



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES NO MAPEAMENTO GENÉTICO DE CARACTERÍSTICAS
AGRONÔMICAS DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

Natalia da Silva e Lamas

BRASÍLIA DF
Julho de 2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES NO MAPEAMENTO GENÉTICO DE CARACTERÍSTICAS
AGRONÔMICAS DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

Natalia da Silva e Lamas

Orientador: Marcio Elias Ferreira

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
como requisito parcial para a
obtenção de título de Mestre em
Biologia Molecular

BRASÍLIA DF
Julho de 2010

Dissertação de autoria de Natalia da Silva e Lamas, intitulada DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NO MAPEAMENTO GENÉTICO DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*), apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular pela Universidade de Brasília, em 30 de julho de 2010, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Márcio Elias Ferreira
Orientador
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ph.D., José Jaime Vasconcelos Cavalcanti
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Glaucia Salles Cortopassi Buso
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedico este trabalho à minha mãe e
irmã. Vocês são o que eu tenho de
melhor.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de realizar mais um sonho; também por constantemente me sustentar em minhas dificuldades e me permitir passar por situações que moldaram meu caráter durante o tempo de duração do mestrado, e por sempre me cuidar e guiar.

Em segundo lugar agradeço à minha linda família, minha mãe Rita e minha irmã Camila, pelo suporte e amor incondicionais.

À UnB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pelo apoio e pela oportunidade.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, em especial ao Doutor José Jaime Cavalcanti, pelo intercâmbio de informações e materiais.

Agradeço à Doutora Gláucia Buso pela convivência, ensinamentos e cuidados comigo, que ultrapassaram a simples relação profissional e se estenderam para outras áreas de minha vida.

Ao Doutor Marcio Elias, pela presença, pelo auxílio, pelas idéias, e pelo apoio em tudo que me foi necessário, me ajudando tanto no trabalho e análise de dados, na escrita e nas decisões a serem tomadas. Pela tolerância e companheirismo.

A todos os meus companheiros de trabalho no laboratório de Genética Vegetal, que se mostraram e se tornaram amigos aos quais não tenho palavras para agradecer por tanta ajuda, carinho e também suporte. São eles: Bruna Jaqueline, Mariana Lira, Thaísa Lacerda, Dione Mendes, Ediene Gouveia, Rodrigo Furtado, Carolina Sansaloni, César Petroli, Pedro Tanno, Justino, Liamar, Tatiana Rosado, Leonardo Correa, pesquisador Marco Antônio Ferreira, Zilneide Pedrosa, Pesquisadora Marília Pappas, e os doutores (as): Danielle Faria, Vânia Azevedo, Ana Ciampi e Márcio de Carvalho Moretzsohn. Sem dúvida alguma esse trabalho só foi possível pela ajuda de vocês.

Aos meus amigos da Embrapa Larissa Tancreti, Erich Tempel, Fernando Fonseca, Marcelo Reis e Firmino, pela amizade e momentos de descontração durante o trabalho.

A todas as pessoas que cuidaram e muito me apoiaram mesmo fora da Embrapa, como Mariana Caldas, Maria Rosângela Viegas, Whang e Aline.

Aos meus queridos amigos e colegas do grão, pelas orações e companhia: Hadassa Oliveira, Bruna Rayda, Thais Mendes, Amanda Lobato, Lucas Garcia, Luka Lacerda, Alessandro Schneider, Daniel Rosa, Luciana Oliveira, Filipe Guimarães, Thiago Garcia, Marina Oliveira, Raquelma e Rogéria.

Aos meus amigos de graduação Gab, Ka, Rick, Victor, Luluka, Karenzita, Aline, Ararinha e Gui, pela amizade que ultrapassa a barreira do tempo e da distância.

“Confia no Senhor de todo seu coração e não te estribes no seu próprio entendimento. Reconhece-O em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas. Não sejas sábio a teus próprios olhos”

Provérbios 3: 5-7

Resumo

O cultivo do cajueiro é observado em quase todos os estados do Brasil. Contudo, adapta-se melhor ao ambiente do litoral nordestino. Essa cultura tem grande importância para a agroindústria dos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde são colhidos 95% da produção brasileira e onde é feito todo o processamento da castanha.

O agronegócio do cajueiro movimenta cerca de 157 milhões de dólares somente em exportações de amêndoas. Apesar da importância sócio-econômica da cajucultura, esta exploração, no entanto, ainda não é intensa em tecnologia. O uso de técnicas modernas de genética molecular no melhoramento genético do cajueiro pode ser decisivo para a mudança do atual perfil deste importante agronegócio pela possibilidade de aumento da produtividade e qualidade dos seus produtos. Até o presente, são poucas as informações sobre marcadores moleculares, genes e regiões cromossômicas que controlam caracteres de importância econômica no cajueiro. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma bateria de marcadores microssatélites de *Anacardium occidentale* a partir da construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para seqüências repetitivas. Os marcadores desenvolvidos foram utilizados em estudos de vínculo genético entre amostras do banco de germoplasma. Foi desenvolvido um esforço de localização dos novos marcadores microssatélites nos mapas genéticos existentes da espécie. Dos 5.472 clones potencialmente contendo fragmentos repetitivos, 540 foram seqüenciados e analisados para a presença de microssatélites. Uma bateria de 117 seqüências foi selecionada com base na qualidade das seqüências microssatélites que cada clone apresentava, e submetida a desenho de iniciadores de PCR para a realização de testes genéticos. Deste total, cem novos pares de iniciadores foram sintetizados e otimizados para genotipagem através de eletroforese em gel de agarose a 3,5%. Quatorze novos marcadores microssatélites foram selecionados ao acaso e analisados em seqüenciador 377 ABI com base na genotipagem de 36 acessos do Banco de Germoplasma de Cajueiro. Esta análise permitiu a estimativa de parâmetros genéticos como Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Poder de Exclusão (PE) de cada um dos

quatorze marcadores microssatélites. O experimento permitiu detectar grande variabilidade de performance analítica entre os marcadores testados. O marcador AOB 48, por exemplo, demonstrou ser o marcador com o maior Conteúdo de Informação Polimórfica, Heterozigosidade observada e Poder de Exclusão entre os marcadores testados. A análise de acessos do Banco de Germoplasma com os quatorze novos marcadores microssatélites indicou que os acessos de cajueiro comum e de cajueiro anão precoce formam grupos distintos com base nos valores de coeficiente de similaridade estimados em comparações par-a-par entre os 36 acessos de cajueiro estudados. Um acesso de *A. microcarpum*, utilizado como controle externo (*outgroup*), foi agrupado com acessos de cajueiro comum, chamando a atenção para a necessidade de aprofundamento no estudo das relações filogenéticas entre *A. occidentale* e *A. microcarpum*. Uma população F1 derivada do cruzamento entre cajueiro anão precoce (CCP1001) e cajueiro comum (CP 96) foi utilizada para mapear os novos marcadores microssatélites no genoma de cajueiro. Entre os cem novos marcadores desenvolvidos neste trabalho, 11 apresentaram segregação de alelos do genitor feminino (CCP 1001) na população F1, enquanto que 21 apresentaram segregação de alelos do genitor masculino (CP 96). Somente três dos 100 marcadores testados apresentaram segregação de alelos dos dois genitores na população F1, totalizando 29 marcadores passíveis de mapeamento nesta população. No total, 11 marcadores SSR desenvolvidos no atual trabalho foram incorporados aos mapas dos genitores masculino e feminino, sendo apenas um marcador comum aos dois genitores. O mapa genético do genitor masculino (acesso CP 96) apresentou o total de 106 marcadores distribuídos em 1.133,6 cM, e o mapa do genitor feminino (CCP 1001) apresentou um total de 99 marcadores distribuídos em 1.065,9 cM. Os novos marcadores estão sendo empregados na análise genética e no melhoramento do cajueiro. Neste trabalho, foram mapeados QTLs (Quantitative Trati Loci) de três características de importância econômica de cajueiro: resistência a mofo-preto (causado pelo fungo *Pilgeriella anacardii*), altura da planta e diâmetro da copa. No mapa do genitor feminino, foram detectados três QTLs para a altura da planta, um para a característica diâmetro da copa e um para resistência a mofo-preto. Já no mapa do genitor masculino, foram detectados três QTLs para a característica resistência a mofo-preto, dois para a

característica altura da planta e dois para o diâmetro da copa. Os novos marcadores microssatélites de cajueiro enriquecem o conjunto de ferramentas genômicas que está sendo construído para apoiar e tornar mais eficiente o melhoramento genético da espécie.

Abstract

The cashew tree is cultivated in almost all states of Brazil. However, it is better adapted to the environmental conditions of the Brazilian NorthEastern Coast. This crop is particularly important for the agricultural sector of the states of Ceará, Piauí and Rio Grande do Norte. These three states are together responsible for 95% of the Brazilian cashew production and virtually all cashew nut processing. The cashew agribusiness responds for approximately 157 million dollars per year only on cashew nut exports. Although cashew business is socially and economically important, cashew production is not intensive in technology use. The application of modern molecular genetics techniques in cashew breeding can be decisive to promote a change in the current production standards of this important agribusiness due to the possibility of increasing yields and promoting increments in fruit and nut quality. There is very limited information about cashew molecular markers, genes and genomic regions associated with economically important traits. The objectives of the present work were to develop and characterize a group of microsatellite markers for *Anacardium occidentale* based on the construction of repetitive DNA enriched genomic libraries. The molecular markers which were obtained were used to study the genetic relationships between cashew accessions of the Germplasm Bank. An attempt was also made to locate the new molecular markers on the genetic maps already developed for the species. A library of 5,472 DNA clones potentially rich on repetitive sequences was developed and used to select 540 clones for DNA sequencing. The sequences obtained were checked out for the presence of microsatellite sites. A total of 117 sequences were then selected based on quality criteria and submitted to primer designing for PCR validation. Validation of a set of one hundred new microsatellite markers was then conducted on 3.5% agarose gel electrophoresis. A subgroup of 14 new microsatellite markers was selected and used to genotype a collection of 36 cashew tree samples on a 377 ABI DNA sequencer. The data obtained allowed to estimate genetic parameters such as observed Heterozygosity (H_o), expected Heterozygosity (H_e), Polymorphism Information Content (PIC) and Power of Exclusion (PE) of each of the 14 microsatellite markers. A great diversity of analytical performance was observed among the tested markers. Marker AOBR

