

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ

MAPEAMENTO GENÉTICO DO CACAUEIRO E IDENTIFICAÇÃO DE  
QTLs PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
OUTUBRO - 2000

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ

MAPEAMENTO GENÉTICO DO CACAUEIRO E IDENTIFICAÇÃO DE  
QTLs PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de outubro de 1999.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Dário Ahnert  
(Conselheiro)

---

Pesq. Cláudia Teixeira Guimarães

---

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

Aos meus pais Saulo e Eneli.

À minha irmã Creide Márcia.

Aos meus avós Vivaldo e Maria e Egídio e Guimar.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela vida e pela oportunidade de concluir mais este objetivo.

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós, que me deram força para vencer as dificuldades ao longo do caminho e que certamente compartilham comigo a felicidade e a realização de concluir mais esta etapa.

À Arlete, pelo amor, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, por me confiar a realização deste trabalho, pela orientação e pelo incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, desde a iniciação científica até o mestrado, e espero que, um dia, no doutorado também.

Ao Professor Conselheiro Everaldo Gonçalves de Barros, à Pesquisadora Cláudia Teixeira Guimarães (EMBRAPA Milho e Sorgo), ao Doutor Ivan Schuster, ao Doutor Marco Antônio Machado e à Doutora Marta Fonseca Martins, pelo excelente convívio, pelos ensinamentos, pelas críticas e sugestões apresentadas durante a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Messias Gonzaga Pereira (UENF/RJ) e ao Pesquisador Jay Wallace Silva e Motta (CEPLAC/ESJOH-PA), que contribuíram com uma parte dos marcadores RAPD utilizados para a construção do presente mapa.

A todos os funcionários da CEPLAC/CEPEC - BA, na pessoa do Doutor Dário Ahnert, que realizaram a avaliação do fenótipo utilizado para o mapeamento de QTLs no presente trabalho.

Aos amigos do BIOMOL, L.A.F.Q. e PROTEÍNA, que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Aloízio Cordeiro, Expedito, José Fausto, Márcio Dias, Gláucia, Márcia, Luciana, Edson, Ludovina, Alessandra, Solange e Hamilton, dos quais sempre recebi o apoio necessário.

Aos amigos Jefrel, Fubá, Fernandinho, Zé Geraldo (J.G.V.J.), Caratinga, Vander e a todos os funcionários dos Departamentos de Química e Bioquímica e Biologia Molecular, que estiveram presentes comigo nos bons e maus momentos durante a realização deste curso.

## **BIOGRAFIA**

VAGNER TEBALDI DE QUEIROZ, filho de Saulo de Tarso Ferreira de Queiroz e de Eneli Moreira Tebaldi de Queiroz, nasceu em 12 de março de 1975, em Itaperuna, Rio de Janeiro.

Em março de 1993, ingressou no Curso de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, graduando-se em Bacharel e Licenciado em julho de 1997.

Em agosto de 1997, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 18 de outubro de 1999.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
EXTRATO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Organização do genoma do cacaueteiro.....	3
2.2. Marcadores genéticos.....	4
2.2.1. Marcadores moleculares.....	5
2.3. Mapeamento genéticos.....	7
2.3.1. Construção de mapas genéticos.....	7
2.3.2. Mapeamento de locos de herança simples.....	8
2.3.3. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa.....	9
2.4. Mapas genéticos em <i>Theobroma cacao</i> L.....	10
2.5. Vassoura-de-bruxa.....	11
2.5.1. Ciclo reprodutivo.....	11
2.5.2. Sintomas.....	12
2.5.3. Controle.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material genético.....	14
3.2. Avaliações fenotípicas.....	14
3.3. Extração de DNA.....	15

	Página
3.4. Marcadores RAPD .....	16
3.5. Marcadores AFLP .....	16
3.6. Denominação dos marcadores no mapa de ligação.....	20
3.7. Análise de ligação .....	20
3.8. Construção do mapa de ligação genética .....	21
3.9. Análise estatística .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. População de mapeamento .....	23
4.2. Detecção de polimorfismos entre os progenitores.....	24
4.3. Duplicação dos fragmentos polimórficos presentes em ambos os progenitores.....	31
4.4. Segregação dos marcadores RAPD e AFLP .....	31
4.5. Construção do mapa de ligação genética .....	36
4.6. Identificação de QTLs utilizando marcadores moleculares.....	44
4.7. Mapeamento de QTLs .....	49
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

*r* - frequência máxima de recombinação

cM - centiMorgans

pg - picograma ( $10^{-12}$  gramas)

pb - pares de base

ICS - Imperial College Selections

SCA - Scavina

RILs - linhagens recombinantes endogâmicas

PCR - reação de polimerase em cadeia

RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso

AP-PCR - PCR com *primers* arbitrários

AFLP - polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CEPEC - Centro de Pesquisas do Cacau

ESJOH - Estação de Recursos Genéticos do Cacau "José Haroldo"

## EXTRATO

QUEIROZ, Vagner Tebaldi de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2000. **Mapeamento genético do cacaueteiro e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Dário Ahnert.

Uma progênie de 82 indivíduos  $F_2$ , obtida do cruzamento entre Scavina-6 e ICS-1, foi analisada utilizando marcadores moleculares. Por meio das técnicas de RAPD e AFLP, foram amplificados 196 fragmentos polimórficos, que foram distribuídos em 26 grupos de ligação. Estes marcadores cobriram uma distância de recombinação de 1.733 cM, com distância média entre dois marcadores adjacentes de 8,84 cM. Análises de regressão simples e múltipla e mapeamento por intervalo foram utilizados para detectar e mapear regiões genômicas associadas com a resistência à vassoura-de-bruxa. A proporção da variância fenotípica explicada por marcador variou entre 8,4%, para o loco iacacac.261, e 12,7%, para o loco sagcat.78. Dos seis marcadores associados à resistência à vassoura-de-bruxa a 1% de probabilidade, os marcadores iAE06.950, sagcat.108 e iAB09.464 foram mantidos no modelo de regressão múltipla, utilizando o método de eliminação *stepwise*. Os três marcadores explicaram juntos 27,8% da variação fenotípica. Através do mapeamento por intervalo, foram identificadas

associações significativas a 5% de probabilidade, nos grupos de ligação 01 e 11. No grupo de ligação 01 foram identificados três QTLs, flanqueados pelos marcadores iaagtc.65 - iBB12.1100, iAH18.850 - iBG09.580 e iAC01.475 - iAS19.970. O grupo 11 apresentou dois QTLs altamente significativos ( $P < 0,01$ ) entre os marcadores sagcat.108 - sAV14.940 e sAV18.590 - sZ04.500. Os marcadores identificados pela análise de regressão múltipla também o foram pelo mapeamento por intervalo, com exceção do marcador iAB09.464, que não se encontra ligado no mapa de ligação construído no presente trabalho.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Vagner Tebaldi de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October, 2000. **Cocoa genetic mapping and QTL identification to witches' broom resistance.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and Dário Ahnert.

An F2 progeny composed by 82 individuals derived from a cross between Scavina-6 and ICS-1 was analyzed using molecular markers. RAPD and AFLP techniques amplified 196 polymorphic fragments distributed along 26 linkage groups. These markers covered a recombination distance of 1,733 cM, with an average of 8.84 cM between two linked markers. Simple and multiple regression analysis, and interval mapping were used to identify and to map genomic regions associated with witches' broom resistance. The proportion of phenotypic variation explained by each marker varied from 8.4%, for iacacac.261 loci, to 12.7%, for sacgcat.78 loci. Out of the six markers associated with witches' broom resistance at 1% of probability, only the markers iAE06.950, saggcat.108 and iAB09.464 were maintained on the multiple regression model using the stepwise elimination method. The three markers explained together 27.8% of the phenotypic variation. Interval mapping analysis detected significant associations in the linkage groups 01 and 11 at 5% of probability. In

the linkage group 01 were identified three QTLs, flanked by the markers iaagctc.65 - iBB12.1100, iAH18.850 - iBG09.580 and iAC01.475 - iAS19.970. The linkage group 11 showed two QTLs highly significant ( $P < 0,01$ ) between the markers sagcat.108 - sAV14.940 and sAV18.590 - sZ04.500. Markers identified by multiple regression analysis were also detected by interval mapping, except for the marker iAB09.464 that were not linked on the genetic map performed in this work.

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), da família Sterculiaceae, é a única espécie economicamente importante entre as 22 espécies que constituem o gênero *Theobroma* (BEKELE e BEKELE, 1996). A gordura extraída de suas sementes é usada na produção de chocolate, cosméticos e produtos farmacêuticos. As variedades comerciais apresentam estreita base genética e são susceptíveis a várias doenças. Dentre as doenças que mais comprometem a produção de cacau, destaca-se a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (WOOD e LASS, 1987).

O melhoramento genético do cacauzeiro por meio dos métodos tradicionais é, via de regra, lento, devido ao longo tempo de geração da cultura (três a quatro anos) e à necessidade de vários anos para a realização dos testes de campo para obtenção dos dados fenotípicos. O mapeamento genético constitui uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas, uma vez que possibilita o mapeamento de regiões genômicas que controlam caracteres de interesse econômico, a quantificação dos efeitos dessas regiões e a clonagem de genes. Dessa forma, a construção de mapas de ligação e a identificação de marcadores moleculares associados a fenótipos de interesse para a cacauicultura são de fundamental importância para a implementação de programas de melhoramento

genético assistidos por marcadores moleculares, acelerando de forma significativa a produção de cultivares de cacau de *performance* agronômica superior.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de construir um mapa genético de uma população F<sub>2</sub> obtida do cruzamento entre os clones Scavina-6 e ICS-1, por meio de marcadores RAPD e AFLP. Os marcadores moleculares ordenados nos grupos de ligação foram utilizados para mapear regiões genômicas associadas com a resistência à vassoura-de-bruxa, possibilitando também a quantificação dos efeitos de cada marcador na característica de interesse.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Organização do genoma do cacauero

A citologia da espécie *Theobroma cacao* L. é típica da família pantropical e subtropical Sterculiaceae (MEHRA, 1976). Trata-se de uma planta diplóide (GLICENSTEIN e FRITZ, 1989), com 20 cromossomos pequenos, variando de 1,25 a 2,85  $\mu\text{m}$  (MARTINSON, 1975), com uma única constrição secundária, não apresentando banda-C (GLICENSTEIN e FRITZ, 1989).

FIGUEIRA et al. (1992) estimaram o tamanho do genoma haplóide do *Theobroma cacao* L., usando citometria de fluxo a *laser*, em aproximadamente 0,43 pg, sendo equivalente a  $4,15 \times 10^8$  pb. COUCH et al. (1993) determinaram que o tamanho do genoma haplóide é de  $2,01 \times 10^8$  pb, baseando-se na técnica de cinética de reassociação de fragmentos de 450 pb. No mesmo trabalho foi ainda determinado que o DNA do cacauero apresenta baixo grau de metilação quando comparado com o DNA de trigo, uma temperatura de fusão de  $84,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , composição de bases de 36% (G + C) e que a fração de fragmentos correspondente a DNA altamente repetitivo é extremamente baixa, à semelhança de outras plantas que possuem um genoma de tamanho reduzido (FLAVELL, 1980).

## 2.2. Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997). Os primeiros marcadores utilizados em plantas foram os marcadores morfológicos (Sax, 1923, citado por KEIM et al., 1990). Por meio de comparações de características morfológicas, como cor de flor, cor de semente, cor e tipo de pubescência, dentre outras, os indivíduos são caracterizados. Embora esses marcadores morfológicos sejam de fácil monitoramento, sua obtenção depende de um processo dispendioso e demorado, uma vez que envolve o desenvolvimento das plantas. Além disso, esses marcadores são afetados pelas condições ambientais (HU e QUIROS, 1991).

Outro tipo de marcador genético que vem sendo largamente utilizado são as isoenzimas (HEIDRICH-SOBRINHO, 1982) e proteínas de reserva de sementes, marcadores que podem ser detectados mediante análise por eletroforese (LADIZINSKY e HYMOWITZ, 1979) e por cromatografia líquida de alto desempenho (BUEHLER et al., 1989). Tais marcadores apresentam a vantagem, sobre os marcadores morfológicos, de serem produtos diretos da expressão de genes específicos.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA, bem como uma nova classe de marcadores genéticos. Classificados como marcadores moleculares, estes baseiam-se na variação natural da seqüência de bases do DNA, apresentam nível de polimorfismo geralmente alto para cada loco estudado e não são afetados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo, sendo amplamente utilizados em análises genéticas, incluindo a construção de mapas de ligação.

### 2.2.1. Marcadores moleculares

Os marcadores RFLP foram os primeiros a serem empregados na construção de mapas genéticos (BOTSTEIN et al., 1980). A técnica compreende a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese e transferência destes para membranas de nitrocelulose ou náilon, onde são hibridizados com sondas de DNA. As sondas são fragmentos de DNA marcados com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes, sendo utilizadas na detecção de seqüências genômicas homólogas. As membranas, após serem hibridizadas com as sondas de DNA, são expostas a um filme auto-radiográfico, sendo revelados os polimorfismos. Embora o RFLP apresente herança codominante e seja extremamente útil em análises genéticas comparativas, é uma técnica trabalhosa e requer elevado nível de conhecimento sobre o genoma a ser analisado.

Com o surgimento da técnica do PCR (MULLIS e FALOONA, 1987), uma nova geração de marcadores moleculares ganhou grande importância, sendo classificados como marcadores baseados em PCR, podendo ser citados, dentre eles, o RAPD e, mais recentemente, o AFLP. RAPD ou AP-PCR foram denominações descritas por dois grupos distintos - WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e McCLELLAND (1990), respectivamente - para descrever a mesma metodologia, tendo a primeira denominação se tornado mais conhecida. O RAPD é uma adaptação da técnica de PCR que utiliza oligodesoxirribonucleotídeos decâmeros únicos (*primers*) de seqüência arbitrária, que amplificam fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma. Os produtos da amplificação são obtidos quando dois sítios de anelamento do iniciador estão localizados em sentidos opostos no DNA e separados entre si por uma distância amplificável, geralmente entre 200 e 2.000 pares de bases. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados dependem da seqüência do *primer* e do DNA-molde (TINGEY e DEL TUFO, 1993). Marcadores RAPD têm sido largamente utilizados em análises genômicas, mostrando-se particularmente úteis no mapeamento de genes de resistência a doenças em plantas. Inúmeros exemplos

são encontrados na literatura, como identificação de marcadores RAPD associados à resistência ao míldio (*Bremia lactucae*) em alface (MICHELMORE et al., 1991), marcador RAPD ligado ao gene que confere resistência ao cancro da haste da soja (CARVALHO, 1995) e marcadores RAPD ligados à resistência ao agente causal da antracnose do feijoeiro (ALZATE-MARIN, 1995). Uma das grandes vantagens do RAPD é a obtenção de elevado número de polimorfismos de forma relativamente simples (WELSH e McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), principalmente em espécies pouco caracterizadas geneticamente, uma vez que não requerem nenhum conhecimento prévio do genoma.

O AFLP é uma classe recente de marcadores, que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP com a praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como uma ferramenta poderosa na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995). A técnica baseia-se na digestão simultânea do DNA genômico com duas enzimas de restrição, sendo *Eco* RI e *Mse* I as mais usadas. Adaptadores complementares às extremidades coesivas de ambos os sítios de restrição são ligados aos fragmentos de DNA digeridos. Estes fragmentos são submetidos a uma reação de PCR com *primers* pré-seletivos de seqüência complementar aos adaptadores, acrescidos de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. Dessa forma, apenas os fragmentos que possuírem os sítios de restrição de *Eco* RI e *Mse* I serão amplificados, aumentando a proporção dos fragmentos de interesse. A população de fragmentos pré-amplificada constituirá o DNA-molde para as reações subseqüentes de amplificação seletiva, utilizando *primers* que contêm a seqüência dos *primers* pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na sua extremidade 3'. A detecção dos fragmentos amplificados é feita pela marcação radioativa ou fluorescente de um dos *primers* seletivos. Os produtos de amplificação são separados em gel de poliacrilamida, com resolução de um par de base, aumentando a precisão e o poder de detecção da técnica.

## **2.3. Mapeamento genético**

O mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, criando a possibilidade de se ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999).

Através do mapa genético é possível uma representação da ordem e da distância entre os locos nos grupos de ligação. A distância genética é medida em termos da frequência de recombinação entre marcadores, que é transformada em distância de mapa (centiMorgans) por meio de algoritmos apropriados. As fórmulas mais comumente utilizadas no mapeamento são as de Haldane e de Kosambi, e a última considera a interferência parcial entre permutas genéticas adjacentes. A frequência de recombinação é bastante variável entre diferentes regiões cromossômicas, entre tipos de cromossomos e entre espécies. Assim, a distância genética não apresenta correlação constante com a distância física, definida em termos de pares de base. No entanto, a ordem dos locos determinada nos grupos de ligação genética corresponde à mesma encontrada nos cromossomos. Com isso, o mapeamento genético de uma espécie consiste na produção de um conjunto ordenado de informações sobre as seqüências de DNA que cobrem todo o genoma.

### **2.3.1. Construção de mapas genéticos**

Os requisitos básicos para a construção de uma mapa genético são a obtenção de populações segregantes e a utilização de vários marcadores que sejam polimórficos entre os genitores e que apresentem segregação mendeliana na progênie.

