

## **TRANSFERIBILIDADE E MAPEAMENTO DE MICROSSATÉLITES ENTRE *Theobroma cacao* L. E *Theobroma grandiflorum* (WILLD. EX. SPRENG.) SCHUM**

**Analine dos Santos Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Moysés Alves<sup>2</sup>, Carlos Rogério de Sousa Silva<sup>3</sup>, Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque<sup>3</sup>, Livia Santos Lima Lemos<sup>4</sup>, Karina Peres Gramacho<sup>1,6</sup>,  
Didier Clément<sup>5,6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC. Rod. Ilhéus/Itabuna, km 16 - Salobrinho, 45662-900, Ilhéus - BA. alinemile@hotmail.com; <sup>2</sup>EMBRAPA Amazônia Oriental - Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n°, Bairro Marco, 66095-903, CP48, Belém, PA. rafael-moyses.alves@embrapa.br; <sup>3</sup>CEPLAC-ERJOH, BR 316, km 17, CP 46, Marituba - PA. paulo.bevilaqua@agricultura.gov.br; carlos-roger@hotmail.com. <sup>4</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia - UFSB Praça Joana Angélica - São José, 45988-058 - Teixeira de Freitas, BA. livia.lemos@cpf.ufsb.edu.br. <sup>5</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour Le Développement (CIRAD-França) CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis TA 96/03, 34398 Montpellier, Cedex 5, France; didier.clement@cirad.fr. <sup>6</sup>Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC km 22 Rod. Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Ilhéus, BA. gramachokp@hotmail.com.

O gênero *Theobroma* abrange 22 espécies nativas da região amazônica, dentre elas, duas merecem destaque de produção no Brasil: *T. cacao* e *T. grandiflorum*. Devido à importância dessas culturas e a possibilidade de obter informações através de transferibilidade de marcadores moleculares específicos de *T. grandiflorum* em *T. cacao*; ii) construir um mapa genético a partir de um cruzamento de *T. grandiflorum*; iii) posicionar no genoma do cacaueiro os microssatélites de *T. grandiflorum*. A partir de trabalhos anteriores, foram selecionados e testados 181 marcadores específicos do cacaueiro nos genitores e em cinco indivíduos da população de cupuaçuzeiro, e 44 marcadores específicos do cupuaçuzeiro em cinco genótipos de cacaueiro representativos da diversidade da espécie. As análises de transferibilidade de microssatélites entre *T. cacao* e *T. grandiflorum* mostraram uma baixa taxa de transferibilidade dos marcadores de cacaueiro quando amplificados em cupuaçuzeiro (43,09%), e uma alta taxa de transferibilidade dos marcadores de cupuaçuzeiro quando amplificados em cacaueiro (93,3%). Foi possível obter um mapeamento genético parcial de *T. grandiflorum*, permitindo flanquear microssatélites, das duas espécies, em sete grupos de ligação do mapa de referência do cacaueiro em um mapa genético consenso da espécie. Os resultados do presente trabalho permitiram obter mais informações sobre a transferibilidade e mapeamento de microssatélites entre *T. cacao* e *T. grandiflorum*. Tais conhecimentos possibilitam estudos posteriores sobre a diversidade genética, caracterização de germoplasma, construção de mapas genéticos e localização de QTLs.

**Palavras-chave:** Marcadores SSR, Vassoura de Bruxa, QTLs.

### **Transferability and mapping of microsatellites between *Theobroma cacao* L. and *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum.**

The genus *Theobroma* comprises 22 species native to the Amazon region, two of which deserve attention in Brazil: *T. cacao* and *T. grandiflorum*. Due to the importance of these cultures and the possibility of obtaining information through the transferability of specific molecular markers and carrying out studies in genetic mapping, this work had as objectives: i) to test the transferability of *T. cacao* microsatellites in *T. grandiflorum*, and specific of *T. grandiflorum* in *T. cacao*; ii) construct a genetic map from a cross of *T. grandiflorum*; iii) to position in the cacao genome the microsatellites of *T. grandiflorum*. From previous studies, 181 specific cacao markers were selected and tested in the parents and in five individuals of the cupuaçu tree population, and 44 cupuaçu - specific markers were evaluated in five cacao genotypes representative of the species diversity. Microsatellite transferability analyzes between *T. cacao* and *T. grandiflorum* showed a low transferability of cacao markers when amplified in cupuaçu trees (43.09%), and a high transferability of cupuaçuzeiro markers when amplified in cacao (93.3%). It was possible to obtain a partial genetic mapping of *T. grandiflorum*, allowing flanking microsatellites of the two species in seven linkage groups of the cacao reference map in a genetic consensus map of the species. The results of the present work allowed to obtain more information on the transferability and mapping of microsatellites between *T. cacao* and *T. grandiflorum*. Such knowledge enables further studies on genetic diversity, characterization of germplasm, genetic mapping and localization of QTLs.

**Key words:** SSR markers, witches' broom, QTL's

## Introdução

*Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum são duas das espécies mais exploradas da família Malvaceae, são diplóides ( $2n=20$  cromossomos) e perenes (Alves et al., 2007). *Theobroma cacao* L. é considerada uma das fontes de renda de pequenos e grandes produtores agrícolas devido ao seu produto final, o chocolate, que nas últimas décadas do século passado foi considerado um dos motores da economia do Brasil e outros países, como a Costa de Marfim, primeiro produtor de cacaueteiro no mundo (ICCO, 2014).

*Theobroma grandiflorum* é nativo da região Amazônica, onde se encontra amplamente distribuído. Foi também introduzido na região da Mata Atlântica principalmente no Sul da Bahia, onde vem ganhando destaque no panorama agrícola e econômico do país decorrente do crescente consumo de sua polpa para fabricação de produtos alimentícios como sucos, sorvetes, geleias, sendo também explorado pela indústria de cosméticos (Alves et al., 2007). Estas características somadas ao fácil manuseio, industrialização e abertura do mercado às frutas exóticas, vêm despertando acentuado interesse não só do mercado regional, bem como, abrindo caminhos para exportação nacional e internacional. Destaca-se nesse mercado o estado do Pará, que é responsável pela maior produção do fruto no país (Homma, Carvalho e Menezes, 2001).

A conservação dos recursos genéticos das espécies amazônicas do gênero *Theobroma* é de fundamental importância uma vez que consiste no reservatório de genes para a espécie *T. cacao*. Atualmente os dois principais bancos ativos de germoplasma de espécies afins ao cacaueteiro são a coleção “George Basil Bartley”, pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira- CEPLAC no município de Ananindeua - Pará e a coleção “George Addison O’Neill” pertencente a Embrapa Amazônia Oriental - CPATU, na cidade de Belém - Pará. O Banco Ativo de Germoplasma do Cacaueteiro é situado nas dependências da CEPLAC - CEPEC, no município de Ilhéus, Bahia e na Amazônia na CEPLAC - ERJOH, os quais complementam-se, possuindo acessos coletados no Brasil e de diversos outros Países, possuindo desta forma ampla variabilidade genética.

No fim do século passado, as plantações de *Theobroma cacao* na Bahia (Pereira et al., 1989) e adjacências sofreram elevadas perdas devido infecção pelo basidiomicota *Moniliophthora perniciosa* (Aime; Phillips-Mora, 2005), agente causador da Vassoura de Bruxa do cacaueteiro. Vários tecidos da planta; ramos, almofadas florais, flores e frutos maduros são infectados pelo patógeno. O crescimento hipertrófico dos meristemas vegetativos infectados, “vassoura”, é o sintoma mais característico da doença (Silva et al., 2003). A Vassoura de Bruxa é uma das principais causas do declínio na produção de frutos de cupuaçuzeiro e cacaueteiro, chegando a perdas de 20 a 90% da produção.

A doença é endêmica da planície Amazônica. No Sul Bahia, o primeiro relato da Vassoura de Bruxa em *T. grandiflorum* ocorreu em meados de 1997 (Lopes, et al., 2001). Vários estudos envolvendo o cupuaçuzeiro estão em andamento com grupos de pesquisas, principalmente na EMBRAPA/CPATU (Belém) responsável pelo programa de melhoramento genético (Alves, et al., 2017, Alves, et al., 2013, Alves, et al., 2007), e EMBRAPA/CENARGEN (Brasília) para os estudos em genômica funcional. Além disso, na Bahia, a CEPLAC - CEPEC e a UESC estão envolvidos em estudos e projetos próprios ou em parceria com a EMBRAPA, para fins de melhoramento da espécie *T. grandiflorum*.

Devido ao grande interesse e importância dessas espécies, torna-se necessário um melhor entendimento dos níveis e distribuição da variabilidade genética. Tais conhecimentos possibilitam estudos posteriores sobre a diversidade genética, caracterização de germoplasma, construção de mapas genéticos e localização de QTLs. Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível das sequências de DNA, dentre elas podemos citar os microssatélites (*Simple Sequence Repeats-SSR*), que são fragmentos de DNA formados por sequências curtas de dois a cinco nucleotídeos repetidos em *tandem*, os quais são flanqueados por sequências únicas não repetidas. A variação alélica em locos de microssatélites pode ser facilmente detectada por PCR usando *primers* flanqueadores específicos (Hancock, 2000).

Em plantas, os microssatélites são muito frequentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma. Atualmente vários locos de microssatélites estão mapeados e

distribuídos nos 10 cromossomos na espécie *T. cacao* (Lanaud et al., 1995; Pugh et al., 2004; Brown et al., 2005; Schnell et al., 2007.; Faleiro et al., 2006; Allegre et al., 2011). Uma das principais características dos marcadores microssatélites é a facilidade de serem transferíveis entre espécies estreitamente relacionadas, diante disso, a genômica comparativa tornou-se uma importante estratégia para a utilização de informações genéticas entre diferentes espécies, revelando que o conteúdo e a forma de genes são, geralmente, conservados entre algumas espécies relacionadas.

O método de transferir marcadores SSR de uma espécie para outra, conhecido como transferibilidade de *primers* ou amplificação cruzada, tem revelado sucesso como no caso da transferência dentro de diferentes famílias de plantas, especialmente nas leguminosas (Kuleung et al., 2004; Peakall et al., 1998). As taxas de amplificação cruzada são maiores quando as espécies são de mesmo gênero, como observado no caso da soja, em que houve 65% de transferibilidade para espécies de *Glicine* e apenas 13% para espécies dos outros gêneros. Esses trabalhos sugerem maior possibilidade de transferência entre espécies do mesmo gênero. Além disso, ressaltam a possibilidade de estudar espécies de menor interesse econômico, que por isso em muitos casos ainda não foram estudadas (Kuleung et al., 2004; Peakall et al., 1998).

