO SUL DA BAHIA E DE SEUS POTENCIAIS PROGENITORES UTILIZANDO MARCADORES RAPD*

JEIZA BOTELHO LEAL[(1)]; CRISLIANE APARECIDA PEREIRA DOS SANTOS[(1)]; LEONARDO MOREIRA DOS SANTOS[(1)]; JOSÉ LUÍS PIRES[(2)]; DÁRIO AHNERT[(1)]; RONAN XAVIER CORRÊA[(1)].

(Artigo submetido à **Bragantia**, Campinas, SP, em 20/07/2004)

RESUMO

A cacauicultura no sul da Bahia foi drasticamente afetada, na década de 1990, pela doença vassoura-de-bruxa (VB). A alta pressão da doença forçou os agricultores e as instituições governamentais locais a selecionar e multiplicar plantas resistentes por meio de enxertia, para reduzir os efeitos da doença nas fazendas. Apesar da importância destas seleções, poucas informações existem quanto à sua diversidade genética e suas inter-relações com os seus possíveis progenitores. No presente estudo, objetivou-se analisar a diversidade genética

---

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2004).

[1]Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA. E-mail: ronanxc@uesc.br. Autor para correspondência: RXC. [2]Seção de Genética, Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA.

das seleções de cacaueiros resistentes à VB e a inter-relação delas com os seus potenciais progenitores, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA). Cento e vinte acessos de cacaueiros (18 considerados potenciais progenitores e 102 seleções resistentes à VB) foram coletados em 17 fazendas localizadas em sete municípios do sul da Bahia. As amostras de DNA de folhas desses acessos foram amplificadas pela técnica de RAPD, utilizando 13 *primers* decâmeros e submetidas à eletroforese. A diversidade genética dos 120 acessos foi inferida com base nos coeficientes de dissimilaridade genética, calculados a partir da análise de 91 bandas, sendo 61 monomórficas e 30 polimórficas. Observou-se que grande parte das seleções encontrados nas fazendas apresenta uma ampla variação genética enquanto que os possíveis progenitores foram menos diversos do que as seleções, indicando que algumas das seleções devem ter-se originado de progenitores não considerados nesta análise. Essas informações poderão ser utilizadas na definição de novas estratégias de cruzamentos e na orientação aos agricultores na escolha de materiais para plantio.

Palavras-chave: diversidade genética, cacau, *Crinipellis perniciosa*, *Theobroma cacao*, marcadores moleculares, genes de resistência.

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY OF RESISTANT SELECTED CACAO TO WITCH'S BROOM IN FARMS OF THE SOUTH OF BAHIA AND OF ITS POTENTIAL PROGENITORS USING RAPD MOLECULAR MARKERS

The cacao plantation in south of Bahia was drastically affected, in the 1990's, by the witches' broom disease (VB). The disease pressure allowed farmers to select resistant plants and multiply them by grafting to reduce disease in their farms. Even though the farmer's selections are very important, few information are available on their genetic diversity and relationships with their suspected progenitors. The objective of this study was to analyze the genetic diversity on a sample of resistant plants and verify their interrelationship with

potential proprogenitors, using RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. Total of 120 accessions (18 considered potential proprogenitors and 102 farmer's resistant selections), were collected on 17 farms located in seven counties in south of Bahia. DNA was extracted from leaves and amplified by using RAPD's, with 13 RAPD primers, and submitted to electrophoresis on agarose-gel. The genetic diversity and interrelationships were inferred based on coefficients of genetic dissimilarities, calculated from the analysis of 91 RAPD bands, being 61 monomorphics and 30 polimorphics. The results showed that the farmer's selections presented wide genetic variation and the possible progenitors were less diverse, indicating that some of the selections may have originated from other progenitors than those included in the analysis. These information can be used in the formulation of new strategies of crossings and to guide farmers on the choice of resistant cultivars.

Key words: genetic diversity, cacao, *Crinipellis perniciosa*, *Theobroma cacao*, molecular markers, resistance genes.

3.1. INTRODUÇÃO

O cacau tem uma grande importância sócio-econômica para os países produtores, em particular para o Brasil, que é o quarto produtor mundial e possui o quinto maior parque industrial chocolateiro do mundo. A cadeia produtiva do cacau envolve investimentos da ordem de dois bilhões de reais e é responsável por aproximadamente 300 mil empregos diretos, mas estima-se que mais de três milhões de pessoas dependem direta ou indiretamente do cacau (Dias, 2001).

A região cacaueira do Sul da Bahia, a maior área de produção do Brasil, é composta por 71 municípios, abrangendo 1.966.894 habitantes (IBGE, 2000). Na década de 1990, os cacauais desta região sofreram infestação generalizada pela doença vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*. Grave crise se instalou na região com as perdas de produtividade causadas pela VB, associadas aos baixos preços do produto no mercado internacional, contribuindo para a descapitalização dos agricultores e o abandono das lavouras. Os mais

afetados foram os produtores mais pobres e trabalhadores rurais que abandonaram as propriedades e migraram para favelas das cidades da região, aumentando a miséria e as desigualdades sócio-econômicas.

Nas décadas de 1960 e 70, foram distribuídas pela CEPLAC sementes híbridas, sem um controle total de progênie, sabendo-se apenas que alguns dos clones utilizados nestas combinações eram o Scavina 06 e 12, que foram implantadas na lavoura cacaueira no sul da Bahia (Pinto e Pires, 1998). Após a disseminação da VB no Sul da Bahia, houve um trabalho intenso dos agricultores e dos órgãos governamentais locais em selecionar plantas resistentes à doença. Muitas das seleções feitas pelos agricultores foram multiplicadas assexuadamente (clonadas) e amplamente distribuídas, sendo encontradas em muitas fazendas. Não há um conhecimento sistematizado sobre a genética da resistência dessas plantas e do grau de relacionamento genético entre elas. Sabe-se apenas que muitas delas originaram-se de poucas fontes de resistência (Yamada et al., 2003). Essas seleções devem ter sido originadas de cerca de 18 genitores que foram utilizados pela CEPLAC para a produção dos híbridos distribuídos aos agricultores (Faleiro et al., 2003).

Os mais variados tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados nos estudos em cacau sobre caracterização de recursos genéticos, diferenças morfológicas, variabilidade genética e filogenia de *Theobroma* (Lanaud et al., 1999). Também são empregados para avaliar a extensão da variabilidade genética entre acessos selecionados (Lerceteau et al., 1997; Marita et al., 2001) e caracterizar genes homólogos que conferem resistência a doenças em cacau (Kuhn et al., 2003). Inclusive, há aplicações recentes em materiais provenientes da região sul da Bahia (Corrêa et al., 2000; Faleiro et al., 2002; Yamada et al., 2003). Contudo, ainda são incipientes os dados científicos sobre os mais de 1.000 genótipos selecionados pelos agricultores em suas fazendas e difundidos entre eles na região cacaueira. No presente trabalho, objetivou-se analisar a diversidade genética entre as seleções resistentes à VB e as suas inter-relações com os seus possíveis progenitores, utilizando marcadores moleculares RAPD. Com base nestas informações pretende-se definir estratégias de utilização desses materiais genéticos no melhoramento genético e na recomendação aos agricultores.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material Vegetal

Um grupo de 120 acessos de cacau (102 seleções de cacau resistentes à VB e 18 potenciais genitores) foi identificado por meio de um levantamento realizado junto aos agricultores no ano de 2000 em 17 fazendas situadas em sete municípios do sul da Bahia (Tabela 1). Amostras de folhas de cada acesso foram coletadas em estádio intermediário de maturação e mantidas a -80 °C até o momento de sua utilização para extração de DNA.

3.2.2. Análises Moleculares

A extração do DNA de folhas foi realizada pelo método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990), modificado para diferentes espécies de plantas (Corrêa et al., 1999; Queirós, 1999; Pacheco, 2001). Amostras de DNA de cada planta foram amplificadas pela técnica de RAPD – *Random Amplified Polymorphic* DNA (Williams et al., 1990). Nas amplificações, foram empregados 13 *primers* decâmeros, identificados pela *Operon* como: A1, A2, A12, A20, B5, B8, B11, C13, C16, D1, D10, D20 e H8. Esse total de *primers* foi determinado empiricamente, procedendo-se às amplificações até que se completassem pelo menos 30 bandas polimórficas, conforme proposto por Nei & Li (1985) e Corrêa et al. (1996). As condições de amplificação e eletroforese foram realizadas de acordo com Corrêa et al. (1999). Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e fotografados. Os padrões de bandas foram transformados em dados binários e incluídos em planilhas do programa computacional *Excel* para análises genético-estatísticas.