Vários tipos de população podem ser utilizados no mapeamento, devendo ser escolhidos cruzamentos que maximizem a probabilidade de detectar polimorfismos em nível de DNA. As populações segregantes utilizadas podem ser originadas de retrocruzamento,  $F_2$ , RILs, dentre outras. A população de

retrocruzamento é considerada pouco informativa, pois segrega apenas para os alelos do progenitor doador. A população  $F_2$  pode ser obtida em apenas duas gerações e contém as três combinações possíveis de dois alelos para um referido loco (AA, Aa e aa). As RILs constituem uma população permanente, visto que cada indivíduo é resultante de autofecundações sucessivas de uma planta  $F_2$ . Entretanto, a limitação na obtenção deste tipo de população é o longo tempo: cerca de sete ou mais gerações de autofecundação.

O número de marcadores necessários para se construir um mapa genético varia em função do tamanho do genoma, do número e do comprimento genético dos cromossomos. Um mapa pode ser considerado completo quando o número de grupos de ligação obtidos pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo, sugerindo que todas as regiões do genoma estão representadas.

O mapeamento genético permite o estudo de qualquer processo morfológico, fisiológico ou de desenvolvimento, desde que haja variações na constituição genética de uma população, com um mínimo de informação prévia (PATERSON, 1996). No contexto do melhoramento de plantas, os mapas genéticos possibilitam a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos simples, uma vez que podem ser identificadas e mapeadas as regiões genômicas que controlam tais caracteres. O efeito de cada uma dessas regiões pode ser quantificado, podendo ser capitalizada toda a informação para os programas de melhoramento. O mapeamento genético representa ainda uma importante metodologia para a clonagem de genes, principalmente quando o produto gênico não é conhecido.

### **2.3.2. Mapeamento de locos de herança simples**

Variações fenotípicas determinadas pela segregação de um ou poucos genes são fáceis de serem caracterizadas e mapeadas; assim, os primeiros trabalhos de mapeamento utilizaram caracteres de herança simples. Isoenzimas, marcadores RFLP e, mais recentemente, marcadores RAPD e AFLP têm sido

utilizados para a identificação de regiões do genoma associadas a caracteres monogênicos, principalmente resistência a doenças e pragas.

Linhagens isogênicas, ou isolinhas, têm sido bastante usadas no mapeamento de locos de heranças simples. As isolinhas são desenvolvidas por meio de ciclos sucessivos de retrocruzamentos com o genótipo recorrente, com o objetivo de introduzir um gene de interesse de um germoplasma não-adaptado em uma linhagem comercial. Desse modo, é obtida uma linhagem geneticamente semelhante à original, exceto na região genômica onde o gene foi introduzido. Análises de linhagens isogênicas com marcadores moleculares permitiram a identificação de marcadores ligados a genes de interesse em várias espécies de importância econômica, como a resistência ao vírus TMV em tomate (YOUNG et al., 1988), resistência a *Pseudomonas* em tomate (MARTIN et al., 1991), resistência a *Pyricularia grisea* em arroz (YU et al., 1991) e resistência a *Phytophthora megasperma* em soja (DIERS et al., 1992).

O mapeamento de caracteres de herança monogênica é relativamente simples, uma vez que classes fenotípicas discretas ou semidiscretas são observadas. Entretanto, complicações na avaliação do fenótipo surgem com questões de penetrância do loco controlador da resistência, proporções de segregação diferentes e interações epistáticas.

### **2.3.3. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa**

A grande maioria dos caracteres de importância econômica estão sob controle genético complexo, envolvem a ação de vários genes e são altamente influenciados pelas condições ambientais, sendo de difícil manipulação e compreensão. Esses caracteres são denominados poligênicos ou quantitativos, apresentando variação contínua do fenótipo, em vez de classes fenotípicas discretas. Para a maioria dos caracteres quantitativos, há poucas informações sobre o número, a posição cromossômica, a magnitude do efeito e as interações dos locos que controlam a sua expressão. Esses locos são denominados locos controladores de caracteres quantitativos (*QTL - Quantitative Trait Loci*),

podendo ser citados, como exemplos, a produtividade e a tolerância a estresses abióticos.

A capacidade de se detectar um QTL é função da magnitude do seu efeito sobre o caráter, do tamanho da população segregante avaliada e da distância entre o marcador e o loco. Quanto maiores o efeito e o tamanho da população e mais próximo o marcador do QTL, mais fácil será a detecção.

O rápido avanço das técnicas de marcadores moleculares, a utilização de delineamentos experimentais apropriados e o desenvolvimento de métodos biométricos com grande poder de resolução têm possibilitado o estudo de caracteres quantitativos, dissecando-os em fatores mendelianos simples. Com o uso de mapas genéticos e de técnicas de mapeamento de QTL, é possível estimar o número e a localização dos genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos no fenótipo, dos efeitos de dosagem e as interações com outros QTLs.

No contexto de mapeamento de características quantitativas, os progenitores são selecionados em função de os respectivos fenótipos serem contrastantes para as características de interesse. Inicialmente, são identificados marcadores moleculares capazes de detectar alelos diferentes entre as linhagens parentais, que são, então, utilizados na população segregante. A segregação de cada marcador é avaliada pelo teste de qui-quadrado, e apenas os que apresentarem segregação mendeliana são submetidos às análises de ligação genética. Os marcadores são, então, ordenados em cada grupo de ligação, e a distância genética (cM) é calculada a partir da frequência de recombinação, utilizando funções de mapeamento próprias.

#### **2.4. Mapas genéticos em *Theobroma cacao* L.**

A primeira tentativa de se produzir um mapa de ligação em cacau foi publicada por OSEI et al. (1993), gerando um mapa de baixa densidade com sete grupos de ligação, contendo um total de 36 marcadores RAPD. LANAUD et al. (1995) publicaram um mapa de ligação com 193 marcadores distribuídos em 10

grupos de ligação, avaliando uma população  $F_1$  de 100 indivíduos obtida de um cruzamento entre dois genótipos heterozigóticos. Um terceiro mapa foi publicado por CROUZILLAT et al. (1996), com 138 marcadores distribuídos em 10 grupos de ligação, cobrindo um total de 1.068 cM do genoma. Nesse trabalho, foram também identificados QTLs associados ao florescimento, ao diâmetro do tronco, à altura do jorquete e ao número de óvulos na geração do primeiro retrocruzamento.

## **2.5. Vassoura-de-bruxa**

A vassoura-de-bruxa, doença causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*, foi inicialmente registrada no Suriname, em 1895 (EVANS e PRIOR, 1987). Na Bahia, o primeiro foco da doença foi identificado na cidade de Uruçuca, em 1989, seguido de outro foco em Camacã (BASTOS, 1991).

### **2.5.1. Ciclo reprodutivo**

O fungo *Crinipellis perniciosa* desenvolve seu ciclo de vida em dois estágios. No primeiro, parasita os tecidos novos e vivos do cacaueteiro, causando inchamentos e provocando superbrotas e anomalias nos frutos e nas almofadas florais; no segundo ciclo, com maior virulência, causa necrose e apodrecimento dos tecidos da planta (AITKEN, 1997).

A colonização e o desenvolvimento do fungo são muito rápidos, iniciando-se nos tecidos jovens e em crescimento, em que o *Crinipellis* obtém nutrientes e se estabelece como parasita. Quando o cacaueteiro é atacado pelo fungo, os nutrientes solúveis se tornam escassos e induzem o fungo a invadir e necrosar os tecidos, passando assim a obter energia dos tecidos mortos da planta. É neste estágio que aparecem os basidiocarpos (fungos no formato de cogumelos), que produzem muitos esporos e disseminam a doença. A liberação dos esporos, processo reprodutivo do fungo, se dá preferencialmente à noite,

estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar. Os esporos são disseminados pelo vento, são sensíveis à luz e têm vida curta, não vivendo mais do que uma hora. A disseminação pode acontecer também pela água e por meio de sementes contaminadas.

### **2.5.2. Sintomas**

O *Crinipellis* só se desenvolve em regiões que contenham tecidos meristemáticos, podendo ser ramos, almofadas florais e frutos. O ataque nos ramos ou brotos vegetativos provoca inchaço da parte afetada, que é acompanhada da proliferação de pequenos brotamentos próximos uns dos outros, onde se prendem as folhas grandes, curvadas e retorcidas, assemelhando-se a uma vassoura. Nas almofadas florais infectadas formam-se cachos de flores anormais, que dão origem a frutos que morrem prematuramente (BASTOS, 1991).

Os frutos infectados apresentam diversos sintomas que dependem do grau de contaminação. Quando a infecção se dá por meio da flor, surgem frutos com formas semelhantes à de um morango, que também morrem prematuramente. Quando a infecção ocorre nos frutos jovens, o sintoma característico é o aparecimento de uma mancha negra, dura e irregular, causando a perda das sementes.

### **2.5.3. Controle**

Embora várias estratégias de controle químico (LAKER e HUDGARD, 1989) e biológico (BASTOS, 1991) tenham sido testadas, as práticas utilizadas para o manejo da doença se restringem à proteção de frutos com fungicidas cúpricos e à poda fitossanitária.

A poda fitossanitária consiste na remoção das partes infectadas da planta. Entretanto, caso ela não seja bem feita, o tecido infectado ainda é capaz de

produzir basidiocarpos (ROCHA e WHEELER, 1985). A poda das partes lesadas deve ser realizada de maneira criteriosa, uma vez que o corte excessivo de ramos implica redução da copa. Desse modo, as plantas daninhas se desenvolvem, alguns cacauzeiros morrem e grandes espaços surgem na plantação (AITKEN, 1997), causando sérios problemas à produtividade da cultura.

Muito esforço tem sido gasto na tentativa de encontrar novos produtos químicos que, combinados com a poda fitossanitária, possam aumentar a eficiência de tal prática. Há várias publicações descrevendo testes que demonstram alguma atividade positiva em experimentos *in vitro*, mas que apresentam eficiência duvidosa em teste de campo, especialmente quando seu custo é considerado (LAKER e HUDGARD, 1989; CIFUENTES et al., 1981; MAYORGA e ARANZAZU, 1981).

A maioria dos fungicidas é do tipo sistêmico, de contato ou fitorreguladores. Os fungicidas de contato são produtos que, depositados na superfície dos galhos, impedem a germinação dos basidiosporos e reduzem a dispersão do fungo. Os fungicidas sistêmicos são translocados dentro da planta, eliminando o micélio ou inibindo a formação da "vassoura". Os fitorreguladores podem ser ou não encontrados normalmente nas plantas, sendo capazes de ativar o mecanismo de defesa natural destas e de contrabalançar o desequilíbrio hormonal causado pelo fungo. A utilização de fungicidas é uma prática muito onerosa e altamente dependente de mão-de-obra, sendo inviável em condições de baixa produtividade e de alta pressão de inóculo (AITKEN, 1997).

Tendo em vista a agressividade da doença e as inúmeras dificuldades enfrentadas pelas estratégias do seu controle, o desenvolvimento de variedades resistentes, por meio do melhoramento genético, constitui uma das alternativas mais claras e viáveis para a revitalização da cultura do cacau no Brasil.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material genético**

Do cruzamento entre Scavina-6 e ICS-1 foram produzidos vários híbridos, dentre os quais foi escolhido o clone TSH 516, devido ao conjunto de características desejáveis por ele apresentadas. O clone foi autofecundado, gerando uma população  $F_2$  constituída de 82 indivíduos, que foi analisada no presente trabalho. O progenitor Scavina-6 tem sido amplamente utilizado como fonte de resistência à vassoura-de-bruxa na produção de híbridos comerciais, e o ICS-1 foi selecionado devido ao seu bom desempenho agrônômico. Além da resistência à vassoura-de-bruxa, os progenitores são contrastantes para diferentes características de importância econômica para a cacauicultura.

#### **3.2. Avaliações fenotípicas**

A população segregante foi avaliada fenotipicamente, quantificando o número de vassouras por planta. A poda fitossanitária é realizada trimestralmente, sendo determinado o número de vassouras removidas de cada planta. Os dados de campo apresentados no presente trabalho foram coletados no

CEPEC/CEPLAC, Itabuna-BA, e equivalem aos primeiros seis meses de avaliações.

### **3.3. Extração de DNA**

Cerca de 300 mg de folha foram triturados na presença de N<sub>2</sub> líquido. O pó resultante foi transferido para tubos *ependorf* e adicionado um volume de 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (p/v)). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 40 minutos e, posteriormente, centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para tubos novos. Ao sobrenadante foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram suavemente invertidos e centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi transferida para tubos novos e o DNA precipitado com a adição de 800 µL de isopropanol gelado. O isopropanol foi descartado, sendo adicionados 600 µL de etanol gelado (95%) ao precipitado. Após o descarte do etanol, o precipitado foi seco ao ar, ressuspenso em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubado a 37 °C por 30 minutos com RNase A, a uma concentração final de 60µg/mL. O DNA foi novamente precipitado com a adição de 30 µL de NaCl 5M e 200 µL de isopropanol gelado aos tubos, seguido de centrifugação a 14.000rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com 600 µL de etanol gelado 95%, seco ao ar e ressuspendido em um volume de 300 µL de TE<sub>0,1</sub> (EDTA 0,1 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7,5).

A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro por leitura da absorvância a 260 nm, sendo cada unidade de absorvância correspondente à concentração de 50 µg/mL de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

### 3.4. Marcadores RAPD

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,8 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA) 0,4  $\mu$ M, uma unidade da enzima *Taq* polimerase e 20 ng de DNA. Os ciclos de amplificações foram realizados em um termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e um minuto a 72 °C, seguido de uma etapa de sete minutos a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, em TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM), contendo brometo de etídio 0,2  $\mu$ g/mL, por aproximadamente quatro horas a 100 volts. Terminada a eletroforese, o gel foi fotografado, utilizando o sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

### 3.5. Marcadores AFLP

A técnica de AFLP foi conduzida segundo a metodologia proposta por VOS et al. (1996), com modificações sugeridas pelo AFLP Starter Primer Kit (Gibco-BRL, Alameda, CA, EUA). O DNA genômico de cada indivíduo foi clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI*. A reação de digestão foi feita em um volume total de 25  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de tampão de reação 5X, 2 $\mu$ L de *EcoRI/MseI* (Gibco-BRL) e 250 ng de DNA genômico. A reação foi conduzida por três horas a 37 °C, seguida por 15 minutos a 70 °C, para inativar as enzimas. Aos fragmentos de restrição foram ligados adaptadores específicos para as extremidades coesivas de cada uma das enzimas, *EcoRI* e *MseI*. A reação de ligação dos adaptadores foi realizada pela adição de 24  $\mu$ L do tampão de ligação contendo os adaptadores e de 1  $\mu$ L da T<sub>4</sub> DNA ligase (Gibco-BRL) aos 25  $\mu$ L da reação de digestão. Os tubos permaneceram por duas horas a 20 °C e, em seguida, os fragmentos foram diluídos (1:6) em TE<sub>0,1</sub>.

A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando 4 µL dos fragmentos de DNA diluídos (1:6), 1 µL dos pares de *primers* pré-seletivos e 15 µL do coquetel de AFLP (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA). Os *primers* pré-seletivos possuem, além da sequência complementar a cada adaptador, um nucleotídeo na extremidade 3' (*EcoRI* +A e *MseI* +C). As reações foram realizadas no termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) programado com 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos. Um alíquota de 10 µL da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,2%, em TBE 1X, contendo brometo de etídio. A visualização de um “rastros” de fragmentos entre 700 e 200 pb indicou que as etapas até então realizadas obtiveram sucesso. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos (1:50) em TE<sub>0,1</sub>.

A amplificação seletiva é uma segunda etapa de amplificação que utiliza os produtos da pré-amplificação diluídos como molde e *primers* seletivos que possuem, além da sequência do *primer* pré-seletivo, combinações ao acaso de dois nucleotídeos na extremidade 3'. As combinações possíveis dos *primers* seletivos estão listadas na Tabela 1. A amplificação seletiva foi realizada em um volume de 20 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,8mM, 212 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), *primer* de *MseI* 0,25 µM e do *primer* de *EcoRI* 0,05 µM (Perkin Elmer), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e 3,5 µL do DNA diluído (1:50). As reações foram amplificadas com 12 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C (-0,7 °C/ciclo) por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, até atingir a temperatura de 56 °C, seguidos de 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos.

A análise dos fragmentos foi realizada em géis de poliacrilamida desnaturante contendo 4,25% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 19:1) e uréia 36% (p/v) em TBE 1X. A Tabela 1 indica os *primers EcoRI* marcados com fluorescência, sendo três *primers* com a fluorescência JOE (E<sub>1</sub>, E<sub>5</sub> e E<sub>8</sub>), três com a fluorescência TAMRA (E<sub>2</sub>, E<sub>4</sub> e E<sub>7</sub>) e dois com FAM (E<sub>3</sub> e E<sub>6</sub>). Assim, os

fragmentos amplificados são detectados pelo seqüenciador automático ABI 377<sup>®</sup>, utilizando um marcador de peso molecular GENESCAN 500-ROX (Perkin Elmer) em cada linha. Dessa forma, foi possível analisar simultaneamente três reações de amplificação seletiva, cada uma marcada com uma fluorescência diferente, em cada gel. Inicialmente, foram transferidas alíquotas de 8 µL, 6 µL e 5 µL das reações que continham fragmentos marcados com as fluorescências JOE, TAMRA e FAM (amarela, verde e azul, respectivamente), para uma placa de Elisa. Dessa mistura, foram transferidos 3,5 µL para tubos de PCR e adicionados 0,25 µL de GENESCAN 500-ROX, 0,50 µL do tampão de amostra concentrado e 0,75 µL de formamida deionizada. As amostras foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos e mantidas em gelo até serem aplicadas no gel.