48, for example, presented the highest PIC, Ho and Power of Exclusion among the tested markers. The analysis of 36 accessions of cashew with the 14 new microsatellite markers indicated that the accessions of dwarfs and common types of cashew are clustered in distinct groups according to similarity coefficient values. An accession of *A. microcarpum* used as outgroup clustered with accessions of common cashew. This points out to the necessity of developing filogenetic studies between *A. occidentale* and *A. microcarpum*. An F1 population obtained upon crossing a dwarf tree (CCP1001) with a common type cashew tree (CP 96) was used to map the new developed markers. Among the 100 new microsatellite markers, 11 showed segregation for the female parent (CCP 1001) in the F1 population, and 21 for the male parent (CP 96). Only three of the 100 markers showed segregation for the two parents in the F1 population. Eleven SSR markers developed in the current work have been located in the male and female linkage maps, but only one marker is common to both maps. The male parent genetic map (CP 96) includes 106 molecular markers covering 1,112.6 cM, while the female parent map (CCP 1001) includes 99 molecular markers covering 1,065.9 cM. The new markers are being used in cashew genetic analysis and breeding. In this work, a QTL analysis was performed for three traits of economic importance for cashew production: resistance to black mold, caused by the fungus *Pilgeriella anacardii*, plant height and canopy diameter. Three QTLs for plant height, as well as QTLs for canopy diameter and black mold have been located on the female parent map. Two QTLs for canopy diameter, two QTLs for plant height and three QTLs for resistance to black mold have been mapped on the male parent linkage map. The new cashew microsatellite markers enrich the group of genomic tools currently being developed to support and increase the efficiency of cashew breeding.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Pseudofrutos de coloração amarela (esquerda) e vermelha (direita) e castanha (fruto verdadeiro) de coloração acinzentada na parte inferior de cada pseudofruto. 19
- Figura 2.** (a) Cajueiro do tipo anão precoce; (b) cajueiro tipo comum. Fotos: CAVALCANTI, 2009. 21
- Figura 3.** Esquema de enriquecimento da biblioteca de DNA com fragmentos contendo regiões repetitivas TC, para a recuperação de clones contendo microssatélites com sequência repetitiva AG..... 35
- Figura 4.** Mapa do vetor pGEM® – T Easy. A inserção do fragmento inativa o gene lacZ, dando origem a colônias brancas que são incapazes de metabolizar o X-gal. 37
- Figura 5.** Teste de digestão utilizando as enzimas Mse I, Sau 3AI e Tsp509. 46
- Figura 6.** a) Digestão de 50 µg do DNA com a enzima Mse I. b) Extração de seção do gel contendo fragmentos de 200 – 800 pares de base..... 47
- Figura 7.** Resultado da purificação da PCR confirmando a presença de fragmento potencialmente contendo uma sequência microssatélite 48
- Figura 8.** Distribuição percentual dos clones sequenciados contendo sequências repetitivas com menos de seis repetições do motivo, sequências repetitivas com mais de seis repetições do motivo, sequências redundantes e ausência de sequências repetitivas. 49
- Figura 9.** Marcadores AOBR 62, AOBR 63 e AOBR 64 mostrando fragmentos de amplificação em 5 acessos diferentes de cajueiro. 50
- Figura 10.** Eletroferogramas de 14 marcadores microssatélites de cajueiro apresentando os genótipos de três acessos (CCP1001, CP96 e CP77), selecionados para a obtenção de parâmetros genéticos. 60
- Figura 11.** Distribuição de frequência alélica dos 14 marcadores selecionados para estimativa de parâmetros genéticos. 63
- Figura 12.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA, baseado em distâncias genéticas entre cada par de acessos calculado pelo coeficiente BAND, entre 36 acessos de cajueiro (*A. occidentale*) e um acesso de *A. microcarpum*, representado por *A. microcarpum* na imagem. 71
- Figura 13.** Marcador microssatélite AOBR 78 apresentando segregação de alelos de ambos os genitores (CCP 1001 e CP 96) na população F1 em gel de eletroforese vertical em poli-acrilamida a 5% de concentração em condições desnaturantes e corados com nitrato de prata..... 73
- Figura 14.** Mapa genético do genitor masculino (CP 1001), desenvolvido com base em população F1 derivada do cruzamento entre o cajueiro anão precoce

(CP 1001) e o cajueiro comum (CP 96). Cada grupo de ligação é representado por uma barra, com os marcadores identificados à direita e a ordem e as distâncias de recombinação (cM) à esquerda. Os grupos de ligação são identificados de acordo com mapa anterior desenvolvido por Cavalcanti & Wilkinson (2007). Os locos em vermelho representam os marcadores microsatélites desenvolvidos neste trabalho, os sublinhados representam marcadores que tiveram suas posições modificadas em relação ao mapa anterior, e em negrito estão os marcadores comuns aos mapas dos genitores masculino e feminino.77

Figura 15. QTLs identificados para diâmetro da copa, nos grupos de ligação M1 e M22 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.....82

Figura 16. QTL identificado para a característica altura da planta, no grupo de ligação M3 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 17. QTL identificado para a característica Resistência a mofo preto, nos grupos de ligação M1, M6 e M14 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.....84

Figura 18. Mapa genético feminino do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) a partir do cruzamento entre o cajueiro anão precoce (CP 1001) e o cajueiro gigante (CP 96). Os marcadores se encontram à direita e a ordem e as distancias relativas (cM) à esquerda. Marcadores sublinhados representam alteração na ordem em relação a Cavalcanti et. al, 2007. Em negrito estão os marcadores em comum aos dois mapas.....86

Figura 19. QTLs identificados para Altura da Planta, nos grupos de ligação F1a, F2 e F6 respectivamente por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.89

Figura 20. QTLs identificados para mofo preto e diâmetro da copa, respectivamente, nos grupos de ligação F7a e F3a, por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.....91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais características dos cajueiros dos tipos comum e anão precoce.....	22
Tabela 2. Iniciadores (“primers”), sequências, motivo, tipo de microsatélite e temperaturas de anelamento (°C).	51
Tabela 3. Número de indivíduos analisados (N), de alelos, heterozigosidade esperada e observada, e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e poder de exclusão encontrados nos 14 locos microsatélites selecionados em 36 acessos de <i>Anacardium occidentale</i> L.....	66
Tabela 4. Número de alelos por loco, Heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e PIC conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 14 locos microsatélites analisados em 8 acessos de cajueiro comum.	67
Tabela 5. Número de alelos por loco, Heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e PIC conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 14 locos microsatélites analisados em 29 acessos de cajueiro anão precoce.	67
Tabela 6. Número de alelos por loco, Heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e PIC conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 14 locos microsatélites analisados em 8 acessos sorteados de cajueiro anão precoce.	68
Tabela 7. Nome do marcador microsatélite, genitor cujos alelos segregam na população F1, evidência de distorção de segregação mendeliana significativa (valor chi-quadrado) e presença ou ausência no mapa saturado.	73
Tabela 8- Tabela 8. Marcadores associados às características Altura da Planta (AP), diâmetro da copa (DC) e resistência a mofo preto (MP) por análise de marca simples no mapa do genitor do tipo comum.	81
Tabela 9. Marcadores associados à característica Altura da Planta por análise de marca simples.	88
Tabela 10. Marcadores associados à característica Altura da Planta por análise de marca simples.	90

Sumário

1. Revisão bibliográfica	18
1.1. Origem e distribuição do cajueiro.....	18
1.2. Aspectos morfológicos	18
1.3. Pragas e doenças.....	20
1.4. Variabilidade genética.....	20
1.5. Importância econômica do cajueiro.....	22
1.6. Melhoramento genético do Cajueiro.....	24
1.7. Marcadores Genéticos	25
1.8. Marcadores Microssatélites.....	26
1.9. Mapeamento genético.....	28
2. Justificativa.....	31
3. Objetivo.....	32
4. Material e Métodos.....	33
4.1 Desenvolvimento de marcadores microssatélites.....	33
4.1.1 Material Vegetal e Extração de DNA genômico:.....	33
4.1.2 Seleção da enzima de restrição para digestão do DNA:.....	33
4.1.3 Corte do gel e recuperação dos fragmentos:.....	33
4.1.4 Enriquecimento da biblioteca genômica:	34
4.1.5 Amplificação dos fragmentos enriquecidos:.....	36
4.1.6 Ligação do DNA em vetor de clonagem plasmidial, transformação e repicagem das colônias:	36
4.1.7 Sequenciamento:	38
4.1.8 Desenho de iniciadores (<i>primers</i>) para amplificação de marcadores microssatélites via pcr.....	40
4.1.9 Otimização de iniciadores para amplificação de marcadores microssatélites:	40
4.2 Caracterização dos NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE CAJUEIRO	41
4.3 Mapeamento genético.....	43
4.4 MAPEAMENTO DE QTLs DE CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	45
5. Resultados e Discussão	46
5.1 Desenvolvimento de marcadores MICROSSATÉLITES:.....	46
5.2 Caracterização de novos marcadores microssatélites de cajueiro	59
5.3. Análise de vínculo genético entre amostras do Banco de Germoplasma de Cajueiro.	69

5.4 Construção de mapa genético incluindo novos marcadores microssatélites de cajueiro.....	72
5.4.1 Mapa genético do genitor masculino (tipo comum CP 96):	75
5.4.2 MAPEAMENTO DE QTLS NO GENOMA DO GENITOR MASCULINO (TIPO COMUM- CP 96)	80
5.4.3 MAPA GENÉTICO DO GENITOR FEMININO (TIPO ANÃO PRECOCE CCP 1001).....	84
5.4.4 MAPEAMENTO DE QTLS NO GENOMA DO GENITOR FEMININO (TIPO ANÃO PRECOCE- CCP 1001):	88
5 Conclusão:.....	93
6 Perspectivas:.....	94
8. Referências bibliográficas.....	95
APÊNDICE A	107
APÊNDICE B	118
APÊNDICE C	140
APÊNDICE D	142

1. Revisão bibliográfica

1.1. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DO CAJUEIRO.

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma angiosperma, dicotiledônea, pertencente à família *Anacardiaceae*. A família compreende cerca de 60 gêneros e mais de 400 espécies (Araújo & Silva, 1995; Ferrão, 1995), sendo o cajueiro a primeira espécie do gênero *Anacardium* a ser classificada (Martinez & Barrera, 1992).