3.2.3. Determinação de Distâncias Genéticas e Análise de Agrupamento

Os coeficientes de dissimilaridade genética foram determinados com base no método de Jaccard (método escolhido com base nos critérios discutidos por Corrêa et al., 1999), a partir de uma matriz de dados binários de presença, ausência e dado faltante, representado por 1, 0 e 9, respectivamente. Esses coeficientes foram utilizados para determinar os agrupamentos pelo método do Centróide e no sistema de Escalonamento Multidimensional – MDS, demonstrando a dispersão dos genótipos no espaço de três dimensões, com auxílio do programa computacional SAS (SAS, 1988).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 91 bandas RAPD, das quais 61 foram monomórficas e 30 polimórficas entre os 120 acessos de cacaueiros, permitindo determinar os coeficientes de dissimilaridades genéticas. A Tabela 2 contém os grupos de acessos formados pelo método centróide a partir desses coeficientes. Observou-se que o grupo I, formado por 91,7% dos acessos, inclui a maior parte das seleções das fazendas e 17 supostos genitores (SCA 06, SCA 12, os trinitários: UF 613, UF 667 e ICS 01; os híbridos que incluem SCA na genealogia: TSH 516, TSH 565, TSH 1188, CEPEC 42 e EET 397; os cacaus comuns: SIAL 70, SIAL 169, Catongo, Q7, Q8, EEG 29; o alto amazônico IMC 67). Esse agrupamento ocorreu porque alguns desses possíveis genitores são híbridos de cruzamento de SCA 06 com ICS 01, como os da série TSH utilizados neste trabalho (Pinto e Pires, 1998). O grupo II, formado por 6,7% dos acessos, inclui oito genótipos provenientes das fazendas e apenas um dos possíveis pais (o alto amazônico PA 300). Essa mesma tendência de agrupamento de um grande número de seleções associadas ao Scavina e um pequeno número de seleções PA, também foi verificada por Yamada e Lopes (1999), em análise de paternidade de cacaueiros com base em dados isoenzimáticos. Além disso, na análise de diversidade genética de diferentes genitores utilizados pela CEPLAC, na década de 1960, para produção de híbridos (Pinto & Pires, 1998), verificou-se que SCA e PA estão

em grupos distintos (Corrêa et al., 2000; Santos & Corrêa, 2001; Yamada et al., 2001). Os grupos III e IV, formados por menos do que 2% dos acessos, possuem apenas os genótipos OC 47, OP 03, respectivamente, sendo que ambos são seleções provenientes das fazendas.Os acessos representados nos três últimos grupos, em virtude de suas distâncias genéticas são indicativos da existência de genitores diferentes de Scavina ou dos híbridos que têm este acesso na genealogia, embora ocorra em menor freqüência entre esses acessos analisados neste trabalho.

Os 120 acessos foram projetados no plano tridimensional, com base nos coeficientes de dissimilaridade genética (Figura 1) e codificados segundo a origem: grupo 1, seleções provenientes das fazendas; grupo 2, acessos trinitários; grupo 3, materiais híbridos; grupo 4, acessos de cacau comum; grupo 5, acessos alto amazônicos e scavinas. Nesta Figura, pode-se observar que os acessos provenientes das fazendas estão dispostos entre os possíveis genitores. Dado que os grupos 2, 4 e 5 são formados por acessos geneticamente diversos, como demonstrado anteriormente (Corrêa et al., 2000; Santos & Corrêa, 2001; Yamada et al., 2001), e provenientes de diferentes áreas de cultivo, pode-se inferir que as seleções provenientes das fazendas e os materiais híbridos apresentam alta diversidade genética. Portanto, assumindo que os locos amostrados são representativos do genoma como proposto por Williams et al. (1990), propõe-se que esses materiais sejam incluídos nos programas de melhoramento do cacau, visando incorporar um maior espectro de variabilidade genética entre os materiais. Como os acessos obtidos nas fazendas apresentaram uma variação contínua entre os 18 genótipos tomados como padrão de referência nas análises, pode-se inferir que os genótipos encontrados nas fazendas do sul da Bahia apresentam uma ampla combinação genética.

Este trabalho confirmou que grande parte das seleções resistente à VB, encontradas nas fazendas, possivelmente descenderam dos Scavinas 06 e 12. No entanto, algumas seleções das fazendas distanciaram-se das demais, como as que se agruparam no grupo II (Tabela 1): VB 1142, SR 03, FB 39, 1142 e 1144, VBB 07, SP 304, FL 16, coletados na Fazenda Almirante Cacau (VB 1142), Fazenda Santa Rosa (SR 03) e Fazenda Brasileira (FB 39, 1142, 1144), e

Fazenda Leolinda (FL 16) estas seleções se mostraram com maior diversidade em relação as demais. Os grupos III e IV representados pelas seleções OC 47 e OP 03 originados na fazenda Oséias Gomes da Costa e Futurosa, respectivamente, se distanciaram de todos os possíveis pais. Mesmo as seleções dos fazendeiros com as maiores distâncias sem relação aos Scavinas, que, portanto, não se agrupariam com estes em análises de agrupamento, são margeadas por genótipos reconhecidamente descendentes deste. No entanto, o presente estudo permite inferir que as seleções VB 1142, SR 03, SP 304, FB 39, 1142 e 1144, VBB 07, FL 16, OP 03 e OC 47 demonstrados na Tabela 1 e distantes dos demais, provavelmente não teriam SCA 06 e seus híbridos como prováveis pais. A origem exata desses materiais poderá ser confirmada com os trabalhos que serão desenvolvidos no nosso laboratório com marcadores microssatélites.

Os resultados desta abordagem molecular corroboram aqueles obtidos com base em caracteres relacionados à produção e resistência à vassoura-de-bruxa, encontrados por Monteiro et al. (2003), de que acessos selecionados pelos agricultores são divergentes entre si. Portanto, são indicativos de que eles são promissores para programas de melhoramento, uma vez que aqueles genótipos mais distantes entre si poderão constituir fontes de diferentes alelos para combinação e formação de cultivares agronomicamente superiores. Assim, as análises moleculares poderiam ser utilizadas como ferramenta auxiliar na orientação de novas estratégias de cruzamentos e diversificação de materiais, visando minimizar os riscos de quebra da resistência a doenças pelos cultivos nas regiões de alta pressão de inóculo. Os genótipos considerados elites por parâmetros agronômicos e de diversidade genética também deverão ser avaliados com base nos marcadores moleculares que vêm sendo obtidos para diferentes características de interesse nos programas de melhoramento genético do cacaueiro, desde que validados para as diferentes populações (Faleiro et al., 2003). Os materiais muito relacionados entre si devem ter os mesmos alelos de resistência à vassoura de bruxa. Assim sendo, como estratégia para os agricultores pode ser recomendada o uso das plantas resistentes e mais distantes geneticamente, indicativos de fontes de resistência diferentes, o que evitaria a quebra de resistência.

3.4. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos: à UESC, pelo apoio financeiro; ao CNPq e à UESC, pela concessão de bolsas de Iniciação Científica; à CAPES, pela bolsa de Mestrado de Jeiza Botelho Leal; e ao pesquisador Dr. Alan V. Pomella e ao Técnico Mariosvaldo Morais Macêdo, pelo fornecimento de parte das amostras de folhas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)**. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus.

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.

CORRÊA, R.X.; AHNERT, D.; SANTOS, L.M.; LEAL, J.B.; SANTOS, C. Divergência Genético-molecular entre os possíveis genitores de seleções de cacaueiro resistentes à vassoura-de-bruxa no sul da Bahia. **Genetics and Molecular Biology (Supplement)**. Ribeirão Preto: SBG, v.23, p.404-405, 2000. (Resumo).

CORRÊA, R.X.; BARROS, E.G.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic distances with different number of RAPD-PCR molecular markers. **Brasilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto: SBG, v.19, p.315, 1996.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento Genético do cacaueiro**. (Editor). Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. 578p.

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

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; ROCHA, J.B.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, 2003.

FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M. ; LOPES, U.V.; FALEIRO, A.S.G.; BAHIA, R.C.S; GOMES, L.M.C.; SANTOS, R.C.; SANTOS, R.F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. acessions maintained in duplicate at the cacao research center germplasm colletion base don RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.2, n.3, p.439-444, 2002 a.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.;YAMADA, M.M. ; BAHIA, R.C.S; CORRÊA, R.X. Diversidade genética de acessos de *Theobroma cacao* L. selecionados por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites. **XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia.** Goiânia, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal, Bahia. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

KUHN, D.N.; 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, p.191-202, 2003.

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

LERCETEAU, E.; ROBERT, T.; PÉRTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* acessions using RAPD and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.95, p.10-19, 1997.

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, p.1305-1316, 2001.

MONTEIRO, E.M.L.; PINTO, R.M.C; CORRÊA, R.X.; MACÊDO, M.M.; AHNERT, D. Variabilidade em clones de cacaueiros resistentes à vassoura-de-bruxa com base em caracteres agronômicos. In: **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.** Porto Seguro, 2003. (CD ROOM).

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.19, p.153-170, 1983.

PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L. Seleção de Plantas de cacau resistentes a vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico** n. 181, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira-Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, 1998. 34p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.03. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1988. 1028p.

SANTOS, C.A.; CORRÊA, R.X. Divergência Genético-molecular em seleções de cacaueiro resistentes à vassoura-de-bruxa no sul da Bahia e seus possíveis genitores. In: **7º Seminário de Iniciação Científica da UESC (Livro de**

resumos). Ilhéus: EDITUS, 2001. p.163-164.

QUEIRÓS, W.T. Mapeamento genético do cacaueiro e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa. 1999. 64p. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)**. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG.

YAMADA, M.M.; LOPES, U.V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom in plantations of Bahia. **Agrotrópica**, Ilhéus, p.83-88, 1999.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U. V.; BAHIA, R.C.; PIRES, J.L.; GOMES, L.M.C.; MELO, G.R.P. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, n.4, p.377-383, 2001.

YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; FLORES, A.B.; MELO, G.R.P. Diversidade e origem de seleções de cacau (*Theobroma cacao* L.) feitas em fazendas para resistência à vassoura-de-bruxa. **XXXVI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.** Porto Seguro - Bahia, 2003. (CD ROOM).

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

Tabela 1. Relação de acessos e respectivas coordenadas tridimensionais correspondentes à Figura 1

Acessos♣	Dimensão 1	Dimensão 2	Dimensão 3	Acessos1	Dimensão 1	Dimensão 2	Dimensão 3
OC 108	0,19439	-0,03114	-0,21319	**FL 77**	-0,04297	-0,09819	-0,17548
OC 03	0,01334	-0,08638	-0,20457	**FL 45**	0,34022	-0,00959	-0,09571
OC 83	0,24044	0,12503	0,24378	**FL 04**	-0,49258	-0,01417	-0,00501
OC 56	0,13388	0,16648	0,19746	**BF 01**	0,04225	0,08623	0,14273
OC 08	-0,06968	0,13910	0,21050	**VT 18**	0,21559	-0,10851	-0,11928
OC 54	-0,07308	-0,01385	-0,05588	**VT 09**	-0,08554	0,09827	-0,01490
OC 207	-0,15206	-0,33025	0,28509	**VT 10**	-0,07080	0,20147	0,03505
OC 70	0,22350	-0,28993	0,12799	**VT 05**	-0,09811	0,05860	0,06486
OC 104	0,10247	0,16740	-0,03344	**OP 01**	0,04225	0,08623	0,14274
OC 239	0,17343	0,07742	-0,32133	**OP 03**	-0,05692	-0,79962	-0,07463
OC 80	0,00071	0,21817	0,22160	**SAF 01**	-0,26868	-0,34447	-0,29314
OC 232	0,24696	-0,17479	0,09035	**BVP**	-0,43699	0,06560	0,10455
OC 10	0,26862	-0,17448	0,06578	**SJ 01**	0,12247	0,23242	-0,30271
OC 99	0,21394	-0,13651	0,29079	**SJ 02**	0,39886	0,12011	-0,19586
OC 217	0,07400	-0,15015	0,16577	**VBB 07**	0,36056	-0,29867	-0,28503
OC 92	-0,15033	-0,12364	0,04495	**VBB 01**	0,13880	-0,22749	-0,06484
OC 101	0,03450	0,08659	0,20615	**VBB 05**	0,31915	-0,11118	-0,22821
OC 15	-0,04680	0,15170	0,18767	**VBB 08**	0,09745	-0,08801	0,20087
OC 218	0,28570	-0,00498	0,10193	**SR 01**	-0,04426	-0,01114	0,16857
OC 97	0,05406	0,35838	0,22897	**SR 04**	-0,05752	0,22729	-0,11861
OC 237	0,00563	0,18933	0,24258	**SR 03**	0,52561	0,04867	-0,31745
OC 208	0,03955	0,21962	0,21923	**SR 05**	-0,18444	-0,26883	-0,16792
OC 48	-0,34610	0,19879	0,33401	**T 10**	0,03818	-0,13919	-0,01489
OC 107	0,00650	0,00475	0,16420	***SIAL 169**	-0,46100	-0,29766	0,00412
OC 219	0,26909	-0,10161	0,04113	***PA 300**	-0,08039	-0,22473	-0,54623
OC 47	-0,05867	0,55002	0,10618	***TSH1188**	-0,16144	-0,40677	0,18318
OC 106	0,05961	-0,01579	0,35239	***TSH 565**	-0,15174	-0,18263	0,07403
OC 231	-0,30708	0,00038	0,38762	***SIAL 70**	-0,40105	-0,20612	-0,09787
OC 235	0,17771	-0,04026	0,20432	***Catongo**	-0,45200	-0,21261	-0,03757
OC 74	0,11893	-0,11212	0,08838	***Cepec 42**	-0,20141	-0,32314	-0,06344
OC 232	0,15465	-0,22342	0,02110	***SCA 12**	0,07956	-0,16844	-0,26965
OC 100	-0,04157	-0,02592	0,11215	***SCA 06**	0,10323	-0,38721	-0,06262
OC 16	-0,00267	0,06969	0,05511	***ICS 01**	-0,19741	-0,03439	-0,26296
OC 95	0,25193	0,06898	0,16706	***UF 613**	-0,52136	-0,07749	-0,13681
OC 220	0,21492	0,28472	0,08309	***EET 397**	0,14956	-0,30211	-0,02114
OC 96	-0,13553	0,04914	0,02827	***C,C, Q8**	-0,33814	-0,15967	-0,27280
FC 1154	-0,25651	0,47188	-0,06726	***C,C, Q7**	-0,40744	-0,14212	-0,25301
FB 1148	-0,05435	0,03760	0,27621	***TSH 516**	-0,10125	0,01046	-0,25366
FB 60	0,24389	0,23083	0,19469	***UF 667**	0,02576	-0,20308	0,15544
FB 33	0,07501	-0,08054	0,28078	***IMC 67**	-0,19830	-0,21551	-0,21749
FB 1142	0,56536	0,01622	-0,09412	***EEG 29**	-0,36062	-0,29505	-0,06273
FB 1139	-0,02674	0,29750	-0,11119	**ALMC 5**	-0,04553	-0,26848	0,01014
FB 19	-0,35318	0,33617	-0,07507	**VBB 1142**	0,58690	-0,00653	-0,04967
FB 26	-0,20306	0,28494	-0,25404	**VB 1139**	-0,03550	0,28423	-0,13415

Continua ...