Tabela 1 - Identificação dos oito *primers* seletivos EcoRI (E<sub>1</sub> a E<sub>8</sub>), dos oito *primers* seletivos MseI (M<sub>1</sub> a M<sub>8</sub>) e das 64 combinações possíveis entre *primers* seletivos de AFLP utilizados na seleção inicial das melhores combinações de *primers* entre os progenitores SCA-6 e ICS-1 e o F<sub>1</sub>. Cada um dos *primers* seletivos apresenta uma combinação específica dos desoxirribonucleotídeos (A-adenina, T-timina, C-citosina e G-guanina) na extremidade 3' do *primer*. E<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, por exemplo, representa a combinação de *primers* EcoRI = ACA e MseI = CAC

	<b>M<sub>1</sub></b> (-CAA)	<b>M<sub>2</sub></b> (-CAC)	<b>M<sub>3</sub></b> (-CAG)	<b>M<sub>4</sub></b> (-CAT)	<b>M<sub>5</sub></b> (-CTA)	<b>M<sub>6</sub></b> (-CTC)	<b>M<sub>7</sub></b> (-CTG)	<b>M<sub>8</sub></b> (-CTT)
<b>E<sub>1</sub></b> (-AAC)	AACCAA	AACCAC	AACCAG	AACCAT	AACCTA	AACCTC	AACCTG	AACCTT
<b>E<sub>2</sub></b> (-AAG)	AAGCAA	AAGCAC	AAGCAG	AAGCAT	AAGCTA	AAGCTC	AAGCTG	AAGCTT
<b>E<sub>3</sub></b> (-ACA)	ACACAA	ACACAC	ACACAG	ACACAT	ACACTA	ACACTC	ACACTG	ACACTT
<b>E<sub>4</sub></b> (-ACC)	ACCCAA	ACCCAC	ACCCAG	ACCCAT	ACCCTA	ACCCTC	ACCCTG	ACCCTT
<b>E<sub>5</sub></b> (-ACG)	ACGCAA	ACGCAC	ACGCAG	ACGCAT	ACGCTA	ACGCTC	ACGCTG	ACGCTT
<b>E<sub>6</sub></b> (-ACT)	ACTCAA	ACTCAC	ACTCAG	ACTCAT	ACTCTA	ACTCTC	ACTCTG	ACTCTT
<b>E<sub>7</sub></b> (-AGC)	AGCCAA	AGCCAC	AGCCAG	AGCCAT	AGCCTA	AGCCTC	AGCCTG	AGCCTT
<b>E<sub>8</sub></b> (-AGG)	AGGCAA	AGGCAC	AGGCAG	AGGCAT	AGGCTA	AGGCTC	AGGCTG	AGGCTT

### 3.6. Denominação dos marcadores no mapa de ligação

Todos os marcadores possuem a primeira letra indicando o progenitor no qual a banda estava presente, sendo **s** para Scavina-6 e **i** para ICS-1.

Os marcadores RAPD foram identificados com as letras do *primer* da série Operon, que foi utilizado na amplificação, seguido do tamanho do fragmento em pares de bases. O tamanho do fragmento foi calculado utilizando o DNA do fago  $\lambda$  digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI* como padrão de peso molecular, com auxílio do programa OnedScan™ (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Os marcadores AFLP foram denominados com as três bases seletivas do *primer EcoRI*, seguido pelas bases seletivas do *primer MseI*, descritas na Tabela 1, e pelo tamanho do fragmento em pares de bases. O tamanho de cada fragmento de AFLP foi calculado utilizando o GENESCAN 500-ROX como padrão de peso molecular, sendo as interpolações feitas pelo programa GeneScan™ 2.1 (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA).

### 3.7. Análise de ligação

Os marcadores RAPD e AFLP foram codificados como ausência (0) e presença (1) das bandas amplificadas em cada um dos 82 indivíduos da população  $F_2$ , sendo também identificado o progenitor de origem da banda. Desse modo, foi obtida uma matriz para dois conjuntos de dados, conforme a presença das bandas em cada um dos progenitores. A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população  $F_2$  por meio do teste de qui-quadrado. Apenas os fragmentos cuja proporção de segregação se ajustou a 3:1 ( $P < 0,05$ ) foram utilizados nas análises posteriores.

### **3.8. Construção do mapa de ligação genética**

A análise de ligação e a determinação da ordem dos marcadores foram feitas com o auxílio do programa MapMaker/EXP 3.0 (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992). Os marcadores foram agrupados utilizando LOD mínimo de 4,0 e frequência máxima de recombinação de 0,30. A distância de mapeamento de Kosambi foi utilizada para a conversão da frequência de recombinação para centiMorgans. A matriz de 1 e 0 foi convertida em uma matriz de A, B, C e D para ser processada pelo programa *Mapmaker*, utilizando as designações **A**, para ausência da banda em Scavina-6; **B**, para ausência da banda em ICS-1; **C**, para presença da banda em Scavina-6; e **D**, para presença da banda em ICS-1.

Como os progenitores da população são heterozigóticos, alguns fragmentos presentes em ambos os progenitores apresentaram a segregação esperada na progênie. Para identificar a origem destes fragmentos, foi utilizado um artifício, como proposto por AL-JANABI et al. (1993), para detecção de marcadores ligados em fase de repulsão em espécies poliplóides. O artifício foi a duplicação do marcador e a conversão de A em B e de C em D; assim, foi simulada a origem dos marcadores como sendo de ambos os progenitores. Após a análise de segregação, as duas formas do mesmo marcador foram submetidas às análises de ligação genética. A forma que se mostrou ligada foi considerada a verdadeira origem do marcador, e a outra forma foi eliminada das análises.

### **3.9. Análise estatística**

Análises de regressão simples foram inicialmente utilizadas para detectar associações entre os marcadores moleculares e a resistência à vassoura-de-bruxa. A proporção da variância fenotípica explicada por marcador foi estimada por meio dos valores de  $R^2$  obtidos da regressão linear, como descrito por EDWARDS et al. (1987). Os marcadores que foram associados à característica fenotípica a  $P < 0,01$  foram analisados por modelos de regressão múltipla,

utilizando o procedimento de eliminação por *stepwise* do programa Jump 3.1.6.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Assim, foi determinada a proporção da variância fenotípica explicada pelo conjunto de marcadores que se ajustaram ao modelo de regressão múltipla a  $P < 0,05$ .

As informações do mapa genético foram utilizadas para mapear os QTLs ao longo dos grupos de ligação, por meio do mapeamento por intervalo, proposto inicialmente por LANDER e BOTSTEIN (1989). O nível de significância para o mapeamento por intervalo foi determinado por testes de permutação ao acaso dos dados fenotípicos, como descrito por DOERGE e CHURCHILL (1996). Todas as análises de mapeamento de QTLs e os testes de permutação foram realizados com auxílio do programa Qgene (NELSON, 1997).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. População de mapeamento**

No presente trabalho foi utilizada uma população  $F_2$  de 82 indivíduos obtida pela autofecundação do clone TSH 516, originado do cruzamento entre os clones heterozigóticos Scavina-6 e ICS-1. O clone Scavina-6 foi escolhido por estar sendo utilizado em vários programas de melhoramento genético do cacaueteiro e por ser uma fonte de genes de resistência à vassoura-de-bruxa; além disso, apresenta sementes com altos teores de gordura. O clone ICS-1 possui sementes e frutos de tamanho médio, alta dureza da gordura e elevada produção, embora seja considerado suscetível à vassoura-de-bruxa. A gordura é o principal e mais valioso produto do cacaueteiro, sendo a sua dureza um aspecto importante, visto que o produto final deve ser sólido à temperatura ambiente, derretendo-se à temperatura do corpo humano. Dessa forma, a população segregante obtida desse cruzamento oferece a possibilidade para o mapeamento de regiões genômicas associadas a várias características agrônômicas de interesse, como teor e dureza de gordura, produção, tamanho do fruto e resistência à vassoura-de-bruxa.

Uma população de mapeamento constituída por 82 indivíduos fornece uma precisão de mapeamento em torno de 3 cM (WU et al., 1992) e se mostra de acordo com o tamanho das populações utilizadas no mapeamento genético do

cacaueiro, que têm oscilado entre 47 (TULSIERAM et al., 1992) e 138 indivíduos (KISS et al., 1993). Populações segregantes  $F_2$  são comumente utilizadas no mapeamento de QTLs, devido ao fato de explorarem o máximo do desequilíbrio de ligação e de representarem todas as possíveis combinações alélicas (AA, Aa e aa). Com isso, torna-se possível a identificação dos mecanismos de ação gênica, de interação com outros locos, além de favorecer a detecção da ligação genética entre o QTL e o marcador. O tempo necessário para a obtenção de populações  $F_2$ , apenas dois ciclos, é extremamente importante para espécies de ciclo reprodutivo longo, como é o caso do cacaueiro.

#### **4.2.Deteção de polimorfismos entre os progenitores**

Os *primers* RAPD e as combinações de *primers* AFLP foram inicialmente testados nos progenitores com a finalidade de selecionar aqueles que produzissem fragmentos polimórficos e que, conseqüentemente, pudessem ser mapeados na população segregante.

Foram testados 580 *primers* RAPD, pertencentes aos 29 *kits* (OPH, OPI, OPJ, OPK, OPR, OPT, OPX, OPY, OPZ, OPAA, OPAB, OPAC, OPAD, OPAE, OPAF, OPAG, OPAH, OPAI, OPAL, OPAN, OPAR, OPAS, OPAU, OPAV, OPAW, OPAX, OPAZ, OPBB e OPBG), dos quais foram utilizados apenas 110 (18,9%) no mapeamento dos indivíduos da população segregante. Os 110 *primers* RAPD amplificaram 201 fragmentos polimórficos, obtendo-se uma média de 1,82 fragmento polimórfico por *primer*, que oscilaram entre um e cinco polimorfismos por *primer*. RONNING et al. (1995), avaliando a herança dos marcadores RAPD em *Theobroma cacao* L., utilizaram 26% dos *primers* RAPD testados, resultando em uma média de 2,2 polimorfismos por *primer*. No mapa de ligação de *Theobroma cacao* L. construído por CROUZILLAT et al. (1996), 24% dos *primers* RAPD detectaram polimorfismos entre os progenitores e produziram uma média de 3,6 polimorfismos por *primer*. A Figura 1 ilustra o padrão de amplificação do DNA dos progenitores, do  $F_1$  e da população  $F_2$  com o *primer* OPAV14.

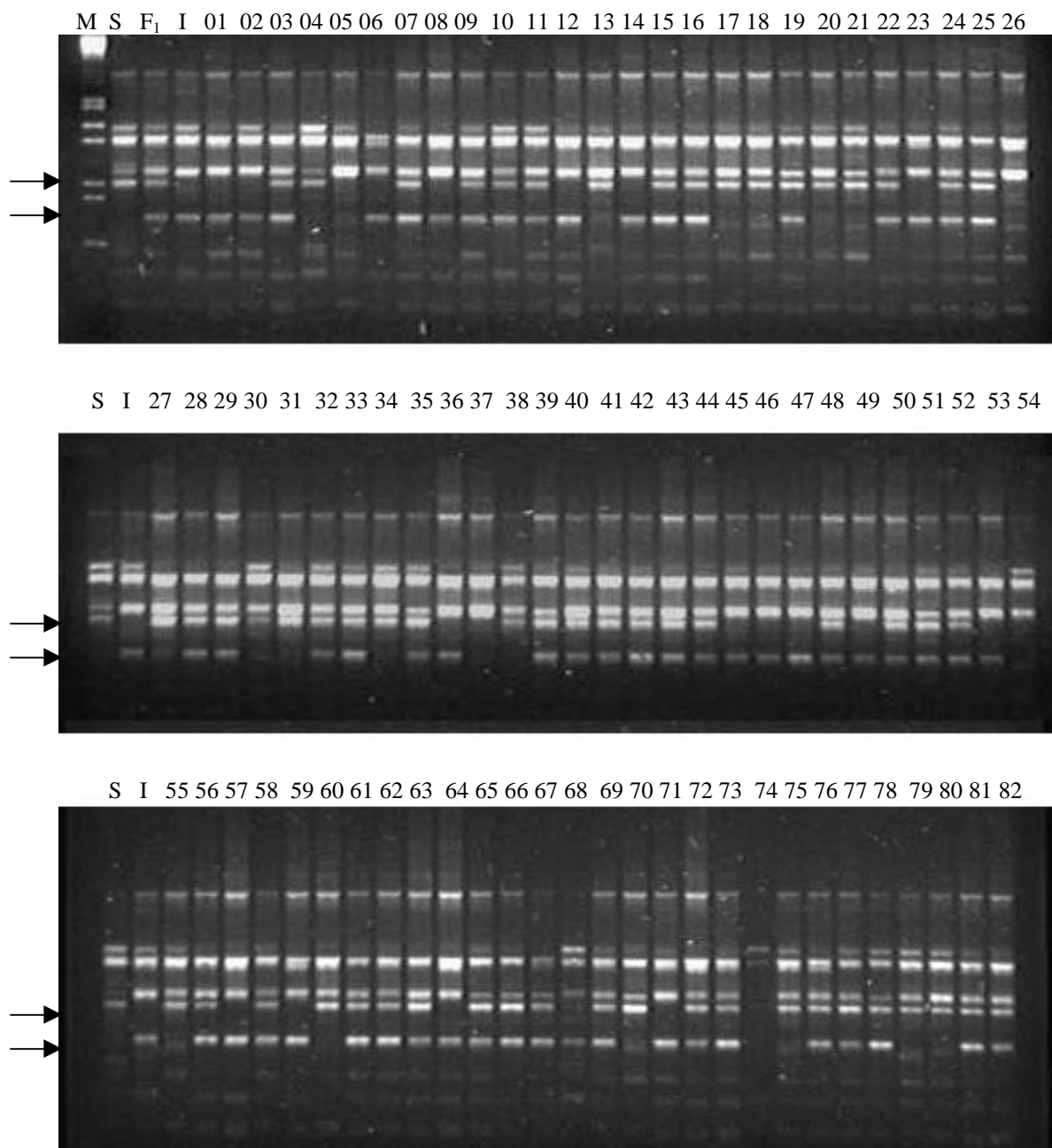


Figura 1 - Padrão eletroforético de fragmentos de DNA dos progenitores Scavina-6 (S), ICS-1 (I), do F<sub>1</sub> e de indivíduos F<sub>2</sub> (1-82) amplificados com o *primer* OPAV14 em gel de agarose 1,2%. M - DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*, utilizado como padrão de peso molecular. As setas indicam os marcadores presentes no F<sub>1</sub>, polimórficos entre os progenitores e que segreram na proporção 3:1 ( $P < 0,05$ ) na progênie.

Todas as 64 combinações de *primers* seletivos de AFLP, *EcoRI* (E<sub>1</sub> a E<sub>8</sub>) e *MseI* (M<sub>1</sub> a M<sub>8</sub>) (Tabela 1) foram utilizadas na amplificação do DNA dos progenitores e do F<sub>1</sub>, para a seleção das combinações de *primers* mais informativas. Das 64 combinações possíveis, 30 foram selecionadas (E<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>M<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>M<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>M<sub>6</sub>, E<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>M<sub>3</sub>, E<sub>3</sub>M<sub>5</sub>, E<sub>3</sub>M<sub>6</sub>, E<sub>3</sub>M<sub>7</sub>, E<sub>4</sub>M<sub>5</sub>, E<sub>4</sub>M<sub>7</sub>, E<sub>5</sub>M<sub>1</sub>, E<sub>5</sub>M<sub>3</sub>, E<sub>5</sub>M<sub>4</sub>, E<sub>5</sub>M<sub>5</sub>, E<sub>6</sub>M<sub>1</sub>, E<sub>6</sub>M<sub>2</sub>, E<sub>6</sub>M<sub>4</sub>, E<sub>6</sub>M<sub>5</sub>, E<sub>6</sub>M<sub>6</sub>, E<sub>7</sub>M<sub>1</sub>, E<sub>7</sub>M<sub>2</sub>, E<sub>7</sub>M<sub>3</sub>, E<sub>7</sub>M<sub>4</sub>, E<sub>7</sub>M<sub>6</sub>, E<sub>8</sub>M<sub>1</sub>, E<sub>8</sub>M<sub>2</sub>, E<sub>8</sub>M<sub>3</sub> e E<sub>8</sub>M<sub>4</sub>). As 30 combinações de *primers* amplificaram um total de 90 fragmentos polimórficos, evidenciando uma média de 3,0 locos polimórficos por combinação de *primers* AFLP, com o número de fragmentos oscilando entre 1 e 13 por combinação de *primers*. As Figuras 2 e 3 ilustram um gel de AFLP obtido pelo seqüenciador automático ABI 377<sup>®</sup>, onde o DNA dos progenitores, do F<sub>1</sub> e de alguns indivíduos F<sub>2</sub> foram amplificados com três combinações de *primers* marcados com fluorescência.