Não se tem certeza da origem exata do cajueiro, porém, acredita-se que a planta tenha seu habitat natural na América tropical, mais precisamente na América do Sul e Central (Ferrão, 1995). Existem indícios de que sua origem possa ser o Nordeste Brasileiro, sendo a primeira descrição da planta feita pelo monge e naturalista francês André Thevet em 1558. Não existem relatos sobre o cajueiro em outro local do mundo em época anterior ao descobrimento do Brasil (Moreira, 2002).

O cajueiro encontra-se disperso em larga faixa do mundo tropical, compreendida entre os paralelos 27° N, no sul da Flórida, e 28° S, na África do Sul (Frota e Parente, 1995). No Brasil, a distribuição natural desta espécie, no entanto, pode ser confundida pela dispersão por cultivo uma vez que, enquanto o principal centro de diversidade do gênero é a região amazônica, com um centro secundário de diversidade nos cerrados, o cajueiro pode ser encontrado em diversos ecossistemas do Norte e Nordeste do Brasil (Duque, 1960; Barros, 1991 *apud* BARROS et al, 1999). Populações de cajueiro são encontradas nas zonas costeiras do Nordeste, como parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga, onde se observa grande variabilidade para os principais caracteres de interesse agroindustrial, como produtividade, peso do fruto, peso da amêndoa e peso do pseudofruto (Barros, 1991; Lima, 1986).

1.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O cajueiro é uma planta perene, de ramificação baixa e porte médio, cuja copa atinge, no tipo comum, altura média de 5 a 8 metros e diâmetro médio entre 12 a 14 metros. Em alguns casos a planta pode atingir cerca de 15 metros

de altura e diâmetro maior que 20 metros, dependendo do genótipo e das condições de clima, solo e sanidade (Araújo & Silva, 1995).

O caule do cajueiro é normalmente tortuoso, grosso e ramificado logo a partir do nível do terreno. Os ramos são também tortuosos, compridos, e muito ramificados (Ferrão, 1995). O sistema radicular constitui-se de uma raiz pivotante bem desenvolvida, normalmente bifurcada, e de uma malha lateral subsuperficial (Araújo & Silva, 1995). As folhas são persistentes, simples, inteiras, alternas, de aspecto subcoriáceo, glabras e curto-pecioladas, penínérveas com nervuras secundárias salientes na página inferior (Ferrão, 1995).

Em condições normais, o cajueiro inicia a floração a partir do terceiro ano após a sementeira, se esta for feita em local definitivo. O número de flores aumenta progressivamente à medida que o cajueiro cresce e a copa se desenvolve, até atingir a plenitude de floração aos 15 anos. Há variedades mais precoces que outras. A floração se dá geralmente no fim da época chuvosa, porém, varia muito de acordo com o clima local e genótipo (Ferrão, 1995).

O fruto (Figura 1) é um aquênio, conhecido popularmente como castanha ou careta. De início, tem coloração esverdeada, tornando-se avermelhada e por último apresenta-se acinzentado. A superfície é cerosa, brilhante e resistente, ornamentada de inúmeras pontuações escuras. O pseudofruto (Figura 1) tem alto teor de água e é normalmente rico em vitamina C e em açúcares, quando maduro. O pseudofruto apresenta uma epiderme muito fina e brilhante, de coloração variável do amarelo ao vermelho, podendo ter pontuações (Ferrão, 1995).



Figura 1. Pseudofrutos de coloração amarela (esquerda) e vermelha (direita) e castanha (fruto verdadeiro) de coloração acinzentada na parte inferior de cada pseudofruto.

1.3. PRAGAS E DOENÇAS

Em razão dos prejuízos que causam à cultura e da freqüência com que são constatadas em campo, as pragas mais importantes do cajueiro são: broca-das-pontas (*Anthistarcha binoculares*), pulgão (*Aphis gossypii*), traça-da-castanha (*Anacampsis sp.*), tripes-da-cinta-vermelha (*Selenotrips robrocinctus*), mosca-branca (*Aleurodicud cocois*) e as coleobrocas dos gêneros *Marshallius* e *Apate* (Paiva & Barros, 2004).

Com relação às doenças foliares, entre as mais importantes da cultura no Brasil, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e o mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*), no momento, respondendo por severas perdas na quantidade e qualidade de frutos produzidos. O uso de clones resistentes representa uma forma de manejo econômico, ecológico e seguro do cajueiro, impedindo a invasão de pragas e doenças, além de proporcionar uma melhor utilização da variabilidade genética da espécie, existente tanto na natureza como aquela exteriorizada nas progênies, oriundas de cruzamento entre plantas de tipos distintos no programa de melhoramento genético (Paiva & Barros, 2004).

1.4. VARIABILIDADE GENÉTICA

No processo de obtenção e seleção de cultivares é despendido um grande esforço físico e financeiro, em razão da grande variabilidade genética apresentada pelos acessos contemplados nos programas de melhoramento (Paiva & Barros, 2004). A variabilidade genética observada na cultura do cajueiro no Brasil tem sido agrupada em dois tipos bem definidos em relação ao porte, denominados de cajueiro tipo anão precoce (Figura 2a) e cajueiro tipo comum (Figura 2b).



Figura 2. (a) Cajueiro do tipo anão precoce; (b) cajueiro tipo comum. Fotos: CAVALCANTI, 2009.

O cajueiro tipo comum, o mais difundido no Brasil, tanto naturalmente como por cultivo, caracteriza-se pelo porte mais alto, com altura variando de 8m a 15m e envergadura de copa atingindo até 20m. A copa apresenta grande variação de formato e distribuição de ramos (Barros, 1988, *apud* Crisóstomo *et al.*, 1999).

A capacidade produtiva individual do cajueiro comum é muito variável, com dados relatando plantas que produzem apenas uns poucos frutos até aquelas com produções em torno de 100 kg de castanha por safra, não obstante existam informações, não oficialmente registradas, de plantas em áreas comerciais com produção de 400 kg de castanhas por safra.

O cajueiro tipo anão precoce, também conhecido por cajueiro de seis meses, caracteriza-se pelo porte baixo, com altura de planta em torno de 3 a 4m, copa compacta e homogênea, e envergadura de copa média em torno de 7 a 9m. O cajueiro anão precoce inicia o florescimento entre 6 e 18 meses. O peso do fruto nas populações naturais varia de 3-10g e do pseudofruto de 20-160g, sendo estas características com menor variabilidade em relação ao tipo comum. A capacidade produtiva individual também é menor, até o momento com a máxima produção registrada de 43kg de castanhas por planta (Barros, 1988, *apud* Crisóstomo *et al.*, 1999).

O ciclo de florescimento do cajueiro anão precoce depende do tipo da planta e das condições ambientais. O florescimento comumente ocorre já no primeiro ano de vida, o que é uma vantagem excepcional em relação ao tipo comum, que normalmente floresce no terceiro ano. Os clones melhorados de cajueiro anão precoce, quando em cultivo irrigado, iniciam a sua produção no

primeiro ano, o que já permite a colheita quando a produção se destina ao mercado de frutas de mesa (Paiva et al., 2003). O cajueiro anão precoce caracteriza-se pelo ciclo produtivo mais alongado, antecipando o florescimento de um a dois meses e prolongando em mais um mês em relação ao tipo comum (Barros et al., 1984 apud Paiva et al., 2003). Quando cultivados sob irrigação no semi-árido, alguns dos clones comerciais disponíveis produzem praticamente o ano todo.

O cajueiro anão-precoce vem substituindo o cajueiro comum por proporcionar maior produtividade, facilitar a colheita e a condução dos pomares em razão do seu baixo porte. Além disso, o cajueiro anão-precoce apresenta maior uniformidade da castanha, do pedúnculo e da produção, permitindo uma exploração comercial mais rentável (Barros & Crisóstomo, 1995; Oliveira et al., 2002; Rosseti & Aquino, 2002).

As principais diferenças entre os dois tipos principais de cajueiro estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais características dos cajueiros dos tipos comum e anão precoce.

Características	Comum	Anão Precoce
Porte (m)	Alto (8-15)	Baixo (< 5)
Tamanho da copa (m)	> 7	5 a 7
Primeira Florada	2 a 5 anos	6 a 18 meses
Variação do peso da castanha (g)	3 a 33	3 a 13
Variação do peso do pedúnculo (g)	20 a 500	20 a 160
Produção: castanha/planta/safra (kg)	<1 a > 100	até 43

Fonte: (Cavalcanti et al, 2009).

1.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAJUEIRO.

A Região Nordeste, com uma área plantada superior a 650 mil hectares, responde por mais de 95% da produção nacional, sendo os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia os principais produtores. No Brasil, a produção de amêndoa de castanha de caju destina-se, tradicionalmente, ao mercado externo, gerando, em média, divisas da ordem de 157 milhões de

dólares anuais. Os Estados Unidos e o Canadá são os principais mercados consumidores da amêndoa brasileira, sendo responsáveis por cerca de 85% das importações. O agronegócio do caju no mundo movimenta cerca de 2,4 bilhões de dólares por ano (Montenegro *et al.*, 2003).

A importância social do caju no Brasil traduz-se pelo número de empregos diretos que gera, empregando 35 mil pessoas no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos. Para o Semi-Árido nordestino, a importância é ainda maior, pois os empregos do campo são gerados na entressafra das culturas tradicionais como milho, feijão e algodão, reduzindo, assim, o êxodo rural (Montenegro *et al.*, 2003).

Segundo Barros *et al.* (2002), após o processamento, estima-se que 90% das amêndoas de castanha de caju (ACC) produzidas no Brasil são exportadas. Essas exportações constituem a base de sustentação econômica do agronegócio do caju brasileiro.

O pedúnculo ou pseudofruto, cujo aproveitamento, até meados dos anos 90 não ultrapassava 5% da produção, vem adquirindo cada vez mais importância na agroindústria do caju. Verifica-se um crescente aumento das vendas, expandindo os mercados com a oferta de 30 subprodutos, dos quais destacam-se doces, o suco concentrado e outras bebidas como refrigerantes gaseificados e cajuína (suco puro e clarificado bastante consumido no estado do Ceará). O consumo do caju de mesa (caju *in natura*) no mercado interno vem crescendo significativamente, principalmente, na região Sudeste, com preços atrativos para o produtor (R\$ 1,50 por quilo), estimulando novos investimentos na expansão e modernização dos pomares e na adoção de boas práticas agrícolas (Oliveira & Andrade, 2005).

