

Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero

Rogério Mercês Ferreira Santos⁽¹⁾, Uilson Vanderlei Lopes⁽²⁾, Rita de Cássia Bahia⁽¹⁾, Regina Celle Rebouças Machado⁽³⁾, Dário Ahnert⁽¹⁾ e Ronan Xavier Corrêa⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual de Santa Cruz, Dep. de Ciências Biológicas, Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16, CEP 45662-000 Ilhéus, BA. E-mail: rogeriomercês@gmail.com, cassiabahia@yahoo.com.br, darioa@uesc.br, ronanxc@uesc.br ⁽²⁾Centro de Pesquisas do Cacau, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Seção de Genética, Caixa Postal 07, CEP 45600-970 Itabuna, BA. E-mail: uilson@cepec.gov.br ⁽³⁾Almirante Centro de Estudos de Cacau, Caixa Postal 55, CEP 45630-000 Itajuípe, BA. E-mail: regina.machado@effem.com

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a resistência à vassoura-de-bruxa de plantas de cacau originadas do cruzamento entre TSH 1188 e CCN 51 (população segregante), por meio de dois métodos de inoculação em condições de campo, e identificar marcadores microssatélites específicos para grupos de plantas resistentes e suscetíveis. As plantas-controle avaliadas pelos métodos de inoculação natural e inoculação artificial em campo produziram os mesmos padrões de sintomas. As plantas da população segregante também coincidiram os padrões de sintomas em 90%, por esses dois métodos. O método de inoculação artificial em campo permite detectar falso-resistentes. Dos 18 pares de primers microssatélites amplificados, 15 foram polimórficos entre os genitores, e seis entre os grupos de plantas segregantes contrastantes quanto à resistência à vassoura-de-bruxa. Foram confirmadas três marcas previamente associadas a QTL (locos para características quantitativas) relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa, comuns a outras populações. Também foram identificados três novos QTL para esta característica, típicos desta população, o que comprova sua utilidade para o melhoramento genético do cacauero.

Termos para indexação: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, inoculação, marcador molecular, QTL, melhoramento genético.

Microsatellite markers related to resistance of cocoa tree against witches'-broom

Abstract – The objectives of this work were to evaluate cocoa tree resistance against witches'-broom, in plants originated from the crossing between TSH 1188 and CCN 51 (segregating population), by means of two methods of inoculation in field conditions, and to identify microsatellite markers specific for resistant and susceptible plants. The control plants bore identical symptoms as the plants of the segregating population in 90% of the cases under the two methods. The method of artificial inoculation in the field allows the detection of false resistance to the disease. Of the 18 pairs of microsatellite primers amplified, 15 were polymorphic between genitors and six were polymorphic between the two groups of plants evaluated for resistance to witches'-broom. Three previously characterized markers were confirmed as associated to QTL (quantitative trait loci) related to resistance to the witches'-broom, which is common in other populations. Three new QTL for this characteristic, typical of this population, were also identified, which proves the utility of this population for cocoa breeding.

Index terms: *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, inoculation, molecular markers, QTL, genetic improvement.

Introdução

O Brasil participa com 4,8% da produção mundial de cacau e tem duas zonas principais de produção: o Sul da Bahia e a Amazônia (International Cocoa Organization, 2005). Um dos maiores entraves na produção de cacau no Brasil é a vassoura-de-bruxa,

doença causada pelo fungo *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel), conforme Aime & Phillips-Mora (2005). Em condições climáticas favoráveis e na ausência de cultivares resistentes, esse fungo pode causar até 100% de perdas de frutos (Andebrhan et al., 1998; Rios-Ruiz et al., 2002). Por isso, é necessário

estudar a herança da resistência, em diferentes cruzamentos relevantes, para o melhoramento genético do cacau.

O clone Scavina-6 (Sca-6) foi selecionado no Peru e vem sendo utilizado como fonte de resistência à vassoura-de-bruxa desde 1940. A maioria das cultivares resistentes cultivadas em diferentes regiões cacaueiras descende desse clone que, no entanto, apresentou suscetibilidade a essa doença em algumas regiões, o que justifica a busca de novas fontes de resistência (Paim et al., 2006).

É necessário, portanto, identificar marcadores moleculares ligados aos locos de características quantitativas (QTL) associados à resistência, com o objetivo de ampliar a base genética da resistência à vassoura-de-bruxa e dispor de ferramentas para auxiliar o melhoramento do cacau.

