

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de  
Características Quantitativas (QTLs) associados à resistência a  
*Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*)  
originários da Amazônia Brasileira**

**Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque  
Engenheiro Agrônomo

**Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características  
Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis perniciosa* em acessos  
de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**

Orientador:  
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Albuquerque, Paulo Sérgio Bevilaqua de  
Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características  
Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis perniciosa* em acessos  
de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira / Paulo Sérgio  
Bevilaqua de Albuquerque. - - Piracicaba, 2006.  
133 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Cacau 2. Mapeamento genético 3. Marcador molecular 4. Resistência  
genética vegetal 5. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDD 633.74

Dedico este trabalho aos meus filhos Camila e Felipe e a minha esposa Natália nos quais muitas vezes busquei a força que precisava para continuar minha jornada.

Ofereço a minha mãe Yolanda (*in memoram*) quem me ensinou o que é amar um filho, e a meu pai Fernando, cujos passos ainda sigo.

## AGRADECIMENTOS

Antes de iniciar os agradecimentos gostaria de enfatizar que sem a ajuda destas pessoas aqui citadas e de outras que por acaso tenha esquecido de mencionar, este trabalho não teria condições de ser realizado.

Ao Prof. Sérgio F. Pascholati pela orientação, confiança depositada e amizade durante a realização do curso de doutorado.

Ao professor e amigo Prof. Antonio Vargas Figueira por ter acreditado neste projeto desde do seu início, por ter disponibilizado o laboratório de melhoramento de plantas do CENA, pela orientação em várias etapas desta tese e pela atuação decisiva para que ela se concretizasse.

Aos Pesquisadores Dr. Cleber Novais Bastos e Dr. Jay Mota pela ajuda e companheirismo nas execuções dos trabalhos realizados em Marituba-PA.

A Dra. Stela Dalva Silva e Dra. Edna Dora Luz pesquisadoras da CEPLAC-CEPEC pela grande colaboração na execução dos ensaios realizados na Bahia.

A Dra. Mariângela Cristofani pesquisadora do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” pelo auxílio nas análises dos dados.

Aos Dr(a)s. Clarice Demétrio (ESALQ), Afrânio Vieira (ESALQ), José Luiz Pires (CEPLAC) e Alexandre Seebben pelas análises estatísticas dos dados.

Ao meu irmão (por afinidade) Edivaldo Emiliano Pimentel a quem devo muito pela sua dedicação e ajuda nos trabalhos desta tese.

Aos meus amigos Sandra Vieira e Carlos Cabral da administração da CEPLAC-SUPOR pelo apoio, dedicação e companheirismo durante todos estes anos de execução do projeto.

Ao Adimil Moura pela sua ajuda nos trabalhos de laboratório realizados na CEPLAC de Marituba-PA.

Aos estagiários da CEPLAC Francimary Carneiro, Elenize e Ricardo.

Aos funcionários da CEPLAC-ERJOH em especial ao José Mangas, Lucena, Zacarias Campos, Francisco Zacarias pelo trabalho de apoio no campo.

Aos funcionários de campo da CEPLAC-CEPEC Ananias, Belmiro, Edésio, Elenizio, Hortêncio, Fabriciano, João, José, Justiniano, Magnaldo, Rubens e Wilson.

As técnicas do laboratório de fitopatologia da CEPLAC-CEPEC, Denise Argolam Ferreira e Cenilda da S. Serra Rocha.

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento de plantas do CENA Eduardo Fonseca, Wlamir Godoy, Raquel, Inês, Seu Zé e Paulo Cassieri.

Aos colegas do CENA Lorena, Raul, Tercílio, Débora, Aline, .....

Aos estagiários do CENA, Rachel Balan, Letícia Barbieri e Ângela Sanches pelo auxílio nos trabalhos.

A Janaína de Cássia Albino pela dedicação quando de sua participação da execução deste trabalho e principalmente pela amizade e apoio recebido durante nosso convívio no CENA.

Aos colegas da ESALQ Cleci Dezordi, Gleiber, Ana Paula, Patrícia, Leonardo, Paulo, Marília, Maurício, Renata, Daniel,.....

A Solange Bonaldo pela amizade.

A Heloisa pelo carinho.

A Liliane Teixeira pelo seu carinho, amizade e apoio durante os momentos alegres e difíceis que tivemos em comum durante estes quatro anos de convivência.

A Fundação Pau-Brasil nas pessoas de Dr. João Louis Pereira, Dra. Neyde Alice Pereira e Uilson Lopes pelo apoio financeiro e logístico na aquisição dos materiais utilizados na tese.