O número de polimorfismos por combinação de *primers* detectado no genoma do cacaueteiro foi inferior ao obtido por KEIM et al. (1997), que obtiveram uma média de nove locos polimórficos por combinação de *primers* AFLP, variando entre 1 e 21, na construção de um mapa genético em soja. O número inferior de polimorfismos detectados no genoma do cacaueteiro, quando comparados com o de soja, pode estar relacionado com o tamanho e a organização dos respectivos genomas. GOLDBERG (1978) determinou que o genoma haplóide da soja contém  $1,81 \times 10^9$  pb (1,97 pg), enquanto o genoma do cacaueteiro possui  $4,15 \times 10^8$  pb (0,43 pg), sendo, portanto, 4,5 vezes menor que o genoma da soja e somente 2,5 vezes maior que o de *Arabidopsis thaliana*. Quanto maior o tamanho do genoma, maior é a probabilidade de existirem sítios de restrição para as enzimas utilizadas e, portanto, maior o potencial de serem produzidos fragmentos amplificáveis. Uma opção para se obter maior número de polimorfismos de AFLP para genomas de tamanho reduzido, como o cacaueteiro, seria a utilização de *primers* contendo duas ou apenas uma única base seletiva para a amplificação final. Tais *primers* são disponíveis em *kits* comerciais específicos para espécies de genoma pequeno.

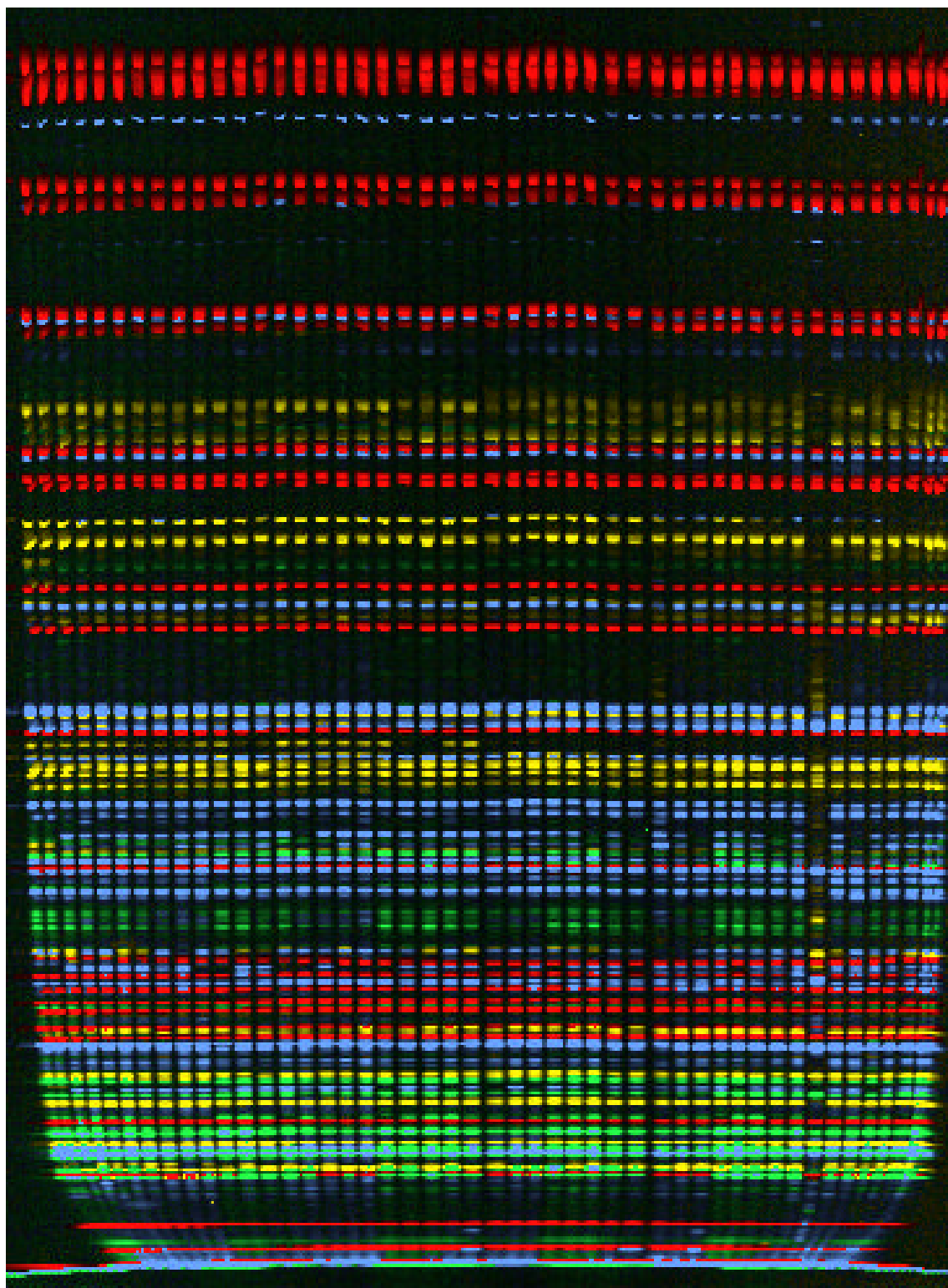


Figura 2 - Padrão de amplificação de DNA, em gel desnaturante de poliacrilamida 4,25%, obtido pela técnica de AFLP<sup>®</sup> e analisado pelo programa GENESCAN<sup>®</sup> do seqüenciador automático ABI 377<sup>®</sup>. Foram utilizadas as combinações de *primers* E<sub>3</sub>M<sub>7</sub> (em azul), E<sub>4</sub>M<sub>7</sub> (em amarelo) e E<sub>5</sub>M<sub>4</sub> (em verde). Em vermelho, o padrão de peso molecular (GENESCAN 500-ROX).

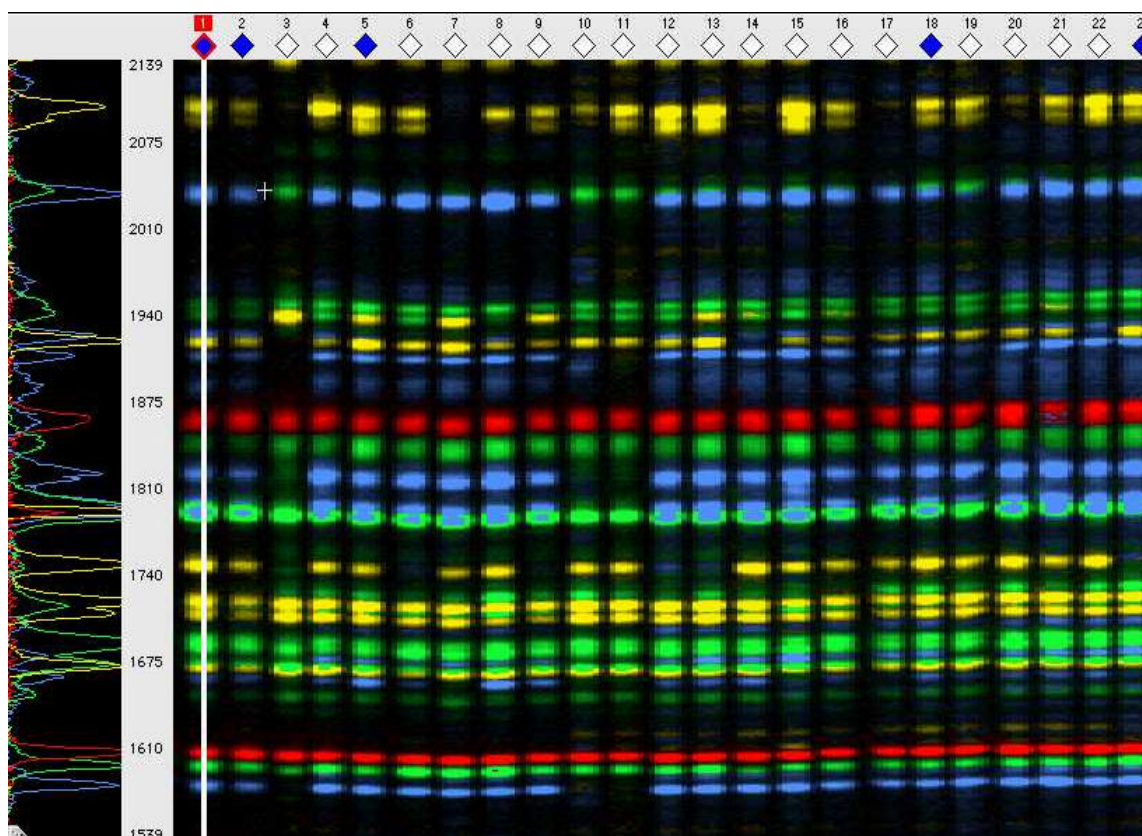


Figura 3 - Detalhe do um gel de AFLP<sup>®</sup>, analisado pelo programa GENESCAN<sup>®</sup> do sequenciador automático ABI 377<sup>®</sup>, contendo fragmentos de DNA entre 67 pb e 127 pb. O DNA dos progenitores SCA-6 (linhas 1 e 2) e ICS-1 (linha 3), do F<sub>1</sub> (linha 4) e da progênie F<sub>2</sub> (linhas 5 a 23) foi amplificado com as combinações de *primers* E<sub>6</sub>M<sub>4</sub> (em azul), E<sub>1</sub>M<sub>3</sub> (em amarelo) e E<sub>8</sub>M<sub>1</sub> (em verde). Em vermelho, o padrão de peso molecular (GENESCAN 500 - ROX).

Com relação à organização, o genoma do cacaueteiro contém quantidade relativamente baixa de DNA repetitivo, à semelhança de outras plantas que possuem genoma reduzido. Aproximadamente 60% do genoma da soja é constituído por padrões de seqüências ricas em A e T curtas dispersas no genoma, que constituem uma alternância de elementos repetidos com cerca de 250 pb (GOLDBERG, 1978). Desse modo, é de se esperar que a probabilidade de a enzima *MseI* encontrar seu sítio de restrição (AATT) seja bem maior em soja. Tal fato é confirmado pela observação de maior número de fragmentos polimórficos por combinação de *primers* AFLP com bases seletivas ricas em AT, ou seja, com proporção de GC de 0,17 (KEIM et al., 1997). No presente trabalho, 56% (17/30) das combinações de *primers* AFLP que geraram maior número de polimorfismos apresentaram conteúdo de GC de 0,5 nas bases seletivas dos *primers* (Tabela 2). A menor proporção de GC entre as 64 combinações de *primers* disponíveis foi de 0,33; assim, não foi possível avaliar o número de fragmentos obtidos por combinações com elevado teor de AT, como descrito por KEIM et al. (1997).

Tabela 2 - Classificação do conteúdo GC nas bases seletivas das combinações de *primers* de AFLP, em relação ao número de fragmentos polimórficos produzidos por combinação de *primers* seletivos analisada

<b>%GC</b>	<b>Combinação de <i>primers</i></b>	<b>Número total de polimorfismos</b>	<b>Número de polimorfismos /combinação</b>
<b>0,17</b>	-	-	-
<b>0,33</b>	E <sub>6</sub> M <sub>4</sub> , E <sub>1</sub> M <sub>4</sub> , E <sub>1</sub> M <sub>1</sub> , E <sub>6</sub> M <sub>5</sub> , E <sub>6</sub> M <sub>1</sub> , E <sub>3</sub> M <sub>5</sub>	18	3
<b>0,50</b>	E <sub>3</sub> M <sub>7</sub> , E <sub>3</sub> M <sub>2</sub> , E <sub>7</sub> M <sub>4</sub> , E <sub>5</sub> M <sub>4</sub> , E <sub>1</sub> M <sub>3</sub> , E <sub>8</sub> M <sub>1</sub> , E <sub>6</sub> M <sub>6</sub> , E <sub>2</sub> M <sub>6</sub> , E <sub>3</sub> M <sub>6</sub> , E <sub>3</sub> M <sub>3</sub> , E <sub>8</sub> M <sub>4</sub> , E <sub>7</sub> M <sub>1</sub> , E <sub>5</sub> M <sub>1</sub> , E <sub>4</sub> M <sub>5</sub> , E <sub>2</sub> M <sub>2</sub> , E <sub>6</sub> M <sub>2</sub> , E <sub>5</sub> M <sub>5</sub>	61	3.58
<b>0,67</b>	E <sub>4</sub> M <sub>7</sub> , E <sub>5</sub> M <sub>3</sub> , E <sub>8</sub> M <sub>2</sub> , E <sub>7</sub> M <sub>6</sub> , E <sub>8</sub> M <sub>3</sub> , E <sub>7</sub> M <sub>3</sub> , E <sub>7</sub> M <sub>2</sub>	11	1.57

Um valor de 0,5 significa que, dos seis nucleotídeos seletivos, três são A ou T e três G ou C.

#### **4.3. Análise dos fragmentos polimórficos presentes em ambos os progenitores**

Os progenitores utilizados para gerar a população segregante foram clones heterozigóticos, e a natureza dos marcadores RAPD e AFLP é essencialmente dominante. Desse modo, não é possível distinguir os marcadores heterozigotos sem avaliar a sua segregação na progênie. Algumas bandas estavam presentes em ambos os progenitores e no  $F_1$ , e segregaram na proporção esperada na progênie, indicando que um ou ambos os progenitores eram heterozigotos para os referidos locos. Assim, foi realizado o artifício de duplicar o marcador e inverter a denominação, a fim de identificar a origem das bandas, como proposto por AL-JANABI et al. (1993). Dessa forma, os fragmentos presentes nos progenitores Scavina-6 e ICS-1, no indivíduo  $F_1$  e que segregaram na população  $F_2$  tiveram suas origens determinadas e também puderam ser utilizados nas análises subseqüentes (Figura 4).

#### **4.4. Segregação dos marcadores RAPD e AFLP**

Os polimorfismos RAPD e AFLP gerados foram classificados de acordo com o progenitor de origem. Os marcadores originados do progenitor Scavina-6 foram identificados com **s** no início da denominação do loco (Tabela 3), e aqueles provenientes de ICS-1 tiveram sua identificação iniciada com **i** (Tabela 4). Os fragmentos presentes em ambos os progenitores e que segregaram na progênie tiveram sua origem determinada conforme o procedimento descrito anteriormente, sendo identificados com a inicial do progenitor que transferiu o fragmento amplificado para o indivíduo  $F_1$  (Tabela 5).

A segregação dos marcadores foi testada por meio do teste de qui-quadrado ( $P < 0,05$ ), revelando 216 fragmentos polimórficos que segregaram na proporção 3:1, dos quais 143 se originaram de 91 *primers* RAPD (1,57 polimorfismo/*primer*) e 73 foram obtidos com 22 combinações de *primers* AFLP

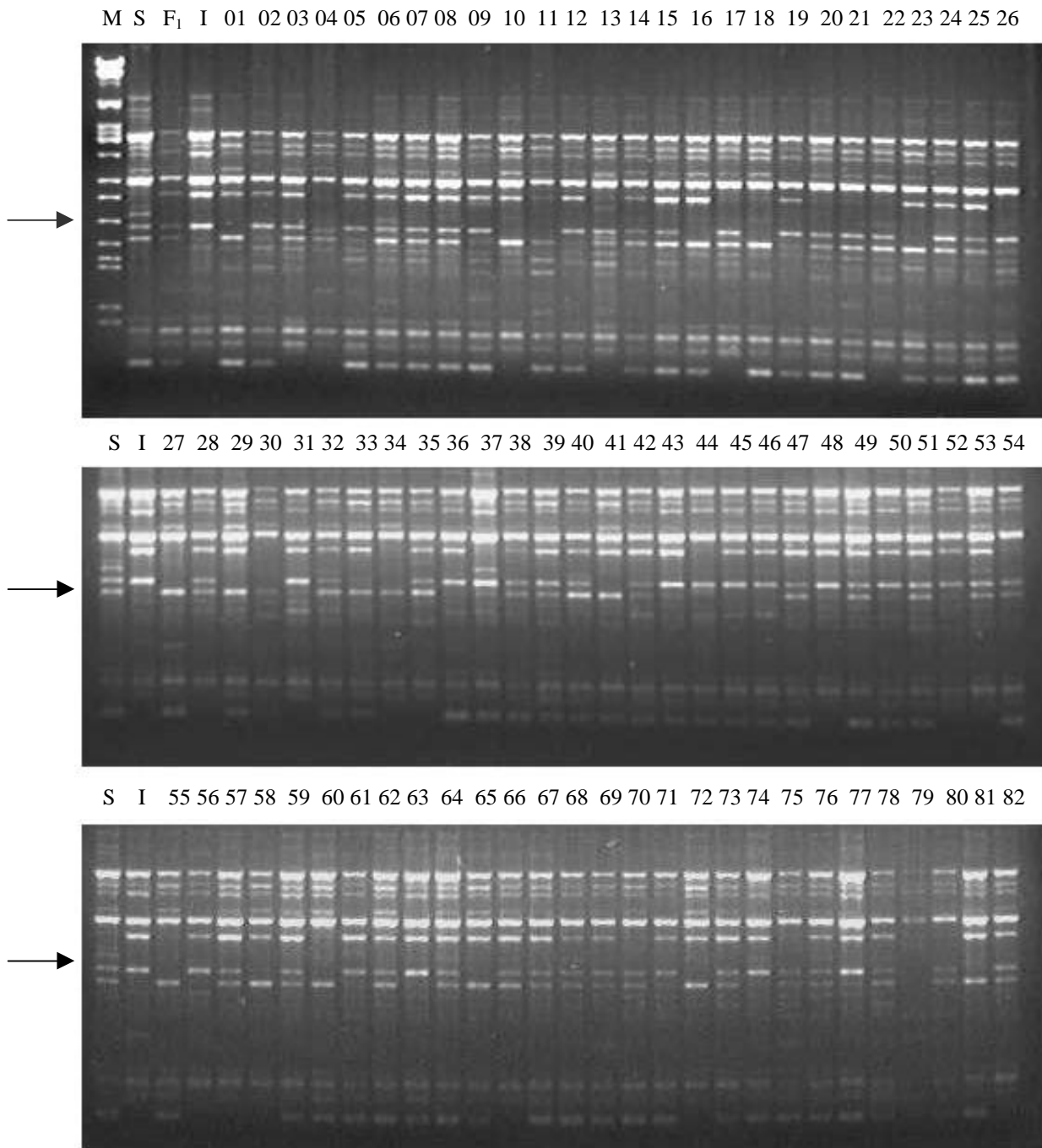


Figura 4 - Padrão eletroforético de fragmentos de DNA dos progenitores Scavina-6 (S), ICS-1 (I), do F<sub>1</sub> e de indivíduos F<sub>2</sub> amplificados com o *primer* OPAB12 em gel de agarose 1,2%. O fragmento indicado pela seta está presente em ambos os progenitores e no F<sub>1</sub>, segregando na progênie F<sub>2</sub>. M - DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*, utilizado como padrão de peso molecular.