No caso do patossistema cacaueiro x *M. perniciosa*, QTL associados à resistência foram localizados nos grupos de ligação I e IX de uma população F₂ do cruzamento entre os clones Sca-6 e ICS 1 (Queiroz et al., 2003; Brown et al., 2005; Faleiro et al., 2006). A obtenção de variedades que comportem um número maior de genes ligados à resistência é estratégia interessante para uma resistência mais estável, durável e efetiva. Esse maior número de genes relacionados à resistência poderá dificultar o aumento da população e a evolução do fungo sobre tais variedades (Pinto & Pires, 1998).

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a resistência à vassoura-de-bruxa de plantas de cacau originadas do cruzamento entre TSH 1188 e CCN 51 (população segregante), por meio de dois métodos de inoculação em condições de campo, e identificar marcadores microssatélites contrastantes entre grupos de plantas resistentes e suscetíveis nessa população.

Material e Métodos

A população segregante consistiu de 300 plantas F₁, originadas do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51, implantada no ano 2000, na Fazenda Experimental do Centro de Estudos Almirante Cacau, Itajuípe, BA. A genealogia de TSH 1188 inclui os clones IMC 67, ICS 1 e Sca-6; a de CCN 51 inclui Nacional do Equador, ICS 95 e IMC 67. Este cruzamento foi escolhido porque inclui diversas características agrônomicas contrastantes e faz parte de um programa

internacional de pesquisa que envolve instituições do Brasil, Costa Rica e Estados Unidos.

O cruzamento foi realizado por polinização manual, tendo-se protegido os botões florais. Cada muda recebeu um número de fruto e das respectivas sementes, para identificar cada planta em campo. As mudas foram transplantadas para o campo aos nove meses, em covas de 40x40x40 cm, no espaçamento de 3x3 m. A área experimental estava sombreada com bananeiras e algumas espécies da Mata Atlântica, e as plantas receberam todos os tratamentos culturais preconizados para a cultura do cacau.

As plantas foram avaliadas quanto ao número de vassouras vegetativas por planta (NVV), por dois métodos de inoculação em condições de campo: natural e artificial.

De 2002 a 2005, foi realizado o método de inoculação natural em campo, em que as fileiras de cacau comum, plantadas a cada quatro fileiras de progênies, e as plantas velhas de cacau comum, no entorno da área experimental, funcionaram como fonte natural de inóculo. As vassouras vegetativas, observadas na área experimental, foram retiradas e penduradas na própria planta, após cada coleta de dados, para garantir uma fonte permanente de inóculo, durante os quatro anos de observação.

Em 2005, foi aplicado o método de inoculação artificial em campo, em que as 50 plantas-teste foram tomadas ao acaso entre as 300 plantas da progênie; o lote de plantas-controle foi constituído por 12 plantas de cacau comum e cinco plantas de cada genitor. Na mesma data, as plantas dos testes e controles foram submetidas à inoculação artificial em campo, de uma suspensão de basidiósporos (Silva, 1997). Essa inoculação artificial seguiu os procedimentos descritos por Albuquerque (2006): adição de 30 µL de suspensão de 1x10⁵ basidiósporos por mL de água:ágar (3:1), em quatro ramos novos de cada planta avaliada em condição de campo, protegidos com um saco plástico transparente, embebido em água destilada, por 24 horas. A avaliação dos sintomas em campo foi realizada após 60 dias.

Amostras de DNA de 16 plantas, cujos fenótipos de resistência foram coincidentes pelos dois métodos de inoculação – sete plantas resistentes e sete suscetíveis, representativas dos extremos da distribuição do NVV, bem como os dois genitores – foram extraídas de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990), com pequenas modificações (Corrêa et al., 1999; Queiroz et al., 2003), e purificadas com kit Prep-A-Gene-Mapris da

BIO RAD. Os 18 pares de iniciadores microssatélites, utilizados nas amplificações, foram isolados e caracterizados por Lanaud et al. (1999), inclusive aqueles que haviam sido caracterizados como ligados a genes de resistência à vassoura-de-bruxa em outras populações (Brown et al., 2005; Faleiro et al., 2006).

As amplificações ocorreram em um volume final de 15,5 µL de mistura com: Tris HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8,3), KCl 50 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2,4 mmol L⁻¹, 0,15 mmol L⁻¹ de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pmol de cada um dos dois iniciadores, meia unidade da enzima *Taq* polimerase e 30 ng de DNA. O termociclador foi ajustado para o seguinte programa: 4 min a 94°C +10 ciclos (30 s a 94°C + 60 s a 60°C – 1°C a cada ciclo + 90 s a 72°C) + 30 ciclos (30 s a 94°C + 60 s a temperatura específica para cada iniciador + 60 s a 72°C) + 6 min a 72°C, e, após a amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4°C.

