

## CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES CLONAIS DE *Theobroma cacao* L. COM BASE EM MARCADORES RAPD, AFLP E MICROSSATÉLITES

*Fábio Gelape Faleiro*<sup>1,2</sup>, *Uilson V. Lopes*<sup>1</sup>, *Milton M. Yamada*<sup>1</sup>, *José L. Pires*<sup>1</sup>, *Rita C. S. Bahia*<sup>1</sup>, *Ronaldo C. Santos*<sup>1</sup>, *Luana M. C. Gomes*<sup>1</sup>, *Ioná S. Araújo*<sup>1</sup>, *Alessandra S. G. Faleiro*<sup>1</sup>, *Karina P. Gramacho*<sup>1</sup>, *Gilson R. P. Melo*<sup>1</sup>, *Wilson R. Monteiro*<sup>1</sup> e *Raúl R. Valle*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC/Laboratório de Biotecnologia, C.P.07, 45600-970, Itabuna - Bahia - Brasil;

<sup>2</sup>Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, C.P. 08223, 73301-970, Planaltina - Distrito Federal - Brasil; ffaleiro@cpac.embrapa.br

Objetivou-se, neste trabalho, caracterizar a diversidade genética das atuais variedades clonais de *Theobroma cacao* L., recomendadas aos produtores pelo CEPEC/CEPLAC, utilizando marcadores moleculares RAPD, AFLP e microsatélites. DNA genômico das nove variedades clonais (TSH-516, TSH-565, TSH-1188, CEPEC-42, EET-397, TSA-654, TSA-656, TSA-792; TSH-774) e do acesso Sca-6 (padrão de resistência à vassoura-de-bruxa) foi extraído e amplificado para obtenção dos marcadores moleculares. Foram utilizados 3, 11 e 18 *primers* ou pares de *primers* para obtenção dos marcadores AFLP, microsatélites e RAPD, respectivamente. Foram gerados um total de 604 marcadores (437 AFLP, 33 microsatélites e 134 RAPD). Distâncias genéticas e análises de agrupamento das variedades clonais foram calculadas, assim como coeficientes de correlação entre as distâncias genéticas obtidas com base em cada tipo de marcador. As correlações entre as distâncias calculadas foram de 29,1% (RAPD-AFLP), 40,0% (AFLP-Microsatélites) e 68,3% (RAPD-Microsatélites). O clone CEPEC-42 apresentou maior distância genética em relação ao padrão de resistência (Sca-6). As variedades EET-397 e das séries TSH e TSA formaram um grupo principal. O interrelacionamento genético das variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC evidencia a necessidade de buscar novas e distintas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa para ampliar a base genética do programa de melhoramento do cacau visando resistência.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, vassoura-de-bruxa, resistência

**Characterization of clonal varieties of *Theobroma cacao* L. using RAPD, AFLP and microsatellite markers.** The objective of this work was to characterize the genetic diversity of the current clonal varieties of *Theobroma cacao* L. recommended by CEPEC/CEPLAC, using RAPD, AFLP and microsatellite markers. Genomic DNA of the nine clonal varieties (TSH-516, TSH-565, TSH-1188, CEPEC-42, EET-397, TSA-654, TSA-656, TSA-792; TSH-774) and of the accession Sca-6 (standard of resistance to witches' broom) was extracted and amplified to obtain the molecular markers. The number of primers or pairs of primers used to obtain the markers was 3, 11 and 18 for AFLP, microsatellites and RAPD, respectively. A total of 604 markers (437 AFLP, 33 microsatellites and 134 RAPD) was obtained. Genetic distances and grouping analyses of the cocoa varieties were made and correlation coefficients between genetic distances obtained with each type of marker were calculated. Correlation coefficients between distances were 29.1% (RAPD-AFLP), 40.0% (AFLP-Microsatellite) and 68.3% (RAPD-Microsatellite). CEPEC-42 was genetically the most distant from the resistance standard (Sca-6). EET-397 and those of the TSH and TSA series were placed in the same group. The close genetic relationship between the clonal varieties recommended by CEPEC/CEPLAC indicates the need of finding new and distinct witches' broom resistance sources to widen the genetic base of the cocoa breeding program aiming resistance to this disease.

**Key words:** Genetic diversity, witches' broom, disease resistance

## Introdução

O cacauero, *Theobroma cacao* L., é uma espécie alógama, perene, que assume grande importância para as regiões produtoras do Brasil, onde cerca de 3 milhões de pessoas dependem direta ou indiretamente dessa cultura. O cacau é importante fonte de receitas públicas, renda e emprego, movimentando cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais em amêndoas e derivados (ABC, CNPC, Coopercaçu, 2001). O sul da Bahia é a principal região produtora de cacau do Brasil, onde praticamente 100 municípios têm suas economias baseadas no cacau, o qual é cultivado em vinte e nove mil propriedades, em área superior a 700 mil hectares (Souza e Dias, 2001).