A chance de sucesso no uso de transferência de marcadores é inversamente proporcional à distância evolucionária entre as duas espécies. No caso do gênero *Theobroma*, já foram isolados, sequenciados e avaliados uma grande quantidade de locos, pelo grupo do CIRAD, em Montpellier - França (Allegre et al.,

2011). Foi verificado que *primers* desenhados para *T. cacao* amplificavam microssatélites de outras espécies do gênero, inclusive o cupuaçuzeiro (Alves et al., 2007). Assim como, também foram testados marcadores específicos do cupuaçuzeiro em genótipos do cacauzeiro para fins de estudos de diversidade genética das espécies (Ferraz dos Santos et al., 2016).

Diante desse cenário, este trabalho surgiu como uma das etapas de um projeto maior que visa à construção de um mapa genético de *T. grandiflorum*. Para tal, esse trabalho teve como objetivos: i) testar a transferibilidade de microssatélites de *T. cacao* em *T. grandiflorum*, e específicos de *T. grandiflorum* em *T. cacao*; ii) construir um mapa genético a partir de um cruzamento de *T. grandiflorum*; iii) posicionar no genoma do cacauzeiro os microssatélites de *T. grandiflorum*.

## Material e Métodos

### Seleção de Genótipos de *T. grandiflorum* e *T. cacao*

Para realização do mapeamento genético e estudos de transferibilidade de marcadores entre espécies *T. cacao* x *T. grandiflorum* foi utilizada uma progênie composta por 142 indivíduos da espécie *T. grandiflorum* originada a partir do cruzamento entre os genótipos CP174 X CP1074, resistente e suscetível à Vassoura de Bruxa, respectivamente, e contrastantes para outras características como tamanho e formato dos frutos (Figura 1). A população está localizada na Estação de Recursos Genéticos José Haroldo - CEPLAC/ERJOH, no município de Benevides, estado do Pará.

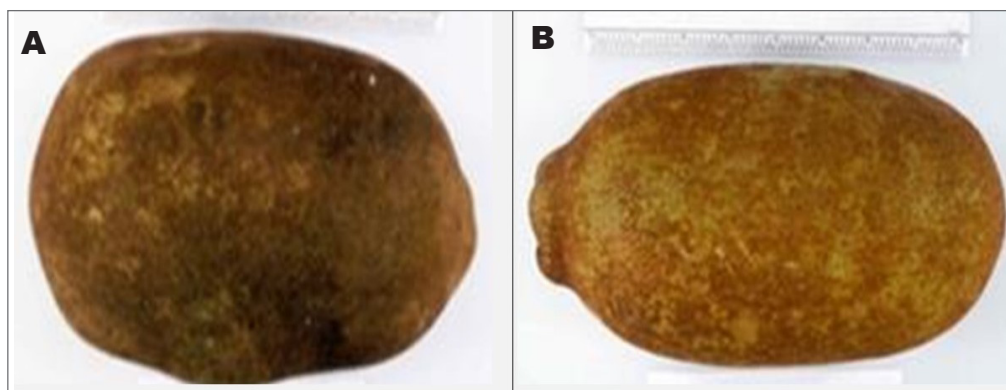


Figura 1. Frutos dos genótipos contrastantes de *Theobroma grandiflorum* que representam os pais da população utilizada nesse estudo. (A) CP174 resistente, (B) CP1074 suscetível a doença Vassoura de Bruxa.

Para os estudos de transferibilidade de marcadores entre as espécies *T. grandiflorum* x *T. cacao*, foi utilizada uma seleção de cinco genótipos de *T. cacao* (CriolloB97/61/B2, Scavina 6, ICS1, SIC864 e CCN51) contrastantes e representativos da diversidade genética da espécie, conforme trabalhos já publicados (Motamayor et al., 2013), cujos indivíduos foram utilizados em cruzamentos para estudos genéticos do cacauzeiro como a população F2 resultado da autofecundação de TSH516, oriundo do cruzamento entre Scavina-6 e ICS1 (Faleiro et al., 2006), o CCN51 do Equador e o genótipo Criollo B97/61/B2 de Belize, que foi escolhido por ser puro homocigoto e utilizado para o sequenciamento do genoma do cacauzeiro (Argout et al., 2010). Foram coletadas amostras foliares de todos os indivíduos para posterior extração de DNA. Esse material foi cortado em discos foliares, acondicionados em tubos Eppendorf de 2 mL armazenados em freezer -80 °C e liofilizados durante 24 horas antes da extração.

#### Seleção dos marcadores SSR

Foram utilizados 44 marcadores microssatélites obtidos para *T. grandiflorum* e determinados como polimórficos nos pais CP174 e CP1074 do cruzamento do cupuaçuzeiro da população acima citada. Dentre estes, 14 SSR/EST foram desenhados pela EMBRAPA/CENARGEN e 30 oriundos da biblioteca SSR feita com DNA genômico (EMBRAPA/CPATU) (Tabela 1). Além desses, 181 marcadores específicos de *T. cacao* foram escolhidos dos diferentes grupos de ligação do cacauzeiro e utilizados para realizar uma triagem dos SSRs polimórficos para os pais CP174 e CP1074. A relação dos SSRs utilizados é apresentada na Tabela 2.

#### Extração de DNA

Foram extraídos DNA de amostras foliares de todos os genótipos seguindo o protocolo MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Risterucci, 2000). 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 %) e 2 µL de gel-red [1 ng/µL], foi aplicada em gel de agarose a 2 %, utilizando como tampão de corrida o TAE1X (EDTA 2 mol.L<sup>-1</sup>; Tris-acetato 9 mol.L<sup>-1</sup>) para realização de corrida eletroforética em cuba horizontal a 80 volts por 30 min.

Tabela 1. Marcadores moleculares específicos de *T. grandiflorum* (EMBRAPA-CENARGEN e CPATU) utilizados nos testes de transferibilidade com *T. cacao*

N.	Nome	Origem	Instituição
1	cupuaçu_rep_c295	EST	CENARGEN
2	cupuaçu_rep_c293_C	EST	CENARGEN
3	cupuaçu_rep_c180	EST	CENARGEN
4	cupuaçu_rep_c432	EST	CENARGEN
5	cupuaçu_c4949	EST	CENARGEN
6	cupuaçu_rep_c2763	EST	CENARGEN
7	cupuaçu_rep_c431C	EST	CENARGEN
8	cupuaçu_rep_c203_A	EST	CENARGEN
9	cupuaçu_rep_c203_B	EST	CENARGEN
10	cupuaçu_rep_c618	EST	CENARGEN
11	cupuaçu_rep_c1251	EST	CENARGEN
12	cupuaçu_rep_c339	EST	CENARGEN
13	cupuaçu_rep_c1773	EST	CENARGEN
14	cupuaçu_rep_c733	EST	CENARGEN
15	Tg04	SSR	CPATU
16	Tg05	SSR	CPATU
17	Tg09	SSR	CPATU
18	Tg11	SSR	CPATU
19	Tg13	SSR	CPATU
20	Tg17	SSR	CPATU
21	Tg20	SSR	CPATU
22	Tg21	SSR	CPATU
23	Tg30	SSR	CPATU
24	Tg31	SSR	CPATU
25	Tg39	SSR	CPATU
26	Tg43	SSR	CPATU
27	Tg44	SSR	CPATU
28	Tg47	SSR	CPATU
29	Tg48	SSR	CPATU
30	Tg54	SSR	CPATU
31	Tg62	SSR	CPATU
32	Tg64	SSR	CPATU
33	Tg65	SSR	CPATU
34	Tg70	SSR	CPATU
35	Tg71	SSR	CPATU
36	Tg72	SSR	CPATU
37	Tg76	SSR	CPATU
38	Tg77	SSR	CPATU
39	Tg88	SSR	CPATU
40	Tg89	SSR	CPATU
41	Tg90	SSR	CPATU
42	Tg102	SSR	CPATU
43	Tg108	SSR	CPATU
44	Tg113	SSR	CPATU

Foram extraídas 142 amostras de DNA a partir de aproximadamente 300 mg de tecido vegetal que apresentaram qualidade e integridade satisfatórias para a execução das análises moleculares variando de 200 a 1000 ng/ul de DNA. A diluição de DNA para execução da etapa molecular obedeceu à proporção

**Tabela 2.** Marcadores moleculares específicos de *T. cacao* utilizados na seleção realizada com os pais (174x1074) e uma parcela da população de *T. grandiflorum*