Os produtos das amplificações foram diluídos em água à proporção de 1:10, e o volume de 2 µL de produtos de amplificação de cada triplex (formados por três pares de iniciadores microssatélites marcados com fluorescências FAM, VIC e NED) foi misturado a 2 µL da mistura composta de: formamida desionizada à concentração de 1%; tampão de corrida constituído de Blue Dextran e EDTA; padrão de peso molecular ROX 500. Essas amostras foram desnaturadas no termociclador, por 4 min a 94°C, e submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida 6% no seqüenciador automático de DNA ABI 377, a 2.400 V, por três horas e meia.

Após a obtenção dos géis, os dados foram analisados com auxílio dos programas Genescan e Genotyper. Foram feitas análises de variância para todas as combinações de marcadores polimórficos e número de vassouras vegetativas. A existência de ligação entre um loco marcador e um caráter quantitativo foi admitida, quando houve diferença altamente significativa ($p \leq 0,005$) entre o valor fenotípico e o marcador. A identificação de marcadores moleculares, associados à resistência à vassoura-de-bruxa, foi feita pela análise de regressão simples. A proporção da variação fenotípica explicada pela associação caráter-marcador foi estimada pelo coeficiente de determinação (R^2) (Edwards et al., 1987), e as médias entre as classes genotípicas foram comparadas pelo teste de Duncan. Em todas as análises estatísticas foi empregado o SAS (SAS Institute, 1989).

Resultados e Discussão

Das 50 plantas testadas pelos dois métodos de inoculação, 45 (90%) apresentaram o mesmo padrão de resistência pelos dois métodos, e cinco (10%) apresentaram vassouras na inoculação artificial, mas não as apresentaram na inoculação natural.

As 12 plantas-controle (cacau-comum, suscetível à vassoura-de-bruxa) desenvolveram os sintomas típicos da doença, pelo método de inoculação artificial em campo, o que demonstra que os inóculos estavam viáveis, e que os procedimentos de inoculação são adequados para detectar plantas suscetíveis.

Entre os genitores, três dos 40 ramos com inoculação desenvolveram sintomas leves de vassoura, o que indica a necessidade de se incluírem padrões de suscetibilidade (o cacau-comum) e de resistência (TSH 1188 e CCN 51) à vassoura-de-bruxa. O método de inoculação artificial em campo permitiu detectar, entre as 50 plantas testadas, em um único teste e no prazo de 60 dias, aquelas de fato suscetíveis, que haviam sido consideradas resistentes em quatro anos de observação.

A resistência à *M. pernicioso* tem uma herança poligênica (Pires et al., 1999). No entanto, as progênies que possuem genes de resistência à vassoura-de-bruxa, provenientes do clone Sca-6, não apresentam distribuição normal típica de herança poligênica, porque esses genes de resistência têm um efeito maior no controle da resistência (Bartley, 1977; Pires et al., 1999; Ahnert, 2000). Na progênie deste trabalho, a distorção na curva no sentido da maior resistência pode ser explicada pela presença do QTL do Sca-6, uma vez que TSH 1188 possui este clone na sua genealogia. O clone CCN 51, por sua vez, derivou de clones com fontes alternativas para resistência à vassoura-de-bruxa, o que também pode ter contribuído para a distorção da curva no sentido de maior resistência, como demonstrado por Santos (2007). Uma provável piramidação de genes, provenientes do Sca-6 e de fontes de resistência oriundas do CCN 51, poderá ser confirmada com estudos posteriores de mapeamento genético dessa população.

Nas amplificações com iniciadores microssatélites, foram identificados polimorfismos potencialmente ligados a genes de resistência à doença vassoura-de-bruxa: os marcadores *mTcCIR21*, *mTcCIR24*, *mTcCIR29*, *mTcCIR30*, *mTcCIR33* e *mTcCIR35* apresentaram-se altamente significativos ($p \leq 0,005$) (Tabela 1). A confirmação da ligação e o cálculo da distância genética requerem a genotipagem de todos os indivíduos

Tabela 1. Análise de variância para a associação marca-QTL entre o número de vassouras vegetativas por planta e os marcadores microssatélites em *Theobroma cacao*.

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

da população. A sensibilidade da estratégia de análise de grupos extremos, para características oligogênicas, está em cerca de até 15 cM para grupos com sete indivíduos e, quando todos os sete indivíduos de um grupo contrastam com os de outro, quanto à presença da banda, a distância do marcador para o gene será inferior a 25 cM (Michelmore et al., 1991). Adicionalmente, pode-se afirmar que a seleção e caracterização desses marcadores poderão contribuir para futuros trabalhos, que envolvem esta e outras populações com potencial para o mapeamento e melhoramento genético do cacauero.