A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso*, tem causado, desde sua introdução em 1989 (Pereira et al., 1989), um dramático impacto econômico, ecológico e social na região cacauera baiana. Devido a alta severidade da doença, no período 1991 a 2000, o Brasil teve sua produção anual reduzida de 375 mil toneladas para cerca de 120 mil, diminuindo sua participação no mercado internacional de 14,8% para 4,5% e saindo da posição de 2º maior produtor mundial de cacau para a 6ª posição (ICCO, 1991; 2000). Plantações comerciais chegam a perder 100% da produção por causa da doença, provocando o abandono das mesmas, tendo o produtor de cacau, como última fonte de renda, a madeira oriunda das árvores outrora usadas para sombrear o cacauero. Além disso, por ser um cultivo arbóreo altamente dependente de mão-de-obra, as perdas impostas pela vassoura-de-bruxa à cultura do cacau levaram a um contingente de mais de 250 mil desempregados no meio rural, aumentando a população em áreas urbanas circunvizinhas, com o conseqüente agravamento dos problemas sociais.

Para a solução desse grave problema, o Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC) tem buscado metodologias para o controle efetivo da doença. Dentre os métodos de controle, a resistência genética do cacauero ao patógeno é a mais promissora, eficiente, barata e ecologicamente correta, com resultados práticos e concretos para o início da recuperação da lavoura cacauera. Em 1994, foi recomendada a primeira variedade clonal com resistência à vassoura-de-bruxa, chamada 'Theobahia' (Monteiro et al. 1995). A partir de 1995 (Pires e Luz, 1995; Pires et al., 1996a; 1996b), com base na avaliação da resistência de vários acessos de cacauero provenientes de diversos locais do mundo, o CEPEC passou a recomendar clones selecionados de cruzamentos envolvendo os acessos IMC 67, ICS 1 and SCA 6, codificados como TSA, TSH, CEPEC e EET. Atualmente, nove clones resistentes estão sendo recomendados para

produtores da região cacauera baiana, com significativo incremento na produção e conseqüente aquecimento da economia local.

Diferentes avaliações sobre resistência, produtividade e autocompatibilidade têm sido realizadas com as atuais variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC (Pinto e Pires, 1998). Tais variedades apresentam excelente produtividade e têm como principal fonte de resistência o clone Scavina-6. Apesar de não serem imunes à doença, apresentam, nas condições ambientais do sul da Bahia, elevada resistência (reduzido número de vassouras), principalmente quando comparadas com as variedades tradicionais.

Além da avaliação das características agrônômicas das variedades recomendadas e do acompanhamento das mesmas ao longo do tempo, um estudo preciso da diversidade genética dessas variedades é de extrema importância para avaliação do material e mesmo para traçar novas estratégias de melhoramento genético. Particularmente para culturas perenes, a recomendação de variedades resistentes com alta diversidade genética e presença de diferentes genes de resistência é essencial para diminuir a pressão de inóculo do patógeno e aumentar a durabilidade da resistência (Zadoks, 1999).

Atualmente, diferentes tipos de marcadores moleculares têm facilitado os estudos de caracterização e diversidade genética de acessos de cacauero (Laurent et al., 1993; 1994; Lerceteau et al., 1997; N'Goran et al., 1994; Pires et al., 2000; Faleiro et al.; 2001a), porque permitem, em um curto espaço de tempo, analisar um número praticamente ilimitado de marcas polimórficas em nível de DNA, sem influência do ambiente. Nesse sentido, objetivou-se, neste trabalho, caracterizar a diversidade genética das atuais variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC por meio de marcadores moleculares RAPD, AFLP e microsatélites.

## Material e Métodos

### Material genético

Nove variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC (TSH-516, TSH-565, TSH-774, TSH-1188, TSA-654, TSA-656, TSA-792, EET-397, CEPEC-42) e a tradicional fonte de resistência à vassoura-de-bruxa (Sca-6) foram utilizadas neste trabalho. As amostras foram coletadas no banco ativo de germoplasma do CEPEC.

### Extração do DNA

Amostras de folhas de cada variedade clonal e do acesso Scavina-6 foram coletadas e armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. O DNA genômico

de cada material foi extraído utilizando-se o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Araújo et al., 2000). Após a extração, a concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989). Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% foram utilizadas como indicadores da integridade e da pureza do DNA extraído. Após a quantificação, as amostras de DNA de boa qualidade foram diluídas para a concentração de 10 ng/μL.