Locos	5'-3' Primer Forward	5'-3' Primer Reverse	Comprimento (pb)	Temp. Anelam. (°C)
<i>mTcCIR10</i>	ACAGATGGCCTACACACT	CAA GCA AGC CTC ATA CTC	208	46
<i>mTcCIR17</i>	AAG GATGAAGGATGTAAGAGAG	CCC ATA CGA GCT GTG AGT	271	51
<i>mTcCIR25</i>	CTT CGT AGT GAA TGT AGG AG	TTA GGT AGG TAG GGT TAT CT	153	46
<i>mTcCIR26</i>	GCA TTC ATC AAT ACA TTC	GCA CTC AAA GTT CAT ACT AC	298	46
<i>mTcCIR36</i>	TTAGGTTACTCGTGAATG	ACTCCTCTGTAGTGTTA	182	46
<i>mTcCIR45</i>	GTCATTGCTGTGTG	CATAGCATTAACTGTGTCTG	284	51
<i>mTcCIR54</i>	AACCTCTTGTCCACGTTA	GAAGGCATACTTACTACTGT	165	46
<i>mTcCIR64</i>	GAGAAAGTAAAAGGAGAGAG	TGTTAGAGAACTGAGAAGTG	167	46,5
<i>mTcCIR70</i>	GGTATGAAGGATTGAGAG	TTCCCTATTGCTATTTATGGG	107	44,4
<i>mTcCIR77</i>	GTTTCCCCCACTCTCT	AATAAATAAATAAACAATACG	287	47,8
<i>mTcCIR84</i>	CATGGGACGCTGCCT	CTCTTATTAATTTGAATTCTCT	136	47,1
<i>mTcCIR105</i>	GTTTACAACCTTATCGCTCTG	AATTTGTATCCCTTATTATTTA	201	46,1
<i>mTcCIR106</i>	ACGAAAAATACCCTAAAAA	TGCTGTTGTTGTCTTGCT	143	45,8
<i>mTcCIR107</i>	TTGCCTGGAAGAGAGA	GATGGAAAGAGAAATAATAGT	120	46,8
<i>mTcCIR109</i>	GGAAAGTGTAGGAAAGTAGAC	GGACCAAAAAGAGCATA	162	46,4
<i>mTcCIR110</i>	GTGAAAAGTGGGGATTG	TAAAGTAAGAGTGGTGATGGT	139	48,2
<i>mTcCIR113</i>	GGAAAGTTACAGCAAGAGAGA	ACAAGCCCGGTGAAGG	142	50,7
<i>mTcCIR114</i>	CAGATGAATGGAATAACTT	GCATGAACACAAAACACAC	207	48,7
<i>mTcCIR126</i>	AACTCTCACTATCATCCAC	AACAAATCATCAAACACTT	212	46,3
<i>mTcCIR133</i>	GGATCACATCCGTTTAGA	AATTTAGCCCTCCAA	155	49
<i>mTcCIR145</i>	CAGACTTCCAACCTCAAACCT	TGAGAATAGATGGACCCGAT	117	49,7
<i>mTcCIR155</i>	CTTGGACTATTGAAAAAC	AAGGATACAATAAGGTAAATAC	274	46,5
<i>mTcCIR158</i>	TGTAGGTTATGCAGCGTGTTC	GATGAGGGGTGTAGCTGTTTG	213	50,2
<i>mTcCIR164</i>	AGAACGGTTCAGGACAATC	AGGACAATGATGAAGAAATAAG	117	49,2
<i>mTcCIR187</i>	TTCACCTAGTGTAATGGTCT	GCAGGCTTCAATTTAGAG	262	49,4
<i>mTcCIR192</i>	TCACTTCACAATAATTTCAAG	AAATTGAATTCCAGTTGTAG	98	46
<i>mTcCIR195</i>	CAAGTTGAATAAAGTCCTAAG	AAAATAAAGAAAATGAAGTAA	350	46,6
<i>mTcCIR212</i>	GAGAAACACTTCAGGATAC	GTCATTTGGCAGATTTA	186	46,6
<i>mTcCIR216</i>	ACTGCCCAGGAATCA	TCTTTGTTTCTGCCTTAT	158	47,4
<i>mTcCIR218</i>	TGACCAAGGAAGCTCTC	GGTGGGAAAGGTGGTA	187	48,9
<i>mTcCIR221</i>	ATGTAGTTGGGCTGTGA	TGTTAAGAGGGAAATGAA	273	48,6
<i>mTcCIR226</i>	TAACCCAAATTCAAAGTC	TTTCAACAGCCTCATCT	246	47,3
<i>mTcCIR228</i>	CCCCTGATACTGTGTG	GAAACCTAATCTCGTAATATGT	110	48,7
<i>mTcCIR231</i>	AGGAGGATTTGCTGAA	CAGGTTCCAATTTGTAT	226	47,3
<i>mTcCIR232</i>	GCTGTTGTCTACTTTTGAAT	CACCCTTTGCACTAGTCTA	205	49,8
<i>mTcCIR234</i>	TTGTGTGCGTTTGTATTC	GAAAGAGAGGGAAAGTGA	123	48,1
<i>mTcCIR237</i>	GAAGACAAGGATGGAGACT	GCAAAGAGAGCAGGAGA	103	50,1
<i>mTcCIR239</i>	CTCCACAGTCAAAATAACA	TTAAATCCCGCAAAGT	203	47,4
<i>mTcCIR241</i>	CAGTTGGAGGGCATT	ACGAGTGAGAGAGTGAAGTT	146	50,2
<i>mTcCIR247</i>	CATTTTATAATTCCTTCT	ACATTTCTTTATTTTCACT	111	39,9
<i>mTcCIR253</i>	TGGCTACTAAACACCTACTA	GGGAGGGGAGTAAAGTT	155	45,4
<i>mTcCIR254</i>	ACAACCTCAAAGAACAAG	GGTAAACCTCGTCATAAT	198	45,3
<i>mTcCIR256</i>	AGAAGGGTGTCAACATTA	GAACAGTCAAACATAAGAGTA	185	46,1
<i>mTcCIR258</i>	TAACCTACAATCCATCAT	ATGGTCATTATCAAATC	116	44,5
<i>mTcCIR259</i>	TTTCTGATTTCCATTA	AGAGGTTCCAAAATACAT	157	45,2
<i>mTcCIR265</i>	TGAATGCTGGAAAAATGT	GTGTCTGCTTTGGTTTGT	246	49,2
<i>mTcCIR272</i>	TTTGCTTTTCCTTCT	TTTGTCAATTTGGATAGTG	258	48,5
<i>mTcCIR277</i>	ACCAAGATCAAAGTCAAGAA	GATAAGAACCAAGTGAAGAGA	304	50,4
<i>mTcCIR281</i>	CCGCTGTTTTGGTATTTT	GGATGAGGGGTGGTTG	194	51,4
<i>mTcCIR283</i>	ATCAATACCACCACACA	CCCTTTTCTCTTTTCT	239	49,3
<i>mTcCIR285</i>	TACTACCTCTACCCTTGT	ATAAATTCCTTCCCTTCT	216	46,7
<i>mTcCIR288</i>	ACAACACAAGGCAAAGA	CCCATTAGCACCAAC	184	48,8
<i>mTcCIR289</i>	CTTCCGCCACTAATAAA	CTATACATAACAGCAGCCA	123	46,8
<i>mTcCIR 293</i>	GAAAGGCCATATTGATGCT	CTATTTCCACACTCAATTCCA	266	55,2
<i>mTcCIR 299</i>	CCTTTTGTTCCTTTCATTTT	CCGCCTTTCTCTTCTCC	146	55,9
<i>mTcCIR 302</i>	CTGTAACCAACCCTAAAAGAAAA	AGTTGAATGTTGGCCCTT	269	55,4
<i>mTcCIR 303</i>	GGCTTCCAGGCTTTACC	CCACTCCGAAATTCCT	258	55,8
<i>mTcCIR 310</i>	GGGGATACTTGACCTCTGTT	GCTGGACCTAAAACGCA	176	55,7
<i>mTcCIR 314</i>	GGATCTTCAGTCCCCAAA	ATCCAGGTAGAGGAGGAATG	247	55,7

Continuação Tabela 2

<i>mTc</i> CIR 315	CCAAATGTTTACAAGGG	TCATGCAGCAACAAGAGA	257	54,7
<i>mTc</i> CIR 318	TTCGGGGTTCACCTGG	CAGCATCGCACAAAGACA	192	56,1
<i>mTc</i> CIR 319	TCTATTTCTATGATGGTGGTTC	CTGCTTTTGTGTTGTGG	204	53,4
<i>mTc</i> CIR 322	TFACTGTCTTCTACCACCTGTTA	CTGCCTTCATTGCATCT	274	52,7
<i>mTc</i> CIR 324	CGAAACTCTCTTTTCGCT	GGCAGTGGGTTGGTTG	250	56,6
<i>mTc</i> CIR 325	TCATCACCACCATGACC	TGGTAAACCCTCCCATC	114	53,8
<i>mTc</i> CIR 327	TTTGAGTGGAAACAATGGC	CCGATCCAAAAGCAAAG	157	55,3
<i>mTc</i> CIR 329	AACTCAAGAAAACGCAAGG	TGGTCAACAATGGGCTT	254	55,6
<i>mTc</i> CIR 331	CCCCTCCATTTGGTTTC	CATGACCTCCGCCTGT	222	56,2
<i>mTc</i> CIR 333	CAGCACCACCTGAAAA	GGTTTCGGAGAAATGGG	123	56,4
<i>mTc</i> CIR 336	AGTGGGAGGAACAGTATGCG	TAAACCGTGTCCACCAAAACA	160	60,0
<i>mTc</i> CIR 337	ACGAAGCCGTAACCTGG	TGCAGGACTCTCTGTCCT	208	54,4
<i>mTc</i> CIR 339	CCAAGCTCCAAGGAAAC	GTCCCAAGTTCTCCCAA	153	54,0
<i>mTc</i> CIR 341	CCGCCGTCTTCTTCTT	TTTTACCTGGGGTTGGG	260	56,6
<i>mTc</i> CIR 342	CCGAAAAACATTGAACAC	TGGGCTCACCTTTCT	223	54,7
<i>mTc</i> CIR 343	GCTTTGCCCTTTCTTCTCT	AGCACTGAACCGAGCAA	265	56,3
<i>mTc</i> CIR 344	GTGGCAGAAAGCAGGG	GGGAGATGGAAAAGGGAA	240	55,9
<i>mTc</i> CIR 348	TGTGGCATCCTCAATCC	GGAGGCGAAGAAGAAGG	261	56,0
<i>mTc</i> CIR 349	CATGGGAGTTGGAAAAGAA	TTGGATTTCGAGGGTGG	244	56,1
<i>mTc</i> CIR 350	CGACGACGACAACAACA	AAGGCAGAGGCTGAGGT	212	55,8
<i>mTc</i> CIR 351	CCAAAGAAAACAGGAAGCAA	GAAGTTAGGGGCATGGG	270	56,4
<i>mTc</i> CIR 352	CGATTCTTCCGTTTCCC	CCATCTGTTGCGGTTGT	151	56,4
<i>mTc</i> CIR 353	TGAGTTGAATCACTTTGGCT	TGTTGGACGGGTTGTTT	250	56,0
<i>mTc</i> CIR 354	AACCCCGAAAAGCACATTCT	TTAAGGTCGTCTCCAGCGTT	272	60,4
<i>mTc</i> CIR 355	TCTGGTGAAAGAGCGAAA	CAAAGAAAACGGCCAAA	195	30,5
<i>mTc</i> CIR 356	GGGGTTGCTTTCTGCTT	AAAACCTGGCGGAGGAG	163	56,3
<i>mTc</i> CIR 358	TTGTGCTTTGTCTATGGGA	TTTTTGCTAATTATCCCAACTTT	227	58,8
<i>mTc</i> CIR 359	TCGAGATACGCAAACGAA	TGGACATTGCGAAAACC	188	56,4
<i>mTc</i> CIR 361	CCCCTCTGTCTCTCTGTCCT	GGGTGGAACCTGAAAACC	189	56,0
<i>mTc</i> CIR 363	CCAGCCGATAAACCCT	GCACCCAAATCAAAGGA	158	55,2
<i>mTc</i> CIR 364	CGCCGATTCTCTCTCCT	CAGTCTCCGACGAAACCA	201	56,4
<i>mTc</i> CIR 366	GGGAAAAACAACAGCAAAA	TTTTGGAGGCTTTGAGG	190	54,6
<i>mTc</i> CIR 367	GGAAAACCTCTCAATTCTCTCTCT	TGAGTTGTTGGAGGTGGA	132	55,6
<i>mTc</i> CIR 373	CAGGTACTCATGGACTTTT	CAAATGGAAGGATTGGG	261	54,4
<i>mTc</i> CIR 374	GGGAGTCTCTTTCTTTCC	ACTCGGAACCCTTAGCAC	121	55,3
<i>mTc</i> CIR 376	TTAGACAATTTGCAGGGGG	TCTCAGGGCAGCACTTTCTT	199	60,0
<i>mTc</i> CIR 380	CCCCGGACACAAAAG	CTGAGCTAGTGGCGGTG	194	56,4
<i>mTc</i> CIR 382	AAAGAGCGAAAGCAGGG	CCACACCAAGGAGCGT	245	56,4
<i>mTc</i> CIR 383	GGGGCATTCTCGCT	TGTAGCTTGGGATGGTTG	150	55,4
<i>mTc</i> CIR 384	TCCGGTGTCTTCATCGT	GGGGAAATGGGAAAAGA	245	55,7
<i>mTc</i> CIR 387	CATGACCATTGCTTTCAACTCT	AGCTGCCCAGCTTTT	221	59,1
<i>mTc</i> CIR 388	TTCCCGAAATTTCCCATC	TTGGGTTCCAGTCAAAGAG	264	56,2
<i>mTc</i> CIR 390	TTGACATCTTGTAGCGGG	GGCCAAAATAAGGGAG	188	55,5
<i>mTc</i> CIR 391	GAAAGCTGGCGGTGAA	CGGCTGGCTGTTCTGT	211	56,7
<i>mTc</i> CIR 392	GCAGCAACGAGTGTTCGTA	GGGGGCCGTTATTCTTTTTTA	176	60,1
<i>mTc</i> CIR 397	CGACCAATACGACGAAGA	ATTAACCGCTTCGATG	268	55,5
<i>mTc</i> CIR 400	TCAAAAACGGGGAACAGA	GTGTGCCGTTGTTTGGT	276	56,0
<i>mTc</i> CIR 404	TTCTTTCCAAAGCCCTC	CGAGGCTGCGGATTT	181	56,4
<i>mTc</i> CIR 413	GCCCTCCGAAAATCCT	CAACCACGAATCTCCCTT	232	55,9
<i>mTc</i> CIR 414	TGGATCACATCCCATCAC	TGACGAAAAGTGCAAGGAG	240	55,8
<i>mTc</i> CIR 418	ATCCAATGCCAAACCTACA	CGAAGCGTATGAGCAGG	276	56,4
<i>mTc</i> CIR 422	ACATCCTTTTCTCTGCCTTT	CCCTTCCCATCCCTCT	208	55,6
<i>mTc</i> CIR 423	TTTGCCAGGAATCTGTTG	CCTTGGGTGGGCTTC	277	55,5
<i>mTc</i> CIR 424	TCTACCAGTCAAAATGCC	CTTCCCTCATCCCCAAC	233	56,1
<i>mTc</i> CIR 428	TGGCTGGTCCCTACCTT	AGACTTGCCCGGTGTTT	264	56,5
<i>mTc</i> CIR 429	GGGGATACACTTCTGCTCT	TTTATTGGTTTCCCGTCC	177	55,8
<i>mTc</i> CIR 430	CGAAGGAAAAGGAAAGTAGAATAAG	CGTGGCTTCGATGAGTT	206	55,7
<i>mTc</i> CIR 431	GCTGCCAATCGTATCCC	TTGGTGAAGCCCTTGGT	238	57,5
<i>mTc</i> CIR 432	GGGGAACCTGAAACCAAAA	CGGTGGTGGCTCTTTC	227	55,9
<i>mTc</i> CIR 433	AGCATTTGCCTTCGCTT	TGAAACAGTCCCTGCCGA	220	57,
<i>mTc</i> CIR 444	TGAACCGGATTGTTGGA	GGGACTTAATCTGGACATGC	125	56,8