(3,32 polimorfismos/par de *primers* AFLP). Do total de 216 fragmentos, 115 foram originados do progenitor Scavina-6 e 101 do progenitor ICS-1.

Foram também detectados 21 marcadores (10,3% de todos os marcadores significativos a 5%) segregando na proporção esperada, entre os níveis de  $P > 0,01$  e  $P < 0,05$  (Tabela 6); dentre eles, 15 foram marcadores RAPD e 6 AFLPs. Desvios de segregação têm sido freqüentemente relatados em vários trabalhos, sendo detectados 25,5% em batata (GEBHARDT et al., 1989), 12-59% em *Brassica oleraceae* (KIANIAN e QUIROS, 1992) e 32% em *Theobroma cacao* L. (RONNING et al., 1995). Na construção de mapas genéticos em *Theobroma cacao* L., LANAUD et al. (1995) e CROUZILLAT et al. (1996) utilizaram 9% e 4% de marcadores moleculares com desvios de segregação, respectivamente.

Todos os fragmentos polimórficos identificados foram considerados como marcadores de natureza dominante, ou seja, nenhum fragmento foi analisado com o padrão de segregação de 1:2:1.

Tabela 3 - Marcadores RAPD e AFLP originados do progenitor SCA-6 segregando na proporção mendeliana esperada (3:1) e o valor de qui-quadrado significativo a  $P > 0,05$  ( $\chi^2 < 3,846$ )

<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
sAA11.880	2,400	0,12	sAU15.1540	0,883	0,34	sZ04.500	0,004	0,95
sAB01.950	0,600	0,43	sAU15.785	0,162	0,68	saaccag.106	0,146	0,70
sAB01.585	0,038	0,84	sAU17.960	1,067	0,30	saaccag.122	0,797	0,37
sAB04.1305	0,990	0,32	sAV10.1465	1,067	0,30	saaccag.89	0,797	0,37
sAB11.775	2,400	0,12	sAV11.1140	0,538	0,46	saaccat.177	2,637	0,10
sAB12.1750	1,027	0,31	sAV11.840	1,123	0,29	saagctc.200	1,385	0,24
sAB12.990	0,267	0,60	sAV14.940	0,105	0,74	saagctc.86	1,317	0,25
sAB12.350	0,267	0,60	sAV16.610	0,600	0,44	sacacac.113	0,016	0,89
sAC13.820	2,824	0,09	sAV18.980	0,342	0,55	sacacac.279	0,016	0,89
sAD17.1120	0,070	0,79	sAV18.590	0,427	0,51	sacacac.311	0,146	0,70
sAE06.2140	1,909	0,16	sAV20.1400	0,004	0,95	sacacac.78	0,797	0,37
sAE06.1710	1,909	0,16	sAX07.820	0,600	0,44	sacactc.97	0,004	0,95
sAE06.1430	1,909	0,16	sJ13.1490	0,838	0,36	sacactg.176	0,146	0,70
sAE06.585	1,563	0,21	sK08.700	0,524	0,47	sacactg.445	0,146	0,70
sAE13.805	0,684	0,40	sT02.500	2,070	0,15	saccctg.303	0,695	0,40
sAE18.1095	0,207	0,65	sT09.1530	0,004	0,95	saccctg.80	0,695	0,40
sAF06.585	2,782	0,09	sT1.900	0,838	0,36	sacgcag.138	0,037	0,84
sAF08.860	0,078	0,78	sT12.1320	0,040	0,84	sacgcag.710	1,067	0,30
sAF16.2315	0,000	0,99	sX18.1430	0,713	0,39	sacgcat.78	0,016	0,89
sAH01.960	0,713	0,40	sX18.1545	1,067	0,30	sactcac.150	1,486	0,22
sAH09.2100	0,450	0,50	sY18.800	0,538	0,46	sactcat.106	0,600	0,44
sAH18.1230	0,039	0,84	sY20.520	0,600	0,44	sactcat.133	0,267	0,60
sAI09.650	0,070	0,80	sZ03.2100	2,305	0,13	sactcat.202	0,600	0,44
sAI12.790	0,974	0,32	sZ06.470	1,960	0,16	sactcat.216	0,267	0,60
sAL04.410	0,202	0,65	sZ01.1440	1,251	0,26	sactcat.313	1,067	0,30
sAL04.2450	0,797	0,37	sZ01.2070	0,732	0,39	sactcat.355	0,713	0,39
sAL08.200	0,037	0,84	sZ10.1590	0,524	0,47	sactcat.80	0,600	0,44
sAN16.1410	1,523	0,21	sZ11.740	1,604	0,20	sactctc.278	0,202	0,65
sAN16.1100	1,967	0,16	sZ15.1140	0,816	0,36	sactctc.63	0,333	0,56
sAR10.760	0,017	0,89	sZ15.1365	0,370	0,54	sagccac.115	1,317	0,25
sAR15.1380	1,961	0,16	sZ15.600	0,230	0,63	sagccat.131	3,659	0,05
sAR16.715	0,427	0,51	sZ15.720	0,370	0,54	sagccat.151	1,317	0,25
sAR17.2040	0,281	0,59	sZ17.290	1,219	0,27	sagccat.210	1,189	0,27
sAS10.920	0,070	0,79	sZ19.640	1,909	0,17	sagccat.90	0,407	0,52
sAU05.980	1,067	0,30	sZ04.1355	0,632	0,42	sagccat.108	1,317	0,25

Tabela 4 - Marcadores RAPD e AFLP originados do progenitor ICS-1 segregando na proporção mendeliana esperada (3:1) e o valor de qui-quadrado significativo a  $P > 0,05$  ( $\chi^2 < 3,846$ )

<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Marcador</b>	<b>c<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
iAB09.464	1,067	0,30	iAL04.1040	0,333	0,56	iZ11.2490	3,630	0,05
iAB12.1435	0,267	0,60	iAL09.1210	0,713	0,39	iZ11.800	0,212	0,64
iAC01.695	1,357	0,24	iAL09.1340	0,524	0,46	iaaccag.108	0,407	0,52
iAC01.475	0,793	0,37	iAN16.1170	0,146	0,70	iaaccag.288	0,146	0,70
iAC05.1470	0,632	0,42	iAR04.710	0,732	0,39	iaaccat.130	0,333	0,56
iAC06.700	2,068	0,15	iAR17.390	0,105	0,74	iaagcac.248	0,067	0,79
iAC11.1890	2,889	0,08	iAS19.970	0,407	0,52	iaagcac.256	1,317	0,25
iAD16.870	0,667	0,41	iAU05.1170	0,267	0,60	iaagctc.198	2,232	0,13
iAD19.965	0,281	0,59	iAU15.475	0,004	0,94	iaagctc.65	0,600	0,43
iAE01.860	1,385	0,24	iAU17.505	0,038	0,84	iacacac.145	0,407	0,52
iAE06.950	0,004	0,95	iAV14.710	0,105	0,74	iacacac.281	0,407	0,52
iAE07.2140	0,018	0,89	iAV18.470	0,342	0,55	iacacac.93	0,016	0,89
iAE12.1170	0,018	0,89	iAV19.720	0,732	0,39	iacacta.283	0,926	0,33
iAE13.1505	0,277	0,59	iAV20.855	0,105	0,74	iacactg.113	0,016	0,89
iAF05.1405	0,268	0,60	iAW02.720	0,146	0,70	iacccta.221	1,067	0,30
iAF15.1370	0,182	0,67	iAX07.1020	0,267	0,60	iagcat.102	0,016	0,89
iAF15.900	0,020	0,88	iAX07.480	0,105	0,74	iactcac.149	0,342	0,55
iAH05.980	2,889	0,08	iAZ14.600	1,667	0,19	iactcac.219	1,317	0,25
iAH09.1500	0,360	0,54	iBB12.1100	0,038	0,84	iactcac.426	1,317	0,25
iAH13.1470	0,070	0,79	iBG09.580	0,004	0,94	iactcat.153	0,600	0,43
iAH14.925	0,207	0,64	iH03.1270	0,632	0,42	iactcat.65	0,067	0,79
iAH15.380	1,251	0,26	iJ18.540	0,111	0,73	iagccag.177	3,659	0,05
iAH18.850	0,524	0,46	iT02.2200	0,039	0,84	iagccat.105	1,815	0,17
iAI04.870	0,751	0,38	iT08.570	1,251	0,26	iagccat.82	0,016	0,89
iAI06.1820	0,632	0,42	iT1.1020	0,154	0,69	iagccat.85	1,967	0,16
iAI15.890	0,498	0,48	iT12.260	0,713	0,39	iaggcaa.86	0,016	0,89
iAI16.910	0,016	0,89	iX05.505	0,039	0,84	iaggcac.121	0,267	0,60
iAI17.1050	1,189	0,27	iY18.1150	1,284	0,25	iaggcac.149	1,317	0,25
iAL01.1090	0,146	0,70	iY20.800	1,219	0,26	iaggcag.263	3,267	0,07
iAL02.1100	0,797	0,37	iY20.970	0,267	0,60	iaggcat.119	0,797	0,37
iAL04.620	0,146	0,70	iZ06.470	0,004	0,94			

Tabela 5 - Marcadores RAPD e AFLP inicialmente presentes em ambos os progenitores segregando na proporção mendeliana esperada (3:1) e o valor de qui-quadrado significativo a  $P > 0,05$ . A posterior identificação da origem de cada marcador foi realizada segundo o procedimento descrito no item 3.5 de Material e Métodos

Marcador	$\chi^2$	$P$	Marcador	$\chi^2$	$P$	Marcador	$\chi^2$	$P$
sAB09.2083	0,427	0,51	iZ19.1140	0,017	0,89	sacacac.83	0,333	0,56
iAB12.1075	0,038	0,84	iaaccag.126	0,407	0,52	iacacta.198	1,667	0,19
iAI18.940	0,511	0,47	saacat.129	2,748	0,09	sacccta.287	0,016	0,89
iAI18.830	1,067	0,30	saagctc.264	2,637	0,10	sacgcag.133	1,317	0,25
iAZ12.845	0,004	0,94	sacacac.234	0,407	0,52	iactcac.167	0,797	0,37
sJ13.860	0,538	0,46	iacacac.261	0,016	0,89			
sX18.1090	0,524	0,46	sacacac.307	0,407	0,52			

Tabela 6 - Marcadores RAPD e AFLP originados dos progenitores SCA-6 e ICS-1 segregando na proporção mendeliana esperada (3:1) e o valor de qui-quadrado significativo entre os níveis de  $P < 0,05$  e  $P > 0,01$  ( $3,846 < \chi^2 < 6,635$ ), apresentando, portanto, desvio de segregação

Marcador	$\chi^2$	$P$	Marcador	$\chi^2$	$P$	Marcador	$\chi^2$	$P$
sAC10.585	4,940	0,026	sY16.1100	4,055	0,044	iY16.980	5,400	0,020
sAE06.1295	6,084	0,013	iAC11.930	4,940	0,025	iacacac.284	4,699	0,030
sAF16.2060	6,505	0,011	iAD01.1270	4,286	0,038	iacactg.168	5,870	0,015
sAW02.830	4,699	0,030	iAF16.1550	6,084	0,013	iacactg.171	4,699	0,030
sBG04.1180	5,634	0,018	iAR12.1015	4,055	0,044	iacactg.213	4,699	0,030
sT15.565	4,940	0,026	iAU8.700	4,267	0,038	iacccta.155	5,400	0,020
sT15.680	6,000	0,014	iI14.875	4,491	0,034	iactcat.179	4,940	0,026

#### 4.5. Construção do mapa de ligação genética

A primeira etapa do processo foi a definição dos parâmetros LOD e máxima frequência de recombinação ( $r$ ) para o agrupamento dos marcadores. Com os grupos definidos, foi determinada a ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação. O agrupamento dos 216 marcadores RAPD e AFLP que segregaram na proporção 3:1 a  $P > 0,05$  foi inicialmente testado com os valores de LOD de 3,0, 4,0 e 5,0, mantendo-se  $r = 0,30$ . Os resultados estão indicados na Tabela 7.

O valor de LOD é o logaritmo na base 10 da razão entre a hipótese de que os marcadores estejam ligados e a hipótese de que eles não estejam ligados. O limite convencional para esse critério é definido como  $LOD > 3,0$ , que corresponde a uma taxa de 1.000:1 a favor da ligação (LEWIN, 1994). Analisando os resultados obtidos na Tabela 7, verifica-se que  $LOD = 3,0$  é o valor que possibilitou a ligação de maior número de marcadores, produzindo um número de grupos de ligação que mais se aproxima do número haplóide de cromossomos em *Theobroma cacao* L., definido como  $n = 10$  (MUNOZ, 1948). No entanto, os grupos de ligação produzidos com  $LOD = 3,0$  são bastante desuniformes, contendo entre 2 e 69 marcadores, gerando, portanto, grupos grandes, o que não retrata a realidade de um grupo de ligação genético. O valor de  $LOD = 5,0$ , apesar de ser o que melhor assegura a existência de ligação entre dois marcadores (100.000:1 a favor da ligação), foi o que apresentou o maior número de grupos de ligação e de marcadores não-ligados, com grupos contendo pequeno número de marcadores. Assim, foi adotado o valor de  $LOD = 4,0$  e de  $r = 0,30$  para a construção do mapa genético do cacauzeiro, por apresentar distribuição mais homogênea dos marcadores entre os grupos de ligação. A melhor ordem dos marcadores dentro dos grupos de ligação foi estabelecida por análises multipontos, utilizando o programa MAPMAKER/EXP 3.0.

Tabela 7 - Agrupamento dos marcadores com máxima frequência de recombinação de 0,30 e diferentes valores de LOD

<b>LOD</b>	<b>Marcadores ligados</b>	<b>Marcadores não-ligados</b>	<b>Grupos de ligação</b>	<b>Variação do número de marcadores nos grupos</b>
3,0	202	14	15	2-68
4,0	196	20	26	2-25
5,0	186	30	29	2-18

Segundo BECKMAN e SOLLER (1983), o número de marcadores (N) necessário para a construção de um mapa de ligação cobrindo todo o genoma é dado pela seguinte relação:

$$N = \frac{\log(1 - P)}{\log(1 - (2c/k))}$$

em que

P: proporção do genoma coberto pelos marcadores;

c: distância em centiMorgans (cM) entre os marcadores; e

k: comprimento do mapa em cM.

CROUZILLAT et al. (1996) estimaram o comprimento do mapa (k) para *Theobroma cacao* L. pelo método descrito por HULBERT et. al. (1988) e obtiveram uma distância de 1.098 cM para o valor de LOD de 4,0. Desse modo, 80 marcadores seriam necessários para cobrir uma proporção de 95% do genoma, com uma distância de 20 cM entre marcadores adjacentes para aumentar as chances de determinar QTLs. Para um espaçamento de 10 cM, seria necessário um total de 162 marcadores. No presente trabalho, entretanto, foram mapeados 124 marcadores nos 10 maiores grupos de ligação, cobrindo uma distância de 1.287 cM, com 52% dos intervalos correspondendo a valores menores que 10cM.

Os 196 marcadores, sendo 127 marcadores RAPD e 69 marcadores AFLP, foram mapeados em 26 grupos de ligação, segundo os parâmetros de LOD e de máxima frequência de recombinação anteriormente mencionados. Esses marcadores cobriram uma distância de recombinação total de 1.733 cM. Os 26 grupos de ligação variaram em tamanho (de 0,1 a 164,4 cM) e o número de unidades de mapa por cromossomo está altamente correlacionado com o número de marcadores por grupo de ligação ( $R^2 = 0,92$ ), indicando que os locos se encontram distribuídos aleatoriamente ao longo dos grupos de ligação. A distribuição dos intervalos (cM) entre dois marcadores adjacentes variou entre 0 e 32,8 cM, com média de 8,84 cM. A maioria dos intervalos (93%) corresponde a intervalos menores que 20 cM. Na Figura 5, os 26 grupos de ligação foram ordenados em ordem decrescente de tamanho, em centiMorgans.