O aumento da lucratividade do cajueiro através da maximização do aproveitamento do pedúnculo, notadamente no mercado de frutas, constitui o principal desafio do melhoramento genético, que tem a responsabilidade de gerar clones que propiciem, além de amêndoas que atendam às especificidades da indústria e dos consumidores, pedúnculos que satisfaçam os mais diferentes paladares, de forma a conquistar os mercados das regiões mais desenvolvidas e economicamente mais prósperas do país (Barros *et al.*, 2002).

1.6. MELHORAMENTO GENÉTICO DO CAJUEIRO

Em virtude das baixas produtividades registradas atualmente na cajucultura brasileira, os programas de melhoramento genético têm direcionado a seleção, prioritariamente, para a obtenção de plantas que possibilitem resultados superiores a 1,5 t de castanha/ha, em regime de sequeiro (Barros et al., 1999). No caso de clones para cultivo sob irrigação, deve-se dar ênfase a genótipos que possibilitem produtividades superiores a 3,8 t/ha (Oliveira, 2000).

Além da produção de castanha, em cultivos de sequeiro e irrigado, os programas de melhoramento genético consideram ainda: o porte baixo da planta que facilita a colheita manual; pedúnculo com características de coloração, sabor, textura, maior período de conservação, consistência da polpa e teor de tanino adequados às preferências do consumidor; castanhas com amêndoas de peso superior a 2,54 g; facilidade de destaque do pedúnculo; rendimento industrial da amêndoa acima de 28%; facilidade na despeliculagem; coloração dentro dos padrões internacionais; e amêndoas resistentes à formação de bandas. A variabilidade genética observada no germoplasma disponível permite inferir que os objetivos do melhoramento podem ser perfeitamente atingidos, uma vez que já foram obtidos resultados promissores em termos de produtividade e qualidade da castanha e do pedúnculo (Paiva et al., 1998; Moura et al., 1998; Barros et al., 2000).

O uso de clones resistentes a pragas e doenças representa uma forma de manejo econômico e ecológico, seguro, proporcionando uma melhor utilização da variabilidade genética da espécie, tanto a existente na natureza quanto a oriunda de cruzamentos entre plantas de tipos diferentes no programa de melhoramento.

A eficiência do método de melhoramento depende do mecanismo genético envolvido na herança da característica a ser melhorada, como o número de genes que a influenciam, efeitos e ações dos genes, herdabilidade, repetibilidade e associações com outras características. Neste sentido, uma eficiente estimativa dos parâmetros genéticos constitui base fundamental para o sucesso de qualquer programa de melhoramento (Resende, 2002). Dessa forma, são necessárias mais informações sobre o controle genético de

características economicamente importantes nesta espécie para maximizar a eficiência dos programas de melhoramento da espécie.

1.7. MARCADORES GENÉTICOS

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Os primeiros marcadores utilizados foram aqueles que controlam a morfologia da planta. Genes que controlam a coloração, forma e resistência a patógenos, dentre outros, são facilmente monitorados e têm sido localizados em diferentes cromossomos de várias espécies. Estes marcadores, contudo, existem em número limitado e o processo de avaliação pode ser demorado, pois eles podem depender do desenvolvimento da planta e sua expressão gênica pode estar sujeita às variações do ambiente (Borém & Miranda, 2005).

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O advento das técnicas de marcadores moleculares, em meados da década de 80, resultou em um aumento significativo da importância dos mapas genéticos no auxílio à seleção em programas de melhoramento, pois estes marcadores permitem a seleção de indivíduos superiores com base no genótipo, que independe do ambiente e não muda durante o ciclo de vida de um indivíduo (Millach, 1998).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética de plantas para a identificação de variedades e testes de identidade genética, para verificar a paternidade de híbridos, para estimar diversidade genética do germoplasma, avaliar a estrutura genética de populações, ou para identificar regiões genômicas associadas à características de interesse econômico. Os diferentes tipos de marcadores moleculares (RFLP, microssatélites, RAPD, AFLP, SNP, etc.) diferem quanto à abundância e distribuição no genoma, nível de polimorfismo detectado, conteúdo de informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade de ensaios laboratoriais, requerimentos técnicos e investimento financeiro (Buso *et al.*, 2003). Entre os marcadores moleculares mais utilizados em análise genética destacam-se os microssatélites.

1.8. MARCADORES MICROSSATÉLITES

Microsatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são sequências de nucleotídeos repetidas lado a lado, cuja unidade de repetição varia de um a seis pares de base (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). Essas sequências hipervariáveis são encontradas abundantemente em uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procaríotos e mesmo no genoma cloroplastidial de plantas (Hearne et al., 1992; Queller et al., 1993; Jarne & Lagoda, 1996).

A expansão do microsatélite, em geral, segue o modelo de mutação aos passos, com o aumento ou diminuição de bases, decorrentes de erros no processo de replicação do DNA, que resultam do deslizamento da DNA polimerase (DNA *slippage*) (Levison & Gutman, 1987; Schlotterer & Tautz, 1992). Este deslizamento é considerado como o principal mecanismo para que sejam gerados variantes em tamanho nos locos microsatélites (Kruglyak et al., 1998; Chambers & Macavoy, 2000).

Os alelos de um loco microsatélite diferem de tamanho em função do número de repetições das sequências básicas (Queller et al., 1993). Microsatélites com menor número de bases na sequência motivo (ex. dinucleotídeo AG) tendem a ser mais polimórficos que microsatélites com motivos compostos por um maior número de bases (ex. pentanucleotídeo ACTAG) (Weber, 1990; Goldstein & Clark, 1995; Petit et al., 2005), porém esta não é uma regra absoluta (Valdes et al., 1993).

Os microsatélites podem ser classificados em três famílias:

1. Perfeitos (ex.: GA_n);
2. Imperfeitos (ex.: $CA_n(TT)CA_n$);
3. Compostos (ex.: CA_nGA_n).

Qualquer tipo de combinação entre estas famílias é possível (Weber, 1990). Já em relação ao motivo, ele pode ser classificado em:

1. Dinucleotídeos (ex: (GA)_n)
2. Trinucleotídeos (ex: (TCA)_n)
3. Tetranucleotídeos (ex: (AGCT)_n)
4. Pentanucleotídeos (ex: (GTAAC)_n)
5. Hexanucleotídeos (ex: (GTCAAG)_n)

Os dinucleotídeos CA e GA têm uma frequência maior em genomas de animais, já TC e AG são mais encontrados em plantas (Depeiges et al., 1995; Jarne & Lagoda, 1996).

A amplificação de locos SSR é feita por PCR e os alelos de um loco são identificados por meio da migração relativa em gel de poliacrilamida ou eletroforese capilar. Os microssatélites, em geral, caracterizam-se por serem co-dominantes, multialélicos, seletivamente neutros, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma (Queller et al., 1993; Valdes et al., 1993; Jarne & Lagoda, 1996). A quantidade de DNA das amostras a serem analisadas com marcadores microssatélites é, em geral, muito pequena.

Microssatélites são usados extensamente para “fingerprinting” de DNA e estudos forenses (Hummel & Schultes, 2000), testes de paternidade e maternidade, estudos de genética de população (Slatkin, 1995; Dakin & Avise, 2004), caracterização e conservação de recursos genéticos (Hoshino et al., 2002) e construção de mapas genéticos (Chen, X. et al., 1997; Brondani, R. P. V. et al., 2002).

O polimorfismo revelado por microssatélites é suficientemente estável para ser usado em análises genéticas. O grande número de locos microssatélites e sua variabilidade elevada fazem deles ferramentas importantes para a construção de mapas genéticos de alta resolução (Hearne et al., 1992).

Das classes de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de mapeamento genético de locos de caracteres quantitativos (QTLs), caracterização e exploração da variabilidade genética em bancos de germoplasma. No entanto, marcadores microssatélites estão disponíveis para um número limitado de espécies de plantas. Portanto, a análise genética baseada em marcadores microssatélites via de regra requer o desenvolvimento desses marcadores para

emprego em uma determinada espécie. O desenvolvimento de microssatélites requer grande quantidade de trabalho no laboratório, exigindo algum conhecimento prévio do genoma da espécie sob estudo, técnicos especializados com domínio de técnicas de biologia molecular e de genética molecular, equipamentos sofisticados para sequenciamento automático e alocação de recursos financeiros (Ferreira & Grattapaglia, 1998). No gênero *Anacardium*, por exemplo, há apenas 21 marcadores microssatélites desenvolvidos até o momento (Croxford et al., 2006), não havendo relato na literatura sobre o desenvolvimento marcadores microssatélites que possibilitem a cobertura total do genoma de cajueiro, e, conseqüentemente, o seu emprego na identificação de regiões genômicas associadas ao controle de características de interesse econômico da cultura.

Cavalcanti & Wilkinson (2007) utilizaram marcadores moleculares AFLP e microssatélites na construção de mapas de ligação do cajueiro. O mapa final incluiu apenas 11 marcadores microssatélites. Esses autores elaboraram os dois primeiros mapas genéticos do cajueiro, um para o cajueiro comum e outro para o cajueiro anão precoce, e identificaram três QTLs: um para resistência ao mofo-preto, um para altura da planta e um terceiro para diâmetro da copa (Cavalcanti & Wilkinson, 2007)

Há necessidade, pois, de desenvolver um número maior de marcadores microssatélites para o cajueiro, visando a saturação do mapa genético e os seu eventual emprego nos programas de melhoramento.

1.9. MAPEAMENTO GENÉTICO

Bateson & Saunders (1902) e Morgan et al. (1915) observaram distorções da segunda lei de Mendel em cruzamentos de ervilha de cheiro (*Lathyrus odoratus*) e mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), respectivamente. Morgan e colaboradores sugeriram a presença de alguns genes agrupados em um mesmo cromossomo, e que durante a meiose, ocorreria ocasionalmente trocas de segmentos (*crossing-overs* ou permutações) entre os cromossomos homólogos. Perceberam também que a proporção da progênie recombinante variava bastante, e propuseram que estas variações, de algum modo, refletiam a distância entre os genes no cromossomo (Bateson & Saunders, 1902; Morgan et al., 1915). Sturtevant, em 1913, demonstrou a utilização das frequências de

recombinantes como indicador quantitativo da distância linear entre dois genes na construção de mapas genéticos (Sturtevant, 1913). Assim, o conceito de localização dos genes em uma ordem linear passou a ser incorporado à teoria cromossômica da herança (Bridges, 1914; Bridges, 1916; Morgan, 1919).

