

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



**ANÁLISE DE POLIMORFISMO EM HOMÓLOGOS DE GENES DE**  
**RESISTÊNCIA EM CACAUEIRO POR MEIO DA TÉCNICA SSCP**

**BRENA FARIAS SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Maio de 2007**

**BRENA FARIAS SANTOS**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO EM HOMÓLOGOS DE GENES DE  
RESISTÊNCIA EM CACAUEIRO POR MEIO DA TÉCNICA SSCP**

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

**BRENA FARIAS SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Mai de 2007**

BRENA FARIAS SANTOS

ANÁLISE DE POLIMORFISMO EM HOMÓLOGOS DE GENES DE  
RESISTÊNCIA EM CACAUEIRO POR MEIO DA TÉCNICA SSCP

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

APROVADA: 14 de maio de 2007

---

Dr. Uilson Vanderlei - (CEPEC/CEPLAC)

---

Dr<sup>a</sup> Ioná Araújo - (DCB-UESC)

---

Dr. Ronan Xavier - (DCB-UESC)

---

Dr. Dário Ahnert - (UESC-ORIENTADOR)

*“A maior recompensa do nosso trabalho  
não é o que nos pagam por ele, mas  
aquilo em que ele nos transforma”.* **John  
Ruskin**

Estressei, curti, chorei e discuti, mas o importante é que me transformei e cresci muito.

## **Dedico**

Este foi um trabalho prazeroso, muito cansativo, mas prazeroso. Prazeroso porque tive sempre ao meu lado pessoas que me deixaram tranqüila e confiante em tudo que fiz.

À minha família por sempre me apoiar em tudo, incentivar e ter orgulho da filha, irmã, sobrinha e tia. Ahh, a minha irmã TAMILIS por sempre me fazer rir e desestressar quando precisava (kkkkk). Aos meus amigos por sempre estarem lembrando o quanto sou importante. E ao meu namorado Ramon, por sempre me dar um abraço, um conforto e palavras que me dão forças e prazer em seguir por este cansativo caminho e por sempre me lembrar do quão sou especial.

Meu eterno AMOR para todos vocês!!

Obrigada!!

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação e Pós-Graduação e por minha excelente formação acadêmica.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Projeto Genocacau, pelo apoio financeiro ao projeto.

A CEPLAC e UESC, pela infra-estrutura laboratorial e disponibilização de mestres na orientação.

Ao Prof. Dr. Dário Ahnert, pela orientação, apoio em todos os momentos, compreensão e confiança em minha competência.

Ao Dr. José Luis Pires, pela co-orientação, ajuda nas análises estatísticas e apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pela sua colaboração e ajuda intelectual sempre que apertava no entendimento do trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Karina Gramacho, pelo apoio dentro do laboratório, disponibilizando infra-estrutura laboratorial, tempo, ensinamentos e apoio intelectual a todo o momento.

Ao Dr. Uilson Vanderlei Lopes, pelos ensinamentos, disponibilização do material genético dos experimentos, ajuda na condução do trabalho quando as coisas apertavam, apoio intelectual, prático e idealizações para desenvolver a dissertação.

A Tia Dr<sup>a</sup> Ioná Araújo pela imensa ajuda e compreensão quando o trabalho estava mais 'emperrado', com suas colaborações práticas, teóricas e intelectual na otimização da técnica SSCP, sempre disponibilizando de seu tempo para

conversar, aconselhar, 'puxar orelhas' e incentivar a sempre dar o meu máximo no trabalho. Obrigada por sempre me escutar.

A Alfredo Dantas e Milton Macoto por cederem o espaço, muitas vezes material e seus ensinamentos para o desenvolvimento do trabalho.

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

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

Aos colegas e amigos do mestrado pelo apoio, amizade e força: Livita, Tharcilla, Adriana, Aíta, Ana Carolina, Heliana, Nadja, Fernandinha, Fabrício, Cristiano, Marcelo, enfim a todos.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Biotecnologia e Fitopatologia do CEPEC/CEPLAC, pelo companheirismo, amizade e fofocas saudáveis: Reinaldo, Rogério, Acassi, Cássia, Leiloca, Narinha, Elisa, Flavinha, Chiquinha, Fernanda, Pabli, Joelson, Vanessa, Débora, Sabrina Soneguetti.

SEMPRE aos meus amigos de todos os momentos (amigos antigos: Chocolate, Vivaldo, Luiza, Amanda, Alines, May, Kau, Allana, Biskui, e amigos recentes: Carolzinha (minha anjinha), Vivi, Vika e Ellany, obrigada pelo apoio de todo o sempre, e CLARO aos meninos) pelo incentivo, força e torcida.

SEMPRE ao meu NAMORADO por TUDO, carinho, amor, força e companheirismo de todos os momentos felizes e difíceis de minha vida.

SEMPRE a minha família pela força, carinho e amor ETERNO.

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

## ÍNDICE

EXTRATO .....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELA.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Genética da resistência em plantas: Interação planta-patógeno.....	4
2.1.1. Hipersensibilidade.....	6
2.1.2. Interação gene-a-gene.....	9
2.2. Genes de resistência em plantas: classificação, funções e distribuição no genoma.....	10
2.3. Melhoramento genético do cacaueteiro visando resistência a doenças.....	14
2.4. Homólogos de genes de resistência e suas aplicações.....	18
2.5. Marcadores moleculares no estudo de diversidade genética.....	20
2.6. Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP).....	21
2.6.1. A técnica SSCP.....	21
2.6.2. Vantagens.....	24
2.6.3. Desvantagens.....	24
2.6.4. Aplicações em estudos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Materiais genéticos do experimento.....	28
3.2. Extração de DNA Genômico.....	30
3.3. Amplificação dos marcadores RGHS-SSCP.....	31
3.4. Otimização da técnica SSCP.....	33

3.4.1. Tamanho do fragmento de interesse.....	33
3.4.2. Temperatura do gel SSCP.....	33
3.4.3. Condições de eletroforese.....	34
3.4.4. Gel SSCP e Diluição das amostras de PCR.....	34
3.5. Eletroforese em gel de acrilamida 6%.....	35
3.6. Codificação dos dados ( <i>Scoring</i> ).....	36
3.7. Análise de polimorfismos nos perfis eletroforéticos entre os clones.....	37
3.8. Análise de diversidade genética e Índice de heterozigose.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Otimização das condições de amplificação dos marcadores RGHs e da técnica SSCP.....	39
4.1.1. Teste de amplificação e <i>Screening</i> dos <i>primers</i> RGHs.....	39
4.1.2. Otimização da técnica SSCP.....	41
4.2. Análise de polimorfismos alélicos nos fragmentos amplificados dos marcadores RGHs.....	45
4.3. Análise de diversidade genética.....	50
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## EXTRATO

SANTOS, Brena Farias, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Análise de Polimorfismo em Homólogos de Genes de Resistência em Cacaueiro por meio da Técnica SSCP.** Orientador: Dário Ahnert. Co-orientador: José Luis Pires. Colaborador: Ronan Xavier.

Genes candidatos à resistência são aqueles genes suspeitos de estarem envolvidos com a expressão da resistência a doenças em plantas. Homólogos de genes de resistência (RGHs), que também são genes candidatos, foram identificados e mapeados em cacaueiro pela técnica de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples). Os objetivos deste estudo foram: (i) adaptar e validar a técnica de SSCP para genotipagem do cacau em nossos laboratórios; (ii) identificar polimorfismos em clones de cacaueiro resistentes e suscetíveis; (iii) identificar marcas únicas encontradas somente em clones resistentes ou em suscetíveis; (iv) analisar o nível de heterozigose em cada locus RGHs. Um total de 57 clones de cacaueiro foi utilizado para o levantamento de dados, sendo 21 clones considerados âncoras neste estudo e 36 clones selecionados por produtores como resistentes à vassoura-de-bruxa. Estes clones estão sendo testados para produção e resistência a doenças em áreas experimentais pela CEPLAC na Região Cacaueira da Bahia. A técnica de SSCP foi usada para genotipagem dos clones em estudo. Um total de 12 primers RGHs foram utilizados para análise de dados dos 57 clones. Os fragmentos amplificados de DNA foram separados por eletroforese em gel de acrilamida não desnaturante a 6%. Os perfis eletroforéticos dos géis foram lidos e transformados em dados binários, em que, a presença da banda foi codificada como um (1) e ausência

como zero (0). As análises estatísticas multivariadas dos dados foram executadas usando os Softwares GENES e SAS. Para a otimização da técnica SSCP, os melhores resultados foram obtidos com as seguintes condições: (i) temperatura ambiente variando de 15-20°C; (ii) eletroforese com 400 V, 15 W, 15 mA, por um período de 5 horas e meia; (iii) gel de acrilamida não desnaturante a 6%, com proporção de 37,5: 1 (acrilamida: bisacrilamida), APS 10% e glicerol 5%. Dos 12 *primers* RGHs em estudo, 10 amplificaram os fragmentos de DNA e sete tiveram 100% de polimorfismo. Um total de 79 marcas distintas de ssDNA foram geradas, com uma média de 7,9 marcas/*primer*. As estimativas de distâncias genéticas variaram de 0, 0253 a 0, 3797, com uma média de 0, 2036. O nível elevado de similaridade entre os clones indica uma baixa variação nos RGHs, regiões supostamente funcionais do genoma. Certamente, espera-se que os RGHs sejam conservados dentro e entre a espécie, que pode explicar estes resultados. O nível de heterozigose variou de 20 a 90%. Quando as distâncias genéticas foram plotadas em espaços tridimensionais, uma dispersão relativamente elevada foi observada sem nenhum agrupamento dos grupos raciais do cacauero ou agrupamentos baseados na resistência e suscetibilidade dos clones. As análises dos dados mostraram a presença de seis marcas únicas RGHs-SSCP em clones suscetíveis à vassoura-de-bruxa: RGH2\_M6 e 7, RGH3BC\_M4, 9 e 10, e RGH7\_M8. Nos clones resistentes, identificaram-se 10 marcas únicas RGHs-SSCP: RGH1\_M1 e M5, RGH3BC\_M1, 2, 14 e 16, RGH4\_M6, RGH5\_M1, 2 e 5.

## ABSTRACT

SANTOS, Brena Farias, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Polymorphism Analysis in Resistance Gene Homologue in Cacao by means of Technique SSCP.** Orientador: Dário Ahnert. Co-orientador: José Luis Pires. Colaborador: Ronan Xavier.

Resistance candidate gene is suspected of being involved in expression of diseases resistance in plants. Resistance genes homologues (RGHs) are examples genes already identified and mapping in cacao for SSCP technique (Single-strand Conformational Polymorphism). The objectives of this study were: (i) to adapt and validate the SSCP technique for cacao genotyping in our laboratory; (ii) to identify polymorphism on resistant and susceptible cacao clones; (iii) to identify unique markers, find only in the resistant or in the susceptible clones; (iv) to analyze heterozygosis in each RGHs locus. Total of 57 cacao clones were utilized for data collection, being 21 clones considered anchors in this study and 36 clones selected by producers as resistant the witches broom disease. These clones are being tested for yield and disease resistance in experimental plots by CEPLAC in the Cacao Region of Bahia. The SSCP technique was used for genotyping the clones under study. Total of 12 RGHs *primers* were screened over 57 clones for data collection. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in a 6% non denaturant acrilamyde gel. The band profile on the gel was read and transformed in a binary code, in which, the presence of a band was coded as one (1) and absence as zero (0). Statistical multivariate data analyses were performed using Software's Genes and SAS. Regard the optimization of the SSCP technique, the best results were obtained

with the following conditions: (i) room temperature varying from 15-20°C; (ii) power of 400 V, 15 W, 15 mA, for a period of 5:30 hours; (iii) non denaturant acrilamye gel, with ratio of 37,5: 1 ( acrilamida: bisacrilamida), 10% APS and 5% glicerol. Of the 12 *primers* RGHS under study, 10 amplified DNA and seven had 100% of polymorphism. Total of 79 distinct ssDNA markers were generated, with an average of 7,9 markers/*primer*. Estimates of genetics distances varied form 0, 0253 to 0, 3797, with an average of 0, 2036. The elevated level of similarity among clones indicates low variation at the RGHS genes, supposedly functional regions of the genome. Indeed, RGHS are expected to be conserved within and among species, which may explain these results. The heterozygosis level varied form 20 to 90%. When the genetics distances were plot in a three-dimensional space, relatively high dispersion was observed without any groupings according with the cacao racial groups or groupings based on the resistance and susceptible of clones. Data analyses showed the presence of six unique RGHS-SSCP marks in the witches' broom susceptible clones RGH2\_M6 e 7, RGH3BC\_M4, 9 and 10, and RGH7\_M8. In the resistant clones, ten unique RGHS-SSCP marks had been identified: RGH1\_M1 e M5, RGH3BC\_M1, 2, 14 e 16, RGH4\_M6, RGH5\_M1, 2 e 5.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Descrição das possíveis interações entre plantas e patógeno.....5
- Figura 2.** Infecção hemibiotrófica do *Colletotrichum lindemuthianum*.....7
- Figura 3.** Resumo dos vários processos e caminhos de mecanismo de defesa da planta após a interação com o patógeno. PV - patógeno virulento e PA – patógeno avirulento.....8
- Figura 4.** Motivos funcionais encontrados em produtos protéicos do gene *RPS2*.....12
- Figura 5.** Representação esquemática de proteínas *R* codificadas por genes *R* clonados de diferentes espécies de plantas.....13
- Figura 6.** Representação esquemática do mapa genético da população F<sub>2</sub> de cacaueteiro ICS 1 X SCA 6..... 20
- Figura 7.** Diagrama da técnica PCR-SSCP comparando as mobilidades eletroforéticas dos fragmentos amplificados do tipo selvagem e tipo mutante com *primers* marcados. ....22
- Figura 8.** Representação esquemática do princípio da técnica de SSCP, diferenciando indivíduo homocigoto e indivíduo heterocigoto.....23

<b>Figura 9.</b> <i>Screening</i> de primers RGHs com gel de agarose a 3%.....	39-40
<b>Figura 10.</b> <i>Screening</i> de primers RGHs com gel de acrilamida a 6%.....	40
<b>Figura 11.</b> <i>Screening</i> de primers RGHs em gel de acrilamida SSR a 6%.....	41
<b>Figura 12.</b> Resultado da otimização da técnica SSCP. Gel SSCP 6% segundo protocolo de Ah/Judelson (2000).....	44
<b>Figura 13.</b> Detecção de polimorfismos entre os clones de cacauero em gel de acrilamida a 6% SSCP, validando a otimização da técnica SSCP descrita para cacau neste estudo de diversidade genética.....	45
<b>Figura 14.</b> Histograma da distribuição de freqüências das dissimilaridades genéticas dos pares de genótipos.....	51
<b>Figura 15.</b> Dispersão dos grupos raciais de clones de cacauero considerados representantes da diversidade da espécie, baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas.....	57
<b>Figura 16.</b> Dispersão dos clones de cacauero incluindo-se os clones selecionados em fazendas, baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas.....	69

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação das cinco classes de genes de resistência a doenças clonados de diferentes espécies de plantas.....10
- Tabela 2.** Lista de clones, por ordem alfabética, agrupada em clones selecionados por produtores e clones considerados como âncoras para estudo de diversidade em genes candidatos à resistência a doenças no cacauero.....28-29
- Tabela 3.** *Primers* RGHs desenhados a partir de regiões conservadas de genes candidatos à resistência a doenças em plantas, usados para este estudo de diversidade em clones de cacauero.....32
- Tabela 4.** Polimorfismos encontrados nos 10 *primers* RGHs, a partir do número de marcas (ssDNA) geradas, número de marcas polimórficas e monomórficas, percentual de polimorfismo e média de marcas por *primer*.....46
- Tabela 5.** Representação esquemática de marcas de ssDNA amplificadas por *primers* RGHs que caracterizaram grupos de clones de cacau suscetíveis e resistentes a doenças.....58
- Tabela 6.** Dissimilaridades médias dos grupos de clones estudados (Conjunto, seleções por fazendeiros e âncoras) e destes grupos em relação ao SCA 6...52

**Tabela 7.** Dissimilaridades Genéticas Médias de cada clone em relação aos demais.....53

**Tabela 8.** Nível de Heterozigose de cada clone em relação aos 10 locos RGHs. Determinando a quantidade de locos heterozigotos, homozigotos e perdidos, além do nível de heterozigose dos clones.....54-55

## 1. INTRODUÇÃO

Genes que conferem resistência às plantas pertencem a dois grupos principais: genes de reconhecimento e sinalização de sinais e genes de defesa. O primeiro grupo representa os genes envolvidos no reconhecimento do patógeno e/ou na sinalização da transdução de sinais, chamados de genes de resistência ou genes *R*, os seus análogos (RGAs) e os seus homólogos (RGHs). E o segundo grupo representa os genes envolvidos em mecanismo de defesa, como os genes codificadores das proteínas WRKY (de regulação) e das proteínas PRs (de inibição do crescimento do patógeno), cujo produto é formado em resposta ao reconhecimento do patógeno (LANAUD et al., 2004).

Acredita-se que os genes de resistência a doenças em plantas são responsáveis por codificar receptores para reconhecimento específico dos produtos dos genes de avirulência *Avr* sintetizados pelo patógeno. A interação dos genes *R* e dos genes *Avr* é iniciador da cascata de transdução de sinais, resultando em processos de defesa da planta. Estes processos levam à resistência da planta e à síntese de produtos reguladores da resposta de hipersensibilidade. Esta interação gene-a-gene foi proposta por Flor (1971).

A planta apresenta, dentre muitas alterações para esta resposta ao patógeno, aumento na intensidade de respiração nos tecidos parasitados, paralização da fotossíntese nos tecidos, diminuição da permeabilidade em direção à extremidade da hifa e por fim morte da célula vegetal (BALARDIN, 2002).

Muitos genes envolvidos na interação planta-patógeno (genes candidatos à resistência) têm sido seqüenciados, clonados e suas funções vêm sendo estudadas (LANAUD et al., 2004). Genes *R* apresentam homologia entre si,

particularmente em certos domínios conhecidos, tais como as repetições de aminoácidos leucina (LRRs), sítios de adesão a nucleotídios (NBSs), função quinase, receptor de interleucina-I, assim permitindo a classificação destes genes. Os genes NBS/LRR são abundantes nas plantas, sendo a maior classe dos genes de resistência.

Estudos sobre a organização destes genes no genoma de plantas demonstram que os genes *R*, RGHs e RGAs estão distribuídos em múltiplas cópias em cluster por todo o genoma e/ou em cópias individuais (BORRONE et al., 2004).

A análise da evolução destes genes *R* demonstra uma alta taxa de duplicação e recombinação entre os genes pertencentes a este cluster, aumentando a variabilidade dos mecanismos de defesa da planta (MONOSI et al., 2004).

A descoberta de similaridades estruturais entre estes genes de resistência e de defesa possibilitou a interessante estratégia de identificar genes homólogos (BERTIOLI et al., 2004a, BERTIOLI, 2004b) e análogos a genes de resistência em diversas outras espécies vegetais distantes e correlatas já seqüenciadas por meio da técnica de PCR com *primers* degenerados. Com os produtos deste PCR faz-se o seqüenciamento e o alinhamento destes fragmentos com as seqüências dos genes já conhecidos a fim de desenhar *primers* seqüência-específicos de domínios conservados como NBS, LRR e quinases e, portanto seqüências candidatas. Estas estratégias podem associar tais seqüências candidatas como marcadores genéticos moleculares altamente polimórficos para a piramidação de genes de resistência em cultivares melhoradas. Também podem ser usados para mapeamento genético como citado nos trabalhos de Kuhn (2003) e estudos de diversidade genética.

A obtenção de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e podridão-parda constitui uma prioridade para o Programa de Melhoramento Genético do Cacaueiro do Sul da Bahia (PINTO & PIRES, 1998) em desenvolvimento pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005) foi registrada na Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1989). A partir da sua introdução, a lavoura cacaueira de 600 mil hectares foi dizimada, onde a

produção que era de 400 mil toneladas declinou para 145 mil em 2006 (ZUGAIB et al., 2006). A podridão-parda, causada pelos fungos *Phytophthora* spp, também causa muitos danos à produção, especialmente em anos de muitas chuvas, sendo responsável por perdas de até 30% na produção dos frutos (MEDEIROS, 1977, LUZ et al., 1997).

Neste contexto é de fundamental importância a realização da caracterização e avaliação dos acessos de cacau para resistência a essas doenças no germoplasma e experimentos da CEPLAC visando conhecer as potencialidades dos mesmos e a variabilidade genética para uso em trabalhos de melhoramento genético.

Vários trabalhos com marcadores moleculares RAPD, AFLP, SSR (YAMADA et al., 2001, 2002, 2003a; FALEIRO et al., 2001c, 2002a) têm sido realizados a fim de caracterizar diversidade genética entre os genótipos de cacau resistente e suscetíveis a doenças, mas poucos trabalhos foram feitos com análise de polimorfismos tão específica como a análise dentro de genes candidatos envolvidos com a defesa e a resistência do cacau.

Os objetivos deste estudo foram: i) otimizar a técnica SSCP para análise de polimorfismo em cacau baseada em eletroforese em gel de acrilamida, corado com prata, e validar esta técnica em regiões gênicas ligadas a resistência a doenças (RGHs) em clones de cacau resistente e suscetíveis, por comparações eletroforéticas; ii) avaliar o nível de diversidade genética entre clones de cacau selecionados por produtores e clones de diferentes países com base no polimorfismo dos RGHs; iii) identificar possíveis marcas RGH-SSCP exclusivas de clones resistentes e suscetíveis que possam representar alelos alternativos para resistência e suscetibilidade dos clones em futuras seleções e cruzamentos dentro do programa de melhoramento da CEPLAC; e iv) avaliar o nível de heterozigose dos locos RGHs de clones de cacau.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Genética da resistência em plantas: Interação planta-patógeno

Estudos sobre resistência genética de plantas a doenças mostram que o controle é, em sua maior freqüência, realizado por genes de efeito maior (AGRIOS, 1997, BORÉM, 1998, RIBEIRO et al., 2001, QUEIROZ et al., 2003). Segundo Ribeiro et al. (2001), estes genes de efeito maior ocorrem freqüentemente em números elevados, por causa da maior facilidade de identificá-los.

Os genes para resistência no hospedeiro são, geralmente, dominantes (*R*), enquanto os genes para suscetibilidade são recessivos (*r*). No patógeno, por outro lado, os genes para avirulência (falta de habilidade para causar infecção) comportam-se como dominantes (*Avr*), em geral, enquanto os genes para virulência são recessivos (*avr*) (FLOR, 1971). Logo, a resistência só ocorre quando os genes complementares são dominantes tanto no hospedeiro quanto no patógeno, revelando o clássico modelo gene-a-gene.

A herança poligênica da resistência tem sido também reportada, mas em menor freqüência devido à dificuldade natural de seu estudo e sua comprovação do que propriamente sua baixa freqüência de ocorrência em plantas. No entanto, com os estudos da herança de vários patossistemas, a resistência poligênica parece predominar. Por exemplo, tratando-se de resistência a insetos, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação a nível molecular e genético. A estes níveis, sabe-se que há indução de genes na planta semelhantes àqueles relacionados com o mecanismo de defesa a lesões mecânicas. Porém, parecem existir locos gênicos em plantas, que podem estar relacionados com a resistência de plantas

a insetos. Em nematóides já foram identificados genes de resistência e genes relacionados com defesa vegetal, que são induzidos na interação planta-nematóide. Esta situação apresenta, por isso, analogia ao que ocorre com os vírus, fungos e bactérias. Em alguns casos, parece haver também uma resposta de hipersensibilidade durante a interação planta-nematóide (WILLIAMSON & HUSSEY, 1996). Porém, existem diferenças devido à complexa relação destes organismos com as plantas (CORDEIRO & SÁ, 2000).

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível (Figura 1). A interação compatível resulta da habilidade do patógeno em sobrepor as complexidades das respostas de defesa do hospedeiro (JACKSON & TAYLORBI, 1996). O patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta. Estas são rapidamente ativadas, retardando o crescimento do patógeno, impedindo assim sua multiplicação e desencadeando a resistência (CORDEIRO & SÁ, 2000; FLOR, 1942, 1971; JACKSON & TAYLORBI, 1996).