Tabela 1. Continuação

Acessos♣	Dimensão 1	Dimensão 2	Dimensão 3	Acessos1	Dimensão 1	Dimensão 2	Dimensão 3
FB 48	0,24686	0,16010	-0,24647	**FC 1**	-0,08485	0,50638	-0,06599
FB 31	-0,36881	0,27073	-0,25524	**M 05**	0,09318	-0,15282	0,34213
FB 76	0,05119	0,38292	-0,10379	**AM 01**	-0,04830	-0,02260	0,42661
FB 55	0,14511	-0,03945	0,23408	**PH 16**	-0,11913	0,14614	0,40490
FB 206	-0,13390	0,33837	-0,29166	**SP 304**	0,42728	-0,23319	-0,04968
FB 1150	-0,14927	0,10091	-0,02561	**AM 02**	0,03089	0,19498	-0,28884
FB 30	-0,19415	0,36560	-0,13973	**FB 28**	0,32934	0,17116	-0,27142
FB 43	0,30398	0,38367	-0,09456	**AM 03**	0,19902	-0,18639	-0,38195
FB 1151	-0,30539	0,14842	-0,01522	**FB 16**	-0,04217	0,31512	-0,09347
FB 39	-0,08237	0,03447	-0,57237	**FB 1144**	0,49245	0,23242	0,05435
FL 60	-0,00795	-0,38114	-0,24612	**FB 24**	-0,05084	-0,30466	0,18949
FB 16	0,09828	-0,54715	0,26653	**FB 72**	0,11925	-0,24829	0,31850
FL 70	-0,16535	0,06941	0,28987	**FB 1149**	0,11132	0,17364	-0,44747
FL 62	-0,18287	-0,04447	-0,12253	**FB 34**	0,17102	0,03684	0,41185
FL 73	-0,26272	0,28533	0,06097	**FB 38**	0,30832	0,13096	0,25791
FL 66	-0,44067	0,08802	0,04149	**ICS 01**	0,19377	0,05276	-0,25456

♣Procedência dos acessos – as letras que identificam os acessos correspondem aos nomes das respectivas fazendas, localizadas nos seguintes municípios baianos: **Camacã**: OC – Oséias Gomes Costa; **Ilhéus**: VBB – Brasil; SP – São Pedro; BVP – Banco da Vitória; **Itabuna**: FC – Conceição; **Itajuípe**: T – Tararanga; M – Massaranduba; SJ – São José; ALMC – Almirante Cacau; **Jussari**: OP – Futurosa; BF – Futurosa; **São José da Vitória**: VT = Venturosa; PH = Porto Híbrido; **Uruçuca**: SAF – Santo Antônio; SR – Santa Rosa; FB – Brasileira; AM = América.
*Acessos que correspondem aos possíveis genitores, bem como a seleção VB 1139, foram coletados na Fazenda Almirante Cacau, Itajuípe, BA.

Tabela 2. Agrupamento dos genótipos pelo método hierárquico centróide, a partir da matriz de coeficientes de dissimilaridade genética

Cluster	Genótipos*
I	**IMC 67**; **SIAL 169**; **SIAL 70**; **CATONGO**; **C, C, Q7**; **C, C, Q8**; **EEG 29**; OC 108; OC 03; OC 83; OC 56; OC 08; OC 54; OC 207; OC 70; OC 104; OC 239; OC 80; OC 232; OC 10; OC 99; OC 217; OC 92; OC 101; OC 15; OC 218; OC 97; OC 237; OC 208; OC 48; OC 107; OC 219; OC 106; OC 231; OC 235; OC 74; OC 232; OC 100; OC 16; OC 95; OC 220; OC 96; FC 1154; FB 1148; FB 60; FB 33; FB 1139; FB 19; FB 26; FB 48; FB 31; FB 76; FB 55; FB 206; FB 1150; FB 30; FB 43; FB 1151; FL 60; FL 70; FL 62; FL 73; FL 66; FL 77; FL 45; FL 04; BF 01; VY 18; VT 09; VT 10; VT 05; OP 01; SAF 01; BVP; SJ 01; SJ 02; VBB 01; VBB 05; VBB 08; SR 01; SR 04; SR 05; T 10; ALMC 05; VB 1139; FC 1; M 05; AM 01; PH 16; AM 02; FB 28; AM 03; FB 16; FB 24; FB 72; FB 1149; FB 34; FB 38; ICS 01; **TSH 1188**; **TSH 565**; **CEPEC 42**; **EET 397**; **TSH 516**; **SCA 12**; **SCA 06**; **ICS 01**; **EET 397**; **UF 667**
II	**PA 300**; FB 1142; FB 39; FL 16; VBB 07; SR 03; VB 1142; SP 304; FB 1144
III	OC 47
IV	OP 03

*Os genótipos em negrito são os supostos genitores.

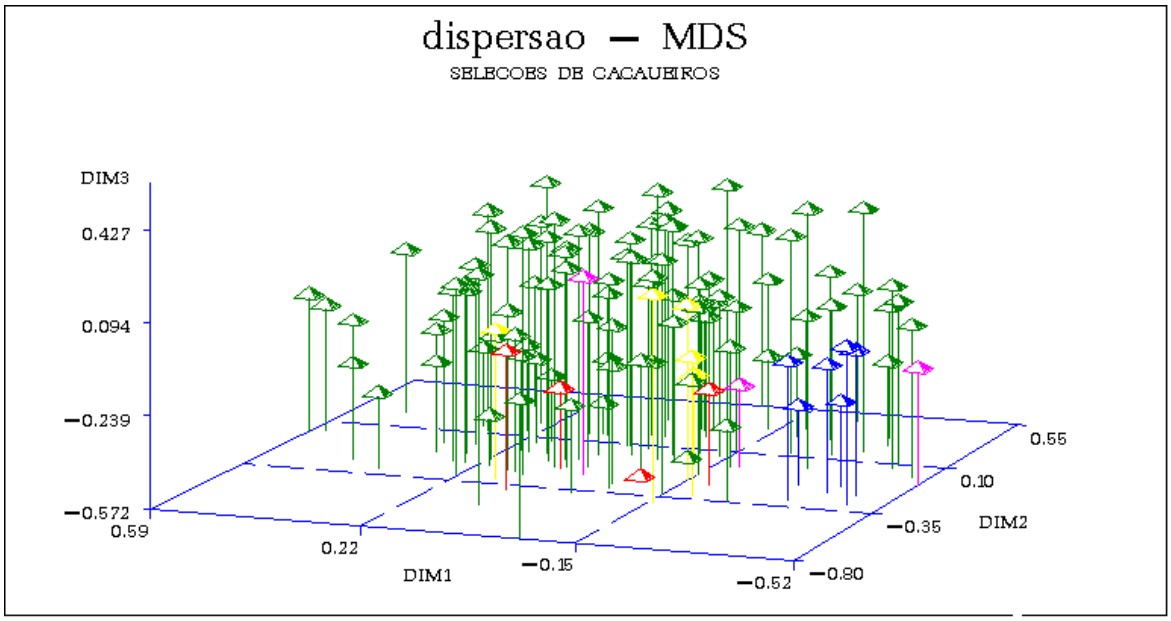

Figura 1. Dispersão multidimensional dos 120 acessos de cacau, separados em quatro grupos de origem: grupo 1 – os acessos representados na cor verde são as seleções das fazendas; grupos 2 a 5 – os demais acessos são os possíveis progenitores, sendo o grupo 2, em rosa, os trinitários (UF 613, ICS 01, UF 667); o grupo 3, em amarelo, os híbridos (TSH 1188, 516, 565, EET 397 e EEG 29); o grupo 4, em azul, os representantes do tipo cacau-comum (SIAL 70, 169, CATONGO, CEPEC 42, Q7 e Q8); o grupo 5, em laranja, os scavinas (06 e 12) e os amazônicos (PA 300 e IMC 67)

4. CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE GENÉTICA DE CACAUEIROS PROVENIENTES DE FAZENDAS DO SUL DA BAHIA E DO BANCO DE GERMOPLASMA DA CEPLAC UTILIZANDO MARCADORES SSR*

JEIZA BOTELHO LEAL[(1)]; FERNANDA AMATO GAIOTTO[(1)]; ISAMIRE SILVA ANDRADE[(1)]; MILTON MACOTO YAMADA[(2)]; COSME DAMIÃO CRUZ[(3)]; DÁRIO AHNERT[(1)]; FÁBIO GELAPE FALEIRO[(4)]; RONAN XAVIER CORRÊA[(1)].

(Artigo a ser submetido)

RESUMO

A análise da diversidade genética com base em marcadores moleculares é uma estratégia bastante utilizada nas pesquisas sobre plantas e animais. No caso do cacau, têm sido buscados materiais com alta diversidade genética como forma de aumentar a riqueza de genes relacionados com resistência a doenças e outras características de interesse nesta cultura. Neste trabalho, objetivou-se

---

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz (2004).