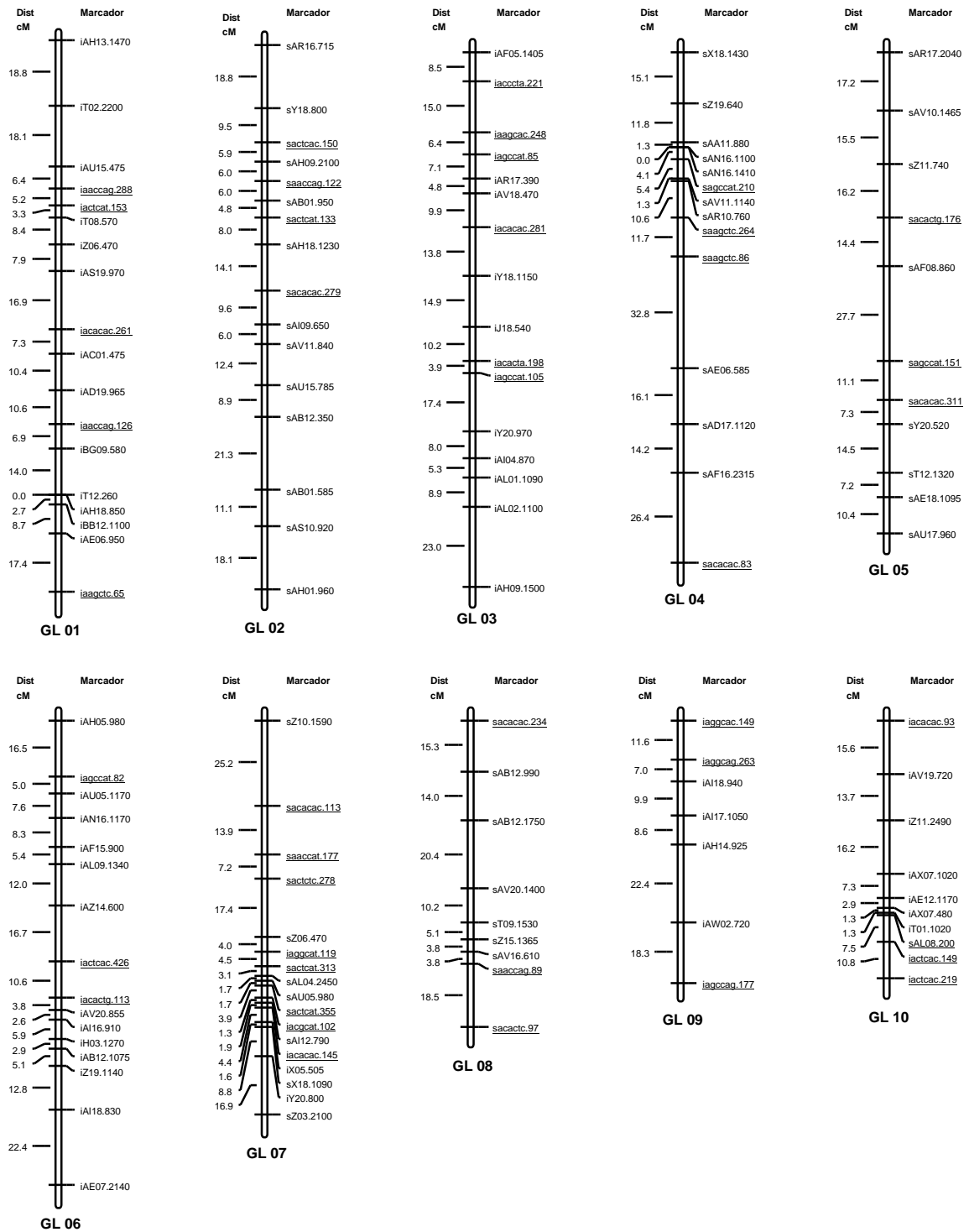


Figura 5 - Mapa genético de *Theobroma cacao* L. construído com LOD = 4 e máxima frequência de recombinação = 0,30. Os 196 marcadores estão distribuídos ao longo dos 26 grupos de ligação que se encontram dispostos em ordem decrescente de comprimento, em centimorgans. Os marcadores estão indicados no lado direito de cada grupo, e as distâncias em cM, calculadas pela função de Kosambi, no lado esquerdo de cada grupo. Os marcadores RAPD estão apresentados por letras maiúsculas, e os marcadores AFLP, sublinhados.

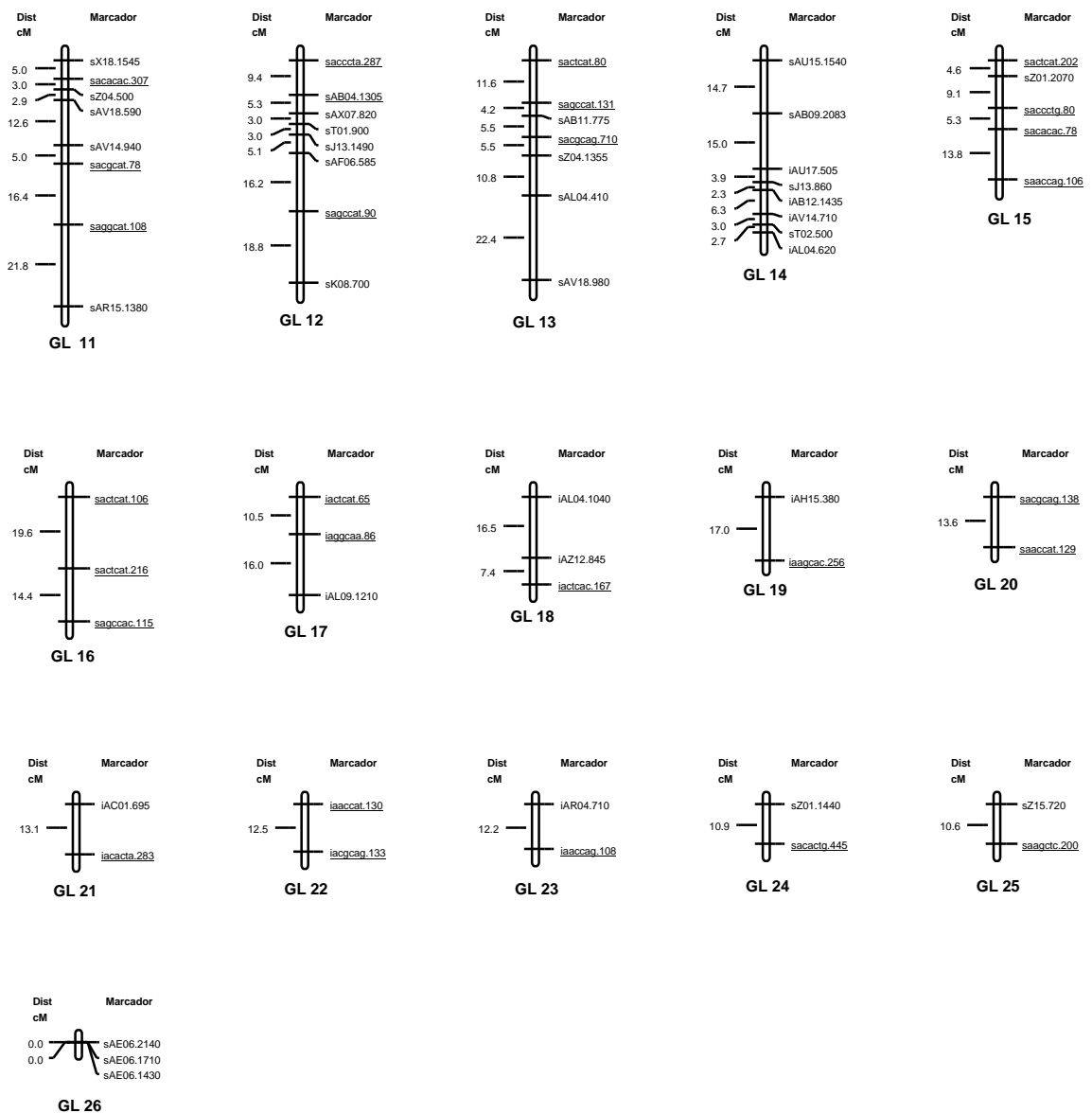


Figura 5, Cont.

Os mapas de ligação são baseados na frequência de recombinação entre dois marcadores adjacentes, apresentando normalmente variações no tamanho e no comprimento dos grupos de ligação de acordo com o nível de saturação do mapa e com a natureza dos marcadores utilizados no mapeamento. A diferença observada entre o número de grupos de ligação obtidos (26 grupos) e o número de cromossomos da espécie ( $n = 10$ ) pode ser explicada pelo nível de saturação do mapa. Nos 10 maiores grupos de ligação encontra-se mapeada a maior parte dos marcadores (63%), e os demais marcadores distribuíram-se em 16 grupos de ligação, contendo entre oito e dois marcadores cada. Neste trabalho, foram mapeados 1.733 cM ao longo dos 26 grupos de ligação com marcadores de natureza exclusivamente dominante. Em trabalhos recentes de mapeamento em *T. cacao* L., CROUZILLAT et al. (1996) obtiveram 10 grupos de ligação mapeando 138 marcadores, que cobriram um total de 1.068 cM, utilizando 23% de marcadores de natureza co-dominante. Entretanto, LANAUD et al. (1995) cobriram 759 cM com 193 marcadores mapeados em 10 grupos de ligação, e 83% dos marcadores foram sondas RFLP. Em soja, SHOEMAKER e OLSON (1993) cobriram uma distância de quase 3.000 cM em 20 grupos de ligação com 490 marcadores; LARK et al. (1993) geraram 31 grupos de ligação, cobrindo cerca de 1.550 cM; e KEIM et al. (1997) empregaram 840 marcadores, que abrangeram 3.441 cM em 28 grupos de ligação.

Pode ser observada alta densidade de marcadores RAPD e AFLP em determinadas regiões de alguns grupos de ligação, como é o caso do GL 07 (Figura 5). Uma possível explicação para a concentração dos marcadores em determinadas regiões do cromossomo seria a reduzida taxa de recombinação que ocorre nas regiões próximas ao centrômero ou em grandes blocos de heterocromatina. Portanto, as regiões de elevada densidade de marcadores podem corresponder ao centrômero ou às regiões de heterocromatina.

Dos 21 marcadores que apresentaram desvios de segregação, oito foram mapeados em quatro grupos de ligação, e quatro marcadores (i14.875, iactg.168, iactg.171 e iactcat.179) promoveram a união dos grupos GL 01, GL 02 e GL 10 e de alguns outros marcadores não-ligados. Tais marcadores, no

entanto, não foram considerados para análise em virtude da desuniformidade gerada entre os grupos de ligação. O grupo resultante passou a alojar 56 marcadores em 497,6 cM, o que corresponde a 28,7% (497,6/1.733) de todo o genoma mapeado. A presença dos demais marcadores que desviaram da segregação mendeliana produziu apenas pequenas modificações nos grupos. O marcador sT15.680 foi alocado no interior do grupo GL 03 e o seu tamanho diminuiu de 159 para 156,8 cM. Já os marcadores iacccta.155, iY16.980 foram mapeados no grupo GL 09 e o sY16.1100 no GL 13, produzindo rearranjo na ordem dos marcadores localizados nas extremidades e alteração no tamanho dos grupos (Figura 6).

A utilização de marcadores com desvio de segregação pode alterar a construção dos grupos de ligação, uma vez que os programas utilizados para calcular a frequência de recombinação levam em consideração a segregação 3:1. Marcadores com desvio de segregação podem aumentar a probabilidade do erro tipo I, ou seja, assumir como verdadeira uma associação entre dois locos quando ela não existe. Por este motivo, optou-se por não utilizar tais marcadores.

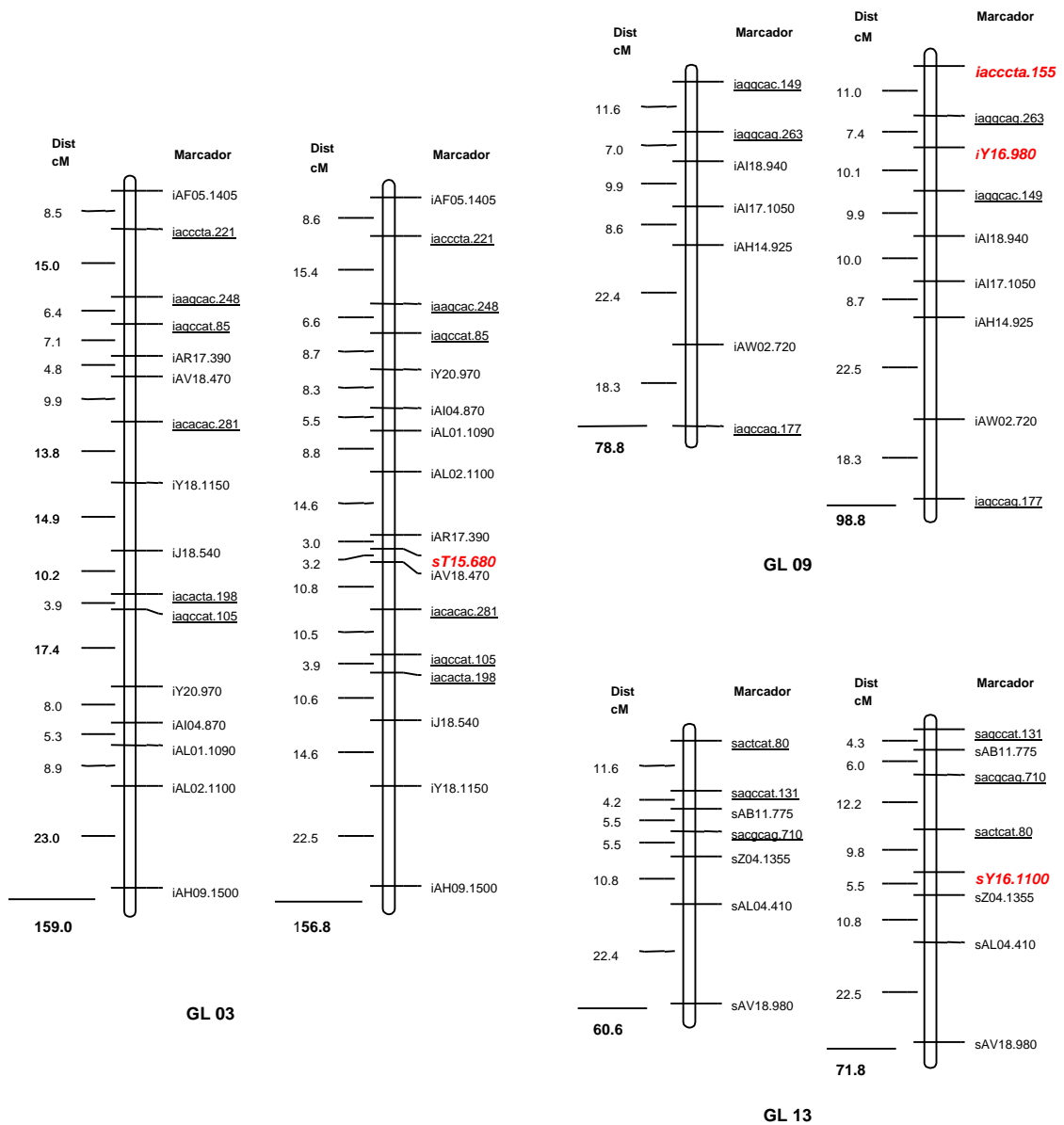


Figura 6 - Distribuição dos marcadores com desvio de segregação nos grupos de ligação e as modificações ocorridas em cada grupo. À esquerda encontram-se os grupos-padrões e à direita os grupos em que os marcadores foram mapeados. Em vermelho, encontram-se representados os marcadores com desvio de segregação.

#### 4.6. Identificação de QTLs utilizando marcadores moleculares

No presente trabalho, o mapa construído com uma população segregante  $F_2$  apresenta uma distância média de 8,84 cM entre marcadores, e 93% dos intervalos correspondem a intervalos menores que 20 cM, favorecendo, portanto, o mapeamento de locos associados a caracteres quantitativos. A capacidade de detectar associações entre marcadores e QTL depende, em grande parte, da magnitude dos seus efeitos, da estrutura e do tamanho da população de mapeamento e do nível de saturação do genoma com marcadores moleculares. Segundo PATERSON (1996), QTLs podem ser encontrados em intervalos que variam de 10 a 30 cM entre dois marcadores adjacentes, e as duas principais populações empregadas com a finalidade de mapeamento de poligenes são RILs e  $F_2$ . A população  $F_2$  apresenta a vantagem de poder ser utilizada para estimar o modo de ação gênica e para testar interações complexas entre locos.