A partir da década de 80, com o advento das técnicas de marcadores moleculares, a construção de mapas genéticos saturados tornou-se possível, assim como a identificação, localização, e estimativa da magnitude do efeito de genes envolvidos no controle de características qualitativas ou quantitativas (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Tanksley et al., 1989). Mapas de ligação vêm sendo desenvolvidos e saturados com marcadores microssatélites em diferentes espécies de plantas, como soja, aveia, milho, trigo, eucalipto, maçã, feijão e arroz (Grattapaglia & Ferreira, 2006).

A existência de desequilíbrio de ligação, que é definido como desvios das frequências alélicas observadas em relação às esperadas sob a hipótese de independência entre duas características (ou marcadores), é a premissa básica para a construção de mapas genéticos (Coelho & Silva, 2002). Fatores como deriva genética, migração e seleção podem causar desequilíbrio de ligação, portanto, para a construção de mapas genéticos faz-se necessário o desenvolvimento de populações de mapeamento, onde o desequilíbrio de ligação é causado, basicamente, pela ligação física entre os locos. É necessário que os genitores da população sejam contrastantes para a característica que se pretende estudar, e que apresentem uma distância genética mínima para que possam ser identificados marcadores polimórficos para a construção do mapa.

Os tipos de populações mais utilizadas para a construção de mapas são linhagens puras recombinantes (*RILs – Recombinant Inbred Lines*), populações obtidas por retrocruzamento, populações F_2 , linhagens de duplo-haplóides ou populações F_1 geradas a partir de cruzamento entre parentais heterozigotos (Jones et al., 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Carneiro & Vieira, 2002; Collard et al., 2005). A escolha do tipo de população está relacionada com a espécie em estudo, além do tipo de marcador utilizado na construção do mapa (Tanksley et al., 1988). Cada uma destas populações possui vantagens e desvantagens. Populações F_2 e de retrocruzamentos são as mais fáceis e rápidas de serem obtidas, porém apresentam a desvantagem de que os indivíduos genotipados são únicos, o que dificulta a avaliação de uma

determinada característica em diferentes ambientes, especialmente características quantitativas. Populações de linhagens puras recombinantes (*RIL- Recombinant Inbred Lines*) são geradas a partir do cruzamento entre dois parentais homocigotos, seguido de gerações sucessivas de auto-fecundação por SSD (*single seed descent*) a partir da população F₂, ou de cruzamento entre irmãos, que resultam na criação de uma população de linhagens puras, cujo genoma é um mosaico (recombinação) dos genomas dos parentais (Broman, 2005). Em geral, o tempo necessário para o desenvolvimento desse tipo de população varia entre seis e oito gerações. Gasta-se muito tempo no desenvolvimento deste tipo de população, porém, sua grande vantagem está na possibilidade de obtenção de uma população de mapeamento imortalizada e permanente, que pode ser transferida e armazenada em forma de sementes, e avaliada em diferentes anos e ambientes em experimentos replicados, para as mais diferentes características (Collard et al., 2005).

No caso do cajueiro e de outras espécies perenes e tipicamente heterocigotas, que apresentam pouca ou nenhuma história de domesticação, há grande dificuldade na obtenção de populações construídas especificamente para a construção de mapas genéticos com maximização de desequilíbrio de ligação. Essas espécies, em geral, apresentam depressão por endogamia e longos ciclos de vida, tornando muito difícil a obtenção de linhagens homocigotas para a realização de cruzamento, seguido de gerações de autofecundação ou retrocruzamento. O emprego da estratégia de pseudo cruzamento-teste duplo (*double pseudo testcross*) (Grattapaglia & Sederoff, 1994) é apropriado para o aproveitamento de híbridos F₁, comumente obtidos em cruzamentos entre plantas perenes, para a construção de mapas genéticos. Para tanto, é necessário utilizar cruzamento entre parentais contrastantes para características de interesse e obter uma progênie F₁ suficientemente grande para permitir uma estimativa das frequências de recombinação entre marcadores segregantes (Grattapaglia, 1997). A geração F₁ de cruzamentos desse tipo é geneticamente heterogênea, e se assemelha a uma F₂ ou retrocruzamento nos moldes clássicos de culturas anuais, sendo que a eficiência desta estratégia depende do nível de heterocigose da espécie e da distância genética entre os indivíduos cruzados (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A possibilidade de clonagem de cada

indivíduo da população F1 possibilita a avaliação de diversas características de interesse econômico ao longo do tempo.

Para a geração de mapas baseados no pseudo cruzamento-teste duplo, pode-se utilizar qualquer marcador molecular. No entanto, alguns marcadores são mais vantajosos que outros, no que diz respeito a serem altamente polimórficos e a forma de segregação. Marcadores dominantes no geral apresentam segregação 1:1 (presença ou ausência), e, neste caso, estariam presentes em um dos pais e ausente em outro, assim como marcadores co-dominantes em casos em que um parental é homozigoto e outro heterozigoto. Nesses casos, ambos os tipos de marcadores possuem a mesma quantidade de informação.

Os marcadores utilizados em pseudo cruzamento-teste duplo permitem a geração de mapas indivíduo-específicos, ou seja, um mapa genético para cada genitor com marcadores distintos. Essa estratégia em geral não possibilita a integração de ambos os mapas, salvo em situações em que são selecionados marcadores comuns aos dois mapas, como marcadores dominantes com alelos segregando na proporção 3:1 e marcadores co-dominantes em situações que os dois genitores são heterozigotos, com alelos segregando na proporção 1:2:1 (Wu et al, 2010). Para a construção do mapa, pode-se utilizar o programa MapMaker (Lander et al, 1987), versão 2.0 para Macintosh, sendo que para cada genitor deve ser feito um “espelho” dos dados, pois o programa assume que os marcadores estão em fase de acoplamento, e, portanto, não reconhece marcadores em fase de repulsão. Para isto, os dados são duplicados e re-codificados. Para o cajueiro já foi desenvolvido um mapa para cada genitor (Cavalcanti et al., 2007), os mesmo usados no presente trabalho. Os dois mapas são compostos por marcadores dominantes (AFLP) e apenas 11 marcadores codominantes (SSR).

2. Justificativa

A disponibilidade de marcadores moleculares, a avaliação do seu conteúdo informativo, e o seu emprego na construção de mapas genéticos e mapeamento de genes de interesse econômico representam avanços importantes no conhecimento genético de uma espécie. O número de

marcadores microssatélites disponíveis para estudos genéticos do cajueiro ainda é muito limitado. Essas ferramentas moleculares são essenciais para o avanço do conhecimento genético da espécie, para estudos de variabilidade genética e conservação de germoplasma, e eventual emprego na seleção assistida de características de importância econômica. Sendo assim, o desenvolvimento de novos marcadores microssatélites e a saturação do mapa genético já existente para a espécie se tornam de grande valia para se obter as melhorias desejadas no cultivo do cajueiro.

3. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e disponibilizar uma nova bateria de locos microssatélites para a análise genética de *Anacardium occidentale*. Além disso, os marcadores microssatélites polimórficos em uma progênie F1 do cruzamento entre cajueiro comum e cajueiro anão precoce foram localizados em grupos de ligação de mapas genéticos em construção para a espécie.

4. Material e Métodos

4.1 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

4.1.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO:

Para a extração do DNA visando a identificação de regiões hipervariáveis do genoma de *A. occidentale*, segundo o protocolo CTAB 2% modificado (Ferreira & Grattapaglia, 1998), foram utilizadas folhas jovens do clone CCP1001 cedidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

4.1.2 SELEÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO PARA DIGESTÃO DO DNA:

Para a construção da biblioteca genômica enriquecida, o DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Mse I*, *Sau 3A I* e *Tsp509 I*, para selecionar a enzima com maior concentração de fragmentos de DNA entre 200 e 800 pares de base (Brondani *et al.*; 2007). Para as três enzimas, utilizou-se 5U para digerir 1 µg de DNA, segundo as especificações do fabricante. As reações de digestão com *Mse I* e *Sau 3A I* foram incubadas por 12 horas a 37 °C, e com *Tsp509 I* a 65 °C pelo mesmo período. As digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% que foi, em seguida, fotodocumentado (Eagle Eye II - Stratagene®)

4.1.3 CORTE DO GEL E RECUPERAÇÃO DOS FRAGMENTOS:

Para a recuperação dos fragmentos de DNA da região desejada, foi feito um corte no gel de agarose para separar os fragmentos entre 200 a 800 pares de base e, posteriormente, feita a recuperação dos mesmos com a utilização do kit QIAquick® da QIAGEN conforme instruções do fabricante. Esses fragmentos foram quantificados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo a concentração final de 2µg/ml, sendo utilizados 2µl da reação purificada + 2µl de tampão de sacarose 3X.

4.1.4 ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA GENÔMICA:

Esta etapa visou a recuperação em maior frequência de fragmentos que continham as sequências-alvo, ou seja, de fragmentos que continham regiões microssatélites de um determinado tipo (Brondani *et al.*; 2007). Para isso, foi necessário fazer a ligação do DNA digerido e purificado a adaptadores de DNA, que possuem extremidades coesivas aos sítios de restrição gerados pela enzima *Mse I*. Esta ligação possibilitou que na amplificação do DNA fossem utilizados iniciadores (“*primers*”) complementares à sequência do adaptador, uma vez que não se conhecia a sequência de DNA dos fragmentos recuperados.

A ligação aos adaptadores foi feita adicionando-se 51 µl de H₂O milli Q; 12 µl de tampão 10X T4 Ligase; 6 µl de adaptador *Mse* a 200 µM; 45µl de DNA a 1µg/µl de concentração e 6 µl da enzima T4 ligase da marca Biolabs® a 400u/µl, totalizando 120 µl de reação, que foi incubada a 12 °C por 12 horas, sendo adicionado 30µl de H₂O milli Q após este tempo. A reação foi mantida em geladeira (4°C) até o uso.