[1]Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45650-000, Ilhéus, BA. E-mail: ronanxc@uesc.br. Autor para correspondência: RXC. [2]Seção de Genética, Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA. [3]Biagro – Universidade Federal de Viçosa.

caracterizar a diversidade genética de seleções de cacaueiros selecionados como resistentes à vassoura-de-bruxa (VB) nas fazendas e de acessos do banco de germoplasma do CEPEC, com base em marcadores microssatélites. Nove pares de *primers* microssatélites de cacau, disponíveis na literatura, foram utilizados na amplificação de DNA dos 50 indivíduos, sendo 23 acessos provenientes do banco de germoplasma e 27 indivíduos selecionados em fazendas sul baianas como resistentes à VB. Os 58 alelos amplificados com esses *primers* foram utilizados para a determinação dos coeficientes de dissimilaridade genética entre os indivíduos. A análise de dispersão dos indivíduos confirmou que existem clones resistentes à VB que são dissimilares daqueles relacionados com o SCA 06. Esses materiais poderão ser recomendados para plantio e utilizados na pesquisa para aumentar a diversidade de materiais nos programas de melhoramento.

Palavras-chave: marcadores co-dominantes, diversidade genética, cacaueiros, vassoura-de-bruxa.

4.1. INTRODUÇÃO

No processo de seleção de cacaueiro para o melhoramento, buscam-se acessos resistentes à vassoura-de-bruxa com alta diversidade genética entre si e, também, geneticamente distintos das tradicionais fontes de resistência. Nesse sentido, o estudo da diversidade genética, bem como a genotipagem e inferência sobre a ascendência de tais acessos selecionados é de extrema importância quando se deseja utilizá-los em programas de melhoramento ou multiplicá-los para distribuição aos produtores.

A estratégia mais utilizada atualmente para estudar a diversidade genética de plantas é o emprego de diferentes tipos de marcadores moleculares. Os marcadores têm facilitado tais estudos porque eles permitem, em um curto espaço de tempo, analisar um número praticamente ilimitado de marcas polimórficas em nível de DNA, sem influência do ambiente (Lanaud, 1987; Laurent et al., 1993; 1994; Lerceteau et al., 1997; N'Goran et al., 1994; Marita, 1998; Pires et al, 2000; Risterucci et al., 2000; Faleiro et al., 2001). Nos programas de melhoramento, a identificação e discriminação de genótipos bem como os

estudos da diversidade entre eles constitui-se em aplicação a curto prazo dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Estudos preliminares sobre a diversidade genética do cacau têm demonstrado que grande parte dos clones resistentes à VB tem o Scavina como fonte de genes de resistência à vassoura-de-bruxa (Leal e Corrêa, 2001; Yamada et al., 2001; Leal et al., 2004). Desta forma, vêm sendo desenvolvidos estudos de diversidade sobre os materiais encontrados no campo para verificar suas relações com fontes alternativas de genes. No entanto, os dados obtidos até o momento são escassos, indicando que há necessidade de prosseguir com as análises envolvendo um maior número de locos e abrangendo um maior número de plantas.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se analisar a diversidade e a provável origem genética de acessos de cacaueiros, selecionados como resistentes à vassoura-de-bruxa em condições de fazenda, com base nos marcadores microssatélites, visando detectar possíveis fontes de genes de resistência para uso em programas de melhoramento genético.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Coleta de Material Genético e Extração de DNA

Um total de 50 amostras, coletadas nos municípios de Ilhéus; Itajuípe; São José da Vitória e Uruçuca, localizadas no Sul da Bahia. Essas plantas foram escolhidas entre as seleções feitas pelos agricultores a partir de materiais híbridos distribuídos pela CEPLAC, que apresentaram elevados níveis de produção e os menores índices de infecção por vassoura-de-bruxa em condições de campo nos anos de 1998 a 2001 (Monteiro, 2003) bem como acessos do banco de germoplasma do CEPEC cujos estudos preliminares revelaram que se tratam de materiais promissores para introdução em programas de melhoramento (Yamada et al., 2001).

A extração do DNA de folhas de cada planta foi realizada pelo método de CTAB (Doyle e Doyle, 1990), considerando-se as modificações previamente estabelecidos 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; Queirós, 1999; Almeida, 2001; Faleiro et al., 2001). A quantificação das amostras foi realizada por espectrofotometria e a análise da integridade, por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook et al., 1989).

4.2.2. Padronização das Condições de Amplificação e Obtenção de Dados Moleculares

As amostras de DNA de cada planta foram amplificadas pela técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) utilizando *primers* específicos para microssatélites ou *simple sequence repeats* - SSR (Litt e Luty, 1989). Os nove *primers* utilizados nas amplificações foram previamente selecionados com base na sua distribuição nos grupos de ligação de cacau, em estudos desenvolvidos pela comunidade científica internacional (Lanaud et al. al., 1995; Crouzillat et al., 1996, Risterucci et al. 2000). Os pares de *primers* são identificados como Y16984 (mTcCIR10), Y16981 (mTcCIR7), Y16987 (mTcCIR13), Y16985 (mTcCIR11), AJ271946 (mTcCIR44), AJ271944 (mTcCIR42), AJ271953 (mTcCIR54), AJ271827 (mTcCIR35), AJ271945 (mTcCIR43) e suas seqüências encontram-se no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Em uma etapa preliminar de padronização das condições de amplificação com os *primers* obtidos na literatura, cada par de *primers* microssatélites foi testado com três amostras de DNA para confirmar a amplificabilidade nas condições descritas na literatura (Lanaud et al., 1999). Nessa etapa de padronização, a separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,8%. Com base nos parâmetros definidos nessa etapa, os produtos das amplificações foram separados em gel de poliacrilamida 5% no seqüenciador automático ABI 377, utilizando os programas Genescan e Genotyper na caracterização de microssatélites amplificados a partir de *primers* marcados com

fluorocromos e analisados por meio do sistema de detecção de fluorescência no seqüenciador de DNA ABI 377.

4.2.3. Análises Genético-estatísticas dos Dados Moleculares

Os padrões de comprimento de fragmentos de DNA ou genótipos de cada indivíduo transformados em planilhas eletrônicas com os códigos 0, 1 e 2, para ausência do alelo, presença de um só alelo, presença de duas cópias de mesmo alelo, respectivamente. O cálculo dos coeficientes ou índices de similaridade (IS) foi realizado com auxílio do programa computacional genes (Cruz, 1998) com base na seguinte expressão:

$$IS = \frac{N + 2M}{2(D + M)}$$

em que:

N = soma dos alelos comuns considerando todos os locos;

D = número total de locos;

M = número de marcadores monomórficos homozigotos (código 2) analisados e que não foram incluídos no arquivo de dados.

A dispersão dos genótipos foi projetada no espaço bidimensional, utilizando o método de coordenadas principais (Cruz e Viana, 1994), com auxílio do programa computacional Genes (Cruz, 1998).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Extração e Amplificação de DNA

As amostras de DNA apresentaram concentrações variando de 303,0 a 2.517,5 ng/μL (Quadro 1), que foram suficientes para a realização de todas as reações necessárias para a análise. O padrão eletroforético obtido (Figura 1) é

Quadro 1. Identificação dos Indivíduos, relação das absorbâncias a 260 e 280 nm e quantificação das concentrações das amostras de DNA