Desses seis marcadores microssatélites, três (*mTcCIR35*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24*) foram mapeados no grupo de ligação IX, com base na população derivada do cruzamento entre os clones ICS 1 e Sca-6 (Queiroz et al., 2003; Faleiro et al., 2006). Nota-se, também, que esses marcadores encontram-se relativamente próximos no mapa. Assim, pode-se inferir que essa região genômica corresponda a um QTL com efeito também na população deste trabalho (Tabela 2).

A associação entre os marcadores *mTcCIR21*, *mTcCIR30* e *mTcCIR24* e o QTL explicou respectivamente 82,7, 74,6 e 78,9% da variação fenotípica para resistência verificada entre as plantas extremas selecionadas. É importante ressaltar que apenas os marcadores que apresentaram três classes genotípicas foram utilizados na regressão linear. Além disso, deve-se destacar que esses percentuais poderão ser menores, quando a população for analisada em sua totalidade, após vários anos de observação, uma vez que foram empregados nas análises os indivíduos selecionados com base na resistência à vassoura-de-bruxa.

Os locos *mTcCIR21*, *mTcCIR29* e *mTcCIR33* encontram-se, respectivamente, nos seguintes grupos de ligação: III (Albuquerque, 2006; Faleiro et al., 2006), I (Faleiro et al., 2006) e IV (Brown et al., 2005). Porém, esses autores não detectaram associação significativa desses locos com a resistência à vassoura-de-bruxa, nas populações que eles estudaram. Neste trabalho, esses marcadores revelaram associação significativa com a resistência à vassoura-de-bruxa, o que indica que eles podem ser considerados como marcadores potencialmente ligados a genes diferentes daqueles analisados por Faleiro et al. (2006) em população distinta deste trabalho. Adicionalmente, deve-se ressaltar que os marcadores *mTcCIR29* e *mTcCIR33* são provenientes de CCN 51 (Tabela 2) e, portanto, devem representar fontes novas de resistência.

Tabela 2. Locos marcadores associados à resistência à vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao*, com indicação para cada alelo microssatélite, a sua localização no mapa genético do cacau, o genitor de origem e o efeito médio da marca (EMM) na resistência.

Marcador microssatélite ⁽¹⁾	Alelo	GL ⁽²⁾	Posição ⁽³⁾	Genitor	Anova ⁽⁴⁾ (p)	Regressão EMM ⁽⁵⁾	R ² ⁽⁶⁾	Médias de classes ⁽⁷⁾		
								0	1	2
<i>mTcCIR21</i>	173	3	24	TSH	<0,0001	-1,85	82,7	3,68(7)a	0,00(1)b	0,00(6)b
<i>mTcCIR24</i>	188	9	31	TSH	0,0002	-1,88	78,9	3,75(6)a	1,62(2)b	0,00(6)b
<i>mTcCIR24</i>	196	9	31	TSH	0,0002	1,88	78,9	0,00(6)b	1,62(2)b	3,75(6)a
<i>mTcCIR29</i>	168	1	20	CCN	0,0004	-	-	3,22(8)a	0,00(6)b	-
<i>mTcCIR29</i>	174	1	20	CCN	0,0004	-	-	-	0,00(6)b	3,22(8)a
<i>mTcCIR30</i>	174	9	28	TSH	<0,0001	-2,71	74,6	3,68(7)a	0,00(6)b	0,00(1)b
<i>mTcCIR33</i>	275	4	13	CCN	0,0050	-	-	-	3,21(7)a	0,46(7)b
<i>mTcCIR33</i>	293	4	13	CCN	0,0050	-	-	0,46(7)b	3,21(7)a	-
<i>mTcCIR35</i>	235	9	23	TSH	0,0004	-	-	3,22(8)a	0,00(6)b	-
<i>mTcCIR35</i>	239	9	23	TSH	0,0004	-	-	-	0,00(6)b	3,22(8)a

⁽¹⁾Marcadores microssatélites selecionados com base na análise de variância (Tabela 1: $p \leq 0,005$). ⁽²⁾Grupo de ligação segundo Faleiro et al. (2006) e Brown et al. (2005). ⁽³⁾Localização do marcador no mapa genético em cM. ⁽⁴⁾Componentes da análise de variância: nível de probabilidade. ⁽⁵⁾EMM: efeito médio da marca. ⁽⁶⁾Porcentagem da variação fenotípica do número de vassouras vegetativas, pela associação do loco marcador e o gene. ⁽⁷⁾Média do número de vassouras vegetativas para cada classe genotípica, em que: 0 é a ausência do marcador; 1 é a presença de uma cópia do alelo; 2 é a presença de duas cópias do alelo (nestas três classes, indica-se entre parêntesis o número de indivíduos que apresentam a classe correspondente); para cada marcador, dentro de cada linha nas colunas de médias de classes, as médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