Aos agentes financeiros ACRI (American Cocoa Research Institute), BASA (Banco da Amazônia), CFC (Common Fund For Commodities) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos recursos disponibilizados para realização dos experimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A ESALQ em especial aos professores e funcionários da Fitopatologia pelos ensinamentos recebidos durante o curso.

Ao Professor Eric Balmer pelas sugestões nas análises dos dados.

A CEPLAC pela oportunidade concedida para realização deste curso.

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

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1.1 Origem, dispersão e importância do cacaueteiro.....	13
2.1.2 Origem, epidemiologia, etiologia e controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro.....	13
2.1.3 Programas de melhoramento do cacaueteiro visando à obtenção de variedades resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	18
2.1.4 Marcadores moleculares e desenvolvimento de mapas de ligação para o cacaueteiro.....	23
2.1.5 Mapeamento de QTLs associados à resistência a patógenos.....	27
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Seleção de acessos de cacaueteiro resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	34
2.2.2 Origem das progênies de cacaueteiro utilizadas nos ensaios.....	34
2.2.3 Avaliação da resistência dos genótipos de cacaueteiro a <i>C. pernicioso</i> .....	36
2.2.3.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial....	36
2.2.3.2 Análise da resistência em campo por infecção natural.....	42
2.2.4 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacaueteiro.....	43
2.2.4.1 Obtenção das populações contrastantes.....	43
2.2.4.2 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes.....	44
2.2.4.3 Construção dos mapas de ligação.....	47
2.2.4.4 Detecção de QTLs associados à resistência a <i>C. pernicioso</i> .....	47
2.2.5 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacaueteiro selecionados como resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	49
2.2.5.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores.....	50
2.2.5.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados.....	52
2.3 Resultados e Discussão.....	53

2.3.1 Avaliação da resistência dos genótipos de cacauero a <i>C. pernicioso</i> .....	53
2.3.1.1 Análise da resistência em casa de vegetação por inoculação artificial....	53
2.3.1.2 Análise da resistência em campo por infecção natural.....	67
2.3.2 Mapas de ligação e detecção de QTLs nas populações de cacauero.....	73
2.3.2.1 Genotipagem das progênies dos cruzamentos contrastantes.....	73
2.3.2.2 Construção dos mapas de ligação.....	81
2.3.2.3 Detecção de QTLs associados à resistência a <i>C. pernicioso</i> .....	86
2.3.3 Análise da genealogia e similaridade genética de acessos de cacauero selecionados como resistentes a <i>C. pernicioso</i> .....	96
2.3.3.1 Relação genética dos acessos com os candidatos a genitores.....	99
2.3.3.2 Similaridade genética entre os acessos selecionados.....	103
3 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES.....	122



## RESUMO

### **Mapas de ligação e Identificação de Locos Controladores de Características Quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**

A vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) é a doença mais importante da cacauicultura no Brasil. Sua principal forma de controle é o emprego de variedades resistentes, entretanto, devido à estreita base genética encontrada nos plantios comerciais de cacauero, esta resistência tem sido frequentemente quebrada. Os objetivos deste trabalho foram: selecionar novas fontes de resistência a *C. pernicioso* entre acessos de cacauero originalmente coletados na Amazônia Brasileira (série CAB), identificar por mapeamento genético locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados a esta resistência nos genótipos selecionados; e avaliar a relação genética dos clones CAB utilizados como genitores resistentes nos cruzamentos contrastantes com os acessos selecionados por agricultores do Sul da Bahia e as fontes tradicionais de resistência a *C. pernicioso*. Com base na proporção de infecção de vassoura-de-bruxa, foram avaliados os níveis de resistência a *C. pernicioso* de 44 famílias de cacauero em condições de casa de vegetação e campo. Nos ensaios de casa de vegetação, as médias das proporções de infecção foram comparadas através de contrastes pelo teste de Wald, e nos de campo por análise de medidas repetidas e contrastes. Dentre as famílias avaliadas em casa de vegetação e campo, as que apresentaram menores incidências de sintomas de vassoura-de-bruxa foram aquelas derivadas de 'CAB 0169', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392' e 'CAB 0410'. Foram desenvolvidos dois mapas de ligação conjuntos para as populações dos cruzamentos contrastantes entre os acessos selecionados como mais resistentes a *C. pernicioso* e o genitor suscetível 'ICS 39'. Nas construções dos mapas de ligação foram utilizados 65 locos de microssatélites. Para a família derivada do cruzamento de 'ICS 39 x CAB 0208' foram formados 11 grupos de ligação com cobertura total de 541 cM e distância média entre marcas de 14 cM. O mapa de ligação 'ICS 39 x CAB 0214' apresentou cobertura total de 501 cM nos 10 grupos de ligação formados com distância média entre marcas de 11,4 cM. Detectaram-se três QTLs associados à resistência a *C. pernicioso*, um no grupo de ligação VIII de 'ICS 39 x CAB 0208' e dois no mapa de 'ICS 39 x CAB 0214', sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo IX. A relação genética entre os dois clones 'CAB' genitores das populações contrastantes e 81 genótipos de cacauero utilizados como fontes de resistência a *C. pernicioso* foram baseadas nas frequências alélicas de 20 locos de microssatélites. As análises de dissimilaridade genética entre os acessos de cacauero originaram dois grupos. Os 'CAB 0208' e 'CAB 0214' não fizeram parte dos grupos formados. O grau de parentesco entre estes dois acessos foi muito alto, chegando próximo ao de irmãos-germano, não sendo aparentados com nenhum dos outros acessos. Os clones selecionados por agricultores derivam na sua maioria de 'Scavina 6', a fonte de resistência comumente empregada.