Continuação Tabela 2

<i>mTc CIR 446</i>	TCTCAAACCCTAGCCC	CATCGTTATCACTGCCCTT	120	56,1
<i>mTc CIR450</i>	CACTGAAAATACCTTTGGGTT	GGGGACAAAAGGATGAAA	246	55,8
<i>mTc CIR452</i>	TCCAAACCATACGAAGCA	TACTCCCAGGCGCTTTC	247	56,0
<i>mTc CIR453</i>	ACACGGGCAATACACCA	AATGGGAACAAGCCCC	217	56,6
<i>mTc CIR454</i>	TGACACCATGTAGAGATTTGG	TGAGTAGCCCTTCTCTCAA	272	56,0
<i>mTc CIR455</i>	GCTCAAGATCCAACAACC	TGCTTTTAGCACGAGGA	143	53,7
<i>mTc CIR457</i>	TGTTTTGGCTTTGGCTC	TTTACaGGGTGAGGACA	233	55,6
<i>mTc CIR458</i>	AAGTAAAGGgTAGGTTTTGTTG	CATTCATATTGTTTcTCCCC	257	54,4
<i>mTc CIR462</i>	GCTCAACACACCATATCCA	ATGTGGcTCCCATATCCT	243	55,2
<i>mTc CIR463</i>	CCAGTGGTTTAGTCCCAGTT	TTGGCAGATTTAGAGAGCA	253	56,6
<i>mTc CIR465</i>	TGCTGTGATGTTGAGAAAG	cTcCCACACTCAGCCC	230	55,6
<i>mTc CIR467</i>	AAACGGGGAGAGAATACAAG	AGCCCAAGGTTCCAAAG	273	55,8
<i>mTc CIR468</i>	TGTTTTGGGAAAATGCT	TCACCATATCACACCC	279	52,2
<i>mTc CIR470</i>	TCGATCTCTTTCCATTTTgT	AAAAGGTTGCCCATATCC	247	54,8
<i>mTc CIR471</i>	AGCTGACTTGGCACCTTT	TGGGTTTGGCATTGTTC	150	55,8
<i>mTc CIR472</i>	TGGTGATGCTTTTGGAGA	CACCGCTGTTCTTTGG	251	56,0
<i>mTc CIR473</i>	TTTTGAGACTCCTGGTTC	GCTACCATTGCTTTAATCCT	258	55,2
<i>mTc CIR476</i>	TGTGGACCTCGTAGGGA	GTGCAGTGTGCAGGGA	161	55,6
<i>mTc CIR477</i>	TCTGGAATCAGTAATCAGCAA	CCCTcTAGCCTTGCACCTC	166	55,9
<i>mTc CIR478</i>	GACAGGGTCAATCAACACA	AACCCCAACCCCTCTT	280	55,0
<i>mTc CIR479</i>	TGTTTAAGTTTGGACAGCA	ACACCTGCCAATACCaa	217	52,6
<i>mTc CIR480</i>	CCCTCAAGCATTAAGAAAA	TGTCCTCTGAAAAGAGTGGt	271	53,1
<i>mTc CIR482</i>	ATACCACATCCTCGTATTTT	GTGGCTGGTGTGaaTg	264	51,2
<i>mTc CIR484</i>	TTAAGATTGTTATTCTCGTGGG	CTTGATTTCGCGGTTTTG	232	56,0
<i>mTc CIR485</i>	GCATCGCATTTGTTCTTG	TTGGGGTCTGTGGTGAG	214	56,2
<i>mTc CIR486</i>	AATGTgACACCAAATTGTCC	CCATGTGGGTTGAGGAA	180	55,6
<i>mTc CIR487</i>	TGCAACTTGACCATTCTTT	ATGCACAAGGACAAGCA	271	54,1
<i>mTc CIR488</i>	TCCACCTCGAAAGAAGAGA	ATTCCCTTGCAGCCTTT	108	55,9
<i>mTc CIR492</i>	TCACCAGAAATGCCAGAA	GAATGGAgAGGAAGGCAA	265	56,0
<i>mTc CIR493</i>	TCGCCAAGGTCACTCTAC	TGTCATCTGTGCCATCTCT	178	54,5
<i>mTc CIR496</i>	ATTCAAATTCGGAAGCCA	CCACTTTGAGCACGGAA	223	58,6
<i>mTc CIR497</i>	TGTTTCGCCGAAAATaG	TCCCACCCATCACTCC	243	55,6
<i>mTc CIR499</i>	GGCATCCTTATCtAGGCAC	AGACGACTGAAGGCCAA	272	54,7
<i>mTc CIR501</i>	TTGGCTATTTACCTCCA	TAACGCAACCACAGCAC	203	54,9
<i>mTc CIR503</i>	CTTCAGCCGTcATGCTC	CCAAAGCCCCAAAACCa	258	56,2
<i>mTc CIR505</i>	GAGCGAAACGTACAGAA	TCCAATTTCAATCCAGTCC	202	55,7
<i>mTc CIR508</i>	CCTCCCCATTTTCATGTTT	CGTTGGAACTTTgGTgG	280	55,6
<i>mTc CIR516</i>	TTATGTGGgCCTTGTGG	GCTCCATTTTCTCTTCC	262	56,1
<i>mTc CIR525</i>	GGCCAGTTGTATTTTGTTC	AATGGGGATACACGCAC	239	54,8
<i>mTc CIR526</i>	CAGTGGATCGAGGGGA	CCGAACCCAGTGACAAA	228	56,0
<i>mTc CIR533</i>	TCAATCCAACCTCCTCCTC	GAAACTGACAAGCAAAGAAA	201	53,1
<i>mTc CIR534</i>	TCGAACCTATTGAGCCG	TAGATTGTGCGCATGTGT	100	53,0
<i>mTc CIR535</i>	GTGTCAACATCCATCTCCC	TGTCGGaGGAATTTATTGG	279	56,0
<i>mTc CIR536</i>	TGCAATGGAGGACCAAG	TCCAcACTTTTGCACCC	217	56,3
<i>mTc CIR537</i>	TTCGTGCTTTACACACCC	GCCATCATCAACAACCTCAA	236	55,4
<i>mTc CIR538</i>	AATCTGTCAACATTCATCTGCT	GGTCAAATGTGGCTTCTT	250	56,4
<i>mTc CIR539</i>	CAAGTAGAGATTAACCACAATCC	TCGAAGCTCATCCACATC	170	54,7
<i>mTc CIR542</i>	CACCTTCCACAACCCTGAA	TGCTGATCCTCCTCCAC	279	55,2
<i>mTc CIR546</i>	CACACTTACCcGcACA	TTCAATTACAGCCCCACAA	276	58,4
<i>mTc CIR548</i>	TTTGCTTTTcTTCCCAC	GCTCATTGCCACTCAAAA	106	53,7
<i>mTc CIR549</i>	TGCCAATTCAGACCACA	GGaTGGCTACTTgTtATTG	252	55,0
<i>mTc CIR550</i>	CATGAGGAATGATTGGGA	ACATGCCTgGATTGATTAC	231	54,9
<i>mTc CIR552</i>	AAgCCTCCCTTGAACC	GTTGGAACCTTGGTGGA	247	55,0
<i>mTc CIR554</i>	GTGGCCTCACTTTtCTCC	ATTCGACGCAGGTTTTG	273	55,5
<i>mTc CIR555</i>	CacTTGAATGcGGgTGT	TGGAAATGGAGTCGAAAAG	242	56,2
<i>mTc CIR556</i>	ACACTTATAGACGGAGCACTAAA	CGCTCTTACATTTGAAAtcTTG	259	55,1
<i>mTc CIR560</i>	TAGTCGCACATAGCCGAG	TTGGGAACAAGCCCC	147	55,9
<i>mTc CIR561</i>	AGGTGAACAAAAGGGCA	CGACCAcCACCATTctt	110	54,8
<i>mTc CIR563</i>	TGAAGACCAAGCAAGTCAA	GGCTATCCATGCACTCAA	200	55,3
<i>mTc CIR564</i>	AGCTTGGGTGACTATGAGAAC	GGAAGAAGGATGGAAGACC	186	55,9
<i>mTc CIR566</i>	CTCAACACACTTAGCTCAACC	TGAAGAATGTGATTACGAAGG	211	55,1