Número	Indivíduo	A(260)	A(280)	A(260)/(A280)	Conc. (ng/uL)
01	SJ 02	0,0838	0,0456	1,8377	419,00
02	LCT 37	0,1102	0,0564	1,9539	551,00
03	VB 1139	0,0932	0,0576	1,6181	466,00
04	TSH 1188	0,1523	0,0783	1,9451	761,50
05	SIC 329	0,1911	0,1121	1,7047	955,50
06	CS 03	0,4089	0,3141	1,3018	2.044,50
07	CCN 51	0,1591	0,0926	1,7181	795,50
08	SIAL505	0,1987	0,1827	1,0876	993,50
09	SP 50	0,1440	0,0748	1,9251	720,00
10	PA 30	0,1776	0,1372	1,2945	888,00
11	SIAL 325	0,1571	0,0978	1,6063	785,50
12	TSA 644	0,5035	0,3870	1,3010	2.517,50
13	UF 168	0,1661	0,1047	1,5864	830,50
14	EET 397	0,1654	0,0874	1,8924	827,00
15	T 11	0,1947	0,1060	1,8368	973,50
16	AM 01	0,1648	0,0941	1,7513	824,00
17	FL 60	0,1754	0,0987	1,7771	877,00
18	TSH 516	0,0652	0,0343	1,9009	326,00
19	UF 667	0,1743	0,0879	1,9829	871,50
20	EEG 29	0,0965	0,0297	3,2492	482,50
21	FB 21	0,0923	0,0569	1,6221	461,50
22	SIAL 169	0,0738	0,0364	2,0275	369,00
23	VB1154	0,1704	0,1018	1,6739	852,00
24	FL 16	0,1753	0,0955	1,8356	876,50
25	SJ 01	0,1582	0,0754	2,0981	791,00
26	SIAL 70	0,0953	0,0462	2,0628	476,50
27	ALMC 05	0,1587	0,0785	2,0193	793,50
28	TSH 565	0,0975	0,0567	1,7196	487,50
29	RB 39	0,2855	0,2127	1,3423	1.427,50
30	VB1117	0,1560	0,0911	1,7124	780,00
31	GNVII	0,1850	0,0954	1,9392	925,00
32	SIC 328	0,2148	0,1112	1,9317	1.074,00
33	PA 300	0,0606	0,0314	1,9299	303,00
34	AM 02	0,2230	0,1233	1,8086	1.115,00
35	M 05	0,1642	0,0957	1,7158	821,00
36	CEPEC 42	0,0806	0,0449	1,7951	403,00
37	EET 392	0,1850	0,0980	1,8878	925,00
38	NO 02	0,1661	0,0987	1,6829	830,50
39	SR 03	0,1378	0,0789	1,7465	689,00
40	LCT16210	0,2627	0,1556	1,6883	1.313,50
41	RB 36	0,3062	0,1866	1,6409	1.531,00
42	T 10	0,1875	0,0981	1,9113	937,50
43	M 04	0,1161	0,0710	1,6352	580,50
44	FL 77	0,2328	0,1236	1,8835	1.164,00
45	SCA 12	0,1312	0,0648	2,0247	656,00
46	VB 1151	0,1101	0,0555	1,9838	550,50
47	COCA	0,1005	0,0538	1,8680	502,50
48	IMC 67	0,1523	0,0921	1,6536	761,50
49	SCA 06	0,1002	0,0448	2,2366	501,00
50	Amazon 15	0,1583	0,0872	1,8154	791,50

indicativo de DNA íntegro. A razão A_{260}/A_{280} variou entre 1,7 e 2,0 (Quadro1), indicando que as amostras estão ricas em DNA e não em contaminantes como proteínas. Portanto, o método de extração adotado permitiu obter amostras de DNA em quantidade e qualidade adequadas às análises.

Nas reações com três pares de *primers* simultaneamente (*triplex*), apenas foram separados adequadamente os produtos amplificados com os dois *primers* marcados com fluorocromo verde (Tet) e azul (6-Fam). Os primers marcados com fluorocromo amarelo (Hex) não foram distinguidos na eletroforese automática. Desta forma, as reações com os *primers* marcados com o fluorocromo amarelo (Hex) foram realizadas separadamente e os produtos da amplificação foram misturados àqueles obtidos nos *duplex*, antes de proceder a corrida eletroforética em gel de seqüenciamento. Nove *primers* que amplificaram adequadamente foram utilizados para amplificar as 50 amostras de DNA dos indivíduos (Figura 2).

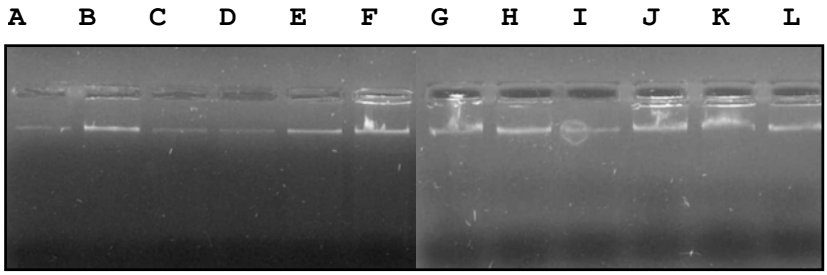

Figura 1. Análise eletroforética da integridade das amostras de DNA, separadas em gel de agarose 1% e coradas com Brometo de Etídio 1ng/μL. A e B correspondem a 50 e 200 ng de DNA do fago Lambda, respectivamente (marcador de concentração). C a L correspondem a 5 µl de DNA extraído de folhas de cacau: C – EET 392; D – RB 36; E – SIC 328; F – SIC – 329; G – SIAL 325; H – UF 168; I – IMC 67; J – PA 30; K – RB 39; L – TSA 644.

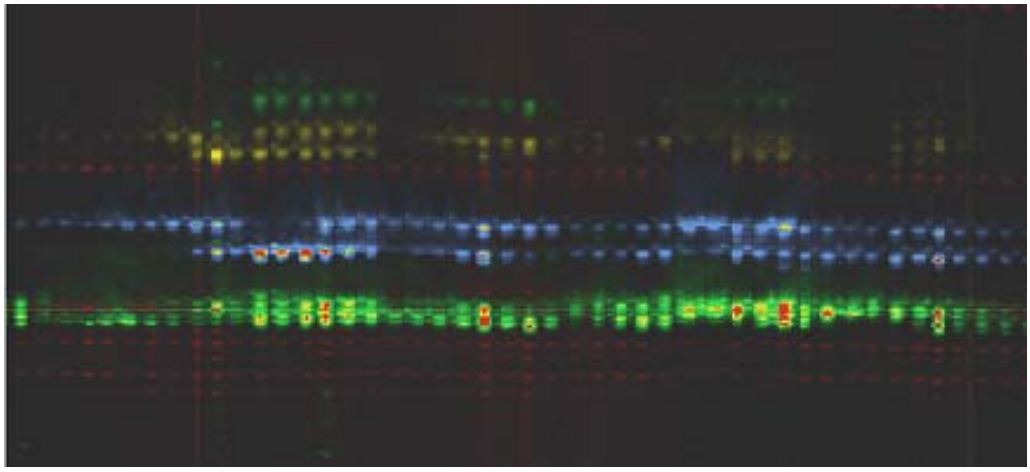

Figura 2. Produtos de amplificação de 50 amostras de DNA de cacau com os *primers* microssatélites AJ271827 (azul: 6-FAM), Y16985 (amarelo: HEX) e AJ271953 (verde: TET) separados em gel de poliacrilamida 5%. O marcador de tamanho de fragmento encontra-se em vermelho (ROX 500).

4.3.2. Análises de Diversidade

Os produtos da amplificação de DNA dos 50 acessos utilizados na análise apresentaram um grande número de alelos por loco (3 a 11) com uma média de 6,4 alelos por loco (Quadro 2). Essa média é superior àquela encontrada por Pires et al. (2001) que foi de 3,3 alelos por loco e por Faleiro et al. (2001) de 3 alelos por loco, utilizando eletroforese em gel de agarose 3%. Todavia, neste trabalho foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% para a separação dos produtos eletroforéticos no seqüenciador ABI 377, que permite diferenciar fragmentos que diferem em apenas um pb, ao passo que o gel de agarose possui uma resolução menor (diferenças acima de 5 pb).

O Quadro 3 contém os genótipos obtidos para cada indivíduo. Pode-se destacar nesses dados o fato de que 70% dos locos estão em heterozigose, o que está de acordo com a história genealógica dos materiais (os acessos do banco de germoplasma utilizados neste trabalho e seleções feitas pelos agricultores a partir de materiais híbridos distribuídos pela CEPLAC em períodos anteriores). Além disso, o cacau é uma espécie alógama, portanto os acessos integrantes do banco de germoplasma tendem a ser heterozigotos. Risterucci et

al. (2000) analisaram o uso de marcadores microssatélites para verificar a identidade e variabilidade genética de acessos de cacaueiro de banco de germoplasma e sugeriram que, dado ser um marcador co-dominante, cerca de 8 a 9 locos seriam suficientes para uma análise inicial.

4.3.3. Análises de Agrupamento

Nas análises de dispersão no plano bidimensional, realizadas com base nas distâncias genéticas (Figura 3), os indivíduos numerados como 33 (PA 300) e 38 (NO 02) ficaram próximos entres si, os nove indivíduos numerados como 44 (FL 77), 03 (VB 1139), 22 (SIAL 169), 28 (TSH 565), 18 (TSH 516), 14 (EET 397), 21 (FB 21), 13 (UF 168) e 16 (AM 02), 40 (LCTEEN 162) e 48 (IMC67) apresentaram-se mais dispersos entre os 50 indivíduos analisados. Os demais 37 acessos agruparam-se muito próximos do SCA 06 e SCA 12 (números sobrepostos na Figura 3). Esse padrão de agrupamento em que uma grande proporção dos indivíduos fica próxima de SCA 06 e SCA 12, e uma pequena proporção fica dispersa ou próxima do genótipo PA 300, mostrou-se similar aos encontrados anteriormente com base em outros tipos de marcadores moleculares (Yamada et al., 1999; Corrêa et al., 2000; Santos e Corrêa, 2001; Leal et al., 2004).