Para o enriquecimento, foi feita a biotinizilação da sequência repetitiva para a qual foi enriquecida a biblioteca genômica. O oligonucleotídeo utilizado no enriquecimento foi o TC₁₄, para a recuperação de microssatélites com sequência repetitiva AG. Para a Biotinizilação, foram adicionados 24 µl de H₂O milli Q; 4µl de tampão TdT (NE buffer 4) da Biolabs®; 4 µl de cloreto de cobalto a 0,25mM; 2µl do Oligo TC₁₄ a 100 uM; 2 µl de Biotina – 16-ddUTP a 1mM (Roche®) e 4µl da enzima Terminal Transferase (Biolabs®) a 20 U/µl, totalizando 40 µl de reação, que foi incubada por trinta minutos em estufa a 37°C, e em seguida, foram adicionados 4µl de EDTA 0,5M para inativar a enzima.

Após adição de EDTA, foi feita precipitação com 110µl de etanol absoluto (-20°C), deixando no freezer a -20°C por 12 horas. Passado este tempo, centrifugou-se por 15 minutos a 13000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foram feitas duas lavagens desse *pellet* com 500µl de álcool 70%, centrifugando por 5 minutos em cada lavagem e descartando o sobrenadante. Depois da última lavagem, deixou-se o *pellet* secar e o mesmo foi ressuscitado em 30µl de H₂O milli Q.

O enriquecimento da biblioteca genômica para sequências repetitivas (microssatélites) foi feito através da hibridização do DNA ligado aos adaptadores pelos oligonucleotídeos biotinizilados, obtidos nas etapas descritas acima, e

associados às contas magnéticas. Essas contas têm em sua superfície moléculas de estreptavidina. Esta proteína possui alta afinidade pela molécula de biotina, e assim, torna-se possível isolar as sequências do DNA que hibridizaram com a sonda de sequência repetitiva ligada à biotina, por meio da recuperação das contas magnéticas, uma vez que a biotina se liga à estreptavidina associada à conta magnética (Brondani *et al.*; 2007).

As contas magnéticas (Dynabeads M-208) conectadas à estreptavidina foram então ligadas a bio-oligos (biotina+ oligos TC₁₄) e depois ao DNA com adaptadores (Figura 3).

Realizou-se então uma PCR para a avaliação do enriquecimento, cuja reação apresentou: 2 µl de DNA total; 15,05µl de H₂O milli Q; 2,5 µl de tampão 10X com MgCl₂ (Phoneutria®); 2,5 µl de dNTP (2 5mM); 2,5 ul de *primer Mse I* a 10mM; 0,25 µl de MgCl₂ a 15mM e 0,20µl de enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria®), totalizando 23 µl de reação.

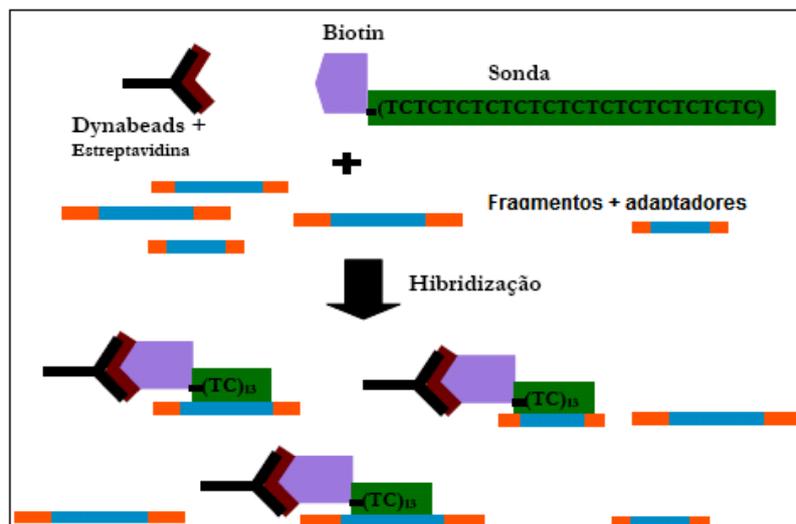


Figura 3. Esquema de enriquecimento da biblioteca de DNA com fragmentos contendo regiões repetitivas TC, para a recuperação de clones contendo microssatélites com sequência repetitiva AG.

As reações foram conduzidas em termociclador da Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600, cujo programa de amplificação de produtos de PCR foi o seguinte: (1) 3 minutos a 95°C para a desnaturação da fita dupla de DNA; (2) 30 ciclos de amplificação com 94°C para desnaturação (45

segundos), seguido de anelamento a 56°C (45 segundos) e extensão a 72°C (2 minutos); (3) extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Após amplificação, a reação foi visualizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. O marcador de peso molecular utilizado foi o Ladder 1Kb.

4.1.5 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ENRIQUECIDOS:

Esta etapa teve como objetivo gerar uma grande quantidade de fragmentos de DNA por intermédio da reação de PCR, utilizando o iniciador complementar ao adaptador e o DNA enriquecido para as sequências repetidas, ligado às contas magnéticas que serão clonados em vetor de clonagem posteriormente. Após a confirmação visualizada através da PCR de checagem, foi feita a amplificação total do DNA (contém as contas magnéticas + DNA + Adaptadores + complexo Bio – Oligo). Essa reação contém os mesmos reagentes e mesmo ciclo que a PCR de checagem. Então, contas magnéticas foram separadas da reação, utilizando o suporte contendo ímã e micropipeta para separar a reação em um novo tubo, descartando-se assim as contas magnéticas. Em seguida, foi feita a purificação desta reação seguindo o protocolo do kit QIAquick® da QIAGEN®. Após a purificação, foi feita quantificação em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

4.1.6 LIGAÇÃO DO DNA EM VETOR DE CLONAGEM PLASMIDIAL, TRANSFORMAÇÃO E REPICAGEM DAS COLÔNIAS:

A utilização do vetor plasmidial pGEM® – T Easy (Promega®) (Figura 4) possibilitou a clonagem de produtos de PCR sem a necessidade de digeri-los previamente com a enzima de restrição. Esse sistema também apresenta a vantagem de permitir a seleção do DNA recombinante por meio do sistema da β -galactosidase utilizando IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) e X-gal (5-bromo-4chloro-3indoyl- β -D-galactopyranoside) (Brondani *et al.*; 2007).

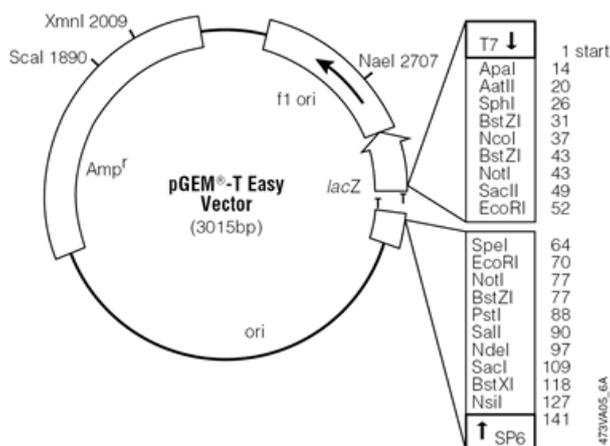


Figura 4. Mapa do vetor pGEM® – T Easy. A inserção do fragmento inativa o gene lacZ, dando origem a colônias brancas que são incapazes de metabolizar o X-gal.

Após a purificação da PCR contendo os fragmentos enriquecidos, o inserto foi ligado ao vetor, utilizando-se 1 µl de vetor pGEM® – T Easy, 5 µl de 2X Rapid Ligation buffers da T4 Ligase, 1µl do produto da PCR purificada, 1 µl da enzima T4 ligase, e 2 µl de H₂O Milli Q , totalizando 10 µl de reação, que foi incubada por 12 horas a 4°C.

Para a transformação, foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue pelo método de eletroporação. Para tal procedimento, foram adicionados em uma cuveta para eletroporação previamente resfriada no gelo 2µl da reação de ligação, 2µl de H₂O Milli Q e 50µl de células competentes armazenadas a -80°C. O eletroporador utilizado foi o Gene Pulser® da Biorad®. Após a eletroporação foram adicionados 950µl de meio SOC na cuveta, sendo seu conteúdo transferido para um tubo de 1,5ml e em seguida incubado por 90 minutos a 37°C sob agitação.

Placas de petri contendo meio de cultura NZY amp (ampicilina 50µg/ml), 40µl de X-gal (40µg/µl) e 16µl de IPTG (0,5 M) foram incubadas com a cultura de células transformadas por 12 horas a 37°C. Após o crescimento, as colônias recombinantes (brancas) foram repicadas em placas (Figura 6) de fundo “U” de 96 poços. Cada poço recebeu 200µl de meio de cultura NZY amp líquido. As placas, em seguida foram incubadas por 12 horas a 37°C. Decorrido o tempo de crescimento, os clones foram diluídos em 79µl de água Milli Q estéril e armazenados em freezer a -20°C até o seu uso.

4.1.7 SEQUENCIAMENTO:

As colônias diluídas na etapa anterior (*Templates*) foram utilizadas nas reações de PCR que antecedem o sequenciamento, utilizando-se 6,22µl de H₂O Milli Q, 1 µl de TP buffer 10X com 15mM de MgCl₂, 0,6 µl dNTP (2,5mM), 0,8 µl de BSA (2,5mg/ml), 0,12µl de *primer* M13 F/R (5mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Phoneutria®), 0,06µl de MgCl₂ e 1 µl de template, totalizando 10 µl de reação.

O programa para termociclador utilizado para a amplificação foi: (1) 5 minutos a 94°C para a desnaturação da fita dupla de DNA; (2) 30 ciclos de amplificação a 92°C para desnaturação (1 minuto), seguido de anelamento a 56°C (1 minuto) e extensão a 72°C (1minuto); (3) extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Para a confirmação do funcionamento da reação de pré-sequenciamento foi feita a quantificação em gel de agarose 1,5%, utilizando-se 2µl da reação mais 3µl de tampão de sacarose 3X. A reação de pré-sequenciamento foi purificada via lise alcalina com Exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* (conhecida como ExoSAP) e foi feita utilizando-se 2,5 µl de Exonuclease I (20U/µl- Biolabs®), 50µl de Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl- promega®) e 347,5 µl de Tris 50mM (pH 8,0). Em uma nova placa de 96 poços foram adicionados em cada poço 5µl da reação de pré-sequenciamento + 2µl do MIX ExoSAP. A Exonuclease I é responsável por degradar o excesso de iniciador não utilizado na reação e qualquer DNA estranho produzido na PCR. Já a *shrimp alkaline phosphatase* é responsável por desfosforilar os nucleotídeos restantes, não utilizados na reação.