#### **Obtenção dos marcadores RAPD e Microsatélites**

As reações de amplificação para RAPD foram feitas em um volume de 25 μL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μM de *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), 1,0 U de *Taq* polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador MJ Research PTC-100 programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

No caso dos microsatélites, as reações de amplificação foram feitas em um volume de 15 μL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 μM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada *primer* (F e R), 1,0 U de *Taq* polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador MJ Research PTC-100, de acordo com o seguinte programa: 4 min a 94 °C + 10 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 60 °C – 1 °C a cada ciclo e 90 s a 72 °C + 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 48 °C e 90 s a 72 °C + 6 min a 72°C. Após amplificação, a temperatura das amostras foi reduzida para 4°C. Foram utilizados 18 *primers* decâmeros para obtenção dos marcadores RAPD e 9 pares de *primers* para microsatélites (Tabela 1).

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água (39,75%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2 e 3% para separação dos fragmentos RAPD e microsatélites, respectivamente. O gel foi submerso em tampão TBE (90 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas. Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,15 μg/mL e fotografados sob luz ultravioleta.

#### **Obtenção de marcadores AFLP**

Aproximadamente 250 ng de DNA genômico de cada material genético foi digerido com 2 μL das enzimas

*EcoRI* e *MseI* (1 U/μL) durante 2 h a 37 °C. Após esse período, as endonucleases foram inativadas incubando-se a mistura por 15 min a 70 °C e colocando-se em seguida em gelo.

Para a ligação dos adaptadores, foi adicionado a cada DNA digerido 24 μL de uma solução de ligação dos adaptadores (Gibco - Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 1 μL da DNA T4 ligase (1 U/μL). A mistura foi misturada suavemente à temperatura ambiente, incubada por 2 h a 20 °C ± 2 °C e em seguida colocada em gelo.

Para realizar a etapa de pré-amplificação, primeiramente foi feita uma diluição 1:10 da mistura de ligação dos adaptadores em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM). Em um novo microtubo foram adicionados 5 μL da mistura de ligação diluída, 40 μL do *primer* de pré-amplificação, 5 μL do tampão 10X de PCR para AFLP (Gibco - Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 1 μL da *Taq* DNA polimerase (1 U/μL). Em seguida, os fragmentos foram pré-amplificados em termociclador MJ Research PTC-100 programado para 20 ciclos de 30 s a 90°C, 60 s a 56°C e 60 s a 72°C. Após a amplificação, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Os produtos da pré-amplificação de cada material genético foram diluídos 1:50 em TE e então submetidos a amplificações seletivas, utilizando-se três combinações de *primers* específicos (Gibco - Life Technologies, Gaithersburg, MD) (Tabela 1) sendo os *primers* *EcoRI* marcados com fluorescência. Para cada amplificação seletiva, 5 μL do produto da pré-amplificação de cada material genético foram adicionados à respectiva combinação de *primers* e os componentes para reação de PCR (Gibco - Life Technologies, Gaithersburg, MD), realizada de acordo com o seguinte programa: 13 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C – 1 °C a cada ciclo e 60 s a 72°C + 23 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 60 s a 72°C.

Após a PCR, em cada reação, foi adicionado um volume de 5 μL de corante (formamida 98%, EDTA 10 mM e azul de bromofenol) adicionado ao marcador de peso molecular ROX GS-500 (Applied Biosystems). Após este procedimento, as amostras foram aquecidas por 3 min a 90°C e, imediatamente, colocadas em gelo.

Um gel de poliacrilamida 6% (20:1 acrilamida:bis, 7,5 M uréia, tampão TBE 1X) foi preparado e submetido a uma pré-eletroforese a uma potência constante de aproximadamente 55 W por 20 min. Após esse período, foram aplicados no gel 2 μL de cada amostra os quais foram submetidos a eletroforese a uma potência constante de 50 W por quatro horas. A avaliação de cada marcador gerado foi feita automaticamente com o auxílio do Programa GeneScan (ABI PRISM, GeneScan Analysis Software User's Manual), obtendo-se informações sobre o tamanho de cada marcador (pb) e sobre a altura e área

Tabela 1. Lista dos *primers* utilizados e os respectivos número de marcadores gerados e média de marcadores por *primer*.

Tipo de marcador	<i>Primers</i> utilizados	Nº de marcadores		
		Total	Média por <i>primer</i>	Nº de marcas polimórficas
Microssatélites	mTcCIR3, mTcCIR4, mTcCIR8, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR13, mTcCIR17, mTcCIR18, mTcCIR19	33	3,7	31
RAPD	OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPB10, OPC5, OPC8, OPC13, OPD1, OPD8, OPD10, OPD13, OPD16, OPE5, OPE14, OPE15, OPE16	137	7,6	117
AFLP	( <i>Mse</i> I CAA- <i>Eco</i> RI AA), ( <i>Mse</i> I CAA- <i>Eco</i> RI AT), ( <i>Mse</i> I CAA- <i>Eco</i> RI TC)	437	145,7	437*

\* No caso dos marcadores AFLP foram contabilizadas apenas as marcas polimórficas.

do pico de fluorescência. Tais informações foram utilizadas para a codificação dos marcadores obtidos em dados binários, com auxílio de um programa do sistema SAS desenvolvido para tal objetivo. Foram considerados como mesmo fragmento, marcadores que diferiam em menos de um par de base.