A análise de variância usando cada marcador como tratamento foi utilizada para testar associações entre os marcadores e valores do fenótipo, revelando a existência de associações significativas entre marcadores e a variação na intensidade de infecção para vassoura-de-bruxa em 2,78% das comparações (Tabela 8). Foi detectado um total de seis marcadores associados, com probabilidade  $P < 0,01$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 8,4%, para o loco iacacac.261, e 12,7%, para o loco sacgcat.78. Dentre as associações significativas ( $P < 0,01$ ), 33,3% (2/6) explicaram entre 8,0 e 10,0% da variância fenotípica da característica, e as demais associações (4/6) apresentaram valores entre 11,0 e 12,7%. O grande número de QTLs encontrado está relacionado com a herança da característica avaliada. O caráter de resistência à vassoura-de-bruxa é controlado por vários genes, caracterizando uma herança quantitativa (PIRES et al., 1996). A Figura 7 representa os grupos de ligação contendo os marcadores associados com a resistência à vassoura-de-bruxa e a proporção da variância fenotípica explicada por marcador.

Tabela 8 - Associação entre os marcadores e o número médio de vassouras-de-bruxa por planta detectada por meio da regressão simples, utilizando o limite de significância de  $P < 0,01$

Marcador	GL <sup>a</sup>	F	P	R <sup>2</sup> (%)	Efeito $\pm$ s
iAE06.950	01	11,08	0,0014	12,1	- 3,69 $\pm$ 1,11
iacacac.261	01	7,29	0,0085	8,4	- 2,96 $\pm$ 1,10
sagcat.108	11	10,98	0,0014	12,2	- 3,85 $\pm$ 1,16
sacgcat.78	11	11,46	0,0011	12,7	- 3,62 $\pm$ 1,07
sAV14.940	11	10,18	0,0021	11,5	- 3,35 $\pm$ 1,05
iAB09.464	NL <sup>b</sup>	8,69	0,0042	9,9	3,47 $\pm$ 1,18

<sup>a</sup> - grupo de ligação.

<sup>b</sup> - não-ligado.

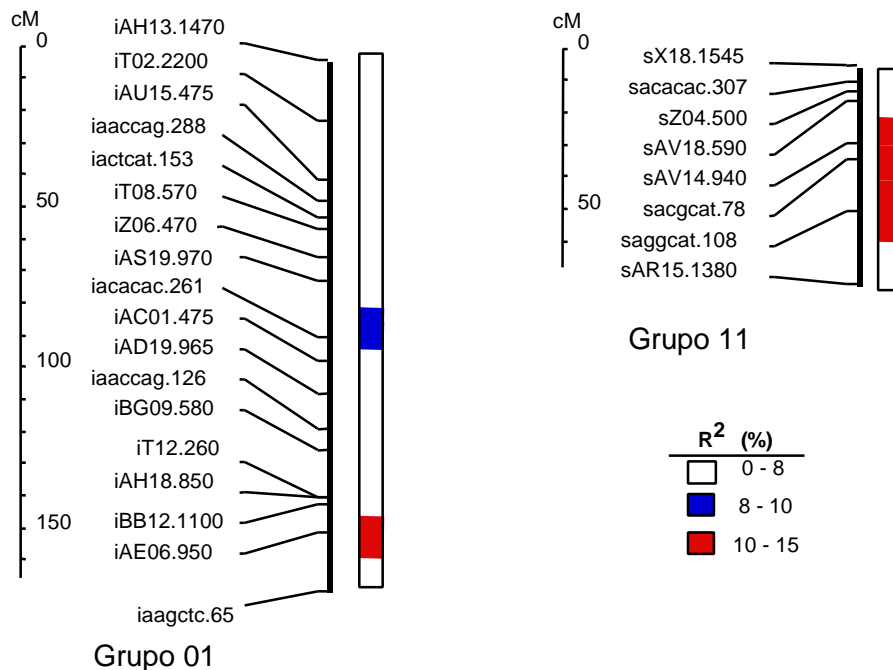


Figura 7 - Representação dos marcadores que se mostraram associados com a resistência à vassoura-de-bruxa pela análise de variância, em seus respectivos grupos de ligação. A proporção fenotípica explicada por cada um encontra-se indicada em termos de R<sup>2</sup> (%).

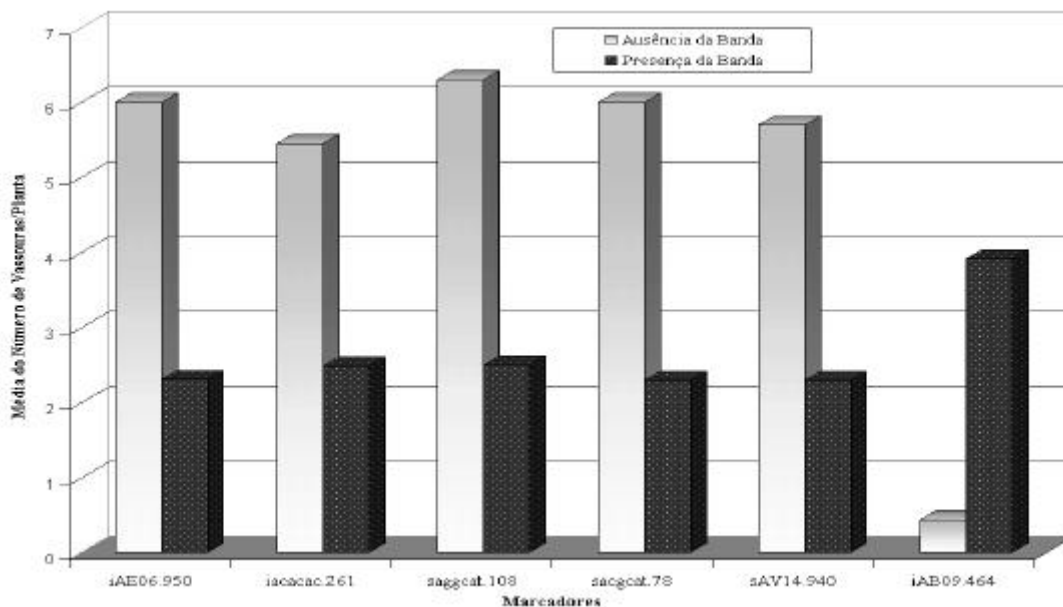


Figura 8 - Valores médios do número de vassouras/planta para cada genótipo dos marcadores que se apresentaram associados com o fenótipo pela análise de variância.

A Figura 8 apresenta a média dos genótipos para cada marcador que se apresentou associado com o fenótipo pela análise de variância. Dos seis marcadores apresentados no gráfico, três são provenientes do progenitor ICS-1 (susceptível) e os três restantes originados do progenitor Scavina-6 (resistente). O marcador iAB09.464 encontra-se ligado em trans ao(s) gene(s) de resistência, pois a média do número de vassouras/planta dos indivíduos que possuem a banda (genótipos: AA ou Aa) é superior ao valor médio dos indivíduos que não a possuem (genótipo: aa). Os marcadores sagcat.108, sacgat.78 e sAV14.940 encontram-se ligados em cis ao(s) gene(s) de resistência, uma vez que a média do número de vassouras/planta dos indivíduos que possuem a banda é inferior ao valor médio observado nos indivíduos que não a possuem. No primeiro caso, a banda marca a susceptibilidade e a sua presença causa efeito positivo na média dos valores fenotípicos (Tabela 8), pois os indivíduos que possuem a banda apresentam média superior. O efeito representa a diferença entre os valores de média dos indivíduos que possuem e os dos que não possuem a banda. No

segundo caso, a banda marca a resistência, uma vez que a presença da banda reduz o número de vassouras por planta, sendo o efeito negativo. Já os marcadores iAE06.950 e iacacac.261, apesar de oriundos do progenitor susceptível, encontram-se ligados em cis com o(s) gene(s) de resistência. Dessa forma, a presença da banda está associada com redução na média do número de vassouras/planta, o que indica que o progenitor ICS-1, embora não expresse a resistência, possui alelos favoráveis. Tal resultado é coerente com o observado em experimento realizado pela CEPLAC - ESJOH/PA, envolvendo os genótipos SCA-6 e ICS-1. Foi constatado que a tolerância à vassoura-de-bruxa no híbrido ( $F_1$ ) mostrou-se superior à observada no próprio SCA-6, genitor resistente (Silva e Mota, comunicação pessoal), indicando, portanto, que os alelos do progenitor susceptível são importantes para a expressão da resistência.

O fenótipo dos genitores nem sempre reflete os alelos que eles possuem e que são transmitidos à sua descendência. GUIMARÃES (1999) detectou alelos que contribuem para o aumento da média de vários caracteres agronômicos em cana-de-açúcar, advindos do progenitor com média inferior, e vice-versa. As contribuições de QTLs complementares advindos de ambos os progenitores foram também observadas na identificação de QTLs para caracteres agronômicos em arroz (XIAO et al., 1996). Com isso, abrem-se as possibilidades de se utilizarem informações de marcadores moleculares para acessar alelos favoráveis que estão mascarados nos genótipos que não expressam a característica, o que não seria possível sem o auxílio dos marcadores. Assim, os marcadores moleculares constituem uma importante estratégia para acelerar e aumentar os ganhos de seleção no melhoramento de características quantitativas, como a resistência à vassoura-de-bruxa.

Os seis marcadores significativamente ( $P < 0,01$ ) associados à variação fenotípica foram avaliados simultaneamente, utilizando o procedimento de regressão múltipla (Tabela 9). Dos seis marcadores, somente três foram mantidos no modelo de regressão múltipla que utilizou o método de eliminação *stepwise*, sendo os demais eliminados pelo teste F, a 5% de significância. A permanência

Tabela 9 - Associação entre marcadores e fenótipo detectada por meio da regressão múltipla, utilizando o limite de significância de  $P < 0,05$  e método de eliminação *stepwise*

<b>Marcador</b>	<b>GL<sup>a</sup></b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>R<sup>2</sup>(%)*</b>	<b>R<sup>2</sup>(%) conjunto</b>
iAE06.950	01	8,55	0,0046	12,1	27,8
sagcat.108	11	6,26	0,0146	12,2	
iAB09.464	NL <sup>b</sup>	6,47	0,0131	9,9	

\*- regressão simples.

<sup>a</sup> - grupo de ligação.

<sup>b</sup> - não-ligado.

dos três marcadores iAE06.950, sagcat.108 e iAB09.464 no modelo de regressão múltipla pode ser um indicativo de que os demais marcadores foram eliminados por estarem flanqueando os mesmos QTLs. A eliminação de marcadores ligados próximos em um mesmo grupo de ligação é esperada, uma vez que estes possuem elevada correlação entre si, comportando-se como uma mesma variável. As informações do mapa de ligação confirmaram o posicionamento dos marcadores iAE06.950 e iacacac.261 no GL01, sendo o segundo deles de menor efeito na característica e eliminado do modelo de regressão múltipla (Tabela 8). Da mesma forma, os marcadores sagcat.108, sacgcat.78 e sAV14.940 também estavam mapeados no GL11, sendo mantido apenas o marcador sagcat.108, o qual apresenta maior efeito na média dos valores fenotípicos. O terceiro marcador que se manteve no modelo de regressão múltipla não se apresentou ligado no mapa genético, estando, conseqüentemente, pouco correlacionado com os demais marcadores (Tabela 8).

Com base nas análises de regressão simples e múltipla, sugere-se que há pelo menos três regiões genômicas influenciando a característica resistência à vassoura-de-bruxa e que os três QTLs explicam um total de 27,8% da variação fenotípica da característica (Tabela 9).

#### 4.7. Mapeamento de QTLs

Os modelos lineares simples, como ANOVA e regressão linear, são métodos que não necessitam das informações dos mapas de ligação, analisando a distribuição dos valores fenotípicos para cada marcador separadamente. Portanto, por utilizarem apenas diferenças entre as médias dos marcadores, não é possível estimar a magnitude do efeito do QTL nem a sua posição no genoma (LYNCH e WALSH, 1997). Desse modo, foi utilizado o método de mapeamento por intervalo (LANDER e BOTSTEIN, 1989), no intuito de aumentar o poder de detecção de QTLs e de melhorar a precisão das estimativas do efeito e da posição destes. Este método baseia-se nas informações da segregação de pares de marcadores adjacentes como unidades de análise. Entretanto, o grande número de testes realizados para detectar associações dos marcadores com os fenótipos gera dificuldades para serem estabelecidos níveis de significância estatística para os testes de hipótese, podendo ocasionar a identificação de falsos QTLs. Assim, DOERGE e CHURCHILL (1996) estabeleceram uma metodologia para a determinação de níveis de significância, utilizando testes não-paramétricos baseados na permutação ao acaso dos dados fenotípicos, em relação aos dados moleculares.

Para determinação dos níveis de significância para o mapeamento por intervalo, foram realizados testes não-paramétricos, utilizando 1.000 permutações ao acaso dos dados fenotípicos, contra os marcadores presentes em cada grupo de ligação, individualmente. Foram obtidos valores de F de 3,84 e 6,75 para o GL 01 e F de 3,84 e 6,46 para o GL 11, para  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. Considerando todos os marcadores mapeados no genoma, foram obtidos valores de F de 3,86 e 6,74. Como os valores de F estiveram próximos, foram utilizados no mapeamento por intervalo os limites de significância não-paramétricos, considerando todos os marcadores mapeados no genoma. Todas as análises estatísticas envolvidas no mapeamento por intervalo e os testes de permutação foram realizados por meio do programa Qgene (NELSON, 1997).

A Figura 9 representa o mapeamento por intervalo nos grupos de ligação 01 e 11, indicando a posição mais provável dos QTLs ao longo de cada grupo de ligação. No GL 01 foram identificados três QTLs associados à resistência a vassoura-de-bruxa, a 5% de probabilidade, entre os marcadores iaagctc.65 e iBB12.1100, iAH18.850 e iBG09.580, iAC01.475 e iAS19.970. O GL 11 apresentou dois QTLs altamente significativos ( $P < 0,01$ ) associados ao caráter, entre os marcadores saggcat.108 e sAV14.940, sAV18.590 e sZ04.500.

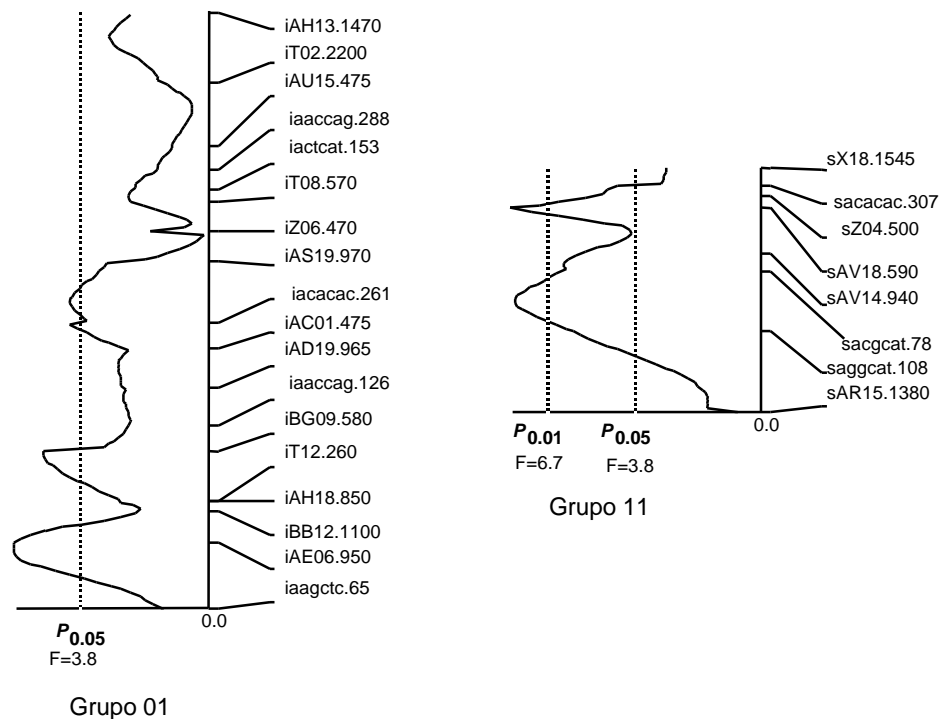


Figura 9 - Mapeamento por intervalo, indicando a presença de QTLs para o número de vassouras-de-bruxa nos grupos de ligação 01 e 11. A curva representa os valores de F calculados para cada cM do grupo de ligação. Os limites de significância ( $P_{0,01}$  e  $P_{0,05}$ ) foram determinados por meio de permutações dos dados fenotípicos, utilizando a informação de todo genoma (DOERGE e CHURCHILL, 1996).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), da família Sterculiaceae, é a única espécie economicamente importante entre as espécies que constituem o gênero, sendo a gordura extraída de suas sementes utilizada na produção de chocolate, cosméticos e produtos farmacêuticos. As variedades comerciais possuem estreita base genética e são susceptíveis a várias doenças, sendo a vassoura-de-bruxa um dos principais problemas atuais da cultura. O melhoramento genético do cacauieiro por meio dos métodos tradicionais é, via de regra, lento, devido ao longo tempo de geração da cultura, entre três e quatro anos. Assim, a utilização de marcadores moleculares para auxiliar o processo de seleção no melhoramento genético de espécies perenes torna-se extremamente atraente, com a perspectiva de tornar mais eficiente a seleção precoce e, com isso, aumentar o ganho genético por unidade de tempo. O mapeamento genético possibilita a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de interesse econômico, a quantificação do efeito destas regiões no caráter estudado e a clonagem de genes, constituindo uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos a construção de um mapa genético baseado em marcadores RAPD e AFLP para o cacauieiro e a identificação de regiões

genômicas associadas com a resistência à vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso*.