de 1:100, onde 1  $\mu$ L de DNA concentrado foi diluído em 99  $\mu$ L de água ultrapura. Foram realizados testes com outras concentrações, porém a que apresentou resultado mais satisfatório, com bandas bem evidentes em gel de agarose foi utilizado como padrão de diluição. Os padrões de bandas obtidos foram avaliados quanto à ocorrência de amplificação e quanto à presença de polimorfismos de DNA.

### Amplificação e genotipagem

Para os *primers* de cacauzeiro, foi utilizada a reação de PCR com volume final de 20  $\mu$ L, contendo entre 5 e 10ng de DNA, 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) 0,2 mM de dNTP 1X de tampão (10X) e 0,5 a 1U de *Taq*DNA polimerase (Fermentas). A temperatura de anelamento dos *primers* foi testada com a utilização de dois protocolos *touchdown* (TD), como segue: o primeiro composto por 10 ciclos para desnaturação a 94°C por 4 minutos, anelamento do *primer* geralmente entre 60-48°C (TD-6048) usando 1°C de decréscimo, e extensão a 72°C por 1 min e 30s, e uma extensão final de 4 min a 72°C. O segundo *touchdown* segue as mesmas especificações do primeiro com a ressalva de que sua variação de temperatura de anelamento variou entre 55 e 46°C (TD-5546).

Os marcadores ESTs de cupuaçuzeiro desenvolvidos pela EMBRAPA/CENARGEN foram amplificados utilizando programa: 96°C por 2 min, 9 ciclos para

desnaturação a 94°C por 45s, anelamento do *primer* entre 62 - 48°C usando 0,5°C de decréscimo, extensão a 72°C por 45s, seguidos por 30 ciclos a 94°C por 45 s, 58°C por 1 min e 72°C por 45 s, finalizando em 72°C por 5 min.

Para os marcadores desenvolvidos pela EMBRAPA/CPATU foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima para cacauzeiro. Os fragmentos obtidos após amplificação foram quantificados por eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante a 6% corado com nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001) e Gramacho et al. (2007) e em agarose Metaphor 4% corado em Gel Red.

### Avaliação da Transferibilidade de marcadores microssatélites

Para avaliar a transferibilidade de marcadores entre as espécies foram selecionados marcadores conhecidamente específicos de *T. cacao* numa coleção de microssatélites do CIRAD. Os marcadores foram genotipados em indivíduos de *T. grandiflorum*, conforme tópico disposto acima, e, os marcadores que apresentassem ocorrência de amplificação foram considerados transferíveis, em seguida foi avaliado o padrão disposto nos géis de poliacrilamida ou agarose Metaphor e separados em duas categorias, monomórficos (1 banda de DNA) e polimórficos (2 bandas de DNA) (Figura 2). Os marcadores classificados como polimórficos foram selecionados para as posteriores etapas do trabalho.

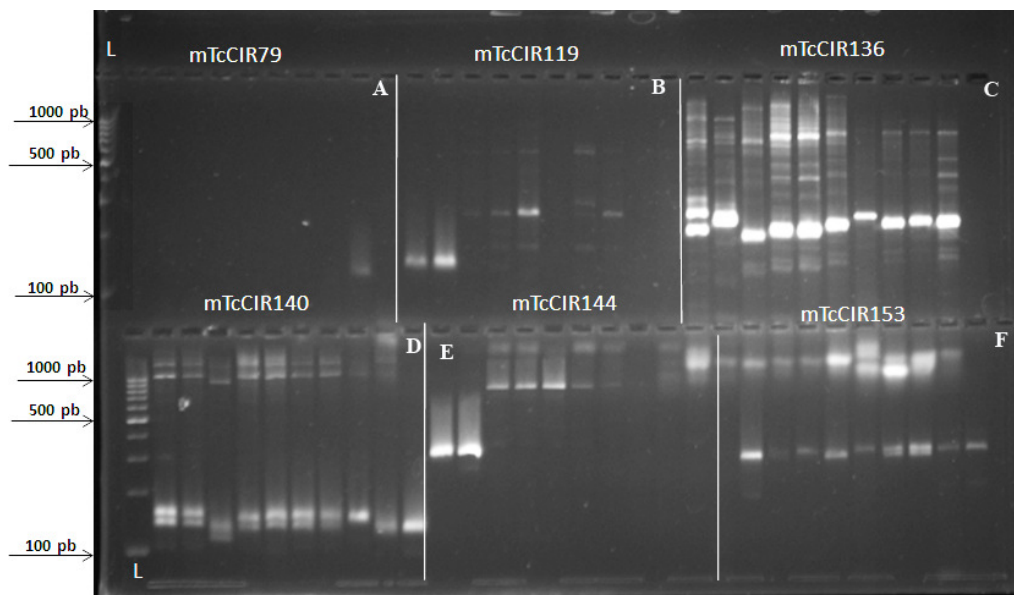


Figura 2. Amplificação de marcadores microssatélites em genótipos do cupuaçuzeiro. (A) marcador mTcCIR79, (B) marcador mTcCIR119. (C) marcador mTcCIR136, (D) marcador mTcCIR140, (E) marcador mTcCIR144, (F) marcador mTcCIR153.



### Mapeamento genético parcial de *Theobroma grandiflorum*

O mapa genético parcial da espécie *T. grandiflorum* foi construído utilizando os resultados de genotipagem cedidos pela equipe da EMBRAPA/CEPLAC-CPATU. Uma matriz de genotipagem de 142 indivíduos e 36 SSRs foi utilizada correspondendo respectivamente ao número de plantas vivas quando realizado o último levantamento e o número de SSRs efetivamente polimórficos entre os pais da população (CP174 e CP1074). Para construção do mapa foi utilizado o software JoinMap 4.1 (Van Ooijen, 2006) utilizando-se LOD 3,0 e 4,0 e máximo de 45% de frequências de recombinação. Foram testadas duas funções de mapeamento, Haldane e Kosambi. O mapeamento foi realizado considerando a população de tipo CP do JoinMap que significa que a progênie é o resultado do cruzamento entre dois pais heterozigotos com possíveis genótipos como os apresentados na Tabela 3.

Foi realizado um BLAST das sequências dos SSR de *T. grandiflorum* no genoma de *T. cacao*. Foram utilizados nessa etapa 149 marcadores, onde 135 foram cedidos pelo CPATU, desses 105 foram considerados monomórficos e 30 polimórficos, mais 14 marcadores oriundos do CENARGEN. Estes SSRs foram submetidos à comparação com sequências do genoma do cacauzeiro V1 disponíveis na Database (<http://cocoa-genome-hub.southgreen.fr/genome-browser>) para o posicionamento no mapa genético físico.

Tabela 3. Descrição da segregação de alelos e possíveis genótipos numa população de tipo CP (Cross Pollinators\*)

Código	Descrição da segregação	Genótipos possíveis
[ab x bc]	Loco heterozigoto para ambos os pais (4 alelos)	ac ad bc bd
[ef x eg]	Loco heterozigoto para ambos os pais (3 alelos)	ee ef eg fg
[hk x hk]	Loco heterozigoto para ambos os pais (2 alelos)	hh hk kk
[lm x ll]	Loco heterozigoto para o primeiro pai	lm ll
[nn x np]	Loco heterozigoto para o primeiro pai	nn np

\*códigos do programa JoinMap v4.1 (Van Ooijen, 2006), de uma população caracterizada como "crosspollinators".

## Resultados e Discussão

Os genitores da população de *T. grandiflorum* foram submetidos a um *screening* em conjunto com amostras de seis indivíduos da população para encontrar *primers* que

apresentassem: i) transferibilidade entre as espécies, ii) e/ou marcadores polimórficos para construção do mapeamento genético parcial da espécie utilizando o cruzamento CP174xCP1074. Do total de 181 marcadores específicos a *T. cacao* e testados em *T. grandiflorum*, 78 marcadores amplificaram (43,09%). Das ampliações, 42 apresentaram polimorfismo (56,41%) e os outros 26 foram considerados monomórficos. Os marcadores polimórficos (Tabela 4) foram selecionados para serem genotipados em toda população e mapeados no cruzamento de *T. grandiflorum*.

A baixa taxa de transferibilidade (43,09%) dos marcadores de cacauzeiro quando amplificados em cupuaçuzeiro pode estar relacionada a diversos fatores, entre eles, a falha na padronização das temperaturas de anelamento dos *primers*. Foi baixa também a porcentagem de marcadores polimórficos, que pode ser explicado pelo conjunto, quantidade e/ou perfil dos marcadores selecionados para este trabalho sendo insuficiente para diagnosticar com precisão a diversidade genética da população. Foi realizado um segundo *screening* com 30 marcadores específicos de cupuaçuzeiro em uma seleção de cinco diferentes genótipos de cacauzeiro (Criollo, Scavina 6, ICS1, SIC864 e CCN51) (Tabela 5), para testar a transferibilidade entre espécies. Destes, 28 (93,3%) foram transferíveis para cacauzeiro, dois não amplificaram. Dos marcadores que apresentaram

transferibilidade, 10 apresentaram um padrão de alelos homozigotos, Tg05, Tg09, Tg11, Tg20, Tg30, Tg48, Tg76, Tg88, Tg108 e Tg113 o que corresponde a 35,71%. Os genótipos que apresentaram maior taxa de transferibilidade foram o Criollo e o Scavina6, e o genótipo que apresentou menor taxa de transferibilidade foi o CCN51. O mesmo teste foi realizado com 14 marcadores cedidos pelo CENARGEN e o resultado mostra que nove deles amplificaram em cacauzeiro apresentando diferentes alelos (Tabela 5, Figura. 3), o que era esperado, uma vez, que se trata de variedades da mesma espécie, provenientes de clones geneticamente diferentes. O experimento mostrou ainda, que a taxa de polimorfismo foi baixa, com apenas dois marcadores polimórficos: o c\_180 e o c\_1251.