Tipo de Plantas	Patógenos Virulentos (ausência do gene <i>avr</i> )	Patógenos Avirulentos (presença do gene <i>avr</i> )
Plantas COM gene de RESISTÊNCIA	Ativação LENTA do mecanismo de defesa DOENÇA (Interação Compatível)	Ativação RÁPIDA do mecanismo de defesa SOBREVIVÊNCIA DA PLANTA (Interação Incompatível)
Plantas SEM gene de RESISTÊNCIA	Ativação LENTA do mecanismo de defesa DOENÇA (Interação Compatível)	Ativação LENTA do mecanismo de defesa DOENÇA (Interação Compatível)

Figura 1. Descrição das possíveis interações entre planta e patógeno, baseados em STASKAVICZ et al. (1995), de acordo com CORDEIRO & SÁ, (2000).

A interação planta-patógeno pode ser estudada nas seguintes fases: reconhecimento genético entre a planta e o patógeno; processo de transdução de sinal; ativação de genes; e ativação do mecanismo de resistência (CORDEIRO & SÁ, 2000).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, frente ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas com o

objetivo do melhoramento vegetal (KOMBRINK & SOMSSICH, 1995, DEMPSEY et al., 1998, GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1998, CORDEIRO & SÁ, 2000).

A interação que se estabelece entre plantas e patógenos constitui-se no confronto entre dois sistemas morfo-genético-fisiológicos, através do qual cada sistema procura predominar. Desta forma, tanto patógeno como hospedeiro procuram garantir sua sobrevivência (BALARDIN, 2002).

As células vegetais respondem ao ataque do patógeno através de uma série de reações bioquímicas. São freqüentemente associadas com a produção de substâncias tóxicas em concentrações suficientemente altas para inibir o crescimento dos fitopatógenos. Normalmente os compostos fenólicos são associados a este processo. Sua síntese ou acúmulo parece ser acelerado após a infecção, pois são encontrados mesmo em plantas sadias (compostos fenólicos) e, outros fenóis (fitoalexinas) não estão presentes em plantas sadias sendo produzidos por estímulo do patógeno (BALARDIN, 2002).

A resistência de plantas a patógenos é considerada uma regra dentro do complexo das interações patógeno-hospedeiro, enquanto que a suscetibilidade é uma exceção (KÚC, 1987). Resistência pode ser conceituada como a capacidade da planta em alterar o curso normal da patogênese, ou seja, sua capacidade em evitar ou atrasar o estabelecimento do patógeno nos seus tecidos. É um processo extremamente dinâmico composto de diversos sistemas capazes de atuar integrada ou isoladamente (BALARDIN, 2002).

O nível de resistência é uma consequência da velocidade e eficácia da ativação destes sistemas. Neste sentido destaca-se a variabilidade genética das plantas como um reservatório de genes envolvidos na resistência (BALARDIN, 2002). Os patógenos, por sua vez, apresentam-se igualmente diversos quanto à suas características morfo-genético-fisiológicas, com níveis variáveis de virulência, demonstrando claramente a habilidade que os patógenos possuem em adaptar-se aos diversos componentes da resistência expressas pelas plantas. Wei et al. (2000) e Balardin (2002) mostraram que a proteína estrutural do pilus Hrp (HrpA) é requerida pela linhagem DC3000 do *Pseudomonas syringae* pv. tomato para causar doença em *Arabidopsis* e para elicitar resposta de hipersensibilidade em tabaco e tomate, demonstrando a variabilidade de virulência da bactéria.

### 2.1.1. Hipersensibilidade (HR)

A HR é conhecida por resultar da interação específica em nível celular do produto do gene *R* e do produto do gene *Avr* (RIBEIRO et al., 2001). Geralmente é uma resposta rápida e localizada na área de infecção (CORDEIRO & SÁ, 2000) em que as células do hospedeiro invadidas e as células vizinhas morrem rapidamente após o contato com o patógeno (AGRIOS, 1988; RIBEIRO et al., 2001). Desta maneira acredita-se que a planta impede a multiplicação do patógeno nas células infectadas, limitando e interrompendo o processo da disseminação da infecção. Morfologicamente, a resposta de hipersensibilidade é reconhecida como uma clorose localizada, progredindo para uma lesão necrótica (CORDEIRO & SÁ, 2000). Segundo Mendgen & Hahn (2002), um patógeno hemibiotrófico, como o exemplo do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, depois da penetração na parede epidérmica da planta, inicia o crescimento como um fungo biotrófico com hifa intracelular primária em um ou poucos dias. Posteriormente, uma hifa secundária é formada matando as células hospedeiras e proliferando por crescimento necrótico (Figura 2). Este é um bom exemplo para servir de analogia à infecção do fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero, *Moniliophthora perniciosa* também hemibiotrófico.

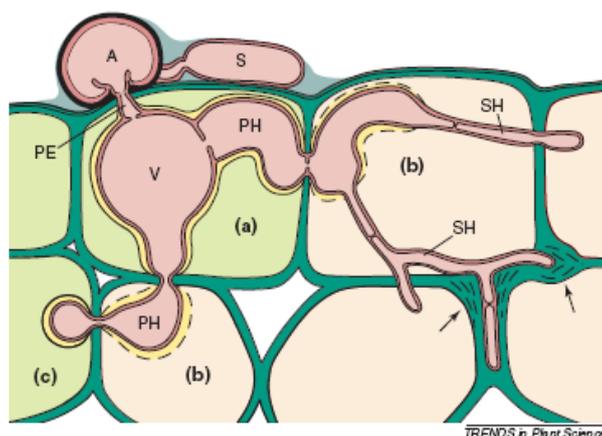


Figura 2: Infecção hemibiotrófica do *Colletotrichum lindemuthianum*. Esporos (S) se aderem à superfície do hospedeiro, germinam e formam tubo germinativo, que se diferencia em apressório (A). A penetração da hifa (PE) desenvolve uma pressão mecânica sobre a parede celular e secreta enzimas hidrolíticas e proteolíticas. A penetração da hifa dentro da célula epidérmica forma uma vesícula (V) e a hifa primária (PH). O protoplasma do hospedeiro permanece vivo em uma relação de parasitismo na fase biotrófica (a). Um ou dois dias após penetração, a membrana plasmática do hospedeiro se desintegra, devido ao acúmulo de enzimas degradativas liberada pela hifa secundária (SH), elicitando respostas de defesa do hospedeiro e levando a morte da célula (b). Havendo mais colonização há mais infecção das células vegetais (c). Fonte: JACKSON & TAYLORBI (1996) e MENDGEN & HAHN (2002).

Ward (1902) também observou que um fungo patogênico penetrava com suas hifas em hospedeiros resistentes e suscetíveis, não tendo observado diferenças entre o comportamento de ambos até que um contato direto fisiológico fosse estabelecido (BALARDIN, 2002).

A planta hospedeira apresenta alterações fisiológicas devido a hipersensibilidade, tais como, aumento na intensidade da respiração nos tecidos parasitados, paralização da atividade fotossintética nos tecidos com reação parabiótica, e diminuição da permeabilidade em direção a extremidade das hifas (clorose ao redor da área atacada). A morte dos tecidos tem sido atribuída à toxicidade de produtos do metabolismo do patógeno (BALARDIN, 2002). Os diversos processos e caminhos do mecanismo de defesa da planta estão resumidos na Figura 3.

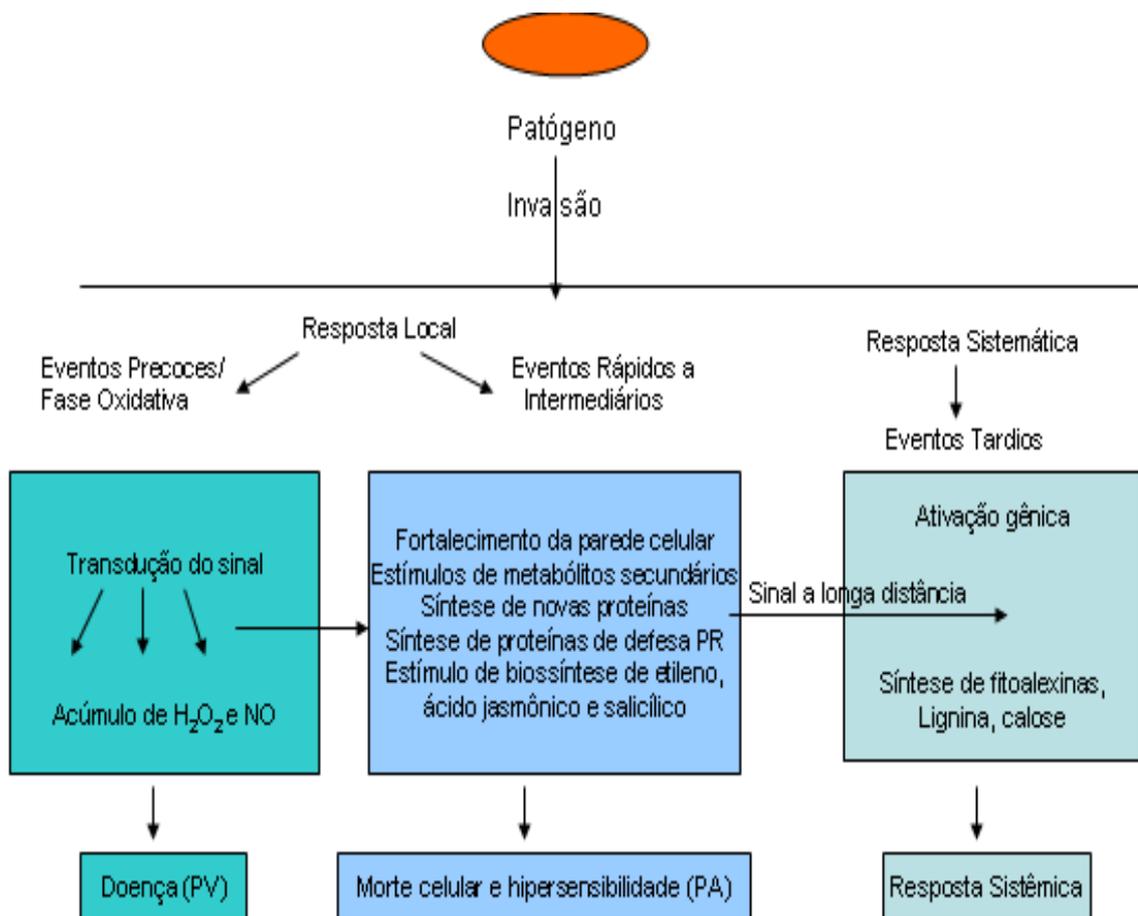


Figura 3: Resumo dos vários processos e caminhos de mecanismo de defesa da planta após a interação com o patógeno. PV - patógeno virulento e PA – patógeno avirulento. Adaptada de CORDEIRO & SÁ (2000).

### 2.1.2. Interação gene-a-gene

Em 1940, FLOR, usando o linho (*Linum usitatissimum*) e o fungo causador da ferrugem - *Melampsora lini*, estudou a herança de resistência da planta e a herança de virulência do patógeno. Este trabalho revelou um clássico modelo gene-a-gene proposto para a resistência ocorrer quando pares complementares de genes dominantes, um no hospedeiro e outro no patógeno, são encontrados (FLOR, 1942, 1971; HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997).

Muitos genes de resistência de efeito maior operam de forma gene-a-gene. Para cada gene de resistência no hospedeiro há o gene correspondente de avirulência no patógeno (FLOR, 1971), e o mesmo pode iniciar a reação hipersensitiva (HR) que conduz à incompatibilidade (RIBEIRO et al., 2001).

Vários modelos têm sido propostos para explicar as bases moleculares do reconhecimento no sistema gene-a-gene, sendo o mais aceito o modelo elicitor-receptor. Este modelo postula que genes *avr* do patógeno codificam moléculas elicitoras, as quais em interação com moléculas receptoras específicas, codificadas pelo gene *R* no hospedeiro, induzem resistência ao desenvolvimento da doença em plantas. Caracterizações moleculares de elicitores patogênicos e de genes *R* de plantas têm revelado inúmeras características sugestivas de tal interação elicitor-receptor (DARCICK & CULVER, 1997). Vários determinantes virais estão envolvidos em elicitar algumas das HRs em plantas, como por exemplo, a proteína da capa (CP) do Tobamovirus que elícita HR conferida pelo gene *N* em *N. sylvestris* e genes *L* em pimenta. Albersheim & Anderson-Prouty (1975) e Darcick & Culver (1997, 2002) exemplificam a indução de uma HR no tecido vegetal, onde um gene *Avr* do patógeno codifica uma glicosil transferase envolvida na síntese de glicoproteínas de superfície, as quais seriam reconhecidas por receptores transmembrânicos codificados por genes *R*. Várias são as evidências que corroboram este modelo, entre elas a identificação de sítios de ligação específicos e de alta afinidade por moléculas elicitoras na membrana plasmática de células vegetais, produção de moléculas supressoras do sistema de defesa por fungos, síntese de enzimas capazes de degradar fitoalexinas por certos patógenos e a clonagem de genes *avr* e seus correspondentes genes *R* (BALARDIN, 2002).

## 2.2. Genes de resistência em plantas: classificação, funções e distribuição no genoma

Na Tabela 1 encontram-se as cinco classes de genes de resistência a doenças em plantas (HC-toxina redutase, Quinase, NBS/LRR: não TIR e TIR, LRR e LRR/Quinase), citando exemplos de genes de cada classe, as espécies de plantas em que foram identificados, o patógeno o qual estabelece um tipo de interação com seus genes *avr* e a caracterização das proteínas *R* (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997).

Tabela 1. Classificação das cinco classes de genes de resistência a doenças clonados de diferentes espécies de plantas. Adaptada de HAMMOND-KOSACK & JONES (1997)

Classe	Gene	Planta	Patógeno	Características das Proteínas <i>R</i>
HC-toxina redutase	<i>Hm1</i>	Milho	<i>Helminthosporium maydis</i> (raça 1)	Enzima detoxificante da toxina
Quinase	<i>Pto</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>tomato</i>	Proteína quinase intracelular serina/treonina
NBS/LRR Não TIR	<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>tomato</i>	Zíper Leucina (LZ) ou CC/NBS/LRR
	<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>maculicola</i>	Proteína intracelular com LZ amino terminal, NBS e LRR
	<i>I2</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>lycopersicon</i>	
NBS/LRR TIR	<i>N</i>	Tabaco	Vírus Mosaico	TOLL/NBS/LRR
	<i>L6, M</i>	Linho	<i>Melampsora lini</i>	Proteína intracelular com domínio amino terminal homólogo da Toll de <i>Drosophila</i> , e NBS e LRR
	<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	
LRR	<i>Cf-9, Cf-2, Cf-4, Cf-5</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	Proteína LRR extracelular com domínio membranar e citoplasmático
LRR/Quinase	<i>Xa-21</i>	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Proteína extracelular LRR com domínio membranar e quinase citoplasmática

Genes de resistência a doenças em plantas apresentam homologia entre si, particularmente em certos domínios conhecidos, tais como as repetições do aminoácido leucina, ou LRR (do inglês Leucine Rich Repeats) na posição 3' terminal, e os sítios de adesão de nucleotídeos na posição 5' terminal, ou NBS (do inglês Nucleotide Binding Sites) (LEISTER et al., 1998, MALVAS, 2003). A

caracterização destes domínios conservados dos genes de resistência permite a classificação dos mesmos. Estes domínios podem estar envolvidos no fenômeno de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro durante o processo de infecção (MALVAS, 2003; QUIRINO, 2003; LANAUD et al., 2004).

A maior classe de genes de resistência caracteriza-se por apresentar o domínio NBS/LRR, incluindo genes como *RPS2*, *RPM1*, *N*, *L6*, *M*, *RPP5*, *PRF* e *I2C-1* (LEISTER et al., 1998). Proteínas contendo os motivos NBS e LRRs supostamente reconhecem produtos extracelulares de genes de avirulência de patógenos e iniciam as respostas de defesa ao enviar sinais para outras células do hospedeiro.

Proteínas que contêm LRRs são proteínas que apresentam séries de aminoácido leucina repetidos em número de 24 ou mais a intervalos regulares, podendo conter ainda outros resíduos hidrofóbicos, asparaginas e prolinas. Os motivos de leucina geram uma estrutura terciária semelhante a uma mola, com cada hélice representando um motivo de leucina repetido. A função dos LRRs parece ser de mediação da interação entre proteínas, podendo atuar extracelularmente como receptor do elicitor codificado pelo gene de avirulência do patógeno ou intracelularmente, em passo anterior à via de transdução dos sinais envolvidos no processo de resistência (BENT et al. 1994; BENT, 1996). Supõe-se que a porção amino terminal do domínio de LRR, que é altamente variável, possui papel mais importante no reconhecimento que a porção carboxi terminal, que é mais conservada (DIXON et al., 1996, MALVAS, 2003).

A maioria dos genes de resistência apresenta, além dos LRRs, sítios de adesão a nucleotídeos (NBS). Também referidos como *P-loops*, ocorrem em diversas proteínas e são responsáveis por atividades de ligação ao ATP ou GTP, tais como subunidades da ATP sintetase e fatores de alongação do ribossomo. A presença destes domínios em diversas proteínas de genes de resistência sugere que estes sítios podem estar envolvidos na ativação de proteínas quinases e proteínas transportadoras (HAMMOND-KOSAK & JONES, 1997, MALVAS, 2003, QUIRINO, 2003).

Tem-se ainda uma outra classe de genes *R* caracterizada por apresentar LRRs e também função de proteína quinase, mas nenhum NBS (LEISTER et al., 1998, MALVAS, 2003). Os genes *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-9*, *Xa-21* e *Pto* (tomate) possuem

LRR na posição 5' terminal da seqüência e/ou domínio quinase serina/treonina na mesma posição (LEISTER, 1998).

As proteínas *R* com domínios NBS/LRR podem ser divididas em duas subclasses: uma com domínio TIR N-terminal, similar ao domínio citoplasmático Toll de *Drosophila* e ao receptor interleucina (IL-1R) de mamíferos (proteínas conhecidas como TNL ou TIR-NBS-LRR); e uma subclasse com domínio não-TIR N-terminal que possui, na maioria das proteínas *R*, um motivo *coiled-coil* (CC) (proteínas conhecidas como CNL ou CC-TIR-NBS; GOMES, 2005).

O motivo CC, formado por hélices que contém cadeias laterais com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, é encontrado em uma variedade de proteínas relacionadas com diversos processos biológicos. Mostra-se envolvido em interações proteína-proteína, mas seu papel na resistência a doenças ainda está por ser elucidado. Em *Arabidopsis*, proteínas *R* com motivo CC, como *RPS2* (Figura 4), *RPS5* e *RPM1*, requerem diferentes componentes das vias de transdução de sinais que culminam na resistência daqueles requeridos por proteínas TIR-NBS-LRR, como *RPP1*, *RPP5* e *RPS4*, sugerindo o envolvimento desse motivo com a sinalização e não com o reconhecimento (van der BIEZEN et al., 2002, MARTIN et al., 2003). O domínio TIR apresenta similaridade com domínios de proteínas presentes em animais (Toll e IL-1R) e requer componentes de sinalização diferentes dos utilizados pelas proteínas CC-NBS-LRR no processo de defesa. Além do papel de sinalização celular, o domínio TIR pode ter ainda a função de reconhecimento do patógeno (LUCK et al., 2000; YOUNG, 2000; MARTIN et al., 2003; NIMCHUK et al., 2003, GOMES, 2005).

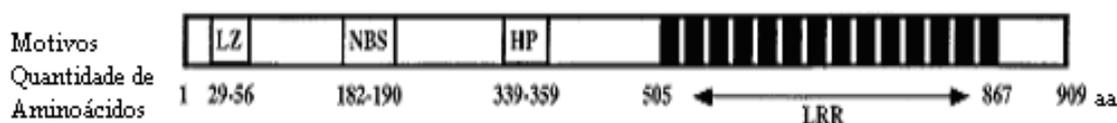


Figura 4. Motivos funcionais encontrados em produtos protéicos do gene *RPS2*. As proteínas têm 909 longos aa e contêm os seguintes motivos: zíper de leucina (LZ), sítio de ligação a nucleotídeo (NBS), região hidrofóbica (HP) e séries de 14 repetições de leucina (LRR). Adaptada de CAICEDO et al. (1999).

Existem ainda outras proteínas *R* pertencentes a classes menos comuns, mas não menos importantes como as proteínas da família serina-treonina-quinase (STK); proteínas com domínio LRR extracitoplasmático (eLRR) ancorado a um domínio transmembrana (TM); e proteínas da família eLRR-TM-quinase.

Esta última apresenta uma estrutura que contém todos os domínios capazes de reconhecimento e transdução de sinais. Assim, o domínio eLRR estaria apto a reconhecer a presença de elicitores produzidos pelos patógenos e o domínio quinase localizado no citoplasma seria o ativador de cascatas de transdução de sinais. Domínios quinases estão envolvidos com a via de transdução de sinal através de fosforilações, sendo extremamente importantes na ativação dos mecanismos de defesa da planta (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997; ROMEIS, 2001; MARTIN et al., 2003, GOMES, 2005).

Existem ainda proteínas *R* que não pertencem às classes anteriores como a HC- toxina redutase, que é uma enzima codificada pelo gene *Hm1* de milho capaz de inativar a toxina produzida pelo patógeno (JOHAL & BRIGGS, 1992; HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997); as glicoproteínas de superfície celular que contém receptor de sinal de endocitose (ECS), como a codificada pelo gene *Ve* de tomateiro (KAWCHUK et al., 2001); e proteínas TIR-NBS-LRR, como a codificada pelo gene *RRS1* de *Arabidopsis*, que contém na porção C-terminal, domínios de sinalização nuclear (NLS) junto a um motivo característico de proteínas ativadoras de transcrição da família WRKY (DESLANDES et al., 2002, GOMES, 2005).

A Figura 5 apresenta esquematicamente o posicionamento e as possíveis funções das diversas classes das proteínas *R*, descritas nesta seção.

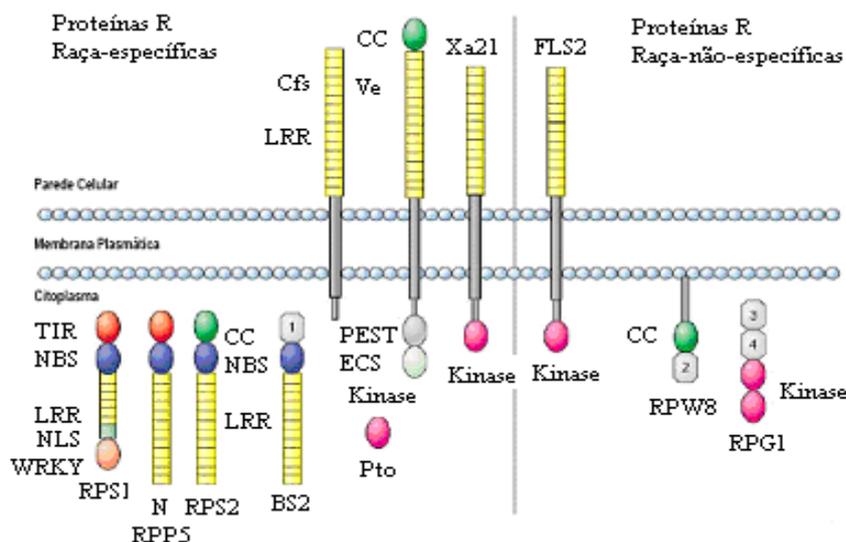


Figura 5: Representação esquemática de proteínas *R* codificadas por genes *R* clonados de diferentes espécies de plantas. Adaptada de HAMMOND-KOSACK & PARKER (2003), citado por GOMES (2005).

Genes de resistência freqüentemente são encontrados em múltiplas cópias agrupadas no genoma, normalmente ocorrem em certos braços do cromossomo, às vezes tão fortemente juntos que podem ser considerados como locos complexos, e verdadeiras séries alélicas (RIBEIRO et al., 2001). Em cacau, foi relatado um pequeno *cluster* formado por dois homólogos de genes de resistência (RGH4 e RGH5) localizados no grupo de ligação 7 do mapa genético da população F<sub>2</sub> de SCA 6 X ICS 1, separados por cerca de 4 cM (KUHN et al., 2003).

Teoricamente, *clusters* de genes funcionariam como um reservatório de DNA que suporta acúmulo de mutação devido à alta freqüência de recombinações desiguais entre os genes muito próximos. A organização em *clusters* de genes contendo os domínios NBS/LRRs mostrou-se conservada entre membros de diferentes taxas (LEE et al., 2001; ZHU et al., 2002). Para as monocotiledôneas, embora não exista uma exata colinearidade quanto à localização dos genes homólogos no mapa de arroz, cevada e milho, existe uma organização geral comum entre estas espécies (MALVAS, 2003).