Quadro 2. Número de alelos por *primer* microssatélite e tamanho do maior e do menor alelo amplificados em amostras de DNA dos 50 indivíduos de cacau

Loco	Padrão*	N° de alelos	Alelo menor	Alelo maior
Y 16984	208	04	205	211
Y 16981	160	05	155	163
AJ 271946	178	03	177	187
AJ 271944	232	07	205	239
Y 16987	258	04	257	261
AJ 271953	165	06	156	166
AJ 271827	235	11	234	270
AJ 271945	206	11	212	234
Y 16985	298	07	291	317

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

Quadro 3. Dados de genotipagem de 50 indivíduos com nove locos microssatélites

Indivíduos	**Locos**								
	Y 16984	Y 16981	AJ 271946	AJ 271944	Y 16987	AJ 271953	AJ 271827	AJ 271945	Y 16985
SJ 02	0	24	12	11	22	0	0	11	0
LCT37A	0	24	22	11	0	55	22	11	11
VB1139	0	24	22	16	0	0	0	11	0
TSH1188	0	24	12	67	0	0	0	0	11
SIC329	0	23	23	67	33	55	66	66	0
CRS03	0	12	22	67	33	56	11	66	77
CCN51	0	12	22	67	22	55	1111	66	11
Sial505	0	12	22	46	12	22	88	23	57
SP50	33	12	22	15	22	55	511	66	77
PA30	33	24	22	44	22	55	511	66	0
Sial325	13	34	12	57	22	55	1111	66	0
TSA644	11	34	12	16	22	55	711	68	33
UF168	11	34	12	16	22	66	67	710	46
EET397	14	24	11	11	22	55	67	610	44
T11	14	24	11	11	22	33	34	37	11
AM01	14	23	11	11	22	33	57	48	77
FL60	14	34	12	11	22	33	69	0	0
TSH516	14	34	12	17	33	33	69	44	0
UF667	14	34	12	17	33	33	58	33	0
EEG29	0	22	12	17	23	55	0	66	0
FB21	0	23	12	17	33	0	0	44	0
Sial169	33	24	12	22	11	55	0	67	77
VB1154	13	14	12	67	22	44	0	66	0
FL16	13	13	12	12	22	55	0	66	77
SJ01	33	13	12	66	22	33	88	36	77
SIAL70	33	12	22	16	22	33	88	34	77
ALMC5	33	24	22	67	22	44	1111	68	77
TSH565	0	45	12	67	22	14	1111	55	0
RB39	24	24	12	77	24	14	711	35	0
VB1117	0	24	12	77	22	44	711	55	0
GNVII	33	24	12	22	22	44	711	78	0
SIC 328	33	25	12	27	22	22	0	36	0
PA300	44	34	22	27	22	66	0	89	37
AM 02	0	0	0	55	22	63	0	35	33
M05	11	33	12	12	23	55	0	79	47
Cpc42	12	34	12	11	22	44	711	48	47
EET392	11	34	12	13	22	33	1010	77	77
NO02	11	44	12	13	22	44	711	88	77
SR03	0	34	12	13	22	55	0	69	0
LCT162	0	0	0	13	22	55	0	610	0
RB36	0	45	12	11	21	44	0	0	0
T10	33	45	12	15	21	44	74	410	22
M04	13	44	12	15	22	33	44	0	22
FL77	34	24	12	46	22	44	27	69	47
SCA12	0	44	12	12	22	11	711	69	77
VB1151	0	24	12	12	22	11	0	69	77
COCA	0	24	12	12	22	22	0	710	0
IMC67	0	24	12	12	22	11	0	0	0
SCA06	11	24	11	11	22	55	88	911	0
AMZ15	0	24	11	11	22	0	0	0	0

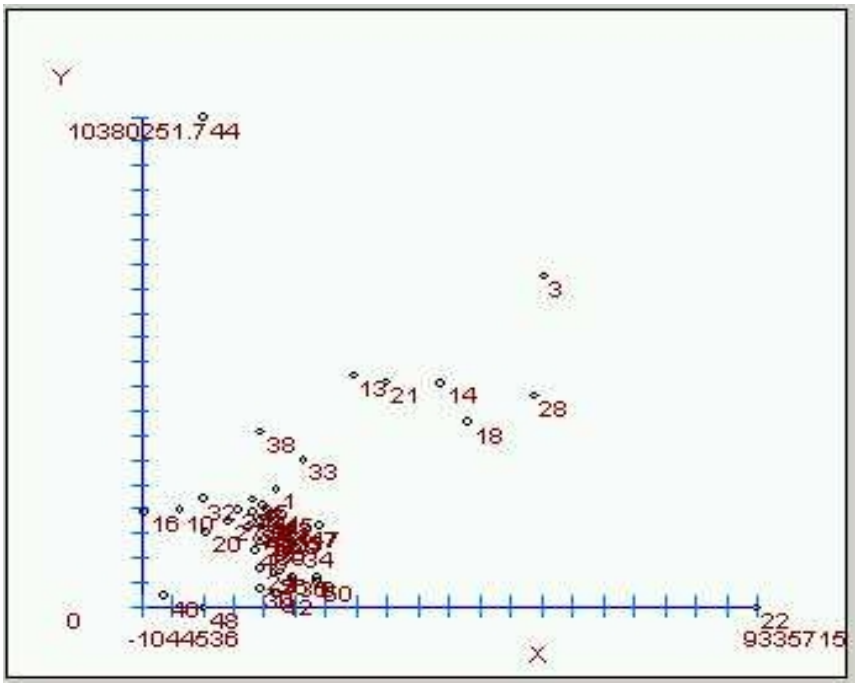

Figura 3. Análise de dispersão dos 50 indivíduos (*Theobroma cacao* L.) com base em suas distâncias genéticas, calculadas pelo método de análise multialélica (58 alelos) a partir de nove locos microssatélites.

Os indivíduos mais distantes no gráfico de dispersão (Figura 3) podem ser agrupados em três origens distintas: os originados das fazendas (FL 77, VB 1139, FB 21, NO 02), os híbridos (TSH 565, TSH 516, EET 397) e os indivíduos trinitário, alto amazônico e cacau comum (UF 168, PA 300 e SIAL 169, respectivamente). A seleção SIAL 169 é um material comum, e o fato de estar isolado e o SIAL 70 requer uma análise com um maior número de locos, já que são materiais aparentados e semelhantes entre si. A existência de genótipos resistentes a VB com elevada diversidade genética, porém distintos geneticamente do acesso SCA 06 (tradicional fonte de resistência a VB), indica possibilidades de existência de diferentes genes relacionados com resistência à vassoura-de-bruxa.

Entre os acessos provenientes das fazendas, os indivíduos provenientes da fazenda Brasileira (FB 21) e da Leolinda (FL 70) mostraram-se como os mais distantes geneticamente (Figura 3). Essa mesma tendência foi observada por Leal et al. (2004), quando indivíduos dessas fazendas foram analisados com

marcadores RAPD e, considerando que marcadores SSR e RAPD permitem resultados altamente correlacionados (Faleiro et al., 2001), confirma-se que eles são dissimilares dos clones derivado do SCA 06. Portanto, esses acessos devem ser incluídos em programas de melhoramento (visando aumentar a variabilidade genética) e submetidos às análises de suas características agronômicas.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)**. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus.

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.

CORRÊA, R.X.; AHNERT, D.; SANTOS, L.M.; LEAL, J.B.; SANTOS, C. Divergência Genético-molecular entre os possíveis genitores de seleções de cacaueiro resistentes à vassoura-de-bruxa no sul da Bahia. **Genetics and Molecular Biology (Supplement)**. Ribeirão Preto: SBG, v.23, p.404-405, 2000. (Resumo).

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**. v.93, n.02, p.205-214, 1996.

CRUZ, C.D. Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics) **Journal Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.135-138, 1998.

CRUZ, C. D.; VIANA, J.M.S. A Methodology of genetic divergence analysis based on sample uni projection on two-dimensional space. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, n.2, p.181-186, 1994.

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

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 cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). In: **Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal**, p.161, 2001. (Resumo).