#### Análises estatísticas

Os diferentes marcadores moleculares gerados foram analisados separadamente, convertendo-os em matrizes numéricas codificadas, a partir das quais foram calculadas distâncias genéticas entre os materiais genéticos e realizadas análises de agrupamento. A codificação dos marcadores RAPD e AFLP foi 1 para presença e 0 para ausência do marcador. No caso dos marcadores microssatélites, a codificação foi 0 para ausência do alelo, 1 para presença de uma cópia do alelo e 2 para presença de duas cópias do alelo.

As distâncias genéticas (DG) calculadas a partir dos marcadores RAPD e AFLP foram baseadas no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979):

$$DG_{ij} = 1 - [2a/(2a + b + c)] \text{ sendo:}$$

$DG_{ij}$  = Distância genética entre as variedades  $i$  e  $j$ ;

$a$  = número de encontros (1 1);  $b$  = número de encontros (1 0) e  $c$  = número de encontros (0 1) entre as variedades  $i$  e  $j$ .

As distâncias genéticas calculadas a partir dos marcadores microssatélites foram baseadas na seguinte fórmula:

$$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL) \text{ sendo:}$$

$DG_{ij}$  = Distância genética entre as variedades  $i$  e  $j$ ;

NLC = Número de Locos Coincidentes;

NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de

cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 para encontros (2 2); 0,5 para encontros (2 1), (1 2) e (1 1) e 0 para encontros (0 1), (1 0) e (2 0).

As matrizes de distâncias genéticas obtidas com base em cada tipo de marcador molecular foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento dos acessos. Foi realizada a dispersão gráfica em espaço bidimensional baseada na minimização das diferenças entre as distâncias genéticas originais e as distâncias gráficas (Cruz e Viana, 1994). A formação de grupos foi baseada no método UPGMA, estabelecendo-se a formação de dois e três grupos com base nas distâncias genéticas geradas por cada tipo de marcador.

Para comparar os resultados obtidos com base em cada tipo de marcador molecular, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as distâncias genéticas, e analisada a coincidência de posicionamento das variedades clonais nos agrupamentos obtidos com base nas distâncias genéticas geradas por cada grupo de marcadores moleculares.

## Resultados e Discussão

A utilização de três combinações de *primers* para AFLP, 9 *primers* para microssatélites e 18 *primers* decâmeros para RAPD geraram, respectivamente, 437, 33 e 134 marcadores moleculares, perfazendo um total de 604, sendo 570 polimórficas (Tabela 1). A Figura 1 mostra produtos de amplificação de DNA das 10 variedades clonais gerados pelas técnicas de AFLP, microssatélites e RAPD, utilizadas no presente trabalho. Com base no número de marcas geradas, é visível a principal vantagem da técnica de AFLP que é o grande