Tabela 4. Relação dos marcadores específicos do cacauieiro polimórficos em *T. grandiflorum* com as sequências (*forward/reverse*), tamanho esperado em pares de bases (pb), motivos de repetição, temperatura de Melting (Tm °C) e grupo de ligação (LG) em que está localizado no mapa genético de *T. cacao*.

Locos microssatélite	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer	T. E. (pb)	Repetição	Tm (°C)	Grupo de Ligação
mTeCIR85	TTGAAGTAGAGAGTTGTAAGAA	TTATGGTGTGGTGTGAT	211	(AG)16	46,7	1
mTeCIR273	AGAATGATCGCAGAGAG	ACGGCATTAGAGAGAGA	167	(CT)4 AC (CT)13 TT (CT)4	47,3	1
mTeCIR113	GGAAAGTTACAGCAAGAGAGA	ACAAGCCCGGTGAAGG	142	(AG)9	50,7	7
mTeCIR114	CAGATGAATGGAATAACTT	GCATGAACACAAACACAC	207	(TC)9(TG)5 G (TG)4	48,7	9
mTeCIR119	TGGACTTGTGCTGGAAC	GCAAGAAATAAAATAGGAAC	123	(AG)12	47,8	5
mTeCIR140	GATTTCATAGTGAAACACAGT	GGAAAACAGAGAGGAAGAGT	104	(CA)07	48,1	3
mTeCIR145	CAGCTTCCAACCTCAAAACT	TGAGAATAGATGGACCGAT	117	(CT)17	49,7	9
mTeCIR153	GCCTCTCACACCAITATCTG	TACATTCATTTACTTCACTGCTG	217	(TC)09	50,1	3
mTeCIR155	CTTGGACTATTGGAAAAC	AAGGATACAATAAGGTAAATAC	274	(TC)12	46,5	10
mTeCIR184	GGTTTTCTAGCTCTCTCC	AGGAAAGAATGACTCATACTA	139	(CA)8 (CT)13	48,2	1
mTeCIR185	ATCCCCCTGCCTAAAGAG	CCTGAATGAAGTAAGACCCAAT	142	(CA)18	50	3
mTeCIR198	TGGGACATAAGGAAATC	CCCAGGTGAAGTAAGACA	186	(CA)3 TA (CA)6	46,3	3
mTeCIR218	TGACCAAGGAAGCTCTC	GGTGGGAAAGGTGGTA	187	(CT)11	48,9	8
mTeCIR240	CATACCTACTACTGCTCTCT	AGTGATTTATGGGACTTT	158	(CT)22	46,5	2
mTeCIR249	TCTCAAGTTCAAGGGTCT	GACACAAATGCCGTTAT	246	(CT)4 TT (CT)28 (AC)16	47,9	1
mTeCIR286	GTTCGTCTTCATCTGTTTA	TTCAACCCACAACCAT	119	(CT)18	46,2	1
mTeCIR287	TCCTTTCTGTTTGTTCCT	TTATCCGTGTCCTTCT	301	(TC)9	48,2	9
mTeCIR293	GAAAGGCCATATTGATGCT	CTATTTCCACACTCAATCCA	266	(AT)9	55,2	9
mTeCIR294	GGGAGAGACACAGAGAGCTA	GCCACTTTCTCCATCGT	128	(AG)14	54,4	9
mTeCIR302	CTGTAACCAACCTAAAGAAA	AGTTGAATGTTGGCCCTT	269	(AT)8	55,4	1
mTeCIR304	GTGCTGGTGGTGAAGGA	GGCTTCGAGGAAGGGT	219	(TA)8	56,1	1
mTeCIR310	GGGATACTTGACCTTGTT	GCTGGACCTAAAACGCA	176	(CT)12	55,6	8
mTeCIR316	AAAAGCATCTCTCCCA	AGCTGTCCATGCTCCT	137	(CT)15	53,9	3
mTeCIR331	CCCCTCCATTGGTTTC	CATGACCTCCGCTGT	222	(CT)11	56,1	1
mTeCIR337	ACGAAGCCGTAACCTGG	TGAGGACTCTCTGTCACT	208	(GGA)5	54,3	6
mTeCIR342	CCGGAAAACATTGAACAC	TGGGCTCACCTTTCT	223	(CT)10	54,7	1
mTeCIR353	TGAGTTGAATCACTTGGCT	TGTGGACGGGTTGTTTC	250	(TGT)	55,9	3
mTeCIR356	GGGGTTGCTTTCTGCTT	AAAACCTGGCGGAGGAG	163	(TC)6	56,2	1
mTeCIR359	TCGAGATACGCAAACGAA	TGGACATTGCGAAAACC	188	(TC)7	56,3	4
mTeCIR382	AAAGAGCGAAAGCAGGG	CCACACCAAGGAGCGT	245	(AG)16	56,4	8
mTeCIR404	TTCTTCCAAAGCCCTC	CGAGGCTGCGGATTT	181	(AAT)6	56,3	5
mTeCIR414	TGGATCACATCCATCAC	TGACGAAAAGTGCAAGGAG	240	(TA)11	55,7	2
mTeCIR419	ATTTGCCCTTCTCGCTC	CAGCAGCACGCCTAAAC	169	(CCG)8	56,4	1
mTeCIR429	GGGGATACATCTTCTGCTCT	TTTATTGGTTTCCCGTCC	177	(CT)12	55,8	9
mTeCIR430	CGAAGGAAAGGAAGTAGAATAAG	CGTGGCTTCGATGAGTT	206	(AG)10	55,6	2
mTeCIR470	TCGATCTCTTCCATTTTgT	AAAAGGTTGCCATATCC	247	(AT)12	54,8	1
mTeCIR471	AGCTGACTTGGCACCTTT	TGGGTTTGGCCATTGTTTC	150	(AC)9	55,8	8
mTeCIR472	TGGTGATGCTTTTGGAGA	CACCGCTGTTCTTTTGG	251	(GA)13	56	8
mTeCIR550	CATGAGGAATGATTGGGA	ACATGCCtGGATTGATTAC	231	(AC)9	54,9	1
mTeCIR556	ACACTTATAGACGGAGCCTAAA	CGCTCTTACATTGAAAatTTG	259	(AT)8	55,1	5
mTeCIR560	TAGTCGCACATAGCCGAG	TTGGGAACAAGCCCC	147	(TA)8	55,9	5
mTeCIR563	CTCAACACACTTAGTCAACC	TGAAGAATGTGATTACGAAGG	211	(AT)10	55,1	6

A literatura mostra *T. cacao* como uma espécie promissora quando relacionada a estudos envolvendo genômica comparativa com a espécie *T. grandiflorum*. As duas espécies mantêm um alto índice de regiões genéticas conservadas, devido à alta porcentagem de marcadores de cacauieiro amplificados em cupuaçuzeiro. Esse fato é justificado ao fato que espécies filogeneticamente próximas apresentam homologia das sequências flangeadoras aos locos microssatélites, permitindo assim sua transferibilidade. Kuhn et al. (2010), encontraram em seu trabalho 87% de transferibilidade de marcadores entre estas

espécies. Segundo os autores, a conservação de sequências entre as duas espécies é significativa e que a genômica comparativa entre cacauieiro e cupuaçuzeiro pode levar a resultados promissores na busca de cultivares que apresentem diversas características de interesse agrônomo. A transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies de um mesmo gênero ou de uma mesma família tem sido observada em plantas tropicais (Chase et al., 1996; Dayanandan et al., 1997; Sousa et al., 2018).

Foram testadas duas funções de mapeamento, Haldane e Kosambi, sendo que não houve diferença

Tabela 5. Transferibilidade dos 30 marcadores específicos de cupuaçu cedidos pela EMBRAPA/CPATU nos diferentes genótipos de cacau

Marcador/ Genótipo	Criollo	Sca6	ICS1	SIC864	CCN51
Tg04	+	-	+	+	+
Tg05	+	+	+	+	+
Tg09	+	+	+	+	-
Tg11	+	+	+	+	-
Tg13	+	+	+	+	+
Tg17	+	+	+	+	+
Tg20	+	+	-	+	-
Tg21	+	+	+	-	+
Tg30	+	+	+	-	+
Tg31	+	+	+	+	+
Tg39	-	-	-	-	-
Tg43	-	-	-	-	-
Tg44	+	+	+	+	-
Tg47	+	+	+	+	+
Tg48	+	+	+	-	+
Tg54	+	+	+	+	-
Tg62	+	+	+	+	+
Tg64	+	+	+	+	+
Tg65	+	+	+	+	+
Tg70	+	+	+	+	+
Tg71	+	+	+	+	+
Tg72	+	+	+	+	+
Tg76	-	+	+	+	+
Tg77	+	+	+	+	+
Tg88	+	+	+	+	+
Tg89	+	+	+	+	+
Tg90	-	-	-	-	-
Tg102	+	+	+	+	+
Tg108	+	+	+	+	+
Tg113	+	+	+	+	-

(+) Apresentaram transferibilidade; (-) Não apresentaram transferibilidade.

significativa entre as duas no resultado final, assumindo-se o resultado proposto pela função Kosambi. O mapeamento parcial foi realizado a partir de 36 marcadores incluindo 13 SSRs do cacaueiro e 23 SSRs do cupuaçuzeiro todos genotipados pela EMBRAPA/CPATU-PA. A matriz de genotipagem foi transformada para ser utilizada de acordo com a segregação dos alelos para uma população CP, ou seja, populações que são provenientes de genitores heterozigotos com fase de ligação dos locos originalmente desconhecida. A análise de segregação dos 36 locos está representada na Tabela 7, que identifica em números como foi realizada a distribuição dos alelos na população para cada marcador.