Acredita-se que a estrutura física dos agrupamentos auxilia na geração e manutenção da diversidade dos genes *R* ocorrendo freqüentemente recombinação desigual causando duplicação, trocas de pares de bases desiguais, deleção parcial e formando novos genes quiméricos (van der VOSSSEN, 1997; MEYERS et al., 2005). Assim, recombinações entre alelos ou entre seqüências relacionadas contribuem para amplificação da variabilidade genética dos mecanismos de defesa das plantas, gerando novos alelos capazes de ativar resposta de defesa às novas raças do patógeno ou seqüências análogas a genes de resistência (RGAs) (MEYERS et al., 1999; HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; YOUNG, 2000; HULBERT et al., 2001; ZHU et al., 2002; LEISTER, 2004; GOMES, 2005).

### **2.3. Melhoramento genético do cacauero visando resistência a doenças**

A mais importante medida de controle das doenças do cacauero tem sido a utilização de genótipos resistentes, por ser a mais econômica, estável e ambientalmente desejável. As populações cacaueras exibem ampla variabilidade

para resistência, provavelmente de natureza poligênica (ROBINSON, 1979, ZADOKS, 1997). Em vista disso, o melhoramento busca níveis adequados de resistência, por meio do estudo dos componentes da resistência, assegurando sua maior durabilidade e estabilidade. Dados de resistência em campo, obtidos em condições experimentais, são úteis para os programas de seleção de genótipos resistentes (ZADOKS, 1997; LUZ et al., 1999a; PIRES et al., 1999). A prática da renovação de cultivares suscetíveis por aquelas que expressam resistência durável aos patógenos tem sido a melhor solução para o controle das doenças. Portanto, um dos objetivos dos Programas de Melhoramento do Cacau é desenvolver cultivares tolerantes ou resistentes que possam ser usados no manejo ou controle de doenças. Nesse sentido, muitos trabalhos estão sendo conduzidos nos diferentes centros de pesquisa de cacau, visando identificar fontes de resistência às diferentes doenças e seu uso para cruzamentos controlados, visando à obtenção de populações segregantes.

No Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) estudos vêm sendo realizados para a compreensão da diversidade genética em clones resistentes de cacaueiro. Em 2001, Marita et al., avaliaram a diversidade genética de 270 acessos de *T. cacao* do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do CEPEC, baseados em marcadores RAPD, encontrando ampla diversidade genética entre os acessos. Faleiro et al. (2001c) avaliaram a diversidade genética nas atuais variedades clonais de cacau recomendadas aos produtores pelo CEPEC (TSH, TSA, CEPEC e EET), utilizando os marcadores RAPD, AFLP e SSR, e também notaram existir ampla diversidade. Pires (2003) também conduziu avaliações moleculares com marcadores RAPD e SSR a fim de analisar as resistências à vassoura-de-bruxa e à podridão-parda na coleção de germoplasma do CEPEC. O autor identificou acessos mais promissores em relação à resistência à vassoura-de-bruxa, constatando-se a ocorrência de um elevado número de genótipos com forte distinção, muitos dos quais de diferentes origens e com baixa similaridade genética entre si. Santos et al. (2005) avaliaram a variabilidade genética entre e dentro dos grupos de materiais resistentes à vassoura-de-bruxa em 30 clones da série CEPEC (20 descendentes do SCA 6 e 10 não) por meio da técnica de RAPD, encontrando baixa diversidade genética dentro dos grupos, revelando estreita base genética para resistência à vassoura-de-bruxa e, ao contrário do que se esperava, a diversidade foi mais alta nos descendentes do SCA 6 de que

nos não descendentes. Araújo (2005) também estudou a diversidade genética de 88 acessos do BAG do CEPEC com resistência à vassoura-de-bruxa com 12 *primers* SSR. Os acessos CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) 271 e 309 foram considerados os candidatos mais promissores a futuros cruzamentos para a obtenção de novas variedades comerciais que acumule o maior número de genes de resistência à vassoura-de-bruxa, devido as suas resistências à doença e a altas dissimilaridades com clones SCAs. Paim et al. (2006) analisaram progênies de 40 acessos amazônicos (CAB) e de SCA, avaliadas no campo por seis anos para resistência à vassoura-de-bruxa. Segundo as avaliações, houve diferenças no número de vassouras vegetativas em algumas das progênies amazônicas e de SCA, revelando a existência de diferentes genes/alelos de resistência em progênies amazônicas e em descendentes do SCA. Estas novas fontes de resistência são importantes para a piramidação de genes/alelos e, assim, ampliar a estabilidade e durabilidade da resistência.

A interação *T. cacao* x *M. perniciosa*, apesar de sua grande importância, foi pouco estudada até o momento. Diferenças genéticas entre isolados de *C. perniciosa* e de acessos de *T. cacao* têm sido detectadas por marcadores do DNA e por avaliações fenotípicas de patogenicidade e resistência, respectivamente (WHEELER & MEPSTED, 1988; GOMES et al., 2000; PIRES et al., 2001, NIELLA, 2000). Os resultados destes estudos evidenciam que o cacauero apresenta diferentes genes de resistência ao fungo *C. perniciosa*. O controle dessa resistência ainda é desconhecido, onde as hipóteses de controle genético monogênico (gene-a-gene ou resistência vertical), poligênico (efeitos aditivos ou resistência horizontal) (ROBINSON, 1979) ou mesmo controle genético integrado destes dois tipos de resistência precisam ser avaliadas com mais precisão (PARLEVLIET & ZADOKS, 1977, NELSON, 1978, PARLEVLIET et al., 1993, FALEIRO et al., 2002b).

Segundo Rios-Ruiz (2001), melhoramento para resistência é, geralmente, considerado mais complexo que para caracteres agrônômicos ou morfológicos, desde que a eficácia da resistência à doença não é estática, e é influenciada, simultaneamente, pelas características do hospedeiro e pela variabilidade genética do patógeno (agressividade do isolado, seleção genética para incremento de virulência etc.). O conceito de "raças fisiológicas" possibilita a compreensão da variabilidade patogênica em relação ao melhoramento para

resistência condicionados por oligogenes (resistência oligogênica ou vertical). Resistência oligogênica, entretanto, não tem sido encontrada para os principais patógenos do cacau. Por outro lado, evidências da resistência horizontal (poligênica ou parcial ou horizontal) são relatadas na literatura. Nessa última, genótipos de cacau testados em condições uniformes expressam amplitude de resposta, variando desde os muito infectados até aqueles relativamente imunes (LUZ et al., 1999a, PHILLIPS-MORA, 1999b, PIRES et al., 1999, SUAREZ-CAPELLO, 1999, RIOS-RUIZ et al., 2000). A variabilidade da patogenicidade em cacau é, ainda, pouco entendida, e muita pesquisa será necessária para otimizar os esforços do melhoramento.

Resistência parcial é aquele nível de resistência que torna a doença manejável sem, contudo, erradicar o patógeno (ZADOKS, 1997). Resistência parcial é utilizada em muitas culturas anuais contra importantes patógenos (PARLEVLIET, 1989, 1993). Apresenta natureza quantitativa, usualmente poligênica, embora possa ser monogênica em alguns casos (PARLEVLIET & ZADOKS, 1977, FALEIRO et al., 2002b), sendo um fenômeno predominante em culturas perenes, incluindo o cacau (ZADOKS, 1999). O caráter quantitativo da resistência horizontal se manifesta pelo lento progresso da doença, pela redução da quantidade de doença e, conseqüentemente, pela redução do nível de inóculo (van der PLANK, 1963). Na literatura, a resistência poligênica é tratada como sinônimo de resistência durável (JACOBS & PARLEVLIET, 1993). Entretanto, existem diversos casos em que a resistência monogênica tem se comportado também como resistência durável e estável (PRABHU & MORAIS, 1993; van der VOSSSEN, 1997; RIOS-RUIZ, 2001; FALEIRO et al., 2002).

Em cacau, o conceito de durabilidade não está, até o momento, bem documentada. O clone SCA 6, resistente à vassoura-de-bruxa, expressa resistência durável em Trinidad (LAKER et al., 1988a, 1988b), mas não no Equador, onde outro patótipo do fungo é predominante (WHEELER & MEPSTED, 1988), e nem no Peru, onde apresenta relativamente alto nível de infecção (RIOS-RUIZ, 2000, 2001).

Não existe forma para prever durabilidade e estabilidade, as quais somente podem ser identificadas, testando-se por longo período e em múltiplas localidades. O melhoramento para resistência em cacau deve visar níveis adequados de resistência durável. Apesar de novos resultados apontarem

para a importância dos genes de efeito maior para o seu controle, o acúmulo de genes de efeito menor é, ainda, a melhor maneira para obter resistência durável (DIAS et al., 2001). Em cacau, os estudos realizados até agora indicam que a espécie tem ampla variabilidade para a resistência poligênica (ROBINSON, 1979). A partir de avaliações sistemáticas de germoplasma, da aplicação de testes apropriados e, finalmente, da identificação, seleção e cruzamento entre genitores resistentes, pode-se esperar o acúmulo de genes de resistência. Nesse caso, a resistência esperada é a durável (DIAS et al., 2001).

#### **2.4. Homólogos de genes de resistência e suas aplicações**

Um homólogo de gene de resistência (RGHs) é um gene com homologia entre seqüências de DNA que contem um motivo com sitio de ligação a nucleotídeo (NBS) e região rica em leucina (LRR) mostrando significativa identidade de seqüência de aminoácidos com genes de resistência já conhecidos e mapeados em outras plantas (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997; HULBERT et al., 2001, KUHN et al., 2003). Os RGHs são genes candidatos à resistência, visto que embora sejam similares em seqüências a outros genes de resistência, ainda não tiveram sua análise de expressão confirmada como uma resposta ao desafio da planta ao patógeno.

Para otimizar a chance de se obter marcadores ligados a características de interesse, existe o uso dos genes candidatos sabidamente envolvidos nas vias metabólicas da resistência a doenças, por exemplo os genes envolvidos na resposta inicial de reconhecimento de patógenos (genes *R*). Estes genes possuem regiões conservadas denominadas motivos. Segundo Graham et al. (2000), a conservação dos motivos destes genes propiciou o desenvolvimento de *primers* degenerados que amplificam, via PCR, regiões análogas (seqüências similares, mas com função ainda não comprovada) a estes genes de resistência em uma variedade de espécies de plantas cuja estrutura genética é pouco conhecida ou desconhecida, como o cacau e café (NOIR et al., 2001; KUHN et al., 2003, MALVAS, 2003, QUIRINO, 2003). Uma vez amplificados estes RGHs, o desafio é tornar estes fragmentos como marcadores genéticos que represente

um loco único e polimórfico no cromossomo dentro da população alvo (KUHN et al., 2003).

Com os produtos deste PCR faz-se seqüenciamento e alinhamento destes fragmentos com as seqüências dos genes *R* conhecidos a fim de desenhar *primers* seqüência-específicos de domínios conservados como NBS, LRR e quinases e, portanto, seqüências candidatas. Estas estratégias podem associar tais seqüências candidatas como marcadores genéticos moleculares altamente polimórficos para a piramidação de genes de interesse em cultivares melhorados, mapeamento e clonagem dos mesmos em programas de melhoramento.

A vantagem da utilização de homólogos como marcadores moleculares é que estes podem representar genes em potencial, entretanto a homologia de seqüências entre domínios conservados de diferentes genes de resistência não indica necessariamente que estes também sejam genes de resistência (MALVAS, 2003). Genes homólogos são aqueles que, apesar de pertencerem a diferentes organismos, são estruturalmente semelhantes e cumprem funções idênticas. A homologia é usada em Biologia para descobrir características de um novo gene através de genes homólogos a este gene que já possuem anotações precisas de suas características (MALVAS, 2003).

Estes homólogos podem ser utilizados como marcadores moleculares em populações segregantes para genes de resistência a outros patógenos. Os genes homólogos podem não estar sempre associados com o fenótipo de resistência e podem estar ligados a genes *R*, mas a uma grande distância. Para comprovar a associação de um gene com a resistência a um determinado patógeno, plantas suscetíveis devem ser transformadas geneticamente a expressar o fenótipo de resistência quando inoculadas (SHEN et al., 1998, MALVAS, 2003) por isso considera-se os RGHs como genes candidatos.

Kuhn et al. (2003) utilizaram os homólogos de genes de resistência como marcadores moleculares em sete cultivares diferentes de cacau resultando no isolamento de 74 RGHs e, usaram a técnica de Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) para estabelecer a segregação de sete categorias destes marcadores em uma população  $F_2$  segregando para resistência à vassoura-de-bruxa (Figura 6). Um destes RGHs foi localizado no mesmo grupo de ligação do QTL de resistência à vassoura-de-bruxa (QTL VB), o RGH2, e três destes RGHs

foram localizados no mesmo grupo de ligação do QTL de resistência à podridão-parda (QTL PP), como o RGH1, RGH4 e RGH5.

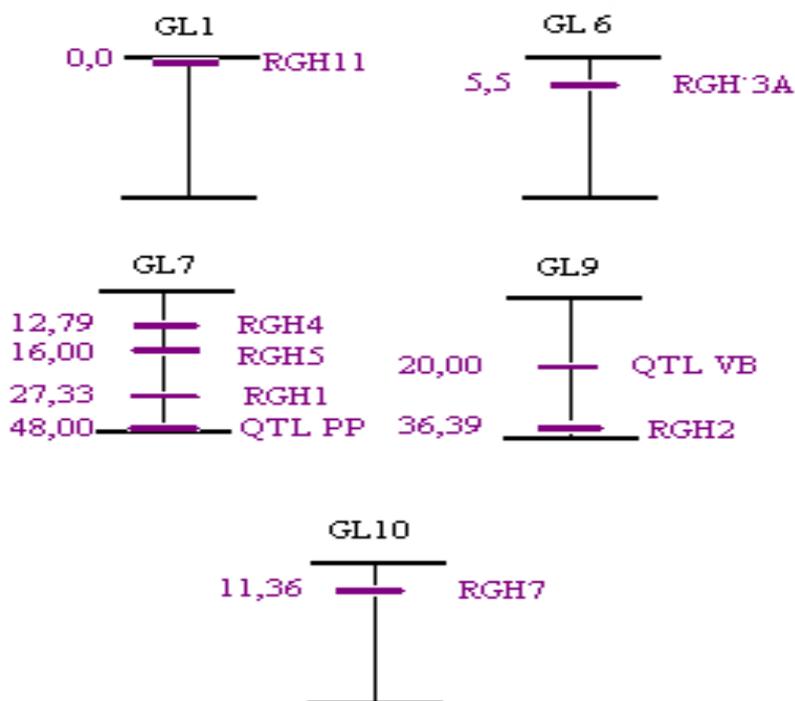


Figura 6. Representação esquemática do mapa genético da população  $F_2$  de cacaueteiro ICS 1 X SCA 6. Com mapeamento de marcadores candidatos à resistência e a defesa da planta os RGHs. QTL à vassoura-de-bruxa (VB) e QTL à podridão-parda (PP). Adaptada de KUHN et al. (2003) e LANAUD et al. (2004).

## 2.5. Marcadores moleculares no estudo de diversidade genética

Diferentes tipos de marcadores moleculares têm sido usados nos estudos de caracterização de diversidade genética de acessos de cacaueteiro (LAURENT et al., 1993; 1994; N'GORAN et al., 1994; LERCETEAU et al., 1997; 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 (FALEIRO et al., 2001a).

A diversidade genética do cacaueteiro têm sido estudada através do uso de sondas de cDNA (LAURENT et al., 1994) e marcadores moleculares genômicos como RAPD (WILDE et al., 1992), AFLP (FALEIRO et al., 2002), microssatélites (FALEIRO et al., 2002) e isoenzimas (YAMADA et al., 2001).

Kuhn et al. (2003) fizeram investigação de RGHs em *Theobroma cacao* e confirmaram o observado para outras plantas (COLLINS et al., 1998; GRAHAM et al., 2000, NOIR et al., 2001), onde há uma elevada diversidade de RGHs e de polimorfismos das seqüências em locos individuais o que lhes faz marcadores genéticos úteis.

A avaliação da diversidade genética entre vários acessos de cacau permite que cruzamentos sejam planejados, utilizando materiais contrastantes geneticamente (DIAS et al., 2001).

Sendo o cacau uma espécie com alta variabilidade genética, o entendimento dessa variabilidade poderá auxiliar, em muito, os programas de melhoramento da cultura (DIAS et al., 2001). O conhecimento da variabilidade genética é importante nos trabalhos de preservação de germoplasma, no desenvolvimento de cultivares superiores, e, também, na seleção de progenitores divergentes para a exploração da heterose em cultivares híbridas (CATTANEO, 2001, DIAS et al., 2001, ARAUJO, 2005), estabelecimento de coleções nucleares, o direcionamento de cruzamentos, até auxiliar na indicação de regiões do centro de diversidade com maior variabilidade genética para coleta de germoplasma.

## **2.6. Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)**

### **2.6.1. A técnica SSCP**

A análise de polimorfismo conformacional de fita simples possibilita rápida diferenciação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes ou até mesmo de mesmo tamanho, mas com variações na seqüência de nucleotídeos (FAJARDO et al., 2005), detectando diferença de mobilidade eletroforética quando há mudança de até uma base nucleotídica (KERR & CURRAN, 1996, FAJARDO et al., 2005).

Na análise de SSCP, o DNA de fita dupla é desnaturado a altas temperaturas, na presença de formamida, e as fitas simples de DNA (ssDNA) são separadas por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida (FAJARDO et al., 2005). Sob condições não desnaturantes as moléculas ssDNA assumem

conformações tridimensionais únicas e estáveis, estruturas estas dobradas por interações intramoleculares, que variam dependendo da seqüência de nucleotídeos (KERR & CURRAN, 1996).

Pequenas mudanças na seqüência de nucleotídeos podem alterar a conformação nas moléculas das ssDNA e, conseqüentemente, sua mobilidade eletroforética. Esta propriedade pode ser explorada para detectar mutações em fragmentos selecionados de DNA, comparando seus padrões eletroforéticos (RUBIO et al., 1996; FAJARDO et al., 2005) como, por exemplo, na Figura 7, diferenças de mobilidade eletroforéticas comparadas entre seqüências tipo selvagem (wt) podem ser visualizadas (KERR & CURRAN, 1996; [http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM\(r\)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html](http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM(r)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html), 2002).

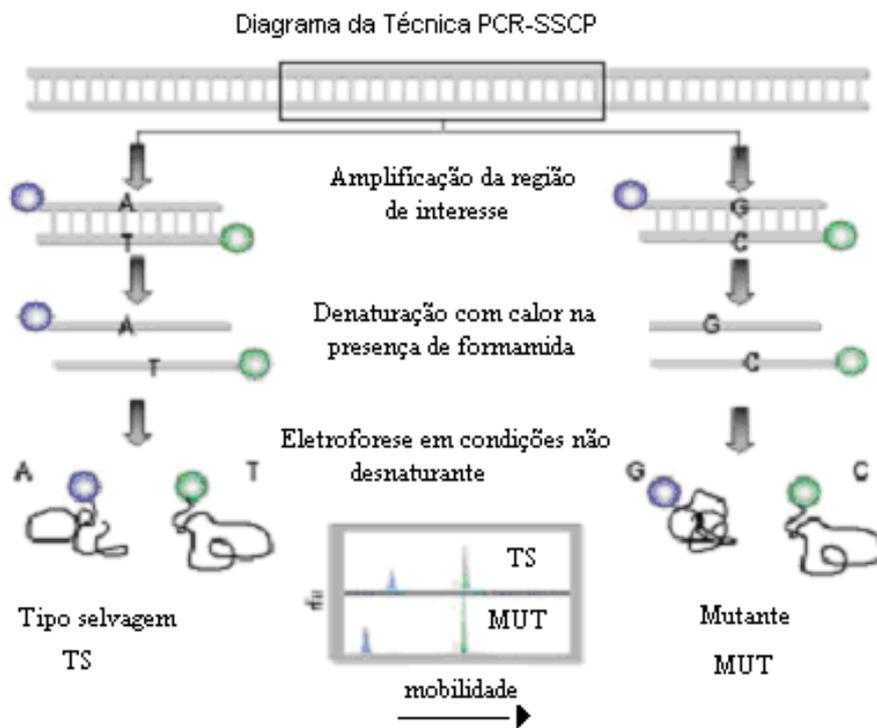


Figura 7. Diagrama da técnica SSCP-PCR comparando as mobilidades eletroforéticas dos fragmentos amplificados do tipo selvagem e tipo mutante com *primers* marcados. Adaptada de [http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM\(r\)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html](http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM(r)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html), 2002.

Entretanto, para se determinar quão significativas são estas diferenças observadas por SSCP, é necessário o seqüenciamento de nucleotídeos destes fragmentos (FAJARDO et al., 2005).

Além de diferenciar as seqüências selvagens das mutantes consegue-se diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos como mostrado na Figura 8 (KERR & CURRAN, 1996). O indivíduo homozigoto A tem duas conformações diferentes originadas de quatro fitas simples de DNA, onde as fitas azuis dos dois cromossomos homólogos são iguais em seqüência nucleotídica e a fita vermelha dos dois cromossomos também iguais. No indivíduo homozigoto B segue-se o mesmo raciocínio, já que apresenta duas conformações diferentes caracterizadas por quatro fitas simples de DNA, duas fitas verdes idênticas e duas fitas amarelas também idênticas em seqüência nucleotídica. Isso mostra que as fitas azuis e vermelhas (indivíduo A) e as fitas verdes e amarelas (indivíduo B) terão conformações diferenciadas, logo mobilidades diferentes no indivíduo heterozigoto.

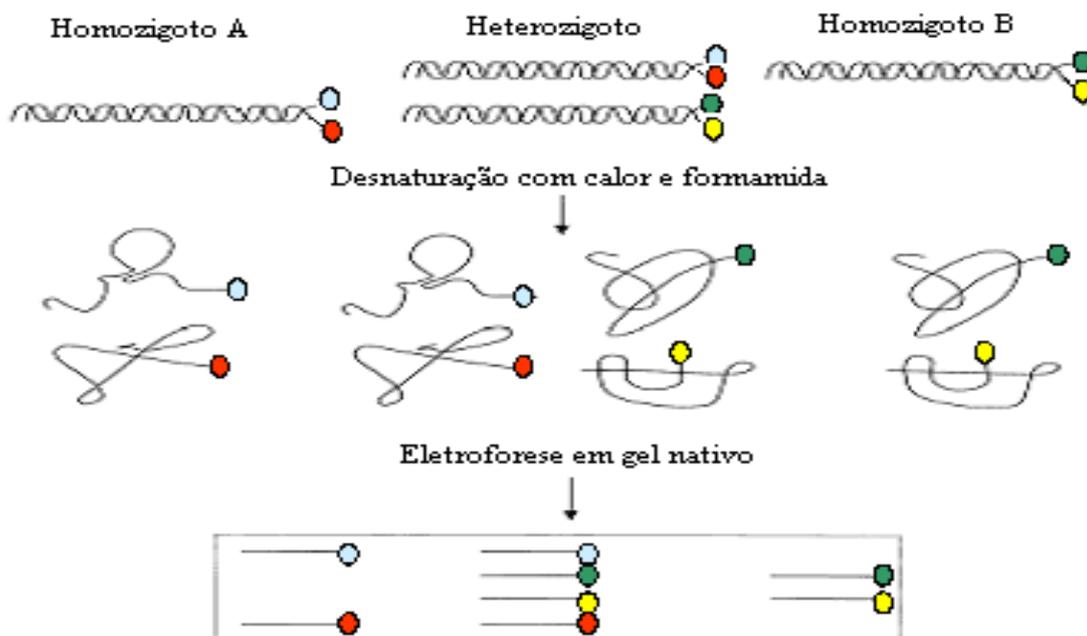


Figura 8. Representação esquemática do princípio da técnica de SSCP, diferenciando indivíduo homozigoto e indivíduo heterozigoto, em uma corrida eletroforética em gel de acrilamida nativo em condições não desnaturantes. Adaptada de Kerr & Curran, 1996.