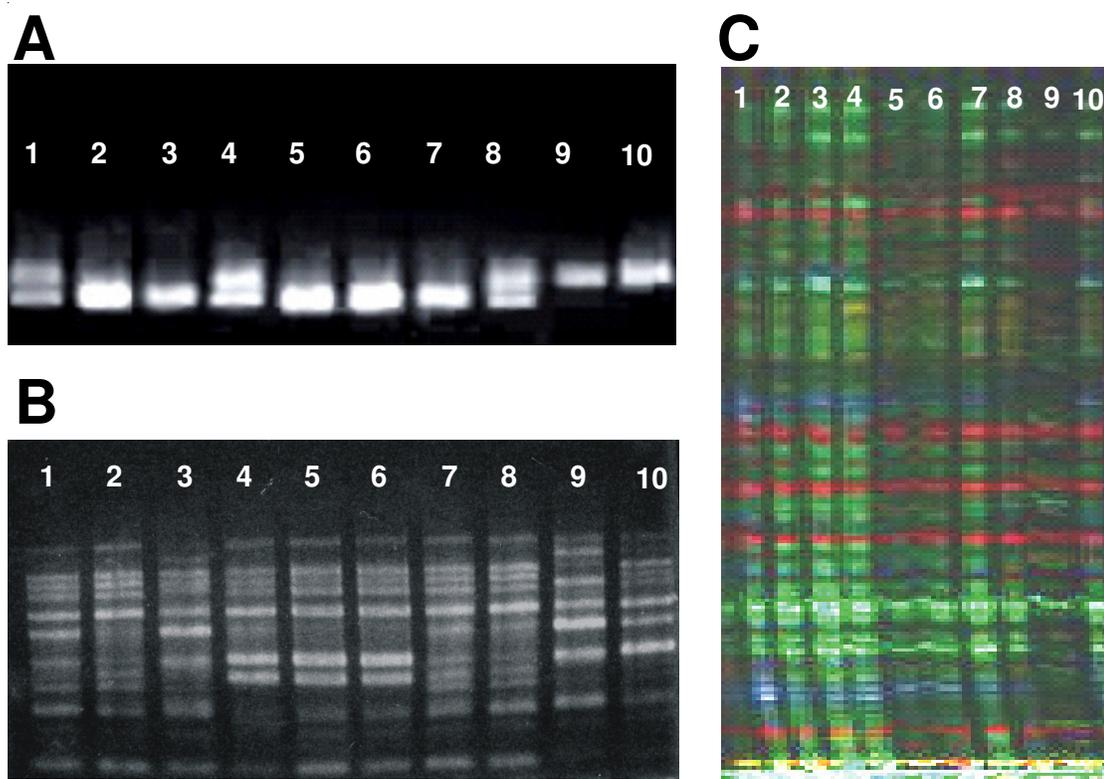


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA genômico de 10 acessos de cacauero (1.TSH-516, 2.TSH-565, 3.TSH-774, 4.TSH-1188, 5.TSA-654, 6.TSA-656, 7.TSA-792, 8.EET-397, 9.CEPEC-42 e 10. Sca-6) obtidos por tecnologias de obtenção de marcadores microssatélites, loco mTcCIR13 (A), RAPD utilizando o *primer* OPD-6 (B) e AFLP utilizando as combinações de *primers* (*Mse*I CAA-*Eco*RI AA), (*Mse*I CAA-*Eco*RI AT), (*Mse*I CAA-*Eco*RI TC) (C).

número de fragmentos gerados por *primer* (Vos et al., 1995). A utilização, neste trabalho, de combinações de *primers* com três e duas bases seletivas possibilitou a obtenção de elevado número de marcadores AFLP. No caso dos marcadores microssatélites, foram obtidos em média, somente três marcadores por *primer*. Esta menor média é compensada pelo alto conteúdo de informação genética por loco, uma vez que os marcadores microssatélites, ao contrário dos AFLP e RAPD, são codominantes (Litt e Luty, 1989).

As análises de agrupamento realizadas com base nas distâncias genéticas calculadas a partir de cada grupo de marcadores moleculares mostraram uma distribuição semelhante das variedades clonais (Figura 2). De modo geral, a variedade clonal CEPEC-42 (9) foi a que apresentou maiores distâncias genéticas em relação às demais variedades, possivelmente pelo envolvimento de um material comum (SIC-19) em seu pedigree genético (Bartley et al 1983). Yamada et al. (2001) mostraram, com base em marcadores RAPD e isoenzimáticos, que o acesso SIC-19 apresenta altas distâncias genéticas em relação a outros genitores das variedades recomendadas

como o Sca-6 e o ICS-1. A análise de agrupamento com base em marcadores RAPD (Figura 2A) mostra que, considerando-se três grupos, as variedades clonais EET-397 e das séries TSH e TSA ficariam localizadas em um grupo principal separadas do clone Sca-6 e do CEPEC-42. Considerando-se dois grupos, o clone Sca-6 faria parte do grupo principal. Este interrelacionamento de oito das nove variedades clonais recomendadas pelo CEPEC é explicado pelo envolvimento do acesso Sca-6 nos cruzamentos que originaram tais variedades. A análise de agrupamento com base em marcadores microssatélites (Figura 2B) é idêntica àquela com base em marcadores RAPD quando se considera a formação de dois grupos. A análise de agrupamento com base em marcadores AFLP (Figura 2C) não mostra uma distinção muito evidente da variedade clonal CEPEC-42 em relação às demais. O envolvimento do Sca-6 no pedigree genético da CEPEC-42 e das demais variedades clonais pode explicar tal resultado.

A maior similaridade das análises de agrupamento obtidas com base em marcadores RAPD e microssatélites é explicada pela maior correlação entre as distâncias