Os marcadores mTgM11, mTgM48 e mTcCIR182 apresentaram distorção de segregação. A literatura a respeito disso é bem diversa, alguns autores são a favor da inclusão de tais marcadores na construção de mapas (Lefebvre et al., 2002), outros preferem a exclusão total dos mesmos (Bearzoti, 2000) por produzirem, em alguns casos, um falso positivo. Nesse trabalho estes marcadores foram incluídos no processo, visto que não foi constatada mudança significativa no resultado final. Foram realizados testes com as duas situações e ambas apresentaram resultados similares. Um total de 11 marcadores não se uniu aos grupos de ligação. O mapa genético de *T. grandiflorum* foi construído então só com base em 25 marcadores, onde, nove eram do cacaueiro e 16 marcadores do cupuaçuzeiro, e foram formados sete grupos de ligação, com cobertura total de 644,5 cM, cinco desses grupos correspondem aos grupos de ligação do cacaueiro, os grupos GL4 e GL5 no mapa proposto correspondem ao GL4 do mapa genético do cacaueiro. Os grupos de ligação

Tabela 6. Marcadores SSR-EST específicos de cupuaçu cedidos pelo CENARGEN, com amplificação em cacau e nos genótipos de cupuaçu CP174 e CP1074

SSR-EST/CENARGEN			Genót. Cupuaçu		Genótipos Cacau				
Nome	Num allelos	Allelos	174	1074	Criollo(B97/61B2)	Scavina 6	ICS 1	SIC864	CCN51
C_432	2(AB)	(AB)	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
C_168	3(A-B-C)	(A-B-C)	BC	BC	AC	AC	AC	AC	AC
C_4949	2(A-B)	(A-B)	AB	AB	AB	AA	AA	AA	AA
C_295	4(A-B-C-D)	(A-B-C-D)	BD	BD	AC	AC	AC	AA	AC
C_432	3(A-B-C)	(A-B-C)	AB	AB	BC	AB	n	AB	BC
C_180	2(A-B)	(A-B)	AB	AA					
C_203A	2(A-B)	(A-B)	AB	AB	AA	AA	AA	AA	AB
C_203B	2(A-B)	(A-B)	AB	AB	AA	AA	AB		
C_1251	2(A-B)	(A-B)	AB	BB					

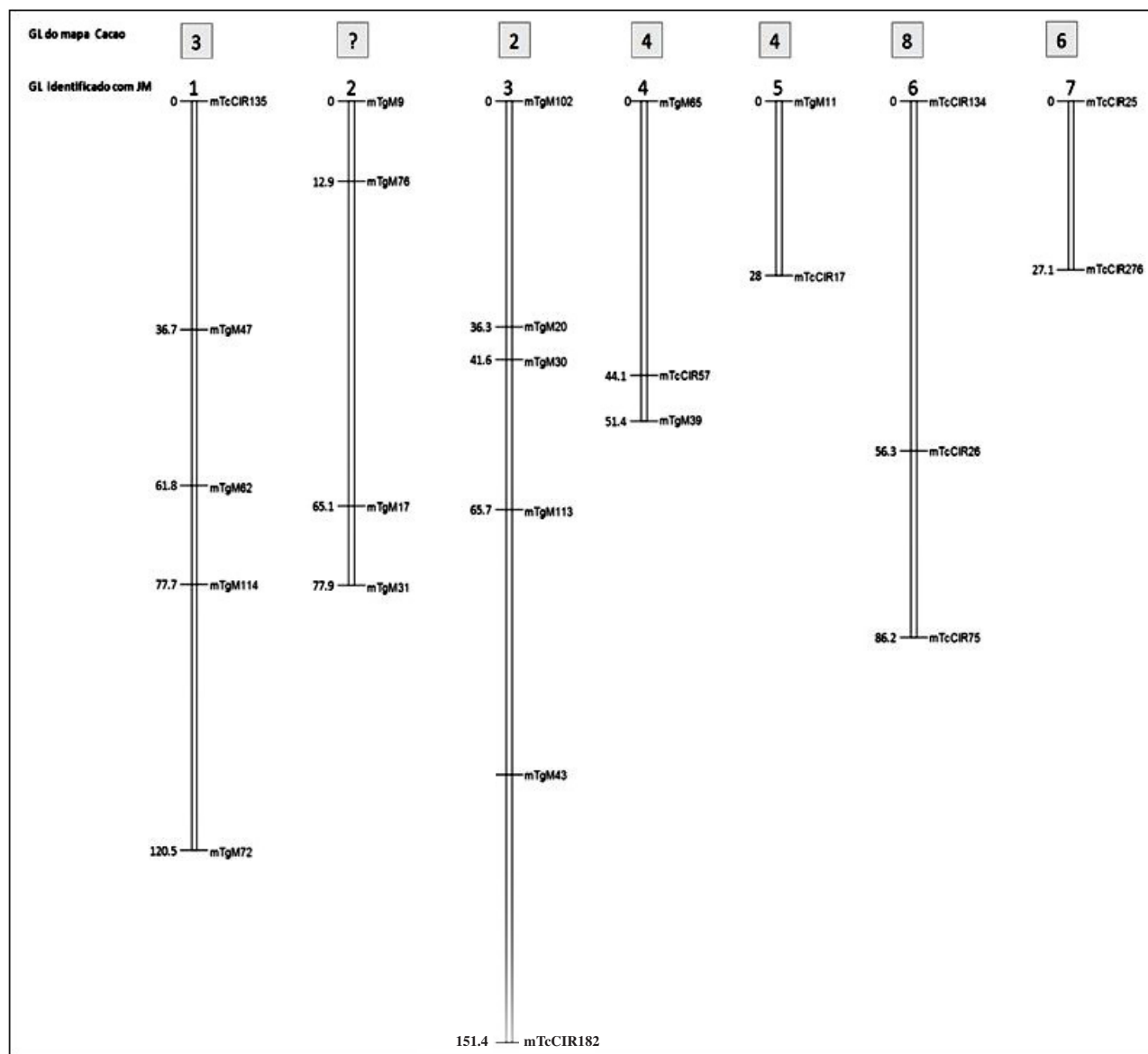


Figura 3. Mapa genético do cruzamento CP174 x CP1074 com nove SSRs de cacau e 16 SSRs de cupuaçu. A linha acima representa a correspondência estabelecida com SSRs de cacau já posicionados no mapa genético do cacau

apresentaram grande diferença em relação aos seus comprimentos variando do menor grupo (GL7) que apresentou apenas dois marcadores com distância de 27.1 cM ao maior grupo (GL3) que apresentou seis marcadores abrangendo uma distância de 151.4 cM.

Por ter um número baixo de marcadores, este mapa precisa ser saturado, com no mínimo 100 marcadores, para que se tenha uma quantidade maior de informações e a formação de novos grupos de ligação, uma vez que, a espécie apresenta um conjunto de 10 cromossomos (Alves, 2007), pois, do ponto de vista

biológico, cada grupo de ligação deve representar um cromossomo da espécie. Diante disso, esse mapa pode ser considerado como uma primeira informação de um mapa genético parcial da população oriunda do cruzamento (CP174 x CP1074) da espécie *T. grandiflorum*. Foram analisados 149 pares de sequências dos microssatélites específicos de *T. grandiflorum*, com o objetivo de encontrar regiões similares conservadas entre essa espécie e *T. cacao* e posicionar os marcadores SSR do cupuaçuzeiro no mapa físico e no mapa genético consenso do cacau

Tabela 7. Frequência e segregação dos locos nas plantas da população de *T. grandiflorum*. (Tabela gerada pelo programa JoinMap)

Nº	Loco	ee	ef	eg	fg	hh	hk	kk	ll	lm	nn	np	-	X2	Df	Signif.
1	mTgM11	50	17	24	26	0	0	0	0	0	0	0	25	21,1	3	*****
2	mTgM30	41	38	32	29	0	0	0	0	0	0	0	2	2,57	3	-
3	mTgM43	29	43	37	32	0	0	0	0	0	0	0	1	3,2	3	-
4	mTgM47	32	34	37	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0,82	3	-
5	mTcCIR26	29	48	34	31	0	0	0	0	0	0	0	0	6,23	3	-
6	mTcCIR162	35	32	40	29	0	0	0	0	0	0	0	6	1,94	3	-
7	mTcCIR75	29	41	34	29	0	0	0	0	0	0	0	9	2,91	3	-
8	mTgM77	0	0	0	0	35	60	45	0	0	0	0	2	4,29	2	-
9	mTcCIR25	0	0	0	0	29	65	36	0	0	0	0	12	0,75	2	-
10	mTgM88	0	0	0	0	31	73	33	0	0	0	0	5	0,65	2	-
11	mTcCIR182	0	0	0	0	30	93	2	0	0	0	0	17	42,31	2	*****
12	mTgM102	0	0	0	0	37	74	30	0	0	0	0	1	1,04	2	-
13	mTgM108	0	0	0	0	25	68	48	0	0	0	0	1	7,68	2	**
14	mTgM113	0	0	0	0	35	68	39	0	0	0	0	0	0,48	2	-
15	mTgM48	0	0	0	0	0	60	82	0	0	0	0	0	98,11	2	*****
16	mTgM20	0	0	0	0	0	0	0	68	72	0	0	2	0,11	1	-
17	mTgM54	0	0	0	0	0	0	0	62	80	0	0	0	2,28	1	-
18	mTcCIR134	0	0	0	0	0	0	0	70	63	0	0	9	0,37	1	-
19	mTcCIR276	0	0	0	0	0	0	0	64	68	0	0	10	0,12	1	-
20	mTcCIR12	0	0	0	0	0	0	0	59	76	0	0	7	2,14	1	-
21	mTcCIR124	0	0	0	0	0	0	0	58	57	0	0	27	0,01	1	-
22	mTgM89	0	0	0	0	0	0	0	64	63	0	0	15	0,01	1	-
23	mTgM09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63	77	2	1,4	1	-
24	mTgM13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	65	76	1	0,86	1	-
25	mTgM17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	76	66	0	0,7	1	-
26	mTgM31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	72	0	0,03	1	-
27	mTgM39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	69	9	0,19	1	-
28	mTgM62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	56	0	6,34	1	**
29	mTgM65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	80	2	2,86	1	*
30	mTgM72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	43	32	5,24	1	**
31	mTgM76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78	64	0	1,38	1	-
32	mTcCIR17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	55	17	1,8	1	-
33	mTcCIR57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	71	1	0,01	1	-
34	mTcCIR135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56	83	3	5,24	1	**
35	mTcCIR148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	72	58	12	1,51	1	-

**Loco:** Nome do marcador; (-) Indivíduos que não apresentaram segregação para o marcador; **X<sup>2</sup>:** Valor de qui-quadrado; **Df:** Graus de liberdade; **Signif.:** Indicativo proporcional de diferença entre a frequência dos genótipos esperada e a frequência observada, traduzindo a importância da distorção na segregação.