### 2.6.2. Vantagens

A técnica SSCP pode analisar um grande número de amostras, sendo rápida, de baixo custo e sensível, além de ser capaz de reduzir drasticamente a quantidade de seqüenciamento necessária para comparações acuradas. Pode ser considerada uma técnica simples em relação à eletroforese automatizada em seqüenciadores de genotipagem baseada em *primers* marcados com fluorescência ([http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM\(r\)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html](http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM(r)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html), 2002).

O método PCR-SSCP tem uma vantagem em que um fragmento inteiro de PCR pode ser analisado para detecção de polimorfismo. Este método pode detectar polimorfismo em genes onde outras técnicas de detecção de polimorfismo não revelam (ZHAO, 1998). Além disso, esta técnica tem o poder de caracterizar indivíduos homocigotos e heterocigotos, mostrando a característica de codominância desta técnica PCR-SSCP.

### 2.6.3. Desvantagens

Muitos parâmetros influenciam na otimização e na corrida eletroforética da técnica SSCP. Isso prejudica na reprodutibilidade e sensibilidade dos padrões SSCPs, já que devem-se adaptar parâmetros de temperatura constante, tampão com potencial iônico constante, mesmas condições eletroforéticas de uma corrida para outra, entre outros parâmetros.

Outra desvantagem da técnica SSCP quando baseada em *primers* não marcados por fluorescência e em eletroforese em gel de acrílica corada com nitrato de prata é a leitura dos dados no gel. Poucos são os trabalhos que utilizam estas condições para a eletroforese e, sim *primers* marcados com eletroforese em seqüenciadores automáticos.

A análise de SSCP indica apenas que a mutação existe. Caso, queira determinar com maior precisão a natureza da mutação que causou uma mudança na mobilidade eletroforética em dada amostra, deve-se subsequenteemente realizar o seqüenciamento do fragmento. Além disso, nem todas mutações de

ponto nas dadas seqüências causarão uma mudança detectável na mobilidade eletroforética, logo esta técnica permite a identificação de polimorfismos e não a caracterização da mutação a qual determinou o polimorfismo.

#### 2.6.4. Aplicações em estudos

Polimorfismo Conformacional de Fita Simples é comumente usado no diagnóstico médico e nos estudos com animais, mas tem sido usado em alguns estudos como ferramenta de análises em plantas e em estudos ecológicos (KUHN et al., 2003). SSCP é mais freqüentemente usado como método de detecção de mutações desconhecidas (ANDERSEN et al., 2003).

SSCP é um método sensível, barato e facilmente usado para detecção de haplótipos. Estudos de genética populacional em geral (SUNNUCKS et al. 2000) e mais especificamente avaliações de populações de insetos com vetor humano tem empregado SSCP (BLACK & DUTEAU, 1997, STOTHARD et al. 1998, DE MERIDA et al., 1999, WOHLFORD et al., 1999, GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al., 2000, BIRUNGI & MUNSTERMANN, 2002, HODGKINSON et al., 2002).

Peters et al. (2000) utilizaram SSCP para monitorar a diversidade de bactérias, actinomicetos e fungos em sucessões de comunidade, com três diferentes pares de *primers* específicos para regiões hipervariáveis do rDNA 18S (fungos) e rDNA 16S (actinomicetos e bactérias). Schwieger & Tebbe (2000), usando o SSCP, analisaram perfis genéticos do gene rRNA 16S e detectaram a especificidade das comunidades da rizosfera com diferentes plantas.

A região promotora e a região codificadora iniciante do gene *hsp70* foram analisadas em galinhas *broiler* de raça comercial (MAZZI et al., 2003). Os produtos de PCR F1-R1, F2-R2, F3-R3 e F19-R24 não mostraram nenhuma diferença em seus padrões de migração em gel de poliacrilamida quando submetido à análise de SSCP. Entretanto, os padrões diferentes de migração foram vistos quando os fragmentos de F4-R3b foram analisados usando esta técnica, indicando que esta região (região codificadora inicial) apresenta polimorfismos. Os dados de seqüenciamento das duas regiões do gene *hsp70* confirmaram as observações obtidas pela análise de SSCP.

No trabalho de Fajardo et al. (2005) foram amplificados dois fragmentos de DNA do vírus *Grapevine leafroll* por RT-PCR, a partir de RNA total extraído de nervuras e pecíolos de videiras infetadas, utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos. Os DNAs amplificados foram clonados e reamplificados, a partir dos clones recombinantes, e comparados quanto às diferenças conformacionais das fitas simples desnaturadas (SSCP), objetivando avaliar a variabilidade do vírus. Foi possível observar dois padrões distintos de bandas (com uma ou duas bandas por padrão) para cada espécie viral. Mais de duas bandas em um perfil de SSCP sugerem a presença de mais de uma seqüência variante na planta analisada, assim como verificado em relação ao vírus *Grapevine leafroll* (GOSZCZYNSKI & JOOSTE, 2002). Devido à freqüente ocorrência de conformações de fitas simples de DNA secundárias e estáveis, as quais migram diferentemente em eletroforese (RUBIO et al., 1996), a interpretação dos perfis de SSCP com mais de duas bandas é difícil e, em alguns casos, pode levar a conclusões errôneas em relação ao número de seqüências variantes presentes em uma única planta (GOSZCZYNSKI & JOOSTE, 2002; FAJARDO et al., 2005).

A análise de variação em genes específicos para determinada característica é o primeiro passo para associação de suas funções à variação fenotípica. No estudo de ZHAO (1998), análises de variação em genes GH (hormônio de crescimento) e PRKARIA em diferentes raças de porcos indígenas foram realizadas utilizando a técnica de comparação de perfis eletroforéticos de SSCP. A detecção de diferenças em freqüências alélicas entre estas raças de porcos são muito úteis para mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), e os SSCPs possibilitam este estudo e mapeamento deste genes.

Com mais locos sendo mapeados por *primers* específicos em espécies animais, vegetais e humana, análise SSCP provavelmente tornará mais comum em estudos de mapeamento, grupo de ligação, características quantitativas e aberrações genéticas.

A diversidade genética de cabras de Jamunapari (*Capra hircus*) foi investigada usando um método otimizado não radioativo PCR-SSCP para detectar polimorfismo no éxon do gene lactalbumina em uma amostra de 50 cabras de leite (KUMAR et al., 2006). Estes dados mostram que PCR-SSCP é

uma ferramenta apropriada para avaliar a variabilidade genética em cabras Jamunapari. O polimorfismo foi detectado nas amostras, indicando que cabras Jamunapari têm alta variabilidade genética no gene da lactalbumina. Este resultado abre prospectos interessantes para os programas da seleção e as estratégias futuros de conservação dos mesmos.

Com plantas têm-se ainda poucos trabalhos utilizando esta técnica SSCP, mas vêm crescendo a utilização da mesma (WATANO et al., 1995; BONDENES et al., 1996; McCALLUM et al., 2001) em especial para mapeamento genético.

Sessenta e sete marcadores STS (Seqüências Sítio Marcadas) foram identificados em seqüências parciais de cDNAs de clones obtidos do interior da casca de *Cryptomeria japonica* (espécie de árvore japonesa; UJINO-IHARA, et al., 2002). Polimorfismos destes STSs foram investigados nos clones parentais da população de mapeamento usando SSCP e análise de seqüenciamento. Vinte e dois STSs mostraram diferenças nucleotídicas entre os pais, e destes 19 diferenças STS foram detectadas sob condições eletroforéticas SSCP.

Kuhn et al. (2003) utilizaram os homólogos de genes resistentes como marcadores moleculares em sete cultivares diferentes de cacau resultando no isolamento de 74 únicos RGHS e, usaram a técnica SSCP para estabelecer a segregação de seis categorias destes marcadores em uma população F<sub>2</sub> segregando para resistência à vassoura-de-bruxa.

Usando *primers* degenerados, 16 locos TcWRKY foram isolados do *Theobroma cacao* (BORRONE et al., 2004). Destes 16 isolados, sete foram polimórficos por comparação de seqüência, e quatro destes foram convertidos com sucesso para marcadores moleculares e mapeados em uma população F<sub>2</sub> de cacau usando SSCP com Eletroforese Capilar (CE-SSCP).

Trinta homólogos de genes de resistência de maçã (ARGHS, *Malus x domestica* Borkh.) foram clonados e caracterizados usando PCR com *primers* degenerados desenhados de regiões conservadas, como NBS e quinase. As análises de seqüências indicaram a presença de no mínimo 27 famílias de genes contendo NBS em maçã. Dezoito ARGHS foram mapeados usando um mapa de ligação de uma população segregante do cruzamento entre dois cultivares de maçã Fiesta e Discovery, através da técnica SSCP (BALDI et al., 2004).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais genéticos do experimento

Foram utilizados 57 clones de cacauzeiros, implantados em experimentos de competição de clones em seis municípios da região cacauzeira pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauzeira (CEPLAC; Tabela 2), dentre eles, controles resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa e à podridão-parda.

Entre os clones selecionados para o estudo, foram incluídos alguns representativos da diversidade que existe na espécie, denominados clones âncoras: os altos amazônicos (RB 36, MO 20, IMC 67, NA 33, POUND 4B, POUND 7, C.SUL 3, MOQ 216), os baixo amazônicos (MA 16, SIAL 169, SIC 23), os trinitários (CCN 10, OC 67, ICS 1, ICS 32), o SCA 6 e seus descendentes (TSHs e EETs; PIRES et al., 2001, YAMADA et al., 2003b).

Tabela 2. Lista de clones, por ordem alfabética, agrupada em clones selecionados por produtores e clones considerados como âncoras para estudo de diversidade em genes candidatos à resistência a doenças no cacauzeiro

TIPO	CLONES	LOCALIZAÇÃO	GRUPO GENÉTICO
	AM 01	ECM-CEPEC	-
	AM 02	ECM-CEPEC	-
	BB 1.33	ECM-CEPEC	-
	BB 6018	ECM-CEPEC	-
	BB 6020	ECM-CEPEC	-
	CSF 22	ECM-CEPEC	-
	FADA 100	ECM-CEPEC	-
	FL 16	ECM-CEPEC	-
	FL 60	ECM-CEPEC	-
	FLN 30	ECM-CEPEC	-
	FSU 13	ECM-CEPEC	-

Seleção De Produtores	FSU 151	ECM-CEPEC	-
	FSU 77	ECM-CEPEC	-
	GM 33	ECM-CEPEC	-
	M 05	ECM-CEPEC	-
	NV 22	ECM-CEPEC	-
	PAT 118	ECM-CEPEC	-
	PAT 84	ECM-CEPEC	-
	PB 617	ECM-CEPEC	-
	PH 16	ECM-CEPEC	-
	RT 06	ECM-CEPEC	-
	RT 09	ECM-CEPEC	-
	RT 106	ECM-CEPEC	-
	RVID 08	ECM-CEPEC	-
	RVID 12	ECM-CEPEC	-
	SJ 02	ECM-CEPEC	-
	SM 06	ECM-CEPEC	-
	T 11	ECM-CEPEC	-
	TR 15	ECM-CEPEC	-
	TR 35	ECM-CEPEC	-
	VB 515	ECM-CEPEC	-
	VB 547	ECM-CEPEC	-
	VB 679	ECM-CEPEC	-
	VB 892	ECM-CEPEC	-
VB 900	ECM-CEPEC	-	
VB 902	ECM-CEPEC	-	
Âncoras	CCN 10	SD	Trinitário
	C.SUL 3	SD	Alto Amazônico
	EET 392	BAG-CEPEC	SILECIA x SCA 6
	EET 399	SD	Híbrido de SCA
	ICS 1	BAG-CEPEC	Trinitário
	ICS 32	SD	Trinitário
	IMC 67	BAG-CEPEC	Alto Amazônico
	MA 16	SD	Baixo Amazônico
	MO 20	SD	Alto Amazônico
	MOQ 216	ECM-CEPEC	Alto Amazônico
	NA 33	ECM-CEPEC	Alto Amazônico
	OC 67	SD	Trinitário
	POUND 4B	BAG-CEPEC	Alto Amazônico
	POUND 7	BAG-CEPEC	Alto Amazônico
	RB 36	SD	Alto Amazônico
	SCA 6	BAG-CEPEC	Potencial Pai
	SIAL 169	ECM-CEPEC	Baixo Amazônico
	SIC 23	ECM-CEPEC	Baixo Amazônico
	TSH 1188	BAG-CEPEC	Híbrido SCA
	TSH 516	BAG-CEPEC	Híbrido SCA
TSH 565	BAG-CEPEC	Híbrido SCA	

Obs.: - Grupo genético desconhecido;  
 ECM-CEPEC: Ensaio Clonal Multilocais, Série 4 no CEPEC;  
 BAG-CEPEC: Banco Ativo do Germoplasma do CEPEC;  
 SD: Ensaio Série Diferenciadora no CEPEC.

Os ensaios de competição de clones, denominado Ensaios Clonais Multilocais-Série 4, foram instalados em julho-agosto de 2001, nas fazendas Santa Rita (Ipiau), Venturosa (Floresta Azul), Barra do Cedro (Itagibá), Corcovado (Ipiau), Maia (Barra do Rocha), e na Estação Experimental Arnaldo Medeiros (Ilhéus), da CEPLAC (LOPES et al., 2006).

Nas fazendas Barra do Cedro, Santa Rita e Esarm foram instaladas experimentos com desenhos estatísticos inteiramente ao acaso, com duas parcelas por clone; já nas fazendas Corcovado, Venturosa e Maia, foram usadas três parcelas por clone. Cada parcela é constituída de duas filas, com três plantas cada (LOPES et al., 2006).

O principal objetivo desta etapa do Projeto implantado pela CEPLAC é submeter clones aos diferentes solos, climas, tipos de manejo e patógeno que ocorram na região, subsidiando decisões de recomendação de novos clones para o produtor. O presente grupo de ensaios é parte de um projeto maior que visa testar 150 clones, em diferentes agrossistemas da região cacaeira.

Estes clones vêm sendo mensalmente avaliados quanto à produção e resistência à vassoura-de-bruxa. Além disto, os mesmos vêm sendo avaliados quanto ao tipo, qualidade da manteiga, número de óvulos, dentre outros.

### **3.2. Extração de DNA genômico**

DNA de cada clone de cacau foi extraído a partir de folhas jovens utilizando o pelo método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990) com algumas modificações (ARAÚJO et al., 2000). Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido de folha de cada clone de cacaeiro foram maceradas em nitrogênio líquido, transferidas para tubos Ependorff de 2 mL e, adicionando-se posteriormente 800 µL de tampão de extração [tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0; EDTA (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0; NaCl (5 mol.L<sup>-1</sup>) 1,3 mol.L<sup>-1</sup>; 0,2 % (v/v) β- mercaptoetanol, 2,8% CTAB (7%), 1% polivinilpirrolidona (PVP 40) e 20 µg/µL de proteinase K]. Após 60 minutos em banho-maria a 65°C, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Aos sobrenadantes adicionaram-se 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitando por 10 minutos, seguindo de centrifugação a 14.000

rpm por 10 minutos. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, recebendo 700 µL de isopropanol gelado, e em seguida agitados suavemente por cinco minutos e colocados a -20°C *overnight*. No dia posterior, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, seus sobrenadantes descartados e os precipitados lavados com 300 µL de etanol 70% (-20° C), por 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados foram secos a temperatura ambiente por 12 horas e ressuspensos em 150 µL de água mili-Q contendo RNase na concentração final de 40 µg/mL e incubados em banho-maria a 37°C até dissolver o precipitado.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 5 µL de cada amostra, adicionada de 3 µL do corante tipo IV (Bromofenol Blue a 0,25%, sacarose 40%) foi aplicada em gel de agarose a 0,8%, corado posteriormente com brometo de etídio a 10 mg/mL e fotodocumentado sob luz ultra violeta (UV) com o sistema da VILBER LOURMAT. Além disso, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro 260 nm Cary Winv 50 (software RNA & DNA) e, diluídas para 10 ng/mL.

### **3.3. Amplificação dos marcadores RGHS-SSCP**

Doze *primers* RGHS-SSCP foram utilizados para genotipagem dos 57 clones em estudo (Tabela 3). Na amplificação dos *primers* RGHS-SSCP utilizou-se o protocolo de reação descrito por Kuhn et al. (2003), com algumas adaptações do protocolo SSR (GRAMACHO et al., 2003), em que foram aumentadas as concentrações de DNA de 2,5 ng para 3 ng a 10 ng/µL, acrescentando-se tampão 10 X e água para completar volume de 20 µL de reação e excluindo-se o BSA. O volume final utilizado para a reação de PCR foi de 20 µL, contendo no mix os seguintes reagentes: 1,5 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP; BioLabs); 200 nM de cada *primer* RGH específico *forward* e *reverse* (KUHN, 2003; Tabela 3); 1 X de tampão; 0,5 U/µL de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda.); e 3 ng de DNA.

Determinados os reagentes e as concentrações da reação de amplificação dos RGHS-SSCP, foi feito um teste de amplificação dos *primers* utilizando-se os clones TSH 1188 e CCN 51 e dois indivíduos originados do cruzamento entre

estes clones. Também foram utilizados os clones SCA 6, ICS 1 e TSH 516, sabidamente diferentes entre si para ratificar os resultados.

As reações de amplificação dos *primers* foram conduzidas em Eppendorf Mastercycler Gradient e seguiram-se os seguintes procedimentos: ciclo inicial de desnaturação foi de 94°C por 2 minutos, seguido de 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 49°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto (cada um dos ciclos), com um ciclo final de extensão de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram separados inicialmente em gel de agarose a 3% com 80 V por 1 hora, corados com brometo de etídeo, fotodocumentados sob luz ultravioleta (UV), com o objetivo de verificar a qualidade e intensidade da reação. Outra alíquota do mesmo produto do PCR foi aplicado em gel de acrilamida SSR a 6% para obter maior resolução quanto à separação dos fragmentos de DNA.

Tabela 3. *Primers* RGHS desenhados por KUHN et al. (2003) a partir de regiões conservadas de genes candidatos à resistência a doenças em plantas, usados para este estudo de diversidade em clones de cacaueteiro

<i>Primer</i> (5'-3')	Seqüência de <i>Primer</i>	Posição na seqüência Nucleotídica
Tcrgh1for437FAM	6CATGGCAAAGAAGTTGGAAAG	24-45
Tcrgh1rev437HEX	8CATCAATCAATTCACGTGGC	490-472
Tcrgh2for440FAM	6CGAAGCAAAGGCAGACAAG	45-63
Tcrgh2rev440HEX	8CGCATCTCCTACATGCATC	484-466
Tcrgh3afor349FAM	6TTGTAATTTGGGTGGTGACTTC	80-101
Tcrgh3arev349HEX	8CAAGATGGCTGKCAAGGG	428-411
Tcrgh3bfor359FAM	6TGGGTGGTKGTGTCTAAAG	88-106
Tcrgh3brev359HEX	8GGGTTTTYTCTCCAACCTTC	446-427
TcRGH4for411FAM	6TTGATTTGGGCAACTGTATCC	79-99
TcRGH4rev411HEX	8ACCACATTCGAGACAAC	489-472
TcRGH5for581FAM	6AGATYMTCAACAACCAAC	31-48
TcRGH5rev581HEX	8TACCNTKTCATCTAACCC	611-594
TcRGH6for487FAM	6CAAACATTCACGAGGAAC	97-115
TcRGH6rev487HEX	8CAATACGCCTCCATTCAC	583-566
TcRGH7for386FAM	6CTTGCTCAGCTTGTCTAC	25-42
TcRGH7rev386HEX	8AATACAGAAAGGCAATCTTC	409-390
TcRGH8for472FAM	6CTTGCTCARCTTGTCTAC	28-45
TcRGH8rev472HEX	8CACAYTTCTTCACAATCTCC	499-480
TcRGH9for447FAM	6ATACTTGTGTTCAAATC	48-65
TcRGH9rev447HEX	8CACTTTCTCACTATTTTC	494-477
TcRGH10for468FAM	6GCTCAGCTCGTTTATAAC	28-45
TcRGH10rev468HEX	8ACACCTTTTCACTATTTTC	495-477
TcRGH11for300FAM	6GTTCTGATACCAACGACC	214-232
TcRGH11rev300HEX	8ATGCCCGTCAAAGTTTTC	513-496

### **3.4. Otimização da técnica SSCP**

Realizaram-se vários testes para otimização da técnica SSCP a fim de obter as condições ideais, já que esta técnica ainda não havia sido utilizada pelos grupos de pesquisa da UESC e CEPLAC. Foram testados procedimentos para ajuste e constância da temperatura, diferentes condições eletroforéticas, diferentes concentrações de reagentes do gel SSCP (proporção de acrilamida e bisacrilamida, percentual de glicerol, percentual de APS), algumas diluições das amostras de PCR. Além disso, vale ressaltar que outro parâmetro importante para melhor detecção e sensibilidade da técnica é o tamanho do fragmento de amplificação. Estes parâmetros influenciam a separação das conformações das fitas simples de DNA e serão descritos abaixo.

#### **3.4.1. Tamanho do fragmento de interesse**

Os tamanhos dos fragmentos de amplificação dos *primers* RGHs variam de 200 a 300 pb. Este tamanho em pares de bases pode ou não influenciar na detecção de mutações nucleotídicas pequenas nos fragmentos amplificados.

Se os resultados do SSCP não tiverem bons padrões de eletroforese e o comprimento do fragmento amplificado estiver bem fora do comprimento ótimo (130-250 pares de bases), deve-se escolher *primers* novos de modo que o comprimento do fragmento esteja dentro da escala ótima de tamanho. Hayashi (1992) encontraram que pelo menos 80% de substituições únicas de pares de bases podem ser detectados se os produtos de PCR forem mantidos sob 400 pb.

#### **3.4.2. Temperatura do gel SSCP**

Esta etapa de otimização da técnica SSCP foi realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, no Laboratório de Citogenética e Marcadores Moleculares.

Alguns testes de temperatura foram feitos em sala refrigerada com temperaturas em torno de 15-20°C, sob o monitoramento de um termômetro

manual a fim de verificar a constância de uma temperatura relativamente baixa (menor ou igual à temperatura ambiente) durante a corrida. Como estava em fase de otimizações, todos os testes foram feitos com gel de acrilamida de microssatélite (gel SSR) e coloração com nitrato de prata.

De acordo com os protocolos estudados (SPINARDI et al., 1991, HONGYO et al., 1993, KERR & CURRAN, 1996, HUMPHRIES et al., 1997, Ah FONG/JUDELSON, 2000, ASENSIO et al., 2001; KAJIWARA & KANEKO, 2002), a temperatura de corrida a 4°C ou a temperaturas baixas ou mesmo temperatura ambiente padronizam as condições não desnaturantes do gel SSCP, embora não se tenham investigado sistematicamente o efeito do controle da temperatura na taxa de detecção de SSCPs.

### **3.4.3. Condições de eletroforese**

O primeiro teste a ser feito foi de acordo com o protocolo de Spinardi et al. (1991), utilizando as condições eletroforéticas do gel SSCP a 40 W por 3 a 7 horas. Contudo na maioria dos protocolos estudados a potência variava de 4 a 15 W (KERR & CURRAN, 1996; HUMPHRIES et al., 1997; ASENSIO et al., 2001, MARTIN-LOPES et al., 2001), logo decidiu-se testar a 4 W por 5 horas.

O segundo teste foi segundo o protocolo de Humphries et al. (1997). O gel SSCP corre rotineiramente a 5 V/cm *overnight* mantendo assim uma temperatura constante de 20-22°C em sala refrigerada. Como as placas de montagem do gel utilizadas tinham 50 cm de comprimento, a voltagem atingida durante a corrida foi de apenas 250 V. A esta voltagem baixa e a uma potência de 4 W o aquecimento do gel é insignificante. Seguindo estas informações, decidiu-se então correr novamente um gel SSR a 4 W por 16 horas (*overnight*) a 250 V.

### **3.4.4. Gel SSCP e Diluição das amostras de PCR**

O primeiro protocolo de gel SSCP testado (<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>) continha os seguintes reagentes: 10 mL de água destilada;

8,3 mL de *bis-sep* [5,8 g de acrilamida e 0,2 g de bisacrilamida (29:1) dissolvidos em 20 mL de água destilada]; 2,2 mL de *gel buffer* (4,36 g Tris em 100 mL de água destilada, pH 8,4); 60 µL de persulfato de amônia (APS) a 40% (w/v); e 40 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED). Acrescentou-se glicerol ao protocolo.