Uma progênie de 82 indivíduos  $F_2$ , obtidos do cruzamento entre Scavina-6 e ICS-1, foi utilizada para o mapeamento genético e de QTLs. O mapa de ligação de *Theobroma cacao* L. foi construído com 216 marcadores, entre RAPD e AFLP, e apenas 196 marcadores (127 RAPDs e 69 AFLPs) foram mapeados ao longo de 26 grupos de ligação, utilizando LOD de 4,0 e máxima frequência de recombinação de 0,3. O mapa genético cobriu uma distância de recombinação total de 1.733 cM, e os grupos de ligação variaram, em tamanho, de 0,1 a 164,4cM. A distribuição dos intervalos entre dois marcadores adjacentes variou entre 0 e 32,8 cM, com média de 8,84 cM, e a maioria dos intervalos (93%) correspondeu a intervalos menores que 20 cM.

Análises de regressão simples e múltipla e mapeamento por intervalo foram utilizados para detectar e mapear regiões genômicas associadas com a resistência à vassoura-de-bruxa. A análise de variância revelou a existência de associações significativas para seis marcadores ( $P < 0,01$ ). Os valores de  $R^2$  variaram entre 8,4%, para o loco iacacac.261, e 12,7%, para o loco sagcat.78. Dentre as associações significativas ( $P < 0,01$ ), duas explicaram entre 8,0 e 10,0% da variância fenotípica da característica e quatro apresentaram valores entre 11,0 e 12,7%. O grande número de QTLs encontrado está relacionado com a herança da característica avaliada. O caráter de resistência à vassoura-de-bruxa é controlado por vários genes, caracterizando uma herança quantitativa (PIRES et al., 1996). Os seis marcadores detectados por meio da regressão simples foram avaliados simultaneamente, utilizando o procedimento de regressão múltipla, permanecendo no modelo os marcadores iAE06.950, sagcat.108 e iAB09.464, a 5% de significância. Os três marcadores identificados explicaram juntos 27,8% da variação fenotípica, revelando a existência de possível efeito epistático entre eles.

Dos três marcadores detectados pelos modelos de regressão múltipla, o marcador sagcat.108 é originado do progenitor resistente (Scavina-6) e encontra-se ligado em cis ao fator de resistência. No entanto, o marcador

iAE06.950, apesar de oriundo do progenitor susceptível (ICS-1), encontra-se ligado em cis com o fator de resistência, indicando que o progenitor ICS-1, embora não expresse a resistência, também possui alelos favoráveis para a característica avaliada.

Por meio do mapeamento por intervalo, foram identificadas associações significativas a 5% de probabilidade nos grupos de ligação 01 e 11. No GL 01 foram identificadas três regiões, entre os marcadores iaagctc.65 e iBB12.1100, iAH18.850 e iBG09.580, iAC01.475 e iAS19.970. O GL 11 apresentou duas regiões altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre os marcadores saggcat.108 e sAV14.940, sAV18.590 e sZ04.500. Foi identificado um total de cinco QTLs associados com a variação do fenótipo. Os marcadores identificados pela análise de regressão múltipla também o foram pelo mapeamento por intervalo, com exceção do marcador iAB09.464, que não se encontra ligado a nenhum grupo de ligação.

No entanto, o mapeamento por intervalo permitiu a detecção de duas outras regiões significativamente associadas que não haviam sido detectadas pelas análises de regressão, pelo fato destas regiões não estarem saturadas com marcadores. Daí a importância de implementar análises mais detalhadas e precisas, como o mapeamento por intervalo, que, ao analisar cada centiMorgan do genoma mapeado, permite a detecção de QTLs mesmo em regiões pouco saturadas por marcadores. Como a metodologia de identificação de QTLs também envolve grande número de testes estatísticos, são elevadas as chances de serem encontrados falsos QTLs. Assim, a confirmação dos QTLs identificados por diferentes metodologias de análise aumenta significativamente a confiabilidade e a precisão dos resultados apresentados.

Sendo assim, as análises de regressão são também muito úteis, por permitirem a avaliação dos marcadores não-ligados. A detecção de um marcador não-ligado associado à característica fenotípica sugere que outra região genômica pode estar influenciando a resistência à vassoura-de-bruxa. Dessa forma, existe a necessidade de aumentar a saturação do mapa genético do cacaueiro e, conseqüentemente, a precisão da detecção de QTLs de interesse.

Conforme mencionado, toda a análise foi realizada com dados preliminares de resistência à vassoura-de-bruxa. Entretanto, avaliações fenotípicas mais precisas estão sendo realizadas pela CEPLAC/CEPEC, na Bahia. Estes novos dados possibilitarão a confirmação dos resultados apresentados neste trabalho e permitirão o mapeamento de regiões associadas a outros caracteres, uma vez que os progenitores utilizados para a obtenção da população de mapeamento apresentam, ainda, outras características desejáveis em programas de melhoramento. O clone Scavina-6, utilizado como fonte de genes de resistência à vassoura-de-bruxa, apresenta alto teor de gordura, e o clone ICS-1 possui semente e fruto de tamanho médio, alta dureza da gordura e alta produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, W.M. Chemical & phytosanitation control of witches' broom for cocoa. In: CURRENT KNOWLEDGE AND PROGRAMS ON WITCHES' BROOM CONTROL, 1, 1997, Miami, FO. **Proceedings...** ACRI: CAOBISCO & IOCCC, 1997. p.120-128.
- AL-JANABI, S.M., HONEYCUTT, R.J., McCLELLAND, M., SOBRAL, B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics**, v.134, n.02, p. 1249-1260, 1993.
- ALZATE-MARIN, A.L. **Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 95p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- ANDEBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 9, 1985, Douala, CA. **Proceedings...** Hertford: Stephen Austin and Sons, 1985. p. 395-402.
- BACHMANN, K. Molecular markers in plant ecology. **New Phytol.**, v.126, n.02, p.403-418, 1994.

- BASTOS, C.N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. In: BETTIOL, W. **Controle de doenças de plantas**. São Paulo:EMBRAPA/CNDDA, 1991. p.320-348.
- BECKMAN, J.S., SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.**, v.67,n.01, p.35-43, 1983.
- BEKELE, F., BEKELE, I. A sampling of the genetic diversity of cacao in the international cocoa gene bank of Trinidad. **Crop Sci.**, v.36, n.01, p.57-64, 1996.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 547p.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.32, n.01, p.314-331, 1980.
- BUEHLER, R.E., McDONALD, M.B., MARTIN, S.K.S. Soybean cultivar identification using high performance liquid chromatography of seed proteins. **Crop Sci.**, v.29, n.01, p.32-37, 1989.
- CARVALHO, G.A. **Marcadores RAPD ligados a genes de resistência ao cancro da haste da soja**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 43p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- CIFUENTES, C., PRIETO, E., TOVAR, G. Evaluation of four systemic fungicides for the control of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, in Guamal, Colombia. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8, 1981, Cartagena, CO. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1981. p.545-550.
- CORRÊA, R.X. **Mapeamento genético da soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) utilizando marcadores RAPD**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

- COUCH, A.J., ZINTEL, H.A., FRITZ, P.J. The genome of the tropical tree *Theobroma cacao* L. **Mol. Gen. Genet.**, v.237, n.01, p.123-128, 1993.
- 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. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, n.02, p.205-214, 1996.
- DIERS, B.W., MANSUR, L., IMSANDE, J., SHOEMAKER, R.C. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Sci.**, v.33, n.02, p.377-383, 1992.
- DOERGE, R. W., CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, n.02, p.285-294, 1996.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.01, 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, n.02, p.113-125. 1987.
- EVANS, H.C., PRIOR, C. Cocoa pod diseases: casual agents and central. **Outlook. Agric.**, v.16, n.01, p.35-41, 1987.
- EVANS, H.C., BASTOS, C.N. Preliminary results of research on witches' broom disease of cacao *Crinipellis pernicioso* in the amazonian region of Brazil. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 7, 1979, Douala, CA. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1981. p.255-256.
- FIGUEIRA, A., JANICK, J., GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.117, n.04, p.673-677, 1992.

- FIGUEIRA, A., JANICK, J., YADAV, M., BeMILLER, J.N. Cacao gum: a new potential economic product. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 11, 1991, Kuala Lumpur, MA. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1991. p.120-122.
- FLAVELL, R.B. The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.31, p.569-596, 1980.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (Documento, 20).
- GALE, M.D., CHAO, S., SHARP, P.J. RFLP mapping in wheat - progress and problems. In: GUSTAFSON, J.P. **Gene manipulation in plant improvement.** New York, NY: Plenum, 1990. v.2, p.353-364.
- GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHABEL, U., WALKEMEIER, B., UHRIG, H., SAALAMINI, F. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theor. Appl. Genet.**, v.78, n.01, p.65-75, 1989.
- GLICENSTEIN, L.J., FRITZ, P.J. Ploidy level in *Theobroma cacao* L. **J. Hered.**, v.80, n.03, p.464-467, 1989.
- GOLDBERG, R.B. DNA sequence organization in the soybean plant. **Biochem. Genet.**, v.16, n.01, p.45-68, 1978.
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.39, n.03, p.439-446, 1974.
- GUIMARÃES, C.T., MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, MG: UFV, 1999. p.715-740.

- GUIMARÃES, C.T. **Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 70p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos. **Pesq. Agric. Bras.**, v.17, n.2, p.281-286, 1982.
- HU, J., QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivar with RAPD markers. **Plant Cell Rep.**, v.10, n.03, p.505-511, 1991.
- HULBERT, S.H., ILLOTT, T.W., LEGG, E.J., LINCOLN, S.E., LANDER, E.S., MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, v.120, n.04, p.947-958, 1988.
- HUNTER, J.R. The status of cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae) in the western hemisphere. **Econ. Bot.**, v.44, n.02, p.425-439, 1990.
- KEIM, P., SCHUPP, J.M., TRAVIS, S.E., CLAYTON, K., FERREIRA, A., WEBB, D.M. A high-density soybean genetic map based upon AFLP markers. **Crop Sci.**, v.37, n.2, p. 537-543, 1997.
- KEIM, P., DIERS, B.W., OLSON, T.C., SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, v.126, n.03, p.735-742, 1990.
- KEIM, P., SHOEMAKER, R.C., PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v.77, n.04, p.786-792, 1989.
- KIANIAN, S.F., QUIROS, C.F. Generation of a *Brassica oleraceae* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, n.03, p.544-554, 1992.

- KISS, G.B., CSANÁDI, G., KÁLMÁN, K., KALÓ, P., OKRÉSZ, L. Construction of a basic genetic map for alfafa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. **Mol. Gen. Genet.**, v.238, n.01, p.129-137, 1993.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.**, v.12, n.01, p.172-175, 1944.
- LADIZINSKY, G., HYMOWITZ, T. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. **Theor. Appl. Genet.**, v.54, n.01, p.145-151, 1979.
- LARK, K.G., WEISEMANN, J.F., MATTHEWS, B.F., PALMER, R., CHASE, K., MACALMA, T. A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minsoy and Noir 1'. **Theor. Appl. Genet.**, v.86, n.3, p.901-906, 1993.
- LAKER, H.A., HUDGARD, S.A. A review of the research on chemical control of witches' broom disease of cocoa. **Cocoa Grow. Bull.**, v.42, n.01, p.12-24, 1989.
- LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M., LANAUD, C. RFLP study of genetic diversity of *Theobroma cacao*. **Angew. Bot.**, v.68, n.01, p.36-39, 1994.
- 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. **Theor. Appl. Genet.**, v.91, n.04, p.987-993, 1995.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** v.121, n.01, p.185-199, 1989.
- LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M. J., LINCOLN, S. E., NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, n.01, p.174-181, 1987.
- LEWIN, B. **Genes V**. New York: Oxford University Press, 1994. 950 p.

- LINCOLN, S., DALY, M., LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0**. 3. ed. [S.e.]: Whitehead Institute, Technical Report, 1992. 105 p.
- LYNCH, M., WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 990p.
- MACHADO, M.A. **Integração de mapas, mapeamento de QTLs e análise da diversidade genética em soja utilizando marcadores AFLP**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K., TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v.88, n.04 p.2336-2340, 1991.
- MARTINSON, V.A. Cytological studies of diploid and tetraploid *Theobroma cacao*. **Genetica**, v.4, n.01, p.341-348, 1975.
- MAYORGA, P.M., ARANZAZU, H.F. Chemical control of witches' broom in cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 8, 1981, Cartagena, CO. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1981. p.551-555.
- 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. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, n.03, p.9828-9832, 1991.
- MEHRA, P.N. **Cytology of himalayan hardwoods**. Calcutta: Sree Saraswaty, 1976. 215p.
- MOSS, D.W. **Isoenzymes**. New York: Hall, 1982. 320p.
- MUEHLBAUER, G.J., STASWICK, P.E., SPECHT, J.E., GRAEF, G.L., SHOEMAKER, R.C., KEIM, P. RFLP mapping using near-isogenic lines in

the soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Theor. Appl. Genet.**, v.81, n.01, p.189-98, 1991.

MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.55, n.02, p.335-350, 1987.

MUNOZ, J.M.O. **Estudios cromosomicos en el genero *Theobroma* L.** Turrialba, Costa Rica: IICA, 1948. 70p. Thesis (M.S.) - IICA, 1948.

NELSON, J.C. QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. **Mol. Breeding**, v.3, n.3, p.239-245, 1997.

N'GORAN, J.A.K., LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M., LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP e RAPD markers. **Heredity**, v.73, n.02, p.589-597, 1994.

OSEI, J.K., FURTEK, D.B., GOODIN, M., RODRIGUEZ, H., MORERA, J., LASTRA, R., FRITZ, P.J. Construction of a low-density linkage map of *Theobroma cacao* using random amplified polymorphic DNA markers and an anthocyanin biosynthetic locus. **Turrialba**, v.45, n.3, p.128-132, 1995.

PATERSON, A.H. **Genome mapping in plants.** San Diego: Academic, 1996. 330p.

PEREIRA, J.L. Prospects for effective control of cocoa diseases. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12, 1996, Salvador, BA. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1996. p.23-27.

PIRES, J.L., MONTEIRO, W.R., LUZ, E.D.M.N., SILVA, S.D.V.M., PINTO, L.R.M., FIGUEIRA, A., GRAMACHO, K.P., LOPES, U.V., BEVILÁQUIA ALBUQUERQUE, P.S., YAMADA, M.M., AHNERT, D., BRUGNEROTTO, M.I.B. Cocoa breeding for witches' broom resistance at CEPEC, bahia, brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE CONTRIBUTION OF DISEASE RESISTANCE TO COCOA VARIETY IMPROVEMENT, 11, 1996, Salvador, BA. **Proceedings...** Lagos, NI: Cocoa Producers' Alliance, 1996. p.91-101.

- RIEDY, M.F., HAMILTON, W.J., AQADRO, C.F. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.20, n.03, p.918, 1992.
- ROCHA, H.M., WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathol.**, v.34, n.3, p.319-328, 1985.
- RONNING, C.M., SCHNELL, R.J., KUHN, D.N. Inheritance of random amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.120, n.4, p.681-686, 1995.
- RUSSEL, J.R., HOSEIN, F., JOHNSON, E., WAUGH, R., POWELL, W. Genetic differentiation of cocoa *Theobroma cacao* L. populations revealed by RAPD analysis. **Molec. Ecol.**, v.2, n.01, p.89-97, 1993.
- SAIN, S.L., KWABENA, K.O., FURTEK, D.B. Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell**, v.37, n.01, p.243-251, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.03, p.08B.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v.8, n.02, p.552-560, 1923.
- SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para resistência ao nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 84p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- SHOEMAKER, R.C., OLSON, T.C. Molecular linkage map of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Genetic maps: locus maps of complex genomes**. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory, 1993. 6138p.

- SORIA, V.J., OCAMPO, F., PAEZ, G. Parental influence of some cacao clones on the yield performance of their progenies. **Turrialba**, v.24, n.01, p.58-65, 1974.
- TINGEY, S.V., DEL TUFO, J.P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Physiol.**, v.101, n.02, p.349-352, 1993.
- TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., KISS, G., CARLSON, J.E. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. **Bio/Techn.**, v.10, n.03, p.686-690, 1992.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v.23, n.18, p.4407-4414, 1995.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKY, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WOOD, G.A.R., LASS, R.A. **Cocoa**. England: Essex, 1985. 520p.
- WOOD, G.A.R. From harvest to store. In: WOOD, G.A.R., LASS, R.A. **Cocoa**. London: Longman, 1987. p.444-504.
- WOOD, G.A.R., LASS, R.A. **Cocoa**. New York: Longman, 1987. 540p.
- WU, K.K., BURNQUIST, W.L., SORRELLS, M.E., TEW, T.L., MOORE, P.H., TANKSLEY, S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theor. Appl. Genet.**, v.83, n.03, p. 788-794, 1992.

- XIAO, J., LI, J., YUAN, L., TANKSLEY, S.D. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. **Theor. Appl. Genet.**, v.92, n.01, p. 230-244, 1996 .
- YOUNG, N.D., ZAMIR, D., GANAL, M.W., TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, v.120, n.02, p.579-585, 1988.
- YU, Z.H., MACKILL, D.J., BONMAN, J.M., TANKSLEY, S.D. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.81, n.02, p.471-476, 1991.