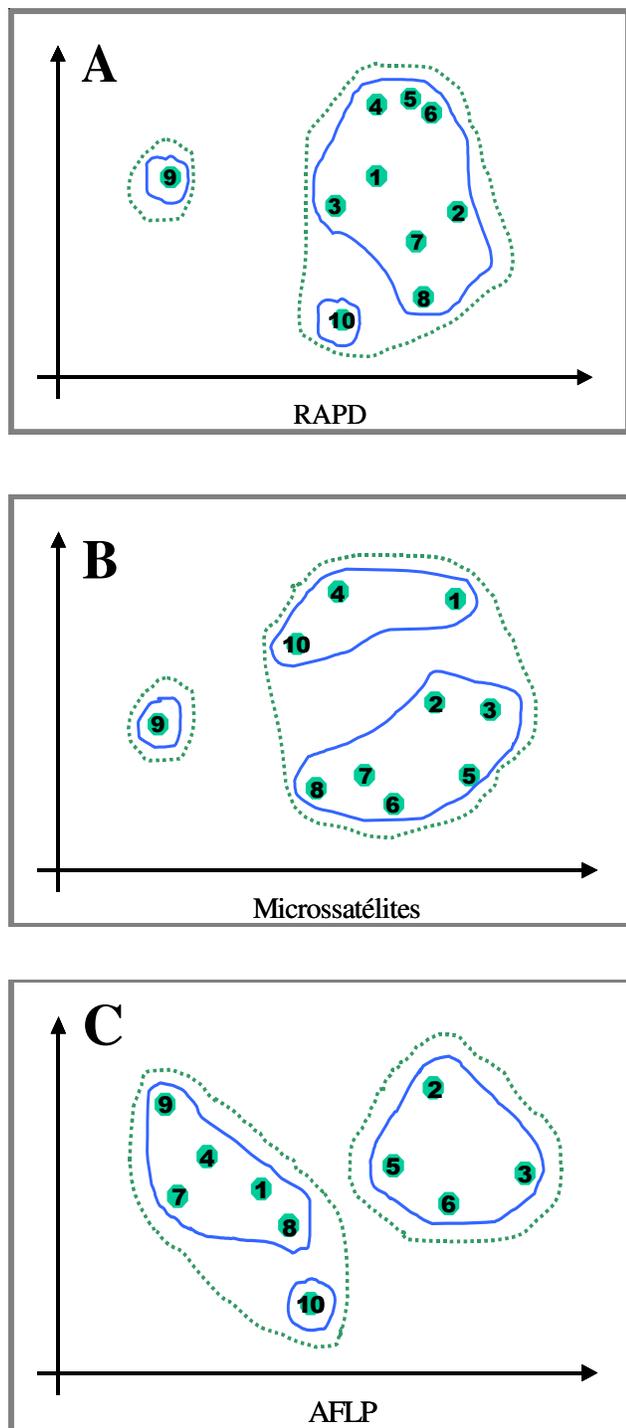


Figura 2. Dispersão de 10 variedades clonais de cacauero (1.TSH-516, 2.TSH-565, 3.TSH-774, 4.TSH-1188, 5.TSA-654, 6.TSA-656, 7.TSA-792, 8.EET-397, 9.CEPEC-42 e 10. Sca-6) baseada nas distâncias genéticas calculadas utilizando-se marcadores moleculares RAPD (A), Microsatélites (B) e AFLP (C). A análise de agrupamento foi realizada com base no método UPGMA, considerando-se 2 (linha pontilhada) e 3 (linha contínua) grupos.

genéticas calculadas com base nesses marcadores (Figura 3). As correlações entre as distâncias genéticas calculadas com base nos marcadores moleculares utilizados neste trabalho foram de 68,3% (RAPD-Microsatélites), 29,1% (RAPD-AFLP) e 40,0% (AFLP-Microsatélites) (Figura 3).