A utilização de glicerol entre 5-10% deve-se à estabilidade que é dada às conformações tridimensionais das fitas simples de DNA e ao aumento da capacidade de detecção de mutações (KERR & CURRAN, 1996; Manual GeneScan, 2000). Utilizou-se o mesmo tampão de carregamento usado em trabalhos com microsatélite (10 mmol.L<sup>-1</sup> NaOH, 0,09 % xilenocianol [w/v], 0,09% azul de bromofenol [w/v], EDTA 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, Formamida 95%).

Foram utilizados DNAs do SCA 6 e ICS 1 já que se sabe da existência de polimorfismos entre estes dois acessos. Os produtos de PCR com o *primer* RGH 7 (*primer* polimórfico) foram diluídos a 1:1, 1:2, 1:5 vv (1 µL PCR + 1 µL H<sub>2</sub>O, 0,5 µL PCR + 1,0 µL H<sub>2</sub>O e 0,5 µL PCR + 2,5 µL H<sub>2</sub>O) e produtos aplicados no gel SSCP. Colocou-se marcador de peso molecular (DNA *ladder* 100 pb, Invitrogen) como referência para possíveis problemas de amplificação ou no gel. Estas diluições diferentes foram testadas para verificar qual a que se obteria melhor resultado.

O segundo protocolo de gel SSCP a ser testado foi de acordo com Ah Fong/Judelson (2000). Preparou-se um gel de acrilamida 6% (37,5 acrilamida: 1 bisacrilamida) com 5% glicerol. Neste protocolo continha os seguintes reagentes: 4,5 mL de solução estoque de 40% acrilamida/bis; 3,0 mL de 50% glicerol; 1,5 mL de TBE 10 X; e completa com água destilada até um volume final de 30 mL. Depois de completo o volume, foram adicionados à solução de acrilamida 27 µL de APS a 10% e 27 µL de TEMED e aplicou-se esta solução nas placas de vidro montadas.

### **3.5. Eletroforese em gel de acrilamida 6%**

Adaptada a técnica do SSCP, descrita para cacau, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de acrilamida 6% (37,5 acrilamida: 1 bisacrilamida) não desnaturante, já com as condições otimizadas e

estabelecidas para corrida. Desta etapa em diante, os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biomol e Fitomol da CEPLAC.

Os produtos de PCR foram diluídos a 1:2 vv (1 µL de produto de PCR e 2 µL de água para PCR), misturados com 1,5 µL de tampão de carregamento 2X para microssatélite, desnaturados a 94°C por 4 minutos na presença de formamida e colocados imediatamente no gelo. Dois a três µL foram aplicados no gel. O marcador de peso molecular, o DNA *ladder* de 10 pb ou 1 kb (Invitrogen), foi aplicado apenas como controle da reação e do gel, já que a migração dos fragmentos no gel SSCP não é determinada por marcador molecular e sim por suas mobilidades eletroforéticas devido a suas conformações nas condições não desnaturantes (SPINARDI et al., 1991; MARTIN-LOPES et al., 2001).

A eletroforese foi realizada em cuba vertical nas condições otimizadas – 400 V - 15 W - 15 mA - 5 horas e meia, em sala refrigerada, tendo como tampão de corrida TBE 0,5X. Após eletroforese, a revelação foi realizada em coloração de nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001) e Gramacho et al. (2003).

### **3.6. Codificação dos Dados (*Scoring*)**

Como este estudo foi baseado em análise de polimorfismo para verificar divergências genéticas, mesmo que pequenas, entre os clones de cacauero, decidiu-se codificar estas bandas (ssDNA) de RGHS como dados binários, a partir da ausência e presença de bandas.

A leitura dos dados (presença e ausência de bandas) foi feita diretamente no gel de acrilamida sobre um transluminador de luz branca, transformada em dados binários (0 para ausência de banda, 1 para presença de banda e 9 para dados perdidos) e tabulada com número de genótipos e número bandas com mobilidades diferentes para posteriores análises.

Cada banda visualizada, pelo princípio da técnica SSCP, foi considerada uma conformação diferenciada de cada fita simples de DNA após desnaturada e separada no gel SSCP não desnaturante. Logo, um indivíduo com duas bandas, ou seja, duas fitas simples de DNA (representando um alelo) foi considerado como indivíduo homocigoto. Já um indivíduo com três ou mais bandas, ou seja, três ou mais fitas simples de DNA foi considerado como indivíduo heterocigoto

com dois alelos ou mais alelos, como resultado de genes repetidos no genoma em *tandem*.

### **3.7. Análise de polimorfismos nos perfis eletroforéticos entre os clones**

As análises de detecção de polimorfismos entre os indivíduos foram realizadas por comparação dos padrões de mobilidades eletroforéticas dos fragmentos amplificados.

Os padrões eletroforéticos entre acessos suscetíveis e resistentes foram comparados para os 12 *primers* RGHs, verificando-se a presença de marcas únicas (exclusivas) para cada *primer* em um grupo de indivíduos que apresentam algum nível de resistência (C.SUL 3, VB 679, TSH 565, EET 392, RB 36, FLN 30 e OC 67) e suscetibilidade (SIC 23, SIAL 169 e ICS 1) à vassoura-de-bruxa do cacau. Estas amostras (grupo de indivíduos resistentes e suscetíveis) foram selecionadas dentre os 57 clones pela identificação de marcas ssDNAs únicas para cada amostra de clones, ou seja, somente aqueles clones que tiveram a presença de marcas únicas de RGH-SSCP foram escolhidos.

Além desta análise, caracterizou-se o polimorfismo dos 12 marcadores RGHs a partir da caracterização do número de fragmentos de ssDNA gerados e destes fragmentos quantos foram polimórficos e monomórficos.

Esta etapa de verificação de marcas ssDNA no gel de acrilamida e análise de polimorfismo foi decisiva para validar a técnica SSCP, descrita por Kuhn et al. (2003) para cacau, neste estudo de diversidade genética entre os clones de cacau. Esta otimização e validação tiveram como pontos de destaque em relação a trabalhos anteriores de diversidade genética em cacau a utilização de *primers* RGHs não marcados com fluorescência e uma corrida eletroforética em gel de acrilamida não desnaturante corada com nitrato de prata, o que tornaram esta técnica mais acessível e mais barata.

### 3.8. Análise de diversidade genética e Índice de heterozigose

Para avaliar a diversidade genética entre os clones com base no marcador RGHs-SSCP utilizaram-se estimativas de dissimilaridade genética obtidas por meio de uma análise multivariada. As estimativas de dissimilaridade foram obtidas de variáveis binárias pela fórmula  $\{Soma [(b+c)/(a+b+c)]\}$ , onde 'a' equivale à coincidência 1-1, 'b' equivale à discordância 1-0 e 'c' é discordância 0-1. Esta fórmula corresponde ao complemento do índice de similaridade de Jaccard, por meio do Programa GENES (CRUZ, 1997).

De acordo com a fórmula para o cálculo das estimativas de dissimilaridade, consideraram-se as bandas comuns a todos os indivíduos como semelhanças genéticas e as não comuns, como diferenças genéticas. Dos dados binários gerou-se uma matriz de estimativas de dissimilaridade. Definida a matriz de distâncias genéticas (matriz de dissimilaridade), o espaço multidimensional foi reduzido a tridimensional pelo método Multidimensional Scaling – MDS SAS (SAS Institute, 1990) e este apresentado em representação gráfica, obtida por SAS G3D (SAS Institute, 1990).

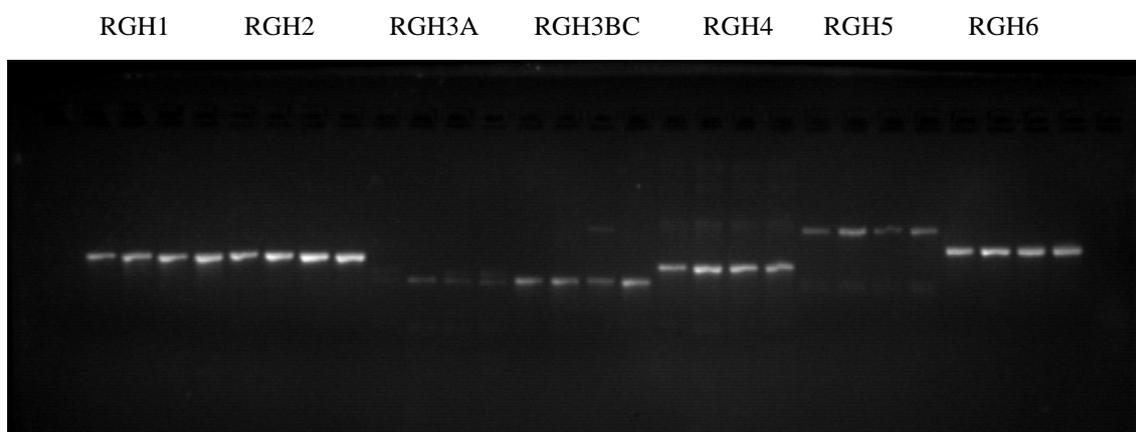
O nível de heterozigose de cada acesso foi calculado baseado na relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Otimização das condições de amplificação dos marcadores RGHs e da técnica SSCP

#### 4.1.1. Teste de amplificação e *Screening* dos *primers* RGHs

No teste inicial de amplificação dos *primers* RGHs, obtiveram-se as amplificações de 10 dos 12 *primers* RGHs em gel de agarose a 3%, com a presença de fragmentos únicos de mesmo tamanho para os dois clones TSH 1188 e CCN 51 e para os dois indivíduos descendentes do cruzamento destes clones (Figura 9). O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 200 a 300pb. Identificou-se também a presença de bandas inespecíficas em alguns *primers*, mas que não foi problema para amplificações posteriores já que as temperaturas de anelamento de cada *primer* foram ajustadas.



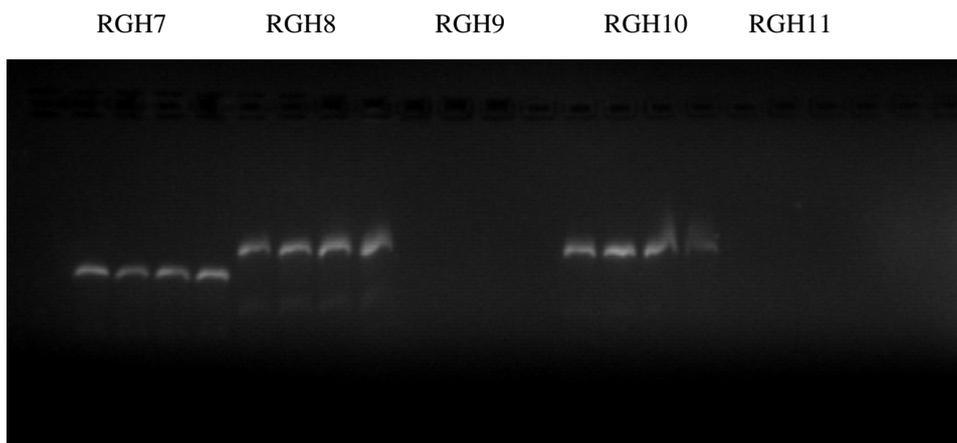


Figura 9. *Screening* de *primers* RGHs em gel de agarose 3%.

Como o gel de agarose não possui poder de resolução e detecção de pequenas diferenças nucleotídicas em fragmentos gênicos (RGH), aplicou-se o mesmo produto de amplificação em gel de acrilamida 6% comumente usado para padrões de SSR (Figura 10). Contudo, não foram detectadas diferenças na migração eletroforética dos fragmentos amplificados entre os parentais TSH 1188 e CCN 51 e seus descendentes. Estes dois clones apresentam níveis de resistência diferentes, o TSH 1188 considerado altamente resistente e o CCN 51 mediamente resistente, o que não foi percebido com a análise de polimorfismo baseada nestes marcadores RGHs. Uma possível explicação para este resultado é a aplicação inapropriada do gel de acrilamida SSR desnaturante para detecção de diferenças nucleotídicas e conformacionais destes fragmentos que devem ser muito pequenas nestes homólogos de genes de resistência.

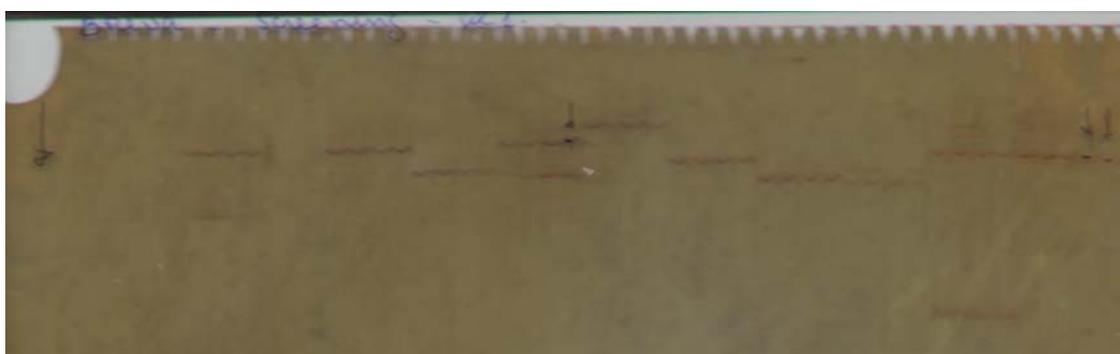


Figura 10. *Screening* de *primers* RGHs em gel de acrilamida SSR a 6%.

A fim de sobrepor e solucionar este problema foram incluídos novos clones diferentes entre si como o SCA 6, ICS 1 e TSH 516, assim pôde-se testar a presença de polimorfismos entre estes indivíduos e entre estes e os clones TSH 1188 e CCN 51. A inclusão dos clones SCA 6 e ICS 1 justificou-se também pelo fato de que marcadores RGHS haviam sido mapeados em progênies do cruzamento destes genótipos (KUHN et al., 2003). Deste modo estes clones passaram a ser referência no *screening* do presente estudo (Figura 11).

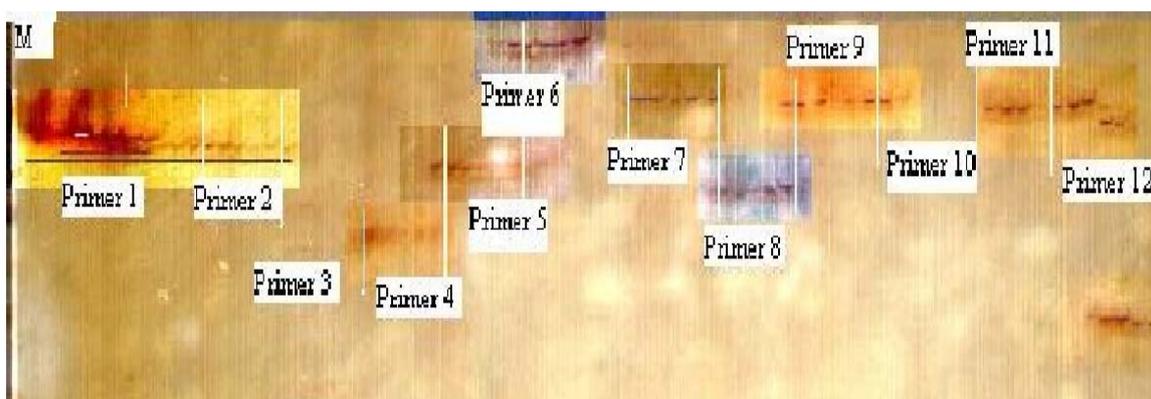


Figura 11: *Screening* dos *primers* RGHS em gel de acrilamida SSR a 6%, a fim de detectar polimorfismos entre os progenitores TSH 1188, CCN 51, SCA 6, ICS 1 e TSH 516.

Com a inclusão destes clones verificou-se que em gel de acrilamida não houve diferenças eletroforéticas para os genótipos TSH 1188 e CCN 51 (primeiro e segundo poços do gel acima), contudo, notaram-se diferenças eletroforéticas para os genótipos SCA 6, ICS 1 e TSH 516 (Figura 11).

#### 4.1.2. Otimização da técnica SSCP

**Tamanho do fragmento de interesse.** Segundo Hayashi (1992) e Humphries et al. (1997), pelo menos 90% das substituições únicas de pares de bases podem ser detectadas em gel de acrilamida se os produtos de PCR tiverem até 200 pb e que 80% das substituições únicas de pares de bases podem ser detectadas se os produtos de PCR tiverem até 400 pb. Neste contexto, o tamanho dos fragmentos de PCR amplificados pelos 12 *primers* RGHS na amostra em estudo foi entre 200 pb e 300 pb estando assim dentro de um percentual confiável de detecção dos polimorfismos entre os clones em estudo.

**Temperatura do gel SSCP.** Em relação à temperatura de corrida do gel SSCP verificou-se que normalmente se utilizam temperaturas variando de 4°C à temperatura ambiente de 25°C (HUMPHRIES et al., 1997, NATARAJ et al., 1999, ANDERSEN et al. 2003). Esta variação de temperaturas utilizadas para a corrida de gel SSCP permite uma boa eficiência na detecção de SSCPs e reprodutibilidade dos padrões eletroforéticos. Uma ascensão da temperatura durante a corrida é particularmente perigosa para a reprodutibilidade, logo são usados constantemente géis finos e ar refrigerado na sala, para manter uma constância da temperatura durante toda corrida (KERR & CURRAN, 1996). Temperatura em torno de 18°C não alcança uma sensibilidade elevada para alguns autores (WENZ et al., 1998; LARSEN et al., 1999). Outros autores (ATHA et al., 1998; ELLIS et al., 2000; ANDERSEN et al., 2003) observaram que a resolução aumenta quando a temperatura é reduzida a 18°C. Gelfi et al. (2000) não perceberam esta tendência em seu estudo, onde o uso da temperatura a 25°C foi considerado ótimo para seu experimento. As diferenças de resultados de diferentes autores são devidas a diferenças no material de estudo, tampão usado na corrida e composição do polímero, mas em especial há uma dependência forte da mobilidade da ssDNA em relação à temperatura de corrida (ANDERSEN et al., 2003). No presente experimento, a temperatura do gel SSCP, em sala refrigerada 15-20°C, foi estabilizada entre 22 e 24°C, assim permanecendo durante toda a corrida. Esta variação da temperatura foi apropriada para este experimento já que se obtiveram diferenças esperadas segundo os princípios da técnica, detectando polimorfismos e heterozigose entre os clones de cacauero.

**Condições de eletroforese e Gel SSCP.** De acordo com o protocolo de Spinardi et al. (1991), a condição eletroforética ideal para o gel SSCP é submetê-lo a 40 W por 3 a 7 horas. Contudo, a maioria dos protocolos estudados utiliza uma potência menor (em torno de 4 W) justificando este uso como o mais adequado para separação das fitas simples dos fragmentos desnaturados e assim também permitindo a melhor conformação das mesmas. A partir destas informações, decidiu-se preparar e correr um gel SSCP (<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>) estabelecendo uma potência a 4W. O resultado para este teste não foi o esperado, pois a potência baixa e o tempo reduzido de corrida fizeram com que a voltagem da fonte elétrica

da cuba aumentasse muito, atingindo cerca de 1200 V, tendo assim um padrão eletroforético de bandas tipo *smile* (em forma de 'u').

Seguindo o protocolo de Humphries et al. (1997), preparou-se outro gel SSCP (<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>), a 4 W por 16 horas (*overnight*) a 250 V, com adição de glicerol. Estas condições eletroforéticas também não apresentaram bons resultados já que a potência e a miliamperagem zeraram durante a corrida sem completar o tempo total estabelecido de 16 horas de corrida. O gel SSCP foi corado para verificar os padrões eletroforéticos obtidos e novamente obteve-se a presença de bandas tipo *smile*.

As possíveis explicações para os padrões eletroforéticos obtidos (bandas *smile*) podem ser devidas à alta voltagem (no primeiro teste), à baixa potência e miliamperagem (no segundo teste) e ao alto percentual de APS a 40% no protocolo usado de gel SSCP (<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>; a maioria dos protocolos usa o APS a 10%). Estes motivos provavelmente prejudicaram a estabilidade conformacional das ssDNAs, assim também suas mobilidades eletroforéticas. O uso do alto percentual de APS possivelmente provocou o espessamento da malha do gel, prejudicando a mobilidade das conformações de DNA. Um outro motivo provável foi a adição de glicerol no protocolo de um gel SSCP que normalmente não o contém (<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>), isso deve ter dificultado as mobilidades das ssDNAs e suas conformações. O glicerol é viscoso e reduz a mobilidade (KERR & CURRAN, 1996), sendo um agente desnaturante fraco. A presença de concentrações baixas de glicerol (5 a 10%) em um gel SSCP pode melhorar a separação de seqüências mutadas, a razão para esta é desconhecida, mas este efeito pode ter ligação com a propriedade desnaturante do glicerol em abrir as fitas simples.

Após muitos testes para atingir as melhores condições eletroforéticas e otimizar o protocolo de gel SSCP, decidiu-se experimentar voltagem entre 200-400 V, potência de 10-15 W, miliamperagem de 10-15 mA e tempo de corrida de 5 horas e meia para otimizar o tempo de trabalho, seguindo o protocolo de gel SSCP de Ah/Judelson (2000) que apresenta em sua composição glicerol a 5%, APS 10% e TBE 0,5X. Este teste produziu o melhor resultado até então com as condições ideais para os experimentos, tanto para as condições eletroforéticas

quanto para os padrões eletroforéticos, além de mostrar a melhor diluição para os produtos de PCR que foi de 1:2 vv (Figura 12).

A separação das fitas simples é melhor em géis de acrilamida com baixo *cross linking* (%C) na razão da concentração de bisacrilamida para concentração total de acrilamida. Este baixo *cross linking* deixa o gel com tamanhos de poros bem grandes e alta sensibilidade às conformações das ssDNA, isto é explicado provavelmente pelo aumento da liberdade das fibras de acrilamida (KERR & CURRAN, 1996). Géis de acrilamida a 1-2%C e 5-6%C são comumente usados, mas também concentrações variando de 4 a 20% têm sido usadas freqüentemente (KERR & CURRAN, 1996, Manual GeneScan, 2000). Em relação ao percentual do polímero acrilamida-bisacrilamida, quando se aumenta este percentual aumenta-se também a habilidade de detecção de diferenças de mobilidade entre dois fragmentos, a concentração polimérica tem efeito na conformação tridimensional e pode mudar a diferença de mobilidade entre fragmento de um mutante e um selvagem. O percentual de acrilamida-bisacrilamida para os géis SSCP que apresenta o melhor resultado é  $\geq 37,5:1$  (AH FUNG/JUDELSON ,2000, Manual GeneScan, 2000). Logo, foi escolhido o protocolo Ah Fung/Judelson (2000) para este experimento, o qual utiliza um gel SSCP a 6%C com um percentual de 37,5:1 (acrilamida:bisacrilamida), além de conter glicerol a 5%.

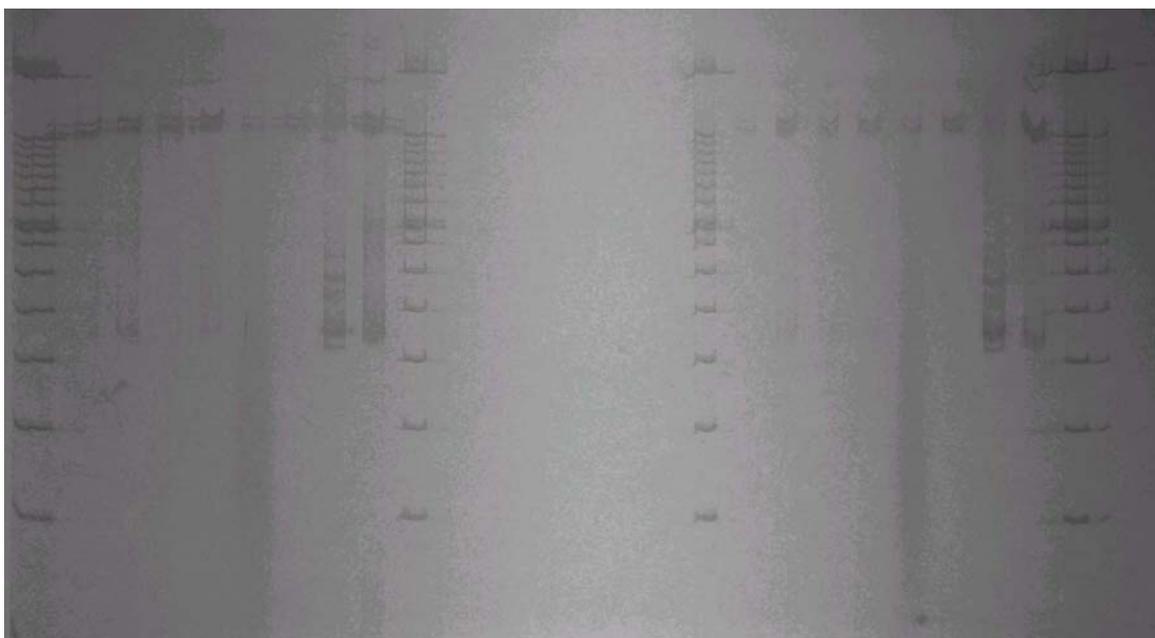


Figura 12. Resultado da otimização da técnica SSCP. Gel SSCP 6% segundo protocolo de Ah/Judelson (2000).