Em seguida, as placas foram levadas para termociclador, onde permaneceram a 37°C por 30 minutos para a ação da enzima e 80°C por 20 minutos para inativá-la.

Após a purificação com ExoSAP foram feitas as reações de sequenciamento. Para estas reações foi utilizado o Kit de sequenciamento *BigDye Terminator Cycle Sequencing®* V. 3.1 da Applied Biosystems®.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1µl da reação purificada com ExoSAP e em seguida foram adicionados, para cada reação, 6 µl de H₂O Milli Q, 1,5 µl de Tampão 5X SEQ BigDye®, 1 µl de BigDye® V.3, 0,5 µl de *primer* M13 F ou R (3,2mM), totalizando 9 µl de reação, que foi submetida ao

seguinte programa em termociclador de modelo 9700 GeneAmp (*Perkin-Elmer/Applied Biosystems*): (1) 2 minutos a 94°C para a desnaturação da fita dupla de DNA; (2) 30 ciclos de amplificação a 94°C para desnaturação (10 segundos), seguido de anelamento a 50°C (10 segundos) e extensão a 60°C (4 minutos); (3) extensão final a 72°C durante 4 minutos.

Após retirar as reações do termociclador foi feita purificação segundo o protocolo a seguir:

- 1) 2,5 µl de EDTA 125mM foram adicionados em cada poço da reação de sequenciamento.
- 2) 25 µl de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da reação de sequenciamento.
- 3) A placa foi selada e o conteúdo misturado por inversão quatro vezes rapidamente.
- 4) A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5) A placa foi centrifugada 30 minutos a 3000 RPM a 4°C.
- 6) A fase líquida foi retirada por inversão e submetida a um pulso de centrifugação na posição invertida e protegida com papel absorvente.
- 7) 70µl de etanol 70% foram adicionados a cada poço.
- 8) A placa foi centrifugada por 15 minutos a 3000 RPM a 4°C.
- 9) Repetiu-se o passo número 6.
- 10) A placa foi seca em termociclador a 75°C por 15 minutos.
- 11) A placa foi envolvida em papel alumínio e colocada no freezer até o momento de uso.

É importante lembrar que no momento de sequenciamento foram adicionados 9µl de HI DI™ da Applied Biosystems® e em seguida, as placas foram colocadas no seqüenciador ABI 3700.

4.1.8 DESENHO DE INICIADORES (*PRIMERS*) PARA AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES VIA PCR

O desenho dos *iniciadores* dos novos marcadores microssatélites de cajueiro foi feito com base na análise das sequências da biblioteca de microssatélites obtidas na etapa anterior. Inicialmente, identificou-se na sequência obtida de cada clone contendo a região microssatélite a parte correspondente à sequência do adaptador e do vetor de clonagem utilizando o programa TROLL (Castelo et al., 2002). Em seguida, os clones que continham repetições microssatélites em tamanho adequado foram selecionadas para o desenho de pares de iniciadores específicos complementares a cada região flanqueadora das sequências repetitivas utilizando o programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000), disponível no site <http://frodo.wi.mit.edu/>.

Os critérios para o desenho dos pares de iniciadores de cada marcador foram os seguintes: temperatura média de anelamento de 53°C a 62°C (diferença máxima de 3°C na temperatura de anelamento entre cada iniciador do par), tamanho entre 18 e 24 bases e conteúdo de GC entre 30% e 60%, além de ausência de complementaridade entre a sequência dos iniciadores de cada par.

4.1.9 OTIMIZAÇÃO DE INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES:

Os pares de iniciadores desenhados foram então sintetizados para serem testados em uma série de reações de PRC utilizando-se quatro acessos de caju obtidos da Embrapa Agroindústria Tropical (acessos C28, EMBRAPA 51, C36 e PRO555/1). O objetivo desta etapa do trabalho foi a obter a temperatura de anelamento ideal para a geração de produto de PCR na região flaqueada por cada par de iniciadores. A reação de amplificação apresentou os seguintes reagentes: 9 ng de DNA, Tampão 1X, dNTP 2,5 mM, BSA, *iniciadores (forward e reverse)* 0,9 µM, Taq polimerase 1U e água. Foi utilizado o seguinte programa em termociclador ABI Applied Biosystems 9700®: (1) 5 minutos a 94°C para a desnaturação da fita dupla de DNA; (2) 30 ciclos de amplificação com 94°C para desnaturação (1 minuto), seguido de anelamento a 56°C (1 minuto) e extensão a 72°C (1 minuto); (3) extensão final a 72°C durante 7 minutos.

A temperatura de anelamento para o teste de cada par de iniciadores variou de 2 em 2°C, a partir de 48 até 62°C, para a eliminação de bandas inespecíficas. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 3,5% corados com brometo de etídeo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE CAJUEIRO

Entre os novos marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, observou-se um grupo que segrega na população F1 selecionada para estudos de mapeamento genético (veja a seguir). Entre estes marcadores, 14 foram escolhidos randomicamente para serem caracterizados, e submetidos a marcação com os fluorocromos 6-FAM (azul), HEX (verde) ou NED (amarelo). Os pares de iniciadores selecionados e otimizados para amplificação via PCR são potenciais marcadores que permitem a detecção de polimorfismo em locos microssatélites do genoma do cajueiro. Cada marcador microssatélite em potencial foi avaliado quanto ao conteúdo de informação polimórfica e demais parâmetros genéticos para emprego em análise genética de cajueiro. Para isso, a performance de cada marcador microssatélite foi avaliada com 36 genótipos de cajueiro, sendo 29 genótipos de cajueiro anão precoce (PRO555/1, BRS189, BRS253, CCP06, CCP76, CCP1001, Embrapa 50, Embrapa 51, CCP09, BRS189, BRS265, FAGA11, CAP 14, BRS226, AC 214-4, AC 276-1, AA 102-3, AA119-3, AA134-1, MDI 11-28, END II 6-9, END II 9-4, SLC 7-4, SLC 12-20, PRO 553-2, PRO 623-4, PRO 720-2, CAPI 1, CAPI6) e 7 clones de cajueiro comum (CP 96, CP 77, BRS274 ou Comum 21, BRS275 ou Comum 31, Comum 28, Comum 30, Comum 36, Comum 18). Todos os materiais são provenientes do Campo Experimental de Pacajus, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical, litoral leste do Estado do Ceará, distante 55 km de Fortaleza.

A reação de PCR com cada marcador microssatélite foi realizada com o kit comercial QIAGEN® Multiplexer PCR, utilizando-se 1 µl de DNA genômico, 2,5 µl de PCR *Master Mix*, 0,5 µl de *Q-solution*, 0,2 µl de Iniciadores marcados com fluorocromos (5µM), 0,8 µl de ddH₂O, totalizando 5 µl de reação.

As reações foram realizadas em placas de PCR de 96 poços e conduzidas em termocicladores de modelo 9700 GeneAmp (*Perkin-*

Elmer/Applied Biosystems). O programa de amplificação de produtos de PCR foi o seguinte: (1) 5 minutos a 94°C para a desnaturação da fita dupla de DNA; (2) 30 ciclos de amplificação com 94°C para desnaturação (1 minuto), seguido de anelamento a 60°C (1 minuto) e extensão a 72°C (2 minutos); (3) extensão final a 65°C durante 7 minutos.

A detecção dos fragmentos amplificados foi realizada em seqüenciadores automáticos de DNA modelos ABI Prism 377®. As condições de carregamento dos géis no ABI Prism 377® utilizaram uma alíquota de 1 µl de produto de PCR misturada com 2 µl de mix [1 ul de tampão de carregamento -98% formamida, 10 mM EDTA-blue dextran- e 1 µl de um marcador padrão de tamanho conhecido produzido no próprio laboratório (Brondani & Grattapaglia, 2001)]. A reação foi desnaturada por 5 min em termociclador ABI 9700 e uma alíquota de ≈ 3 µl de amostras carregada em géis de poliacrilamida “Long Ranger” a 4% em tampão TBE 1X. Os fragmentos amplificados foram analisados e genotipados nos programas da Applied Biosystems - GeneScan (versão 3.1.2) e Genotyper (versão 2.5.2), respectivamente.

As estatísticas descritivas de cada marcador foram estimadas pelo programa PowerMarker (v.3.25) (LIU, K.; MUSE, 2005). Para cada marcador microsatélite testado foram estimados, com base nos 36 acessos de caju selecionados, os seguintes parâmetros: número de alelos observados em cada loco (No); a heterozigiosidade observada (Ho); a heterozigiosidade esperada (He), o poder de Exclusão e o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), que estima como o grau de polimorfismo em um loco marcador influencia a probabilidade de detecção de ligação com um loco referência, ou a probabilidade de uma progênie de uma linhagem parental que possui um alelo raro permitir a dedução do genótipo da linhagem parental no loco marcador (Botstein et al., 1980).

Para a análise de similaridade entre os acessos utilizados, foi introduzido um novo acesso como *outgroup*, pertencente à espécie *Anacardium microcarpum*, totalizando 37 acessos. As distâncias genéticas entre cada par de acessos foram calculadas a partir da planilha com os genótipos (comprimento dos alelos em pares de bases). Foi utilizado o coeficiente BAND, que leva em consideração o número de alelos comuns entre os acessos a serem comparados, usando-se o programa NTSYS, versão 2.1 (Rohlf, 2000). A matriz

de distâncias resultante foi submetida à análise de agrupamento usando UPGMA (“unweighted pair-group method analysis”). A fim de verificar a consistência dos agrupamentos obtidos a partir dos dados de distâncias genéticas, a correlação cofenética (r) foi estimada (Mantel, 1967). Para isso, a matriz de distâncias genéticas foi comparada com a matriz cofenética. Essas análises foram realizadas usando-se o programa NTSYS, versão 2.1 (Rohlf, 2000).