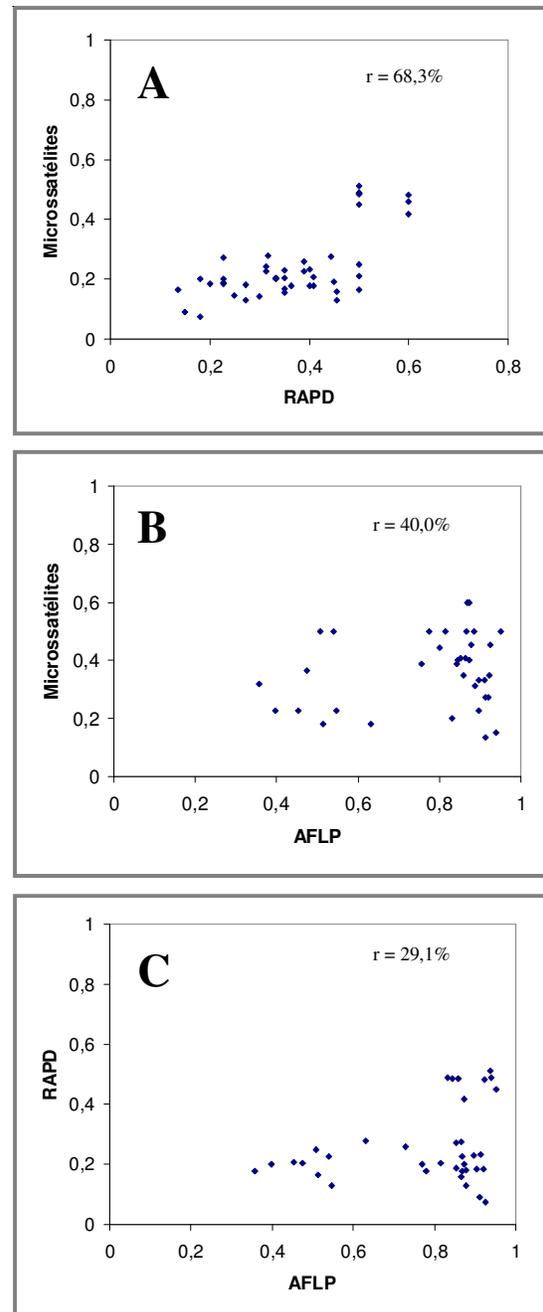


Figura 3. Dispersão das distâncias genéticas entre pares de variedades clonais de cacauero calculadas com base em marcadores microsatélites e RAPD (A), microsatélites e AFLP (B) e RAPD e AFLP (C). Correlações de Pearson entre as distâncias também são apresentadas.

Vários trabalhos têm sido realizados para comparar as informações geradas por diferentes marcadores moleculares, utilizando-se diferentes critérios comparativos (N'Goran et al., 1994; Arnau et al., 2001; Briard et al., 2001; Grzebelus et al., 2001), sendo a correlação linear entre as distâncias genéticas um dos mais utilizados. Diferentes fatores afetam a correlação entre as distâncias genéticas calculadas com base em diferentes marcadores moleculares, sendo o número e a reproducibilidade das marcas moleculares analisadas de grande importância. O número de marcas moleculares necessário para a diferenciação de materiais genéticos depende do número e da similaridade genética dos materiais, sendo que quanto maior o número e a similaridade dos materiais, maior será o número de marcas moleculares necessárias para a diferenciação dos mesmos. No presente estudo, foram analisados materiais interrelacionados geneticamente o que requer maior número de marcas moleculares para a diferenciação dos mesmos. A baixa reproducibilidade das marcas foi mencionada por Arnau et al. (2001) como um problema dos marcadores AFLP, o que pode explicar as correlações obtidas nesse trabalho. Por outro lado, correlações acima de 70,0% foram obtidas entre distâncias genéticas calculadas com base em marcadores AFLP e RAPD para estudo da diversidade genética em cenoura (Grzebelus et al., 2001). Este último autor fez um estudo de reproducibilidade das marcas, utilizando em seu estudo apenas as marcas consistentes. No caso do cacaueteiro, estudos comparativos da utilização de marcadores RAPD e RFLP no estudo da diversidade genética mostraram que ambos os tipos de marcadores foram eficientes para a classificação de acessos nos

grupos Criolo, Alto Amazônicos, Baixo Amazônicos e Trinitários (N'Goran et al., 1994).

As distâncias genéticas médias entre cada variedade clonal são apresentadas na Tabela 2. De um modo geral, a variedade clonal CEPEC-42 foi a que apresentou maior distância genética em relação ao padrão (Sca-6). Maiores distâncias genéticas também foram observadas entre a variedade CEPEC-42 e as demais. A menor distância genética (0,127) foi verificada entre as variedades clonais TSA-654 e TSA-656, o que seria esperado considerando-se que são irmãs completas, oriundas do cruzamento entre IMC-67 e Sca-6 (Pinto e Pires, 1998).

Neste trabalho foi verificado um alto interrelacionamento genético das variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC, o que evidencia a necessidade de buscar novas e distintas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa para ampliar a base genética do programa de melhoramento do cacaueteiro visando resistência. Para isso, novas fontes de resistência geneticamente distintas do Sca-6 têm sido identificadas no banco de germoplasma do CEPEC/CEPLAC (Pires et al., 2001) e também em plantações comerciais da região cacaueteira baiana (Faleiro et al., 2001b). A ampliação da base genética será essencial para o aumento da eficiência e durabilidade da resistência à vassoura-de-bruxa.

## Agradecimentos

Ao Common Fund for Commodities, International Cocoa Organization e FUNDECAU pelo auxílio financeiro. Ao IBECAU pela bolsa de pesquisa concedida a Fábio G. Faleiro.

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas médias entre nove variedades clonais recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC e o clone Sca 6, calculadas com base em marcadores RAPD, microssatélites e AFLP.