Palavras-chave: Cacauero, *Theobroma cacao*, vassoura-de-bruxa, *Crinipellis pernicioso*, resistência, QTL, mapeamento, marcador molecular, SSR.

## ABSTRACT

### Linkage Maps and Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) associated with resistance to *Crinipellis pernicioso* in cacao (*Theobroma cacao*) accessions from the Brazilian Amazon

The witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) is the most important disease of cacao in Brazil. The main method of disease control is the use of resistant cultivars, however due to the narrow genetic basis found in commercial cacao growing areas, the resistance is frequently broken. The objectives of this work were: to select new sources of resistance to *C. pernicioso* among cacao accessions originally collected in the Brazilian Amazon (CAB series); to identify by genetic mapping, quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance in selected genotypes; and to evaluate the genetic relationship between the selected accessions and clones selected by cacao growers from Southern Bahia with traditional resistance sources against *C. pernicioso*. Based on the proportion of witches' broom infection, the levels of resistance to *C. pernicioso* were estimated in 44 cacao families under greenhouse and field conditions. Under greenhouse conditions, the average proportion of infection was compared based on Wald test, and under field conditions using an analysis of repeated measures and contrast. Among the families evaluated under greenhouse and field conditions, the ones with least incidence of witches' broom symptoms derived from 'CAB 0169', 'CAB 0208', 'CAB 0214', 'CAB 0270', 'CAB 0371', 'CAB 0388', 'CAB 0392' and 'CAB 0410'. Two linkage maps were developed for populations derived from crosses between contrasting accessions selected as the most resistant to *C. pernicioso* ('CAB 0208' and 'CAB 0214') and a susceptible accession 'ICS 39'. The linkage maps were developed using 65 microsatellite loci, applying the software JoinMap 3.0<sup>®</sup>. The identification and localization of QTLs associated with resistance to *C. pernicioso* were performed using MAPQTL<sup>™</sup> 4.0. For the family derived from 'ICS 39 x CAB 0208', 11 linkage groups were formed, with total coverage of 541 cM and 14 cM average distance between markers. The linkage map from 'ICS 39 x CAB 0214' presented a total coverage of 501 cM in 10 linkage groups formed with an average distance between markers of 11.4 cM. Three QTLs associated with resistance to *C. pernicioso* were detected, with one at linkage group VIII of 'ICS 39 x CAB 0208', and two for the 'ICS 39 x CAB 0214' family, with one located at linkage group IV and another at group IX. The genetic relationship between these two CAB accessions and 81 genotypes used as source of resistance to *C. pernicioso* were determined using genetic dissimilarity and co-ancestry based on allele frequencies of 20 microsatellite loci. The dissimilarity analyses among the accessions generated two distinct groups. 'CAB 0208' and 'CAB 0214' did not belong to any of the two groups. The co-ancestry between the two accessions were high, close to full-sib, but without any relationship with any of the other genotypes. The clones selected by growers derived mostly from 'Scavina 6', a commonly used source of resistance to *C. pernicioso*.

Keywords: Cacao; cocoa; *Theobroma cacao*; witches' broom; *Crinipellis pernicioso*, resistance, QTL, genetic mapping; molecular marker; SSR.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