O marcador *mTcCIR30* confere o maior efeito médio da marca, onde a presença de um alelo reduz o número de vassouras vegetativas em 2,71. Esses alelos são interessantes quanto ao acúmulo de genes favoráveis ao melhoramento para resistência à vassoura-de-bruxa. Pela análise de regressão linear, os efeitos médios das marcas (EMM) foram estimados para cada marcador. O marcador *mTcCIR24* aumenta o número de vassouras em 1,88 a cada adição de alelo, o que permite inferir que esse marcador está relacionado à suscetibilidade na população em estudo, isto é, ligado em repulsão com o gene de resistência.

Conclusões

1. A inoculação artificial em campo aumenta a eficácia e diminui o custo e o tempo da avaliação fenotípica da resistência à vassoura-de-bruxa, além de possibilitar a seleção dos grupos de plantas contrastantes quanto à resistência.

2. Os marcadores microssatélites *mTcCIR21*, *mTcCIR24*, *mTcCIR29*, *mTcCIR30*, *mTcCIR33* e *mTcCIR35* estão ligados com a resistência à vassoura-de-bruxa e devem ser usados para análise de população segregante para avaliação de QTL.

Agradecimentos

À Fapesb, por concessão da bolsa; ao Centro de Estudos Almirante Cacau, Itajuípe, BA, pelo apoio na

condução do experimento no campo; ao Banco do Nordeste, pelo apoio financeiro; ao Dr. Paulo S.B. Albuquerque, pela orientação na metodologia de inoculação artificial em campo; ao Prof. Anthony Raw, pela revisão do Abstract.

Referências

- AHNERT, D. Use of QTLs for witches' broom resistance in cocoa breeding. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON NEW TECHNOLOGIES AND COCOA BREEDING, 2000, Kota Kinabalu. **Proceedings**. London: INGENIC, 2001. p.116-119.
- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, p.1012-1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P.S.B. **Mapas de ligação e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**. 2006. 98p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C.; NAKAYAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotropica**, v.10, p.49-60, 1998.
- BARTLEY, B.G.D. The status of genetic resistance in cocoa to *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: THE INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1977, Caracas. **Proceedings**. Caracas: [s.n.], 1977. p.57-69.
- BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C.; LOPES, U.; KUHN, D.N.; BORRONE, J.W. Resistance gene mapping for

- witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F₂ population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, p.366-373, 2005.
- 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**, v.58, p.15-22, 1999.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular marker facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.
- FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA FILHO, G.A.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v.149, p.227-235, 2006.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Determinantes de los precios del cacao y el funcionamiento del mercado mundial del cacao**. Londres: ICCO, 2005. (Comitê de Mercado. MC/5/4).
- LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v.8, p.2141-2152, 1999.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Genetics**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- PAIM, V.R.L.D.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; SILVA, S.D.V.M.; SOUZA, J.T. de; ALBUQUERQUE, P.S.B.; SANTOS FILHO, L.P. Sources of resistance to *Crinipellis pernicioso* in progenies of cacao accessions collected in the Brazilian amazon. **Scientia Agricola**, v.63, p.572-578, 2006.
- PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 1998. 35p. (Boletim técnico, 181).
- PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; PINTO, L.R.M.; LUZ, E.D.M.N. Resistance to witches' broom evaluation of genotypes from different origins. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1999, Salvador. **Proceedings**. Salvador: [s.n.], 1996. p.389-397.
- QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v.122, n.3, p.268-272, 2003.
- RIOS-RUIZ, R.A. Melhoramento para resistência a doenças. In: DIAS, L.A.S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacau**. Viçosa: Funape; UFG, 2002. p.290-324.
- SANTOS, R.M.F. **Caracterização da resistência à vassoura-de-bruxa, do vigor vegetativo e de polimorfismos em microssatélites na população de cacauzeiros derivada do cruzamento entre os clones TSH 1188 e CCN 51**. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: version 6. 4th ed. Cary: SAS Institute, 1989. 846p.
- SILVA, S.D.V.M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauzeiro a *Crinipellis pernicioso***. 1997. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Recebido em 24 de abril de 2007 e aprovado em 30 de julho de 2007