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

HOSBIANO, A. A, PALMIERI, D. A., BRAVO, J.P., PEREIRA, T.E.B., LOPES, C.R., GIMENES, M. A, Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº 29, 2002.

LANAUD, C. Nouvelles donnéss sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.): diversité des populations, systeme d'incompatibilité, haploides spontanes, leurs consequences pour l'amelioration de cette espece. 1987. **PhD Thesis**. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; N'GORAN, A.K.J.; CLEMENT, D.; FLAMENT, M.H.; LAURENT, V.; FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, n.04, p.987-993, 1995.

LANAUD, C., RISTERUCCI, A.M., PIERETTI, I., FALQUE, M. BOUET, A.; FLAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, 8:2141-2152,1999.

LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. RFLP study of genetic diversity of *Theobroma cacao*. **Angew Botany,** 68: 36-39, 1994.

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

LEAL, J.B.;CORRÊA, R. X.; Diversidade genética de Jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (**Vell**.) Alem.ex.Benth.), Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* **Lam**.) e cacau (*Theobroma cacao* **L**.) no litoral sul da Bahia por meio de marcadores moleculares.**Livro de resumos VII Seminário de Iniciação Científica**. p.63. 2001.

LEAL, J.B.; SANTOS, C.A.P.; SANTOS, L.M.; PIRES, J.L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Variabilidade genética de cacaueiros resistentes à vassoura-de-bruxa selecionados em fazendas do sul da Bahia e seus potenciais genitores utilizando marcadores RAPD. **Bragantia**, Campinas. 2004. (Submetido).

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

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

MARITA, J.M. Characterization of *Theobroma cacao* using RAPD marker based estimates of genetic distance and development of a core collection to maximize genetic diversity. 1988. **MSc Thesis.** University of Wisconsin, Madison.

N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, 73: 589-597, 1994.

PIRES, J.L.; MARITA, J.M.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; AITKEN, W.M.; MELO, G.P.; MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, Ingenic,** Malaysia, 2000. p.72-88.

PIRES, J.L.; FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.G.; MONTEIRO, W.R.Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* L. à *Crinipellis perniciosa* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, 26 (suplemento): 347, 2001.

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

SANTOS, C.A.; CORRÊA, R.X. Divergência Genético-molecular em seleções de cacaueiro resistentes à vassoura-de-bruxa no sul da Bahia e seus possíveis genitores. In: **7º Seminário de Iniciação Científica da UESC (Livro de resumos)**. Ilhéus: Editus, 2001. p.163-164.

QUEIRÓS, W.T. Mapeamento genético do cacaueiro e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa. 1999. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 64p.

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

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**, Londrina, v.1, n.4, p.377-383, 2001.

5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Grande parte das seleções encontradas nas fazendas apresenta uma ampla variação genética, indicando que outros materiais, diferentes dos que foram incluídos neste trabalho como possíveis progenitores
2. Os materiais provenientes das fazendas apresentaram grande diversidade genética, a maioria deles agrupa-se com o Scavina e alguns desses materiais mostraram-se dissimilares do scavina.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Os marcadores microssatélites recentemente citados na literatura como estando próximos a marca que confere resistência a vassoura-de-bruxa, serão incluídos nesta análise.
2. Os resultados analisados neste trabalho são dados preliminares, sendo que a meta é analisar 15 locos microssatélites nesse grupo de 50 plantas, e caracterizar os diferentes acessos com mais precisão quanto a diversidade e a origem genéticas.
3. Submeter às informações genéticas dos diferentes acessos analisados com os marcadores microssatélites para depósito no banco de dados genotípicos da UESC/CEPLAC, em desenvolvimento.
4. Informar aos agricultores que forneceram o material genético às características de similaridade entre seus materiais e possibilitar aos programas de melhoramento genético do cacau, subsidiar estratégias buscando mais eficiência produtiva e menores riscos para os agricultores (minimizar os riscos de quebra de resistência com a introdução de múltiplas fontes de genes).

7. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

CEPEC, Centro de Pesquisas do Cacau. **Informe Técnico** referente ao biênio 1970/71, n.1, p. 15-27. 1971.

CORRÊA, R.X.; AHNERT, D.; SANTOS, L.M.; LEAL, J.B.; SANTOS, C. Divergência Genético-molecular entre os possíveis genitores de seleções de cacaueiro resistentes à vassoura-de-bruxa no sul da Bahia. **Genetics and Molecular Biology (Supplement)**. Ribeirão Preto: SBG, v.23, p.404-405, 2000. (Resumo).

DIAS, L.A.S. (Editor). Melhoramento Genético do cacaueiro. Viçosa, MG: **FUNAPE,** UFG, 2001. 578p.

FALEIRO, A.S. G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO,G.R.P.;YAMADA, M.M. ; BAHIA, R.C.S; CORRÊA, R.X. Diversidade genética de acessos de *Theobroma cacao* L. selecionados por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites .**XXXV Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. 2001.** Goiânia, 2001.

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

HOLIDAY, P. Witches' Broom Disease of cocoa. London: **HMSO**.1952.

HOSBIANO, A . A , PALMIERI, D. A, BRAVO, J.P., PEREIRA, T.E.B., LOPES, C.R., GIMENES, M.A, Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** nº 29. 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal, Bahia. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

KUHN, D.N.; 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, p.191-202, 2003.

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

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

LUZ, E.D. M. N.; YAMADA, M, M.; SILVA, S. D.V.M.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; PINTO, L.R. M.; MONTEIRO, W. R.; BEZERRA, J.L.; MELO, G. R. P.; Research on cacao resistance to black pod disease in Bahia, Brazil, **Brugnerotto**, 1999.

MARITA, J.M., NIENHUSIS, J., PIRES, J., AITKEN, W. M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on Witches`Broom disease resistence. **Crop Science**, v.41, p. 1305-1316, 2001.

N'GORAN, J.A.K., LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M., LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, 73: 589-597, 1994.

PEREIRA, S.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, I.M.; ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência da vassoura-de-Bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v.1, p.79-81, 1989.

PERREIRA, J.L.; ALMEIDA, L.C.C.; SANTOS, S.M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at rradication d containment. **Crop Protection**. 15: 743-752,1996.

PERREIRA, A.B. Melhoramento clonal. DIAS, L.A.S. (Editor). **Melhoramento Genético do cacaueiro**. Viçosa, MG: **FUNAPE**, UFG, 2001. 578p.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de Plantas de cacau resistentes a vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico**, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **CEPEC/CEPLAC**, Ilhéus-BA, n. 181, 1998. p.34.

PIRES, J.L.; FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.G.; MONTEIRO, W.R.Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* L. à *Crinipellis perniciosa* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, 26 (suplemento): 347, 2001.

PURDY, L.H.; SHIMITDT, R.A. Status of cacao Witches ' Broom: Biology, Epidemiology and Management. **Annual Review Phytopathol**., v.34, p.573-94, 1996.

SERENO, M.L.; ALBURQUERQUE, P.S.B.; VENCOVSKY, R.; FIGUEIRA, A. Avaliação da diversidade genética de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) silvestres da Amazônia brasileira por marcadores microssatélites. **XXXVI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. 2003.** Porto Seguro - Bahia, 2003.

SILVA, P. Cacau e lagartão ou vassoura-de-bruxa:registros efetuados Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos de 1785 a 1787 na Amazônia. **Boletin Técnico CEPEC/CEPLAC**, Brasília, v.146, p.21, 1987.

SOUNIGO, O., LACHENAUD, P., BASTIDE, P., CILAS, C., N'GORAN, J., LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal Applied Genetics**, 44(3), 2003.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* Nov. Spec., the cause of the krulloten disease of cacao in Surname. Transl. AMW ter Laag, **Dep. Van den Landbouw**, Suriname. Bull. n.25. p.25. 1915. (Translated from German).

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**, Londrina, v.1, n.4, p.377-383, 2001.

YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; LOPES, U. V.; FLORES , A. B.; MELO, G.R.P. Diversidade e Origem de seleções de cacau (*Theobroma cacao* L.) feitas em fazendas para resistência à vassoura-de-bruxa. **XXXVI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. 2003.** Porto Seguro - Bahia, 2003.

WHITKUS, R.; DE LA CRUZ, M.; MOTA-BRAVO, L.; GÓMEZ-POMPA, A. Genetic diversity and relationsships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in sourthern Mexico. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.96, p.621-627, 1998.