Após a otimização da técnica SSCP, com *primers* não marcados e corrida em gel de acrilamida corada com nitrato de prata, verificaram-se marcas ssDNA com diferentes mobilidades eletroforéticas no gel de acrilamida para os clones de cacauero. Este fato pôde validar a técnica RGH-SSCP para análise de polimorfismos em regiões gênicas ligadas a genes candidatos à resistência em cacau e, conseqüentemente, análise da diversidade genética entre os clones de cacauero. A Figura 13 mostra os padrões eletroforéticos dos SSCP nos 57 clones estudados, destacando a identificação de marcas ssDNA com diferentes mobilidades eletroforéticas no gel de acrilamida e a diferenciação de indivíduos homocigotos (com duas bandas ssDNA) e heterocigotos (com três ou quatro bandas ssDNA).

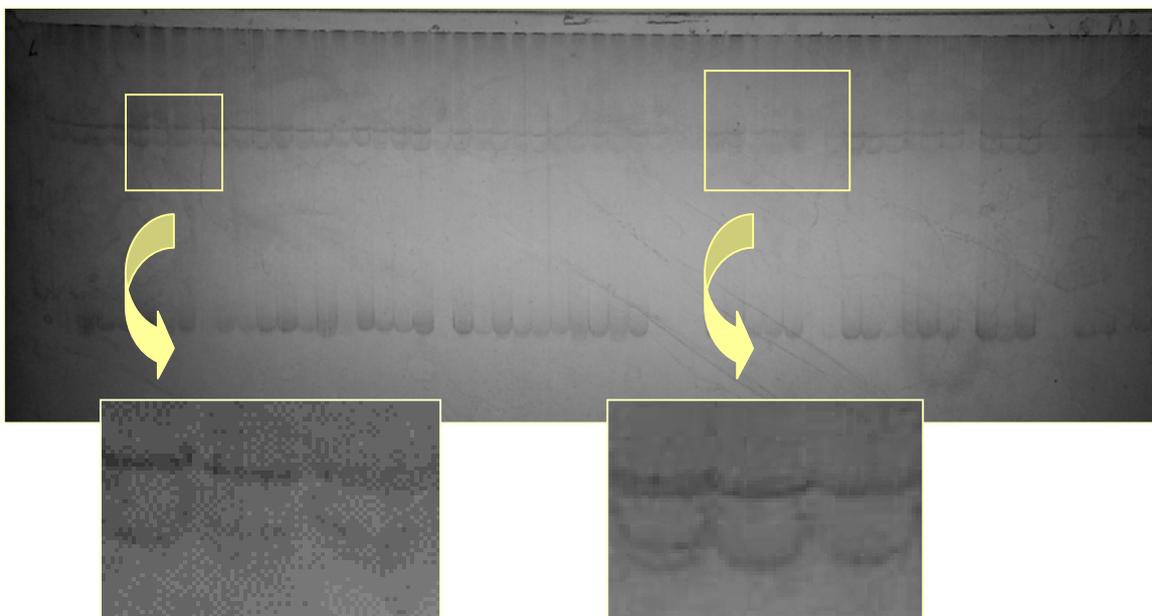


Figura 13: Detecção de polimorfismos entre os clones de cacauero em gel de acrilamida a 6% SSCP, validando a otimização da técnica SSCP descrita para cacau neste estudo de diversidade genética. A figura maior mostra todo o padrão eletroforético obtido para os clones e, em destaque verificam-se marcas ssDNA com diferentes mobilidades no gel e a diferenciação de indivíduos homocigotos e heterocigotos.

#### 4.2. Análise de polimorfismos alélicos nos fragmentos amplificados dos marcadores RGHs

Dos 12 *primers* RGHs testados, 10 amplificaram e destes sete tiveram todas as marcas polimórficas entre os 57 clones estudados (Tabela 4).

Obtiveram-se ao todo 79 marcas distintas de ssDNA, com média de 7,9 marcas por *primer*, e variação de 4 a 16 marcas para RGH10 e RGH3BC, respectivamente. A técnica SSCP detecta diferenças conformacionais do DNA fita simples na eletroforese, o que a torna sensível e vantajosa para detecção de marcas distintas com diferenças mínimas de até de um par de bases na seqüência nucleotídica (KERR & CURRAN, 1996, Manual GeneScan, 2000) em relação a outras técnicas como RAPD e SSR. O polimorfismo encontrado pelo uso da técnica SSCP neste conjunto de clones de cacau foi superior ao encontrado por vários autores que utilizaram marcadores genômicos (RISTERUCCI et al., 2000, FALEIRO et al., 2004b, SANTOS et al., 2005).

Tabela 4. Polimorfismos encontrados nos 10 *primers* RGHs, a partir do número de marcas (ssDNA) geradas, número de marcas polimórficas e monomórficas, percentual de polimorfismo e média de marcas por *primer*

PRIMER	Nº MARCAS GERADAS	Nº MARCAS POLIMÓRFICAS	Nº MARCAS MONOMÓRFICAS	% POLIMORFISMO
RGH1	6	6	0	100
RGH2	7	7	0	100
RGH3A	6	6	0	100
RGH3BC	16	16	0	100
RGH4	6	6	0	100
RGH5	8	6	2	75
RGH6	7	7	0	100
RGH7	8	6	2	75
RGH8	11	11	0	100
RGH10	4	2	2	50
MÉDIA	7,9	7,3	0,6	90

Risterucci et al., (2000) utilizando 20 locos SSR para o estudo da diversidade genética em 28 acessos obtiveram uma média de 5,6 alelos/locos. Faleiro et al. (2004b) utilizando 16 pares de *primers* SSR em 30 acessos estudados, observaram uma média de 4 alelos/locos. Santos et al. (2005) analisou 59 *primers* RAPD em 30 acessos de cacau da série CEPEC resultando em uma média de 5,7 fragmentos/*primer*.

Faleiro et al. (2001c), utilizaram três combinações de *primers* para AFLP, nove *primers* para SSR e 18 *primers* para RAPD gerando 437 (145,7 marcas/*primer*), 33 (3,7 marcas/*primer*) e 137 (7,6 marcas/*primer*) marcas moleculares, respectivamente. Este último trabalho mostrou a vantagem, para número de marcas geradas, da técnica de AFLP em comparação com a técnica

dos marcadores SSR. Segundo Litt e Luty (1989) e Faleiro et al. (2001c), este fato é compensado pelo alto conteúdo de informação genética por loco, uma vez que os marcadores SSR, ao contrário dos AFLP e RAPD, são codominantes. Comparando estas técnicas de marcadores genômicos com a técnica SSCP usada com marcadores gênicos (RGHs), uma outra vantagem desta é o poder de diferenciação de heterozigotos e homozigotos caracterizando como marcador codominante e além de gerar muitas marcas para cada loco.

Seis dos 10 marcadores RGHs amplificados geraram marcas ssDNA específicas, encontradas somente em plantas resistentes ou somente em plantas suscetíveis (Tabela 5). Nos clones suscetíveis, os *primers* RGH2 e RGH7 geraram três marcas únicas para estes clones (RGH2\_M6, RGH2\_M7 e RGH7\_M8). Já nos clones resistentes, os *primers* RGH1, RGH4 e RGH5 geraram seis marcas únicas para os mesmos (RGH1\_M1, RGH1\_M5, RGH4\_M6, RGH5\_M1, RGH5\_M2 e RGH5\_M5). O *primer* RGH3BC foi o único que amplificou marcas únicas ssDNAs para os dois grupos de clones, identificando-se três marcas para clones suscetíveis (RGH3BC\_M4, M9 e M10) e quatro marcas para clones resistentes (RGH3BC\_M1, M2, M14 e M16).

Estas marcas caracterizam cada um destes clones, ou seja, possivelmente podem ser marcas específicas de características individuais dos clones, que não seja necessariamente resistência, como por exemplo, RGH4\_M6 que foi exclusivo do TSH 565. Mesmo porque nem todos homólogos de genes de resistência amplificados são comprovados como funcionais ou estão ligados a genes conhecidos. Contudo há uma grande possibilidade de que os mesmos estejam envolvidos em algum mecanismo de defesa dentro da planta (CHEN et al., 1998), podendo ser marcas alternativas de possíveis alelos para serem utilizadas em programa de melhoramento a fim de orientar o planejamento de experimentos de segregação dessas regiões genômicas com características de resistência, envolvendo esses materiais.

Tabela 5. Representação esquemática de marcas ssDNA amplificados por *primers* RGHs que caracterizaram grupos de clones de cacau suscetíveis (SIC 23, SIAL 169 e ICS 1) e resistentes a doenças (C.SUL 3, VB 679, TSH 565, EET 392, RB 36, FLN 30 e OC 67). Os *primers* RGHs listados foram aqueles que amplificaram apenas marcas (M) características para clones de grupos distintos de resistência, e a enumeração das marcas M representam a posição da mobilidade eletroforética de cada uma por *primer*

PRIMERS	CLONES SUSCETÍVEIS			CLONES RESISTENTES						
	SIC 23	SIAL 169	ICS 1	C.SUL 3	VB 679	TSH 565	EET 392	RB 36	FLN 30	OC 67
RGH1					RGH1_M1		RGH1_M5			
RGH2	RGH2_M7	RGH2_M6 RGH2_M7	RGH2_M6							
RGH3BC	RGH3BC_M4 RGH3BC_M9	RGH3BC_M4 RGH3BC_M9	RGH3BC_M4 RGH3BC_M10	RGH3BC_M14 RGH3BC_M16	RGH3BC_M1 RGH3BC_M2					
RGH4						RGH4_M6				
RGH5								RGH5_M5	RGH5_M2	RGH5_M1 RGH5_M2
RGH7	RGH7_M8	RGH7_M8								

As marcas RGHs supostamente caracterizam a resistência à vassoura-de-bruxa dos materiais resistentes selecionados para esta análise, por exemplo, percebidos no campo. Já no grupo de materiais suscetíveis também se observaram marcas RGH-SSCP exclusivas do mesmo, isto pode indicar que houve mutações nestas regiões altamente conservadas de suspeitos genes de resistência a doenças em plantas, como regiões NBS, LRR, STK, durante a evolução da espécie, caracterizando a suscetibilidade dos clones.

Existe a tendência de inter-relacionar o fenótipo de resistência a doenças em plantas e um único marcador identificado dentro de um gene candidato (CRAWFORD et al., 2004). Se o marcador identificado não for um variante causal, este inter-relacionamento se suporta na suposição de estar existindo um desequilíbrio de ligação ou uma associação alélica entre o variante causal e o marcador examinado. Contudo, sem conhecimento prévio da variação genética completa dentro do gene candidato ou da estrutura de desequilíbrio de ligação na região, estes resultados positivos e negativos devem ser interpretados com cuidado (CARDON & BELL, 2001, CRAWFORD et al., 2004). Logo, não há possibilidade de se afirmar, no presente estudo, sobre as variações conformacionais de DNA fita simples identificadas no gel de acrilamida como variações alélicas que estão ligadas à resistência a doenças no cacau, sem mesmo conhecer da variação dentro das regiões conservadas dos RGHs e suas estruturas de desequilíbrio de ligação.

A principal fonte destas variações alélicas é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que ocorre dentro de regiões funcionais como regiões codificadoras, junções *splicing* e regiões promotoras, sendo de enorme interesse já que mudanças nestas regiões gênicas podem causar doenças Mendelianas comuns e complexas (BOTSTEIN & RISCH, 2003, CRAWFORD et al., 2004). A técnica de SSCP pode detectar SNPs através de sua corrida eletroforética, já que tem a sensibilidade de detectar mutações de até um par de bases (KERR & CURRAN, 1996, Manual GeneScan, 2000). Porém, não se pode afirmar sobre a existência destes SNPs causando mudanças conformacionais das ssDNAs sem antes se conhecer as seqüências nucleotídicas destes genes candidatos a resistência e suas variações alélicas.

A ocorrência de mutações em alelos dos genes de resistência em plantas pode levar a níveis diferenciados de resistência ou suscetibilidade. Alelos de

suscetibilidade, supostamente, ocorrem por mutações simples em alelos selvagens de resistência (BERGELSON et al., 2001, MALVAS, 2003), porém não há evidências concretas a este respeito (BERGELSON et al., 2001). Até o momento, entretanto pouco é conhecido sobre a dinâmica da evolução molecular de genes de resistência. Por exemplo, no loco *RPS2*, alelos de resistência são geneticamente mais similares entre si do que os alelos de suscetibilidade. Em um estudo de evolução molecular, o gene *RPS2* apresentou um nível de polimorfismo de 1,25%, sendo que aproximadamente metade deste polimorfismo resultou em alteração de aminoácidos e 70% destes casos foram alterações não conservadas. Este nível de polimorfismo geralmente não é encontrado em plantas e demonstra que, provavelmente, o gene *RPS2* é um gene que evolui rapidamente (CAICEDO et al., 1999, MALVAS, 2003).

#### **4.3. Análise de diversidade genética**

As estimativas de dissimilaridade genética baseadas em marcadores RGH-SSCP, geradas a partir de 1596 pares de combinações de 57 acessos de cacau, variaram de 0,0253 a 0,3797, com média de 0,2036 (Figura 14). Nesta figura observa-se ainda que a grande parte dos pares de genótipos variou de 0,15 a 0,25 de dissimilaridade apresentando uma tendência de distribuição normal. Os clones FLN 30 e RVID 08 (0,3797) foram os mais dissimilares enquanto que os clones RT 09 e RT 106 (0,0253) os mais similares. No geral, estes resultados indicam que neste grupo de acessos e com base nesta técnica houve alto índice de similaridade, o que pode ser explicado pelo fato de que se estudou a diversidade dentro dos genes. Também pode se tratar do fato de a maioria dos clones incluídos no estudo terem sido selecionados por produtores para resistência e, em tese, deveriam ter alelos similares de resistência à vassoura-de-bruxa.

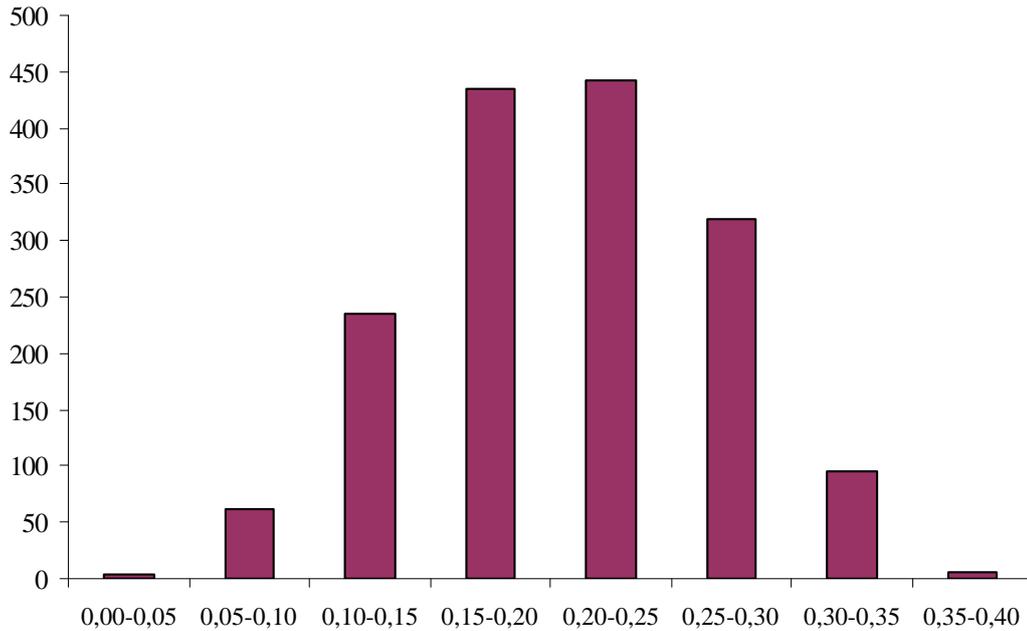


Figura 14. Histograma da distribuição de freqüências das dissimilaridades genéticas dos pares de genótipos, onde no eixo x estão os intervalos das dissimilaridades genéticas e no eixo y estão o nº de pares de combinações de dissimilaridades.

Em um estudo de diversidade genética com 270 acessos de cacau de diferentes origens baseados em RAPD (15 acessos idênticos ao deste trabalho), observou-se uma variação da distância genética de 0,000 a 0,5691, com média de 0,310 (MARITA et al., 2001). Faleiro et al. (2004b), analisando 30 acessos de cacau, baseado em SSR, sendo 16 clones idênticos ao deste trabalho, encontrou distâncias genéticas de 0,13 a 0,71. Tanto com o marcador RAPD quanto SSR indicaram alta variabilidade entre os clones com amplitudes de distâncias genéticas altas, o que não foi percebido neste estudo com marcador RGH-SSCP.

A análise dos 21 clones considerados âncoras mostrou existir alta similaridade genética entre os mesmos 81% (0,1909), apesar de serem de diferentes origens geográficas (Tabela 6). Este índice de similaridade é superior a valores encontrados com marcadores genômicos (MARITA et al., 2001, YAMADA et al., 2003b, FALEIRO et al., 2004b).

Elevado índice de similaridade genética 79% (0,2112) também foi encontrado para os 36 clones selecionados por produtores, contudo menor que os clones âncoras. Isto pode indicar algum progenitor comum entre estes clones, possivelmente o clone SCA 6 a fonte mais comum de resistência genética à vassoura-de-bruxa (PIRES et al., 2001, YAMADA et al., 2003b). Estes além de

serem muito similares entre si, são 83% (0,1733) similares ao SCA 6 mostrando que possivelmente existe uma relação de ascendência em comum, apesar de não se poder afirmar esta ascendência ao SCA 6. Não se esperava uma alta dissimilaridade entre os clones selecionados por produtores e o SCA 6, pois a amplificação destes fragmentos RGHs é feita em regiões conservadas, ou seja, esperava-se mais similaridades entre os fragmentos mostrando que as diferenças pequenas existentes entre os mesmos serão significativas para seleções de níveis diferenciados de resistência dos clones de cacauero. Segundo Malvas (2003) parece comum que polimorfismos ocorram mais em íntrons que em éxons. Assim, considerando que estas seqüências homólogas façam parte de um loco envolvido na resistência e, portanto sejam expressas, a quantidade de polimorfismos deveria ser menor como o observado.

Tabela 6. Dissimilaridades médias dos grupos de clones estudados (Conjunto, seleções por produtores e âncoras) e destes grupos em relação ao SCA 6

Grupos	Dissimilaridades Médias
Conjunto	0,2036
Seleções	0,2112
Âncoras	0,1909
Conjunto X SCA 6	0,1668
Seleções X SCA 6	0,1733
Âncoras X SCA 6	0,1633

Os acessos SCA 6; ICS 1; SIC 19 e IMC 67 foram utilizados como controles no estudo de Faleiro et al. (2004b), tendo o SCA 6 apresentado menor média de distância genética em relação aos acessos selecionados por produtores, um pouco acima de 0,4. Outros estudos, também apresentaram inter-relacionamento genético entre as seleções por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa e o SCA 6 (YAMADA & LOPES, 1999, ARAÚJO et al. 2003, FALEIRO et al., 2004a). Estudos de herança genética da resistência mostram que o SCA 6 tem um gene de efeito maior que controla a resistência à vassoura-de-bruxa (BARTLEY, 1981, QUEIROZ et al., 2003, FALEIRO et al., 2006).

Para melhor representar as dissimilaridades de cada clone em relação aos demais, calcularam-se as distâncias genéticas médias, logo quanto maior o valor de dissimilaridade, menos similar em relação aos demais (Tabela 7).

**Tabela 7. Dissimilaridades genéticas médias de cada clone em relação aos demais**

CLONE	DISTÂNCIA MÉDIA	CLONE	DISTÂNCIA MÉDIA	CLONE	DISTÂNCIA MÉDIA
AM 01	0,2039	ICS 1	0,2101	SCA 6	0,1668
AM 02	0,2167	IMC 67	0,2014	C.SUL 3	0,2152
BB 1.33	0,2492	M 05	0,1757	SIAL 169	0,2234
BB 6018	0,2720	NV 22	0,1794	SIC 23	0,1983
BB 6020	0,2580	NA 33	0,1854	SJ 02	0,1845
CCN 10	0,2301	MA 16	0,2016	MOQ 216	0,1377
CSF 22	0,2187	PAT 118	0,1765	SM 06	0,2421
OC 67	0,2014	PAT 84	0,1275	T 11	0,2156
EET 392	0,1634	PB 617	0,1497	TR 15	0,1797
FADA 100	0,2090	PH 16	0,1552	TR 35	0,2094
RB 36	0,2101	POUND 4B	0,1632	TSH 1188	0,1597
FL 16	0,2145	POUND 7	0,1948	TSH 516	0,1819
FL 60	0,2385	EET 399	0,1577	TSH 565	0,2121
FLN 30	0,2314	ICS 32	0,1652	VB 515	0,2085
MO 20	0,2052	RT 06	0,1905	VB 547	0,2341
FSU 13	0,2278	RT 09	0,2125	VB 679	0,2445
FSU 151	0,2429	RT 106	0,1885	VB 892	0,2363
FSU 77	0,2085	RVID 08	0,2389	VB 900	0,1752
GM 33	0,2054	RVID 12	0,1461	VB 902	0,1648

A série de clones BBs apresentaram as médias de dissimilaridades mais altas (0,2720, 0,2580 e 0,2492), em média, aos demais clones. Este fato pode ser importante para o planejamento de cruzamentos com estes materiais em melhoramento genético visando maximizar a diversidade em plantações, logo é importante caracterizar estes clones da série BB para resistência a doenças do cacaueteiro e produção. Já os clones PAT 84 e MOQ 216 apresentaram 0,1275 e 0,1377, respectivamente, de dissimilaridades médias aos demais clones. O SCA 6 teve 0,1668 de dissimilaridade média para os demais, ou seja, 83% de similaridade, considerada alta.

O índice de heterozigose dos locos por clone variou de 20 a 90%, correspondendo aos clones VB 892 e FSU 77, respectivamente (Tabela 8). Dos clones analisados, 35 clones (61%) apresentaram um índice de heterozigose acima de 50% para os 10 locos RGHs. No estudo realizado por Faleiro et al. (2004b), 15% das seleções analisadas tiveram acima de 50% de seus locos heterozigotos. Dezesesseis clones apresentaram índice de heterozigose abaixo de

50% para os 10 RGHs e seis clones tiveram índice de heterozigose em 50% para os locos estudados.