(Allegre et al., 2011), cujas sequências estão disponíveis no banco de dados do genoma do cacaueteiro (na versão V1). A Tabela geral com o resultado dos *blast* no genoma do cacaueteiro (positivos com dois *primers*, positivo com apenas um *primer* e negativo sem alinhamento) está apresentada na Tabela 8. Do conjunto analisado, 20 apresentaram alinhamento completo com sequências (*forward* e *reverse*), assim, dos 14 marcadores de origem EST, oito pares apresentaram similaridade nas duas sequências de *primers* (57.14%), ressaltando que essas são sequências de regiões expressas conservadas conhecidas (Gupta; Rustgi, 2004) e tendem a se alinhar mais facilmente.

Em contrapartida, de 135 marcadores originados a partir de DNA genômico, apenas 12 marcadores apresentaram similaridade completa com o genoma do cacaueteiro (8.8%). Isso vem, provavelmente porque a parte sequenciada do genoma V1 do cacaueteiro representa somente 75% do total do seu genoma predito (Argout et al., 2010). Um novo sequenciamento do genoma do cacaueteiro (V2) já está disponível (Argout et al., 2017 e <http://cocoa-genome-hub.southgreen.fr/genome-browser>), este cobre 96,7% dos cromossomos do cacaueteiro, porém os dados apresentados aqui não foram reanalisados.

Tabela 8. Relação total de todas sequências utilizadas para realização do *blast*

SSRs Cupuaçu			Resultados do <i>Blast</i> dos <i>primers</i> no Genome Browser						
Nome	OR Sequencias	Instituição	cromos- somo	Start	End	Ampli- consize	Nb hit in Forward	Nb hit in Reverse	State
<b>cupuacu_rep_c295</b>	EST	CENARGEN	Tc00	8666688	8666792	105 bp	1	1	OK
<b>Tg 20</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc00	20599290			1	NA	
<b>Tg 21</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc00	20599312			1	NA	
<b>Tg 60</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc00	55214224	55214383	160	1	1	OK
<b>Tg 80</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc00	25471238			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c692_C</b>	EST	CENARGEN	Tc01	2959034	2959692	659 bp	1	1	OK
<b>Tg 102</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc01	4509926	4510029	104 bp	1	1	OK
<b>Tg 24</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc01	877045	877162	118	1	1	OK
<b>Tg 25</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc01	877140	877243	104	1	1	OK
<b>Tg 96</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc01	5314708			1	NA	
<b>Tg 122</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc01	17971070			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c180</b>	EST	CENARGEN	Tc02	26334484			1	NA	
<b>Tg 22</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc02	6642488			1	NA	
<b>Tg 32</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc02	6554703			1	NA	
<b>Tg 49</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc02	23881231	23881364	134	1	1	OK
<b>Tg 127</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc02	17861027			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c432</b>	EST	CENARGEN	Tc03	19453902	19460025	6124 bp	1	1	
<b>Tg 91</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc03	21985815	21985990	176	1	1	OK
<b>Tg 103</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc03	11485748	11486063	316	1	1	OK
<b>Tg 45</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc04	20433737			1	NA	
<b>cupuacu_c4949</b>	EST	CENARGEN	Tc05	4877515			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c2763</b>	EST	CENARGEN	Tc05	12108098			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c431C</b>	EST	CENARGEN	Tc05	670239	670510	272 bp	1	1	OK
<b>Tg 62</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc05	1912377			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c203_A</b>	EST	CENARGEN	Tc06	14402937	14403153	217 bp	1	1	OK
<b>cupuacu_rep_c203_B</b>	EST	CENARGEN	Tc06	14402937	14403153	217 bp	1	1	OK
<b>cupuacu_rep_c618</b>	EST	CENARGEN	Tc06	6992017	6992199	183 bp	1	1	OK
<b>Tg 48</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc06	15005803	15005967	165 bp	1	1	OK
<b>Tg 36</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc06	14552135	14552269	135	1	1	OK
<b>cupuacu_rep_c1251</b>	EST	CENARGEN	Tc07	1161691			1	NA	
<b>Tg 107</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc07	7770762			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c339</b>	EST	CENARGEN	Tc08	3062207	3062334	128 bp	1	1	OK
<b>Tg 120</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc08	8680156	8680298	143	1	1	OK
<b>Tg 134</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc08	1421686	1421787	102	1	1	OK
<b>Tg 19</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc09	10326010			1	NA	
<b>Tg 78</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc09	1556773			1	NA	
<b>cupuacu_rep_c1773</b>	EST	CENARGEN	Tc10	3348576	3348698	123 bp	1	1	OK
<b>Tg 42</b>	Bibliotecas	CPATU	Tc10	760284	760427	144	1	1	OK
<b>cupuacu_rep_c733</b>	EST	CENARGEN					NA	NA	
<b>Tg 04</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 05</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 09</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 13</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 17</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 30</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 31</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 39</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 43</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 44</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 48</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 62</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 64</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 65</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 70</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	
<b>Tg 71</b>	Bibliotecas	CPATU					NA	NA	

Continuação Tabela 8

Tg 72	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 76	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 77	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 88	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 89	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 90	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 108	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 113	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 114	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 115	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 116	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 117	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 01	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 02	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 03	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 06	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 07	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 08	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 10	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 12	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 14	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 15	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 16	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 18	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 23	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 26	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 27	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 28	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 29	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 33	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 34	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 35	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 37	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 38	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 40	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 41	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 46	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 50	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 51	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 52	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 55	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 56	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 57	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 58	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 59	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 61	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 63	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 66	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 67	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 68	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 69	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 73	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 74	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 75	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 79	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 81	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 82	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 83	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 84	Bibliotecas	CPATU	NA	NA

Continuação Tabela 8

Tg 85	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 86	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 87	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 92	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 93	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 94	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 95	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 97	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 98	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 99	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 100	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 101	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 104	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 105	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 106	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 109	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 110	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 111	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 112	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 118	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 119	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 121	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 123	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 124	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 125	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 126	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 128	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 129	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 130	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 131	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 132	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 133	Bibliotecas	CPATU	NA	NA
Tg 135	Bibliotecas	CPATU	NA	NA

## Conclusões

As análises de transferibilidade de marcadores microssatélites entre *T. cacao* e *T. grandiflorum* mostraram uma baixa taxa de transferibilidade entre os marcadores do cacauzeiro quando amplificados em cupuaçuzeiro e uma alta taxa de transferibilidade dos marcadores de cupuaçuzeiro quando amplificados em cacauzeiro, indicando que a conservação de sequências entre essas duas espécies pode levar a resultados promissores na busca de cultivares que apresentem diversas características de interesse agrônomo. Os marcadores microssatélites oriundos de ESTs tiveram uma taxa de transferibilidade maior que os microssatélites provenientes de regiões genômicas.

Através desse trabalho foi possível obter um Mapeamento genético parcial de *T. grandiflorum*, que servirá como referência para trabalhos futuros envolvendo mapeamento genético da espécie.

## Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos a todas as Instituições e pessoas que fizeram com que esse trabalho fosse concluído com êxito. Em especial a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos a primeira autora; à UESC, CEPLAC, EMBRAPA (de Belém e Brasília) e ao CIRAD.

## Literatura Citada

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012-1022.
- ALLEGRE, M. et al. 2011. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel



- for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. DNA Research. 13p.
- ALVES, R. M. et al. 2017. Phenotypic and genotypic characterization and compatibility among genotypes to select elite clones of cupuassu. *Acta Amazonica* 47(13):175-184.
- ALVES, R. M. et al. 2013. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de Cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.], *Revista Brasileira de Fruticultura* 35(3):818-828.
- ALVES, R. M. et al. 2007. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Tree Genetic Genomic* 3:289-298.
- ARGOUT, X. et al. 2017. The cacao Criollo genome v2.0: an improved version of the genome for genetic and functional genomics studies. *BMC Genomics* 18:730.
- ARGOUT, X. et al. 2010. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics* 4:101-108.
- BEARZOTI, E. 2000. Mapeamento de QTL. In: Pinheiro, J. B.; Carneiro, I. F. ed. *Análise e QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia, GO, FUNAPE. pp.63-224.
- BROWN, S. J. et al. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *Journal American Society Horticulture Science* 130(3):366-372.
- CHASE, M. R.; KESSELI, R.; BAWA, K. S. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83:51-57.
- CRESTE, S.; TULMAN, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(4):299-306.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84:1658-1663.
- FALEIRO, F. G. et al. 2006. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis perniciosa*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 149:227-235.
- FERRAZ DOS SANTOS, L. et al. 2016. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. *Plos One* 11(3):1-19.
- GRAMACHO, K. P. et al. 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis perniciosa*. *Molecular Ecology Notes* 7:153-155.
- GUPTA, P. K.; RUSTGI, S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional and Integrative Genomics* 4:139-162.
- HANCOCK, J. M. 2000. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. ed. *Microsatellites. Evolution and applications*. New York, Oxford University Press. pp.1-9.
- HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, R. A.; MENEZES, A. J. E. A. 2001. Extrativismo e plantio racional de cupuaçuzeiros no sudeste paraense: a transição inevitável. (Compactdisc). In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 39, Recife, PE. Anais. Brasília, DF, SOBER.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION - ICCO. 2014. Annual Report 2011/2012. 70p.
- KUHN, D. N. et al. 2010. Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. *Tree Genetics & Genomes* 6:783-792.
- KULEUNG, C. P. S.; BAENZIGER, I.; DWEIKAT. 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical Applied Genetics* 108:1147-1150.
- LANAUD, C. et al. 1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 91(6-7):987-993.
- LEFEBVRE, V. et al. 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45:839-854.

- LOPES J. R. M.; LUZ, E. M. N.; BEZERRA, J. L. 2001. Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis pernicioso* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 26(3):601-605.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. 2013. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology* 14:53
- PEAKALL, R. et al. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genus and the other legume genera. *Molecular Biology and Evolution* 15:1275-1287.
- PEREIRA, J. L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura de bruxa na principal região produtora de cacauero do Brasil. *Agrotrópica (Brasil)* 1:79-81.
- PUGH, T. et al. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1151-1161.
- RISTERUCCI, A. M. et al. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 10:948-955.
- SCHNELL, R. J. et al. 2007. Development of a marker assisted selection program for cacao. *Phytopathology* 97(12):1664-1669.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2003. Cacao resistance to *Crinipellis pernicioso*: diallelic crosses increase genes for resistance. In: International Congress of Plant Pathology, 8th. Christchurch Addendum to Abstracts of Offered Papers, Christchurch - New Zealand 8th ICPP. p.8.
- SOUSA, L. L. et al. 2018. Transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies de *Psidium*. *Ciência & Tecnologia (Brasil)* 10(2 Número especial.)
- VAN OOIJEN, J. W. 2006. JoinMAP V4.1, software for the calculation of genetic maps in experimental.