	TSH 516	TSH 565	TSH 774	TSH 1188	TSA 654	TSA 656	TSA 792	EET 397	CEPEC 42	Sca 6
TSH 516	0,000									
TSH 565	0,215	0,000								
TSH 774	0,210	0,206	0,000							
TSH 1188	0,235	0,293	0,286	0,000						
TSA 654	0,250	0,180	0,208	0,259	0,000					
TSA 656	0,320	0,188	0,236	0,270	0,127	0,000				
TSA 792	0,325	0,223	0,225	0,218	0,229	0,187	0,000			
EET 397	0,350	0,265	0,282	0,253	0,239	0,193	0,136	0,000		
CEPEC 42	0,525	0,443	0,435	0,371	0,442	0,421	0,386	0,399	0,000	
Sca 6	0,271	0,314	0,316	0,261	0,323	0,290	0,259	0,240	0,395	0,000

## Literatura Citada

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CACAUCULTORES, Copercacau. 2001 Pacto do Cacau – Programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira; Resumo da Proposta de Readequação. Ilhéus, CEPLAC. 20p.
- ARAÚJO, I.S. et al. 2000. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores moleculares RAPD. Genetics and Molecular Biology 26 (supl): 219-220.
- ARNAU, G., LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. 2001. Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification? Acta Horticulturae 546: 301-306.
- BARTLEY, B.G.D., MARIANO, A.H.; CASTRO, G.C.T. 1983. Coleta, seleção, quarentena e intercâmbio de recursos genéticos. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Informe de pesquisas, 1983. pp. 5-6.
- BRIARD, M. et al. 2001. A comparative study on the use of ISSR, microsatellites and RAPD markers for varietal identification of carrot genotypes. Acta Horticulturae 546: 377-385.
- CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S. 1994. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. Revista Brasileira de Genética 17: 69-73.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- FALEIRO, F. G. et al. 2001a. Variabilidade genética de variedades de *Theobroma cacao* L. provenientes das amazônias brasileira, equatoriana e peruana com base em marcadores RAPD e microssatélites. In: Congresso Nacional de Genética, 47, Águas de Lindóia, SP. 2001. (Resumo) [CD-ROM].
- FALEIRO, F. G. et al. 2001b. Diversidade genética de 59 acessos VB's de *Theobroma Cacao* L. com base em marcadores moleculares RAPD. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 1, Goiana, GO, 2001. Anais. (Resumo estendido). [CD-ROM].
- GRZEBELUS, D. et al. 2001. Comparison of RAPD and AFLP techniques used for the evaluation of genetic diversity of carrot breeding materials. Acta Horticulturae 546 : 413-416.
- LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. 1993. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. Heredity 71: 96-103.
- LAURENT, V., RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. 1994. RFLP study of genetic diversity of *Theobroma cacao*. Angew Botany 68: 36-39.
- LERCETEAU, E. et al. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 10-19.
- LITT, M.; LUTH, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. The American Journal of Human Genetics 44: 398-401.
- MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; PINTO, L.R.M. 1995. Variedade Theobahia; histórico e características gerais. Informação e Difusão. Nova Série (Brasil), nº.1. pp.1-2.
- N'GORAN, J.A.K. et al. 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. Heredity 73: 589-597.
- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 76: 5269-5273.
- PEREIRA, S.L. et al. 1989. Primeira ocorrência da vassoura de bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotrópica (Brasil) 1: 79-81.
- PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L. 1998. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº.181. 34p.
- PIRES, J.L.; LUZ, E.D.M.N. 1995. Resistência à vassoura-de-bruxa na espécie *Theobroma cacao*. Fitopatologia Brasileira 20:303.
- PIRES, J.L. et al. 1996a. Resistência à vassoura-de-bruxa; avaliação de genótipos de diferentes origens. In: Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, 12, Salvador, 1996. Atas. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 389-397.
- PIRES, J.L. et al. 1996b. Cocoa breeding for witches's broom resistance at CEPEC, Bahia, Brasil. In: International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement, Salvador, 1996. s.l. INGENIC. pp. 24 - 25.
- PIRES, J.L. et al. 2000. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia 2000. Proceedings. s.l. INGENIC. pp. 72-88.
- PIRES, J.L. et al. 2001. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. Fitopatologia brasileira, 26 (supl.): 347.
- QUATERLY BULLETIN OF COCOA STATISTICS. 1991. London, ICCO. v. 18: 59.
- QUATERLY BULLETIN OF COCOA STATISTICS. 2000. London, ICCO. v. 27: 101.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. 653p.
- SOUZA, C.A.S.; DIAS, L.A.S. 2001. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In Dias, L.A.S. (Ed.) Melhoramento genético do cacaueiro. Editora Folha de Viçosa Ltda, Viçosa. pp. 1-47.
- VOS, P. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.
- YAMADA, M.M. et al. 2001. Genetic variability in cultivated cacao populations in bahia, brazil, using isozymes and RAPD markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology 4: 377-384.
- ZADOKS, J.C. 1996. Phytopathological aspects of disease resistance and resistance breeding in cocoa: An external review. In: International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. Salvador, 1996. s.l. INGENIC. pp. 17-22.