Tabela 8. Nível de Heterozigose de cada Clone em relação aos 10 locos RGHs. Determinando a quantidade de locos heterozigotos, homozigotos e perdidos, além do nível de heterozigose dos clones

QUANTIDADE DE LOCOS				
	HETEROZIGOTOS	HOMOZIGOTOS	PERDIDOS	% HETEROZIGOSE
AM 01	5	4	1	55,56
AM 02	4	6	0	40,00
BB 1.33	7	3	0	70,00
BB 6018	7	3	0	70,00
BB 6020	7	3	0	70,00
CCN 10	7	3	0	70,00
CSF 22	5	5	0	50,00
OC 67	4	4	2	50,00
EET 392	3	4	3	42,86
FADA 100	7	3	0	70,00
RB36	5	4	1	55,56
FL16	6	3	1	66,67
FL 60	7	2	1	77,78
FLN 30	7	3	0	70,00
MO 20	6	3	1	66,67
FSU 13	6	4	0	60,00
FSU 151	8	2	0	80,00
FSU 77	9	1	0	90,00
GM 33	5	4	1	55,56
ICS 1	2	6	2	25,00
IMC 67	3	7	0	30,00
M 05	4	5	1	44,44
NV 22	4	6	0	40,00
NA 33	5	5	0	50,00
MA 16	4	5	1	44,44
PAT 118	6	3	1	66,67
PAT 84	3	4	3	42,86
PB 617	5	3	2	62,50
PH 16	4	5	1	44,44
POUND 4B	4	6	0	40,00
POUND 7	4	6	0	40,00
EET 399	6	2	2	75,00
ICS 32	5	2	3	71,43
RT 06	5	5	0	50,00
RT 09	6	4	0	60,00
RT 106	5	4	1	55,56
RVID 08	7	3	0	70,00
RVID 12	6	2	2	75,00
SCA 6	6	2	2	75,00
C.SUL 3	6	4	0	60,00

SIAL 169	8	2	0	80,00
SIC 23	8	1	1	88,89
SJ 02	4	5	1	44,44
MOQ 216	4	4	2	50,00
SM 06	5	4	1	55,56
T 11	7	2	1	77,78
TR 15	3	6	1	33,33
TR 35	6	4	0	60,00
TSH 1188	4	4	2	50,00
TSH 516	6	3	1	66,67
TSH 565	6	2	2	75,00
VB 515	7	1	2	87,50
VB 547	7	3	0	70,00
VB 679	7	3	0	70,00
VB 892	2	8	0	20,00
VB 900	4	5	1	44,44
VB 902	2	6	2	25,00

Estes resultados mostram um alto nível de heterozigose dos clones para os locos em estudo podendo ser explicado pela presença de maior parte dos clones de estudo serem selecionados por produtores de plantações de híbridos de cacauero. Alto índice de heterozigose é desejável para a pesquisa na área, que busca fontes diferentes do SCA para resistência à vassoura-de-bruxa e uma maior durabilidade da mesma, além de aumentar a variabilidade da espécie *Theobroma cacao* por meio de alelos ou marcas genéticas diferentes. Logo, estes resultados mostram uma característica desejável das seleções realizadas pelos produtores: o efeito positivo da heterozigose na resistência e no rendimento do cacau (ATANDA, 1973; FALEIRO et al., 2004b).

Contudo alguns resultados são questionáveis, como o exemplo do clone SCA 6 que teve 75% de heterozigose em seus locos, e em análises baseadas em marcador SSR o mesmo é altamente homozigoto (FALEIRO et al., 2001d), além de ser homozigoto para resistência à vassoura-de-bruxa (PIRES et al. 1999). Os Scavinas apresentaram um nível muito baixo de heterozigose com marcador SSR, o que condiz com a sua alta capacidade combinatória (FALEIRO et al., 2001d). Segundo Faleiro et al. (2004b), em estudo com SSR, o SCA 6 apresentou índice de mais de 70% de homozigose.

Os clones da série SIC e SIAL (baixo amazônicos), também são altamente homozigotos (FALEIRO et al., 2001d). Uma explicação pra este fato é que estes clones foram introduzidos na Bahia por uma pequena população seguida de várias gerações de autofecundação e cruzamentos entre estes autofecundados,

tipicamente estes processos de endogamia ocorrem em populações isoladas. Contudo no presente estudo estes materiais apresentaram índices de 88,89 e 80,00% de heterozigose, respectivamente. O nível de heterozigose de materiais alto amazônicos (RB 36, MO 20, IMC 67, NA 33, POUNDS, C.SUL 3 e MOQ 216) variou de 30 a 66%. O ICS 1 é um material híbrido trinitário (PIRES et al., 2001, FALEIRO et al., 2001d, YAMADA et al., 2003b), logo esperava-se um alto índice de heterozigose, o que não foi observado neste estudo.

Segundo Araújo (2005) em estudo de diversidade genética com marcadores SSR obteve os seguintes índices de heterozigose para alguns dos clones similares ao deste estudo: CCN 10 apresentou 66,6% de heterozigose, o EET 399 - 16,7%, o ICS 1 - 0%, ICS 32 - 66,6% , MA 16 - 16,7% , MO 20 - 66,6%, MOQ 216 - 25% , NA 33 - 25% , OC 67 - 8,3% , POUND 4B - 33,3% , RB 36 - 25%, SCA 6 -16,7%. Contrastando estes dados com a análise feita com marcadores RGHs-SSCP obtiveram-se índices de heterozigose para os mesmos clones: CCN 10 apresentou 70%, EET 399 - 75%, ICS 1 - 25%, ICS 32 - 71,43%, MA 16 - 44,44%, MO 20 - 66,67%, MOQ 216 - 50%, NA 33 - 50%, OC 67 - 50%, POUND 4B - 40%, RB 36 - 55,56% e SCA 6 - 75%. Estas comparações mostram algumas poucas semelhanças entre os valores quanto a heterozigose do CCN 10, ICS 32, MO 20 e POUND 4B. Logo, a análise de heterozigose dentro de regiões gênicas é diferente quando comparada com análises de outros trabalhos, por exemplo, baseadas em SSR, o que era esperado visto que se tratam de genes específicos de resistência a doenças.

O padrão de heterozigose pode ser caracterizado em função das regiões do genoma as quais se baseiam as análises dos marcadores utilizados. Clones analisados com marcadores genômicos tendem a apresentar maior heterozigose e clones analisados com marcadores gênicos tendem a ser mais homozigotos, como o exemplo dos marcadores RGHs que apresentam regiões conservadas entre espécies de plantas diferentes. Contudo ao analisar a disposição física e estrutural das regiões dos genes de resistência, verifica-se que após as regiões conservadas seguem-se regiões muito variáveis responsáveis pelas diversas funções dos mecanismos de defesa da planta. Além disso, como os homólogos de genes de resistência estão em *cluster* no genoma, é possível que alguns genes sejam funcionais e outros sejam reservatórios de mutação dando este alto índice de heterozigose para os locos RGHs nos clones estudados.

A presença de acessos com altos níveis de homozigose ou heterozigose é de fundamental importância para um programa de melhoramento. Segundo Faleiro et al. (2001b) e Araújo (2005), os genótipos mais homozigotos são mais adequados para obtenção de híbridos mais uniformes e com maior potencial quanto aos efeitos aditivos. Por outro lado, os genótipos amplamente heterozigotos são interessantes quando se deseja produzir progênes visando selecionar indivíduos para algumas características de interesse agrônômico (MOTA, 2003, ARAUJO, 2005).

Analisando o gráfico de dispersão dos clones considerados âncoras, percebeu-se que o SCA 6 e seus descendentes apresentam-se pouco dispersos. Os Alto Amazônicos dispersaram por todo o plano multidimensional, assim como os Baixo Amazônicos e os Trinitários que também não se agruparam (Figura 15). Esses clones apresentaram dissimilaridade média entre eles de 19%, mostrando uma alta similaridade entre si, o que está consistente com esse padrão de dispersão.

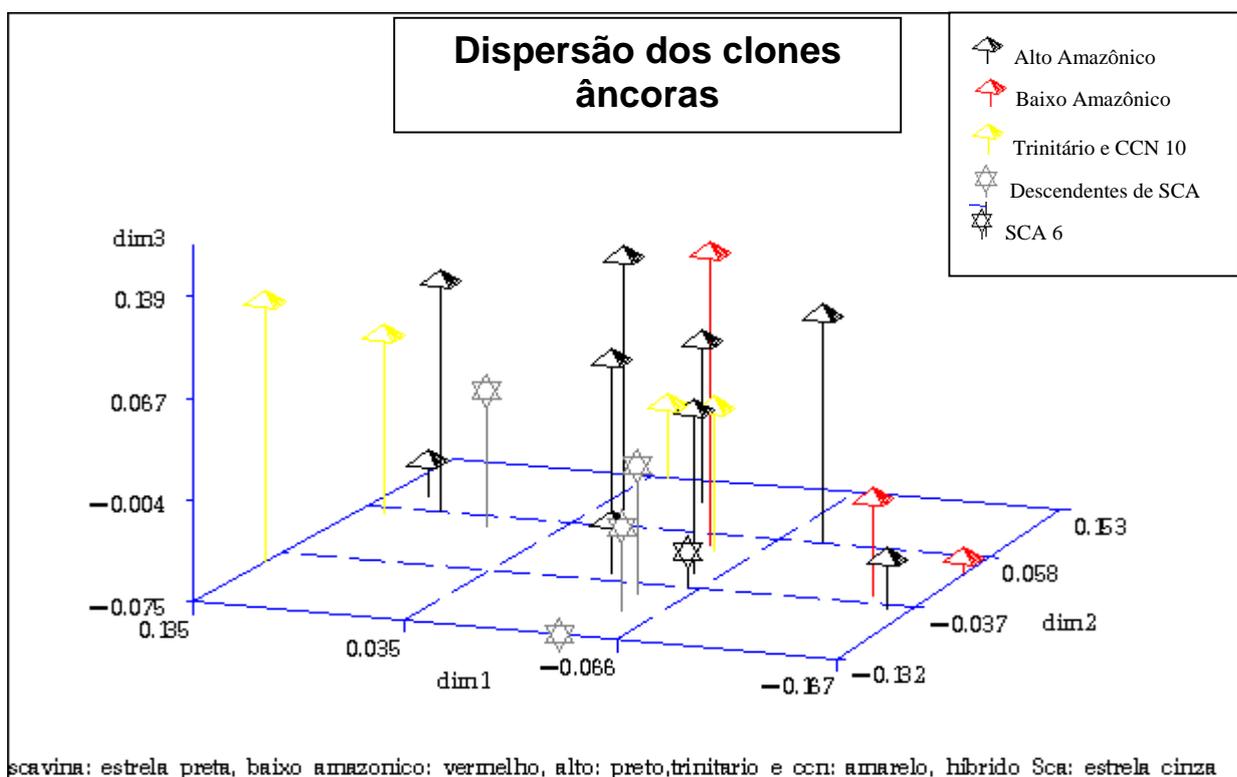


Figura 15. Dispersão dos grupos raciais de clones de cacaveiro considerados representantes da diversidade da espécie (Alto e Baixo Amazônicos, Trinitário e CCN 10, SCA 6 e seus descendentes), baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas.

Normalmente, acessos Alto Amazônicos mostram diversidade genética mais alta do que outros acessos de outras regiões como os Trinitários e os Baixo Amazônicos que tendem a formar grupos bem característicos no plano tridimensional (N'GORAN et al., 1994, MARITA et al., 2001, SANTOS et al., 2005).

Baseando-se apenas na Figura 15 percebeu-se uma dispersão relativamente alta, sem agrupamentos característicos para os grupos raciais do cacau, ressaltando que esta análise é baseada no polimorfismo encontrado dentro de regiões gênicas conservadas de supostos genes de resistência a doenças em plantas (RGHs) detectados no cacau. Logo esta dispersão não se baseia no genoma como um todo e sim em regiões conservadas e específicas no genoma do cacau, o que pode não estar condizendo com alguns outros trabalhos que utilizaram alguns destes clones como referenciais.

Após a inclusão dos clones selecionados em fazendas no gráfico de dispersão para análise, observou-se ampla dispersão dos clones em relação aos clones âncoras (Figura 16). Alguns deles concentrando-se ao redor do SCA 6, mas também próximos de Trinitários, Baixo e Alto Amazônicos, mostrando-se assim ampla diversidade do material.

Percebe-se alta similaridade entre os clones como um todo, entre os grupos de clones considerados como âncoras e o grupo de clones selecionados por produtores, além de dispersão gráfica relativamente mais baixa em comparação a outros trabalhos com marcadores genômicos. Contudo a identificação de pequenas diferenças nucleotídicas nos fragmentos RGHs, possibilita conformações diferenciadas entre os clones e, estas conformações podem mostrar-se representativas de possíveis alelos alternativos para características de interesse ao melhoramento genético do cacau, como a resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda.

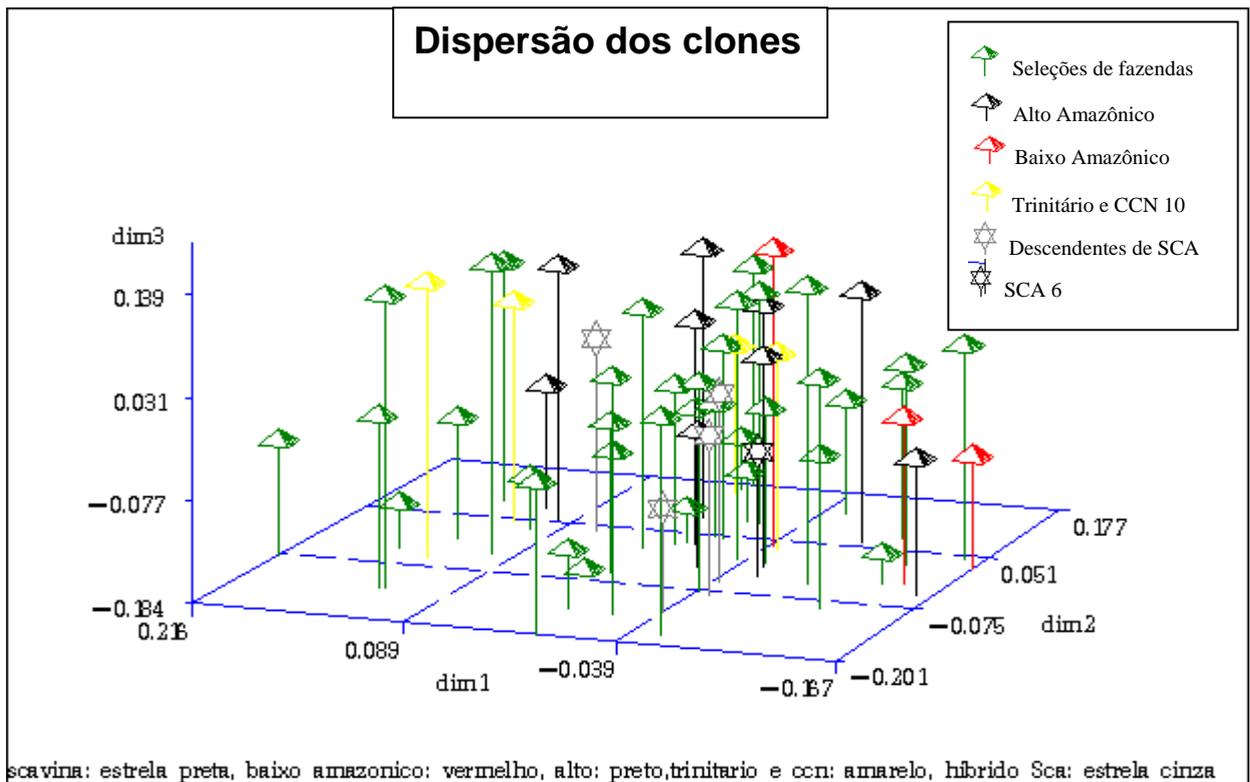


Figura 16. Dispersão dos clones de cacau incluindo-se os clones selecionados em fazendas, baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas.

Uma análise de dispersão genética (YAMADA et al., 2003b), baseada em SSR, feito com clones de cacau (seleções em fazendas, os SCAs, descendentes de SCAs, descendentes de Silécia, clones Amazônicos, Trinitários, clones derivados das variedades tradicionais da região - SIC, SIAL, etc e, materiais de origem desconhecida) teve como resultado caracterizações típicas dos grupos de cacau: materiais forastero amazônicos com maior diversidade (incluindo os SCAs e seleções de variedades locais) e os Trinitários, com menor diversidade. Os materiais reconhecidos como descendentes de SCA tiveram dispersão genética grande em relação aos outros progenitores em estudo e em relação aos clones considerados parentes mais distanciados do SCA (netos de SCA). As seleções de fazendas com as maiores distâncias genéticas em relação aos SCAs foram margeadas por genótipos descendentes do mesmo. Assim, segundo Yamada et al. (2003b), as distâncias genéticas em relação aos SCAs são indicativos muito pobres da possibilidade de inexistência de parentesco, e a metodologia de dispersão baseada em marcadores SSR foi inapropriada para o *screening* voltado à busca de novas fontes de resistência nestas seleções em fazendas.

Complementando esta análise de Yamada et al. (2003b), percebe-se neste trabalho resultados bem diferenciados de outros baseados em SSR, RAPD e AFLP que são diferenciados por contemplar e buscar divergências genéticas entre os clones de cacau em todo seu genoma. Logo, deve-se tomar muito cuidado ao inferir sobre determinados resultados de parentescos ou não com SCAs ou indicar novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa ou podridão-parda, baseados em marcadores genéticos que contemplam todo o genoma. Estudos comparativos de técnicas e marcadores moleculares são necessários para poder caracterizar as vantagens dos mesmos, como SSR, RAPD e AFLP em comparação com esta técnica utilizada no trabalho RGH-SSCP.

## 5. CONCLUSÕES

A técnica RGH-SSCP descrita para cacau foi otimizada e validada para este estudo de análise de polimorfismos para verificar diversidade genética em cacaueiro. Esta otimização da técnica foi realizada com *primers* não marcados e géis corados com nitrato de prata, permitindo a disponibilidade de uma nova técnica barata e sensível, além de simples ao ser comparada com as técnicas utilizando eletroforeses automatizadas com *primers* marcados com fluorescência.

O uso da técnica RGH-SSCP mostrou-se sensível em detectar polimorfismos genéticos dentro de dez *primers* RGHs nos clones de cacau.

O índice de heterozigose dos locos por clone variou de 20 a 90%, sendo maior quando comparado a trabalhos baseados em marcadores SSR.

As análises de diversidade genética baseadas em marcadores gênicos (RGHs) mostraram que os clones considerados neste estudo como âncoras são menos divergentes geneticamente quando foram comparadas com análises por marcadores genômicos como RAPD, AFLP e SSR. Os clones selecionados por produtores foram também muito similares entre si e ao SCA 6. Esta similaridade alta entre os clones possivelmente é devida a amplificação de regiões conservadas em genes de resistência a doenças em plantas.

Identificaram-se marcas RGH-SSCP exclusivas de clones selecionados como resistentes e marcas RGH-SSCP exclusivas de clones suscetíveis, o que requer novos estudos para testar a hipótese de ligação genética.

Novos estudos de diversidade genética devem ser realizados para a análise de polimorfismo utilizando-se SSCP adaptada para o cacau com outras populações e clones.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3<sup>rd</sup> ed. New York. Academic Press. 1988.

AGRIOS, G.N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, p.171-221. 1997.

**Ah Fong/Judelson** Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. 2000.

AIME, M.C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n.5, p.1012-1022. 2005.

ALBERSHEIM, P., ANDERSON-PROUTY, A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and biochemistry of pathogenesis. **Annual Review Plant Physiology**, v.26, p.31–52. 1975.

ANDERSEN, P.S.T., JESPERGAARD, C., VUUST, J., CHRISTIANSEN, M., LARSEN, L.A. Capillary Electrophoresis-Based Single Strand DNA Conformation Analysis in High-Throughput Mutation Screening. **Human Mutation**, v.21, p.455-465. 2003.

ARAÚJO, I.S. et al. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores moleculares RAPD. **Genetics and Molecular Biology** 26 (supl), p.219-220. 2000.

ARAÚJO, I.S., BAHIA, R.C.S., FALEIRO, F.G., GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P., AHNERT, D., LOPES, U.V., YAMADA, M.M., VALLE, R.R. Caracterização da diversidade genética e ascendência de fontes de resistência de *Theobroma*

cacao à vassoura-de-bruxa com base em marcadores moleculares RAPD. In: 13th International Cocoa Research Conference. Cocoa Producers' Alliance, **Proceedings**, Kota Kinabalu, p.613-618. 2003.

ARAÚJO, I.S. Desenvolvimento e Caracterização de marcadores microsatélites e sua aplicação em estudo de diversidade genética do cacauero (*Theobroma cacao* L.). **Tese Doutorado**. UENF. Campos dos Goytacazes-RJ. 2005.

ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., RODRIGUEZ, M., HERÁNDEZ, P., GARCÍA, T., MARTÍN, R. PCR-SSCP: A single Method for the Autentication of Grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*Lates niloticus*) Fillets. **Journal Agric. Food Chemical**, v.49, p.1720-1723. 2001.

ATANDA, O.A. Heterosis in crosses of *Theobroma cacao*. **Experimental Agriculture**, v.9, p.23-29. 1973.

ATHA, D.H., WENZ, H.M., MOREHEAD, H., TIAN, J., O'CONNELL, C.D. Detection of p53 point mutations by single strand conformation polymorphism: analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, p.172–179. 1998.

BALARDIN, R.S. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Departamento de Defesa Fitossanitária. **Fitopatologia**. 2002.

BALDI, P., PATOCCHI, A., ZINI, E., TOLLER, C., VELASCO, R., KOMJANE. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. **Theoretical Applied Genetics**, v.109, p.231-239. 2004.

BARTLEY, B.G.D. The status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer. In: **Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**, Caracas, Venezuela, 1977. Imprimiére, Lomé, Togo, p.57-69. 1981.

BENT, A.F., KUNKEL, B.N., DAHLBECK, D., BROWN, K.L., SCHMIDT, R., GIRAUDAT, J., LEUNG, J., STASKAWICZ, B.J. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science** 23, v.265, n.5180, p.1856-1860. 1994.

BENT, A.F. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. **The Plant Cell**, v.8, p.1757-1771. 1996.

BERGELSON, J., KREITMAN, M., STAHL, E.A., TIAN, D. Evolutionary dynamics of plant *R*-genes. **Science**, v.292, p.2281-2285. 2001.

BERTIOLI, S.C.M., JOSE, A.C.F.V., BERTIOLI, D.J., PROITE, K., GUIMARÃES, P.M. Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo RGA para o mapeamento genético de *Arachis* silvestre. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n.60. Brasília: DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004a.

BERTIOLI, S.C.M. Desenvolvimento de marcadores moleculares RGA para o mapeamento genético em espécies silvestres de *Arachis*: Southern Blot e PCR. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n.77. Brasília: DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004b.

BIRUNGI, J., MUNSTERMANN, L.E. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and the United States. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.95, p.125-132. 2002.

BLACK, W.C.IV, DUTEAU, N.M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In J. M. Crampton, C. B. Beard, and C. Louis (eds.), **Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual**. Chapman & Hall, London. p.361-373. 1997.

BONDENES, C., LAIGRET, F., KREMER, A. Inheritance and molecular variations of PCR-SSCP fragments in pedunculate oak (*Quercus robur*). **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.384-354. 1996.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 2 ed. Viçosa: Editora **UFV**. 1998.

BORRONE, J.W., KUHN, D.N., SCHNELL, R.J. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. **Theoretical Applied Genetics**, v.109, p.495–507. 2004.

BOTSTEIN, D., RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nat. Genet. Suppl.**, v.33, p.228–237. 2003.

CAICEDO, A.L., SCHAAL, B.A., KUNKEL, B.N. Diversity and molecular evolution of the RPS2 resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.302-306. 1999.

CARDON, L.R., BELL, J.I. Association study designs for complex diseases. **Nat. Rev. Genet.**, v.2, p.91-99. 2001.

CATTANEO, L.F. Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica Papaia* L.). **Tese Doutorado**. Campos dos Goytacazes, RJ, UENF, 94p. 2001.

CHEN, X.M., LINE, R.F., LEUNG, H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. **Theoretical Applied Genetics**, v.97, p.345-355. 1998.

COLLINS, N.C., WEBB, C.A., SEAH, S., ELLIS, J.G., HULBERT, S.H., PRYOR, A. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.11, p.968–978.1998.

Competição de Clones de Cacaueiro em Agrossistemas da Região Cacaueira da Bahia (Série 4). **Relatório Parcial II**. Parceria: CEPLAC/Produtores. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Centro de Pesquisas do Cacau. Seção de Genética. 2004.

CORDEIRO, M.C.R., SÁ, M.F.G. Interação planta-patógeno e o uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia** 10. 2000.

CRAWFORD, D.C., CARLSON, C.S., RIEDER, M.J., CARRINGTON, D.P., YI, Q., SMITH, J.D., EBERLE, M.A., KRUGLYAK, L., NICKERSON, D.A. Haplotype Diversity across 100 Candidate Genes for Inflammation, Lipid Metabolism, and Blood Pressure Regulation in Two Populations. **American Journal Human Genetics**, v.74, n.4, p.610-622. 2004.

CRESTE, S., TULMANN NETO, A., FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299–306. 2001.

CRUZ, C.D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, UFV, 442p. 1997.

CULVER, J. N. TOBACCOMOSAIC VIRUS ASSEMBLY AND DISASSEMBLY: Determinants in Pathogenicity and Resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.40, p.287-308. 2002.

DARCICK, C.D., CULVER, J.N. Tobamovirus Coat Proteins: Elicitors of the Hypersensitive Response in *Solanum melongena* (Eggplant). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.6, p.776-778. 1997.