4.3 MAPEAMENTO GENÉTICO:

Para a construção do mapa genético, foram utilizados 79 acessos da população segregante em F_1 do cruzamento entre cajueiro anão precoce (CCP 1001) e cajueiro comum (CP 96). O cruzamento foi realizado em setembro de 2000. Esta população F_1 é a mesma utilizada por Cavalcanti & Wilkinson (2007) no desenvolvimento do primeiro mapa genético de caju empregando marcadores AFLP e microssatélites. No presente estudo, no entanto, estavam disponíveis 6 dos 85 acessos utilizados no estudo de 2007. O método de mapeamento empregado foi o pseudo cruzamento-teste duplo (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Os novos marcadores microssatélites passíveis de serem adicionados a este mapa foram selecionados com base no polimorfismo detectado entre os genitores CCP 1001 e CP 96. Para isso, as reações de PCR foram realizadas da mesma forma que as reações de otimização citadas anteriormente, empregando para cada marcador as temperaturas ótimas de anelamento ajustadas para os respectivos pares de iniciadores. Os produtos de PCR foram separados em géis de poliacrilamida a 5% de concentração em condições desnaturantes e corados com nitrato de prata (Creste *et al*, 2001).

Os marcadores microssatélites que, após a avaliação de polimorfismo entre os genitores, mostraram-se heterozigotos em um dos genitores e homozigoto no outro, ou heterozigoto no primeiro e homozigoto no segundo genitor, ou ainda heterozigoto para alelos distintos nos dois genitores, foram considerados, portanto, aptos a serem utilizados para mapeamento nesta população F_1 .

Mapas genéticos individuais foram construídos para cada genitor utilizando os genótipos de cada indivíduo F1 obtidos com os novos marcadores microssatélites, juntamente com os dados de AFLP e microssatélites de Cavalcanti & Wilkinson (2007), gentilmente cedidos pelo Dr. Jaime Cavalcanti, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. Os marcadores microssatélites foram inicialmente submetidos ao teste qui-quadrado para análise de distorção da segregação mendeliana. Para a análise de ligação e construção do mapa genético utilizou-se o programa MAPMAKER/MacIntosh versão 2.0. Foram considerados para análise de ligação apenas os marcadores com menos de 20% de dados faltantes na população F1 e, de maneira similar, indivíduos F1 com pelo menos 80% dos dados de marcadores considerados. Utilizou-se um valor mínimo de LOD 5,0 e fração de recombinação (θ) máxima de 0,45 como parâmetros iniciais no estabelecimento dos grupos de ligação pelo comando "Group" do Mapmaker. O estabelecimento dos grupos de ligação foi, em geral, feito com o *LOD score* variando de 4 a 6. Quando existe um grande número de marcadores, valores baixos de *LOD* (menores que 4) podem ocasionar ligações espúrias, enquanto o aumento nos valores de *LOD*, acima de 6, pode resultar na fragmentação dos grupos de ligação (Carneiro & Vieira, 2002). Por essa razão, o *LOD* estabelecido para a análise inicial foi de valor 5,0. No entanto, nos grupos de ligação menos saturados de marcadores o *LOD* utilizado passou para 4,0, baseando-se no agrupamento de marcadores do mapa já existente para a espécie em estudo (Cavalcanti & Wilkinson, 2007). Para a estimativa de fração de recombinação entre marcadores ligados foi utilizada a função de mapeamento de Kosambi, que admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência), assumindo interferência completa entre regiões próximas do genoma. A ordem mais provável dos marcadores dentro de cada grupo de ligação foi estimada através dos comandos "three point" e "ripple". As ordens finais dos locos em cada grupo de ligação foram confirmadas com a ordem de sua posição no mapa de referência (Cavalcanti & Wilkinson, 2007), e os grupos de ligação detectados foram também nomeados de acordo com o mesmo trabalho.

4.4 MAPEAMENTO DE QTLs DE CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Três características foram consideradas para a detecção de associação com marcadores moleculares através da análise de marca simples pelo método de regressão linear simples, utilizando o programa WinQTLCartographer: Resistência a mofo preto (causado pelo fungo *Pilgeriella anacardii*), diâmetro da copa e altura da planta. Os dados fenotípicos destas três características foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jaime Cavalcanti, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. Em seguida, análises de Mapeamento de Intervalo (Lander & Botstein, 1989) e Mapeamento de Intervalo Composto (Jansen, 1993), também foram realizadas com o programa WinQTLCartographer. Para determinar a significância estatística na detecção de QTLs foi estimado o valor de LOD mínimo de cada característica analisada através de testes de permutação (1.000 permutações; nível de significância de 0,05) (Churchill & Doerge, 1994; Doerge & Churchill, 1996). Os parâmetros de análise de Mapeamento de Intervalo Composto foram os referentes ao Modelo 6 no programa (*forward regression method*, três, cinco, oito e dez marcadores controle, janela de 10 cM).

5. Resultados e Discussão

5.1 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES:

Entre as enzimas de restrição testadas foi observado que as enzimas *Mse I* e *Sau 3AI* produziram ótima digestão do DNA extraído das folhas de caju, gerando uma grande quantidade de fragmentos entre 800 e 200pb (Figura 5), tamanho satisfatório para clonagem de segmentos ricos em regiões microssatélites e sequenciamento dos clones. As duas enzimas de restrição foram selecionadas para desenvolvimento de marcadores para aumentar o número de iniciadores a serem gerados e utilizados para o mapeamento da espécie. A utilização de duas enzimas de restrição maximiza a possibilidade de cortes em diferentes regiões do genoma, minimizando redundâncias, possibilitando um maior número de marcadores derivados de cada biblioteca.

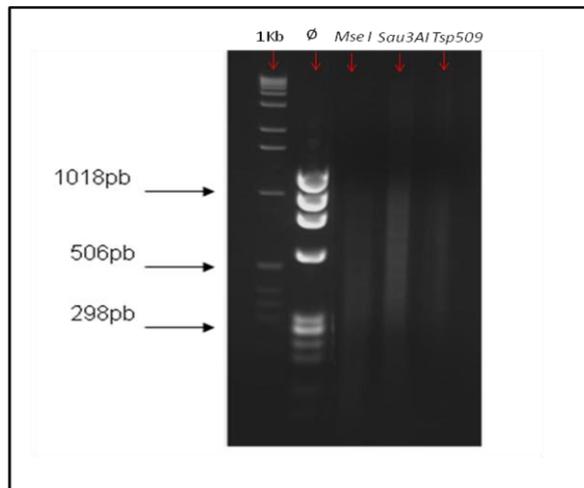


Figura 5. Teste de digestão utilizando as enzimas *Mse I*, *Sau 3AI* e *Tsp509*.

A partir de 50µg de DNA digerido com *Mse I* foi possível recuperar, pela eluição do gel, os fragmentos contendo sequência microssatélites na faixa de tamanho requerido (Figura 6). A ligação com os adaptadores e o enriquecimento da biblioteca foram analisados na reação de PCR para controle do enriquecimento dos fragmentos, confirmando que não houve perda de DNA nos tubos de lavagem.

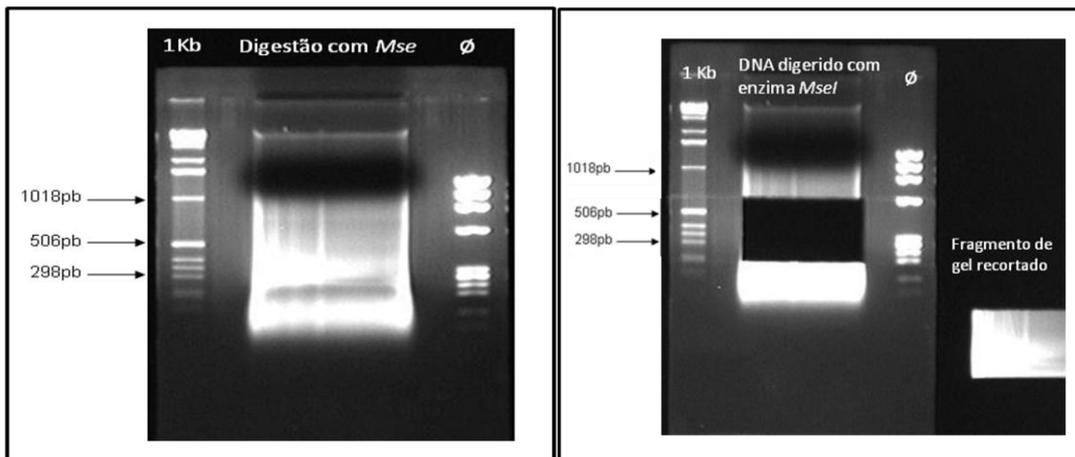


Figura 6. a) Digestão de 50 µg do DNA com a enzima Mse I. b) Extração de seção do gel contendo fragmentos de 200 – 800 pares de base.

A confirmação da inserção dos fragmentos de DNA genômico em colônias bacterianas contendo o vetor de clonagem foi feita pela checagem da presença do gene de resistência a ampicilina do plasmídeo pGEM-T[®] easy, cuja função foi degradar o antibiótico presente no meio sólido, e também, na seleção pela coloração branco-azul (IPTG/X-gal) das colônias de bactérias. Das colônias resistentes ao antibiótico, cerca de 54% eram brancas (recombinantes) e 46% eram azuis (não recombinantes), totalizando 5.472 colônias contendo fragmentos passíveis de sequenciamento. A purificação da reação com as contas magnéticas + DNA + Adaptadores + complexo Bio – Oligo com o Kit da QIAquick da QIAGEN[®] foi bem sucedida, restando apenas o fragmento amplificado (Figura 7).

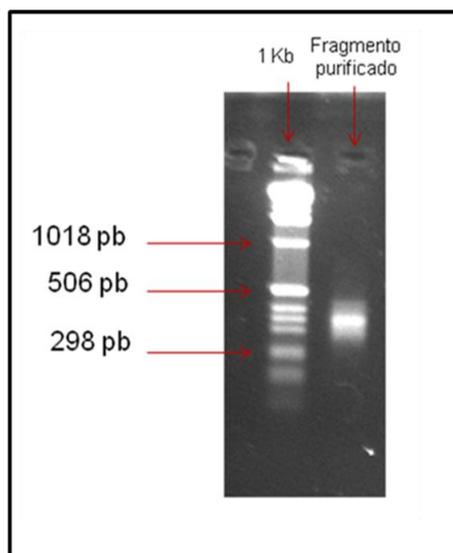


Figura 7. Resultado da purificação da PCR confirmando a presença de fragmento potencialmente contendo uma sequência microssatélite

A confirmação da reação de pré-sequenciamento foi obtida a partir da quantificação do DNA amplificado em gel