De MERIDA, A.M.P., PALMIERI, M.M., YURRITA, A., MOLINA, E., BLACK IV, W. C. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.230-239. 1999.

DEMPSEY, D.A., SILVA, H., KLESSIG, D.F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends Microbiol.**, v.6, n.2, p.54-61. 1998.

DESLANDES, L., OLIVIER, J., THEULIERES, F., HIRSCH, J., FENG, D.X., BITTNER-EDDY, P., BEYNON, J., MARCO, Y. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v.99, p.2404–2409. 2002.

DIAS, L.A.S. et al. Melhoramento Genético do Cacaueiro. Viçosa-MG: **FUNAPE, UFG**, 578p. 2001.

DIXON, M.S., JONES, D.A., KEDDIE, J.S., THOMAS, C.M., HARRISON, K., JONES, J.D.G. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, v.84, p.451-459. 1996.

DOYLE, J.C., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Carlsbad, v.12, p.13-15.1990.

ELLIS, L.A., TAYLOR, C.F., TAYLOR, G.R. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. **Human Mutat.**, v.15, p.556–564. 2000.

FAJARDO, T.V.M., EIRAS, M., SCHENATO, P.G., NICKEL, O., KUHN, G.B. Avaliação da Variabilidade do *Grapevine leafroll-associated virus 1* e 3 por Análise de Sequências de Nucleotídeos e Polimorfismo Conformacional de Fita Simples. **Genetics and Molecular Biology** 29, v.2, p.287-289. 2005.

FALEIRO, A.S.G., FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., MELO, G.R.P., MONTEIRO, W.R., YAMADA, M.M., BAHIA, R.C.S., CORRÊA, R.X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.290-297. 2004b.

FALEIRO, F.G., PIRES, J. L., YAMADA, M.M., LOPES, U.V., FALEIRO, A.S.G., BAHIA, R.C.S. Heterozigose de acessos de *Theobroma cacao* L. de diferentes origens, com base em marcadores microssatélites. *In: 47º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia. Anais do 47º Congresso Nacional de Genética.* 2001d.

FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., YAMADA, M.M., PIRES, J.L., BAHIA, R.C.S., SANTOS, R.C., GOMES, L.M.C., ARAÚJO, I.S., FALEIRO, A.S.G., GRAMACHO, K.P., MELO, G.R.P., MONTEIRO, W.R.E., VALLE, R.R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e MICROSSATÉLITES. **Agrotropica**, v.13, n.2, p.79-86. 2001c.

FALEIRO, F.G. et al. 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. 2001a. (Resumo) [CD-ROM].*

FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., YAMADA, M.M., GRAMACHO, K., PIRES, J.L., BAHIA, R.C.S., SANTOS, R.C., GOMES, L.M.C., ARAÚJO, I.S., FALEIRO, A.S.G., MELO, G.R.P., MONTEIRO, W.R., VALLE, R.R. Caracterização molecular de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. recomendadas pelo CEPEC/CEPLAC com base em marcadores moleculares RAPD, AFLP e microssatélites. *In: Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal.* p.160. 2001b.

FALEIRO, F.G., YAMADA, M.M., LOPES, U.V., FALEIRO, A.S.G., BAHIA, R.C.S., GOMES, L.M.C., SANTOS, R.C., SANTOS, R.F. Genetic Similarity of *Theobroma cacao* L. Accessions Maintained in Duplicate at the Cacao Research Center Germplasm Collection, Based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.439-444. 2002a.

FALEIRO, F.G., RESENDE, M.L.V., NIELLA, G.R., CASTRO, H.A., PEREZ, J.O., JÚNIOR, C.A.V., PIRES, J.L. Resistência Horizontal/vertical e agressividade/virulência no patossistema *Theobroma cacao* x *Crinipellis pernicioso*. **Agrotropica**, v.14, n.3, p.121-126. 2002b.

FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., YAMADA, M.M., MELO, G.R.P., MONTEIRO, W.R., PIRES, J.L., ROCHA, J.B., BAHIA, R.C.S., GOMES, L.M.C., ARAÚJO, I.S.,

FALEIRO, A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.12-17. 2004a.

FALEIRO, F.G. et al. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v.149, p.227-235. 2006.

FLOR, H .H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Lancaster, v.32, p.653-659. 1942.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.275-276. 1971.

GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, v.52, n.2, p.165-175. 1998.

GELFI, C., VIGANO, A., CURCIO, M., RIGHETTI, P.G., RIGHETTI, S.C., CORNA, E., ZUNINO, F. Single-strand conformation polymorphism analysis by capillary zone electrophoresis in neutral pH buffer. **Electrophoresis**, v.21, p.785–791. 2000.

GOMES, L.M.C. et al. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 25 (Supl.), p.377. 2000.

GOMES, L. M.C. Caracterização Parcial de análogos de genes de resistência em duas espécies de eucalipto. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de viçosa. PPG Genética e Melhoramento.Viçosa-MG. 2005.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., MUNOZ, M.D.L., FERNANDEZ-SALAS, I., BEATY, B. J., BLACK, W.C.IV. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.62, p.200-209. 2000.

GOSZCZYNSKI, D.E., JOOSTE, A.E.C. The application of singlestrand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of *Grapevine virus A*. **Vitis**, v.41, p.77-82. 2002.

GRAHAM, M.A., MAREK, L.F., LOHNES, D., CREGAN, P., SHOEMAKER, R.C. Expression and genome organization of resistance gene analogs in soybean. **Genome**, v.43, p.86-93. 2000.

GRAMACHO, K.P., BAHIA, C., LOPES, U.V., ZAIDAN, H., GESTEIRA, A.S., ARAUJO, M.R. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Crinipellis pernicioso*. In: 14<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, Gana. **Proceedings**. Gana: Cambery. 2003.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant Disease Resistance Genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607. 1997.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Responses to Plant Pathogens **In Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. p.1102-1156. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA. 2000.

HAMMOND-KOSACK, K.E., PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.177-193. 2003.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. **GATA**, v.9, p.73-79. 1992.

HODGKINSON, V.H., BIRUNGI, J., HAGHPANAH, M., JOSHI, S., MUNSTERMANN, L.E. Rapid Identification of Mitochondrial Cytochrome B Haplotypes by Single Strand Conformation Polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Populations. **Journal of Medical Entomology**, v.39, n.4. 2002.

HONGYO, T., BUZARDL, G.S., CALVERT, R.J., WEGHORST, C.M. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.16, p.3637-3642. Oxford University Press. 1993.

HULBERT, S.H., WEBB, C.A., SMITH, S.M., SUN, Q. RESISTANCE GENE COMPLEXES: Evolution and Utilization. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.285-312. 2001.

HUMPHRIES, S.E., GUDNASON, V., WHITTALL, R., IAN, N.M. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its

use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. **Clinical Chemistry** 43 (3), p.427-435. 1997.

JACKSON, A. O., TAYLORBI. C. Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface. **The Plant Cell**, v.8, p.1651-1668. 1996.

JACOBS, T.H., PARLEVLIT, J.E. Durability of disease resistance. Kluwer Academic Publishers, London. 375p.; **Current plant science and biotechnology in agriculture**, v.18. 1993.

JOHAL, G.S., BRIGGS, S.P. Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. **Science**, v.258, n.5084, p.985-987. 1992.

KAJIWARA, H., KANEKO, T. Utility of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis Was Improved by Low-Cross-Linking polyacrilamide Gel and Quick Low-Background Silver Staining. **Analytical Biochemistry**, v.300, p.273-274. 2002.

KAWCHUK, L. M., HACHEY, J., LYNCH, D. R., KULCSAR, F., VAN ROOIJEN, G, WATERER, D. R., ROBERTSON, A., KOKKO, E., BYERS, R., HOWARD, R. J., FISCHER, R., PRÜFER, D. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. **PNAS**, v.98, n.11, p.6511-6515. 2001.

KERR, R., CURRAN, M.D. Applications of polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism to microbiology. **Journal Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.49, p.315-320. 1996.

KOMBRINK, E., SOMSSICH, I.E. Defense responses of plants to pathogens. **Adv. Bot. Res.**, v.21, p.1-34. 1995.

KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet, I. (Ed.) **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York. John Wiley & Sons. p.255-274. 1987.

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

KUMAR, D., GUPTA, N., AHLAWAT, S.P.S., SATYANARAYANA, R., SUNDER, S., GUPTA, S.C. Single strand confirmation polymorphism (SSCP) detection in

exon I of the  $\alpha$ -lactalbumin gene of Indian Jamunapari milk goats (*Capra hircus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.275-281. 2006.

LAKER, H.A., SREENIVASAN, T.N., RAJKUMAR, D. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management** 34 (3), p.318-323. 1988a.

LAKER, H.A., SREENIVASAN, T.N., KUMAR, D.R. The resistance of some cocoa clones to *Crinipellis pernicios*a in Trinidad. *In*: International Cocoa Research Conference, 10, **Proceedings**. Cocoa Producers' Alliance, Lagos, p.637-641. 1988b.

LANAUD, C., RISTERUCCI, A.M., PIERETTI, I., N'GORAN, J.A.K., FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, v.13, p.211–227. 2004.

LARSEN, L.A., CHRISTIANSEN, M., VUUST, J., ANDERSEN, P.S. Highthroughput single-strand conformation polymorphism analysis by automated capillary electrophoresis: robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants. **Hum Mutat.**, v.13, p.318–327. 1999.

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

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

LEE, J.M., GRANT, D., VALLEJOS, C.E., SHOEMAKER, R.C. Genome organization in dicots. II. *Arabidopsis* is a “binding species” to resolve genome evolution events among legumes. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.765-773. 2001.

LEISTER, D., KURTH, J., YANO, M., SASAKI, T., DEVOS, K., GRANER, A., SCHULZE-LEFERT, P. Rapid reorganization of resistance gene homologues is cereal genomes. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v.95, p370-375. 1998.

LEISTER, D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. **Trends Genet.**, v.20, n.3, p.16-22. 2004.

LERCETEAU, E. et al. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.10-19. 1997.

LITT, M., LUTH, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401. 1989.

LOPES, U.V., PAIM, M., LUZ, E.D.N., SILVA, S.D.V.M., GRAMACHO, K.P., PIRES, J.L. Resistance of Cacao Farmer Selections to *Phytophthora citrophthora* in Brazil. *In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference*, San José, Costa Rica, October 2006. (in press)

LUCK, J.E., LAWRENCE, G.J., DODDS, P.N., SHEPHERD, K.W., ELLIS, J.G. Regions outside of the Leucine-Rich Repeats of Flax Rust Resistance Proteins Play a Role in Specificity Determination. **The Plant Cell**, v.12, p.1367-1377. 2000.

LUZ, E.D.M.N., BEZERRA, J.L., RESENDE, M.L.V., OLIVEIRA, M.L. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. *In: Ribeiro do Vale, F.X. & Zambolim, L. (Eds.) Controle de Doenças de Plantas-Grandes Culturas*. Viçosa. UFV, 2v. p.617-622. 1997.

LUZ, E.D.M.N., SILVA, S.D.V.M., ALBUQUERQUE, P.S.B., GRAMACHO, K.P., BRUGNEROTTO, M.I.B., PAIM, M.C.A., PINTO, L.R.M., LOPES, U.V., PIRES, J.L. Evaluation of cocoa progeny in Bahia, Brazil for resistance to *Crinipellis perniciosus*. *In: International Cocoa Research Conference, 12, Proceedings*. Cocoa Producers' Alliance, Lagos, p.219-226. 1999a.

MALVAS, C.C. Clonagem e Caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em *Brassica oleracea* L. e *Zea mays* L. **Tese de doutorado em Agronomia: Fitopatologia**. Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2003.

Manual GeneScan Reference Guide. Chemistry Reference for the ABI PRISM 377 and ABI373 DNA Sequencers. **Applied Biosystems**. 2000.

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

MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J., SESSA, G. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.23-61. 2003.

MARTIN-LOPES, P., ZHANG, H., KOEBNER, R. Detection of Single Nucleotide Mutations in Wheat Using Single Strand Conformation Polymorphism Gels. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.159-162. 2001.

MAZZI, C.M., FERRO, J.A., FERRO, M.I.T., SAVINO, V.J.M., COELHO, A.A.D., MACARI, M. Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in Broiler chickens (*Gallus gallus*) of different breeds. **Brazilian Society of Genetics**. 2003.

McCALLUM, J., LEITE, D., PITHER-JOYCE, M., HARVEY, M.J. Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.). **Theoretical Appl. Genet.**, v.103, p.979-991. 2001.

MEDEIROS, A.G. Sporulation of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. in relation to epidemiology and chemical control of black pod disease. **Tese de Pós Doutorado**. Riverside. University of California. 1977.

MENDGEN, K., HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends Plant Sci.**, v.7, p.352-356. 2002.

MEYERS, B.C., DICKERMAN, A.W., MICHELMORE, R.W., SIVARAMAKRISHNAN, S., SOBRAL, B.W., YOUNG, N.D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **The Plant Journal**, v.20, p.317-332. 1999.

MEYERS, B.C., KAUSHIK, S., NANDETY, R.S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.128-134. 2005.

MONOSI, B., WISSER, R.J., PENNILL, L., HULBERT, S.H. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. **Theoretical Applied Genetics**, v.109, p.1434-1447. 2004.

MOTA, J.W.S. Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao* L. da Amazônia brasileira por microssatélites. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 87p. **Tese de Doutorado**. 2003.

NATARAJ, A.J., OLIVOS-GLANDER, I., KUSUKAWA, N., HIGHSMITH, W.E.Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. **Electrophoresis**, v.20, p.1177–1185. 1999.

NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, p.359-378. 1978.

N'GORAN, J.A.K. et al. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, v.73, p.589-597. 1994.

NIELLA, G.R. Frutificação in vitro, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L. **Tese de Doutorado**. Lavras, UFLA. 75p. 2000.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B. F., DANGL, J. L. Recognition and Response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, v.37, p.579-609. 2003.

NOIR, S., COMBES, M.C., ANTHONY, F., LASHERMES, P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Molecular Genetic Genomics**, v.265, p.654-662. 2001.

PAIM, V.R.L.M., LUZ, E.D.M.N., PIRES, J.L., SILVA, S.D.V., SOUZA, J.T., ALBUQUERQUE, P.S.B., FILHO, L.P.S. Sources of resistance to *Crinipellis pernicioso* in progenies of cacao accessions collected on the Brazilian Amazon. **Science Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.63, n.6, p.572-578. 2006.

PARLEVLIET, J.E., ZADOKS, J.C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, v.26, p.5-21. 1977.

PARLEVLIET, J.E. Identification and evaluation of quantitative resistance. In: Leonard, K. J. & Fry, W. E. (eds). **Plant disease epidemiology, genetics, resistance and management**. McGraw-Hill, New York , v.2.1989.

PARLEVLIET, J.E., JACOBS, T., PARLEVLIET, J.E. What is durable resistance, a general outline. In Jacobs, T.H. and Parlevliet, J.E (eds.) **Durability of Disease Resistance**. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, v.18, p.23-29. 1993.

PEREIRA, J.L.M., RAM, A., FIGUEIREDO, J.M., ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v.1, p.79-81. 1989.

PETERS, S., KOSCHINSKY, S., SCHWIEGER, F., TEBBE, C.C. Secession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.930-936. 2000.

PHILLIPS-MORA, W. Studies at CATIE on Moniliasis resistance (*Moniliophthora roreri* (Cif.& Par.) Evans et al. In: Proceedings of the International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. **INGENIC**, Reading, p.111-117. 1999b.

PINTO, L.R.M., PIRES, J.L. Seleção de Plantas de Cacau Resistentes à Vassoura-de-bruxa. Ilhéus. **CEPLAC/CEPEC**.1998.

PIRES, J. L. et al. Cocoa breeding for witches' broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. In: International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. **Proceedings** Salvador, Brasil. p.910-1001. 1999.

PIRES, J.L., MARITA, J.M., LOPES, U.V., YAMADA, M.M., AITKEN, W.M., MELO, G.P., MONTEIRO, W.R., AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germoplasm collection in Bahia, Brasil. In: International Workshop on New Thechnologies and cocoa Breeding, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. **Proceedings**, S.1. **INGENIC**, p.72-88. 2000.

PIRES, J.L. et al. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.347. 2001.

PIRES, J.L. Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacauero com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. **Tese de doutorado**, Viçosa, UFV, 328p. 2003.

PRABHU, A.S., MORAIS, O.P. Resistência estável às doenças de plantas. In: Luz, W. C. (Ed). **Revista Anual de Patología de Plantas**. RAPP, Passo Fundo, v.1, p.239-273. 1993.

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

QUIRINO, M.S. Polimorfismos de seqüência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência. **Mestrado em Fitopatologia**. Universidade de São Paulo. Piracicaba/SP. 2003.

Rapid, High Throughput Mutation Discovery Using Fluorescent SSCP on the ABI PRISM 3100 and 3100-*Avant* Genetic Analyzers. **Appllication Note-Genetic Analyzers**. Applied Biosystem. Disponível na Internet via WWW. URL: < [http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM\(r\)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html](http://www.biocompare.com/technicalarticle/1365/Rapid-High-Throughput-Mutation-Discovery-Using-Fluorescent-SSCP-On-The-ABI-PRISM(r)-3100-And-3100-Avant-Genetic-Analyzers-from-Applied-Biosystems.html) >.2002.

RIBEIRO DO VALE, F.X., PARLEVLIT, J.E., ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.577-589. 2001.

RIOS-RUIZ, R.A., MAFFIA, L.A., ALFENAS, A.C., DIAS, L.A.S. Resistência de clones de cacaueteiro a vassoura de bruxa causada por *Crinipellis pernicioso* em Tingo María, Peru. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.416. 2000.

RIOS-RUIZ, R.A. Melhoramento para resistência a doenças. In: **Melhoramento genético do cacaueteiro**. (L.A.S. Dias, Ed.). L.A.S. Viçosa, cap.7, p.295-298. 2001.

RISTERUCCI, A.M. et al. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) for Resistance to *Phytophthora* in *Theobroma cacao* L. **INGENIC Newsletter**, St. Augustine, v.5, p.9-10. 2000.

ROBINSON, R. A. Permanent and impermanent resistance to crop parasites; a re-examination of the pathosystem concept with special reference to rice blast. **Pflanzenzuchtg**, v.83, p.1-39. 1979.

ROMEIS, T. Protein kinases in the plant defence response. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.4, p.807-814. 2001.

RUBIO, L., AYLLÓN, M.A., GUERRI, J., PAPPU, H., NIBLETT, C., MORENO, P. Differentiation of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) isolates by single-strand

conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, v.129, p.479-489. 1996.

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

SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS/STAT user's guide**. Cary, 2000. CD-ROM.

SCHWIEGER, F., TEBBE, C.C. Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*)-Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.3556-3565. 2000.

SHEN, K.A., MEYERS, B.C., ISLAM-FARIDI, M.N., CHIN, D.B., STELLY, D.M., MICHELMORE, R.W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. **Mol Plant Microbe Interact**, v.11, p.815-823. 1998.

Single-strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP). Disponível na Internet via WWW. URL: <<http://www.hku.hk/oncology/lcg/ProtocolforSSCP.htm>>. Arquivo capturado em 30 de julho de 2006.

SPINARDI, L., MAZARS, R., THEILLET, C. Protocols for an improved detection of mutations by SSCP. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.14. Oxford University Press. 1991.

STASKAVICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G., JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v.268, p.661-667. 1995.

STOTHARD, J.R., YAMAMOTO, Y., CHERCHI, A., GARCIA, A.L., VALENTE, S.A.S., SCHOFIELD, C. J., MILES, M.A. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. **Bull. Entomol. Res.**, v.88, p.553-560. 1998.

SUAREZ-CAPELLO, C. Monilia por rot resistance in Ecuador. In: Proceedings of the International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. **INGENIC**, Reading, p.119-121. 1999.

SUNNUCKS, P., WILSON, A.C.C., BEHEREGARAY, L.B., ZENGER, K., FRENCH, J., TAYLOR, A.C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Mol. Ecol.**, v.9, p.1699-1710. 2000.

UJINO-IHARA, T., MATSUMUTO, A., IWATA, H., YOSHIMURA, K., TSUMURA, Y. Single-strand conformation polymorphism of sequence-tagged site markers base don partial sequences of cDNA clones in *Cryptomeria japonica*. **Genes Genet. Syst.**, v.77, n.4, p.251-257. 2002.

van der BIEZEN, E.A., FREDDIE, C.T., KAHN, K., PARKER, J.E , JONES., J.D.G. Arabidopsis *RPP4* is a member of the *RPP5* multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. **The Plant Journal**, v.29, n.4, p.439–451. 2002.

Van der PLANK, J.E. Plant disease, epidemiology and control. **Academic Press**, New York. 1963.

Van der VOSSSEN, H.A.M. Strategies of variety improvement in cocoa with emphasis on durable disease resistance. An external review prepared for INGENIC. **INGENIC**, Reading. 1997.

ZADOKS, J.C. Disease resistance testing in cocoa. A review on behalf of FAO/INGENIC. **INGENIC**, Reading. 1997.

ZADOKS, J.C. 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. **Proceedings**. Salvador, Readings INGENIC. p.17-22. 1999.

ZHAO, S., PENG, LI, K., LIU, J., ZHOU, P., MORAN, C. Detection of PCR-SSCP polymorphisms of the Porcine GH and PRKARIA gene in duroc and Chinese indigenous Erhualian pigs. **6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Austrália, v.26, n.324. 1998.

ZHU, H., CANNON, S.B., YOUNG, N.D., COOK, D.R. Phylogeny and genomic organization of the TIR and Non-TIR NBS-LRR resistance gene family in

Medicago Truncatula. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.15, n.6, p.529-539. 2002.

ZUGAIB, A.C.C., SANTOS, A.M., MIDDLEJ, R.R. Análise do Mercado Processador de Cacau no Brasil vista sob o modelo Estrutura-Condução-Desempenho. <http://www.ceplac.gov.br> **Radar Técnico**, CEPLAC/ Ilhéus, p.01-88. 2006.

YAMADA, M.M., LOPES, U.V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom disease in plantations of Bahia, Brazil **Agrotrópica**, v.11, p.83-88. 1999.

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

YAMADA, M.M., FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., NETO, A.D., PIRES, J.L., FLORES, A.B., FALEIRO, A.S.G., BAHIA, R.C.S. Diversidade genética de acessos de cacau da série CEPEC por meio de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, v.14, n.3, p.137-140. 2002.

YAMADA, M.M., FALEIRO, F.G., LOPES, U.V., PIRES, J.L., NETO, A.D., FLORES, A.B., FALEIRO, A.S.G. Genetic variability and heterozygosity of cocoa accessions of Parinari (Pa) population, based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, n.4, p.289-296. 2003a.

YAMADA, M.M., LOPES, U., PIRES, J.L., FLORES, A.B., MELO, G.R.P. Diversidade e origem das seleções cacau (*Theobroma cacao* L.) feitas nas fazendas para resistência a vassoura-de-bruxa. In: **Segundo congresso de melhoramento de plantas**, Porto Seguro - Ba. CD, 2003b.

YOUNG, N. D. The genetic architecture of resistance. **Plant Biology**, v.3, p.285-290. 2000.

WATANO, Y., IMAZU, M., SHIMIZU, T. Chloroplast DNA typing by PCR-SSCP in the *Pinus pulmilla* - *P. parviflora* var. *pentaphylla* complex (Pinaceae). **J. Plant Res.**, v.108. 1995.

WEI, W., PLOVANICH-JONES, A., DENG, W., JIN, Q., COLLMER, A., HUANG, H., HE, S.Y. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for

type III secretion of Hrp and *Avr* proteins in *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. **PNAS**, v.97, n.5. 2000.

WENZ, H.M., RAMACHANDRA, S., O'CONNELL, C.D., ATHA, D.H. Identification of known p53 point mutations by capillary electrophoresis using unique mobility profiles in a blinded study. **Mutat Res.**, v.382, p.121-132. 1998.

WHEELER, B.E.J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, v.30, p.347-488. 1988.

WILLIAMSON, V. M., HUSSEY, R. S. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1735-1745. 1996.

WOHLFORD, D.L., KRAFSUR, E.S., GRIFFITHS, N.T., MARQUEZ, J.G., BAKER, M.D. Genetic differentiation of some *Glossina morsitans morsitans* populations. **Med. Vet. Entomol.**, v.13, p.377-385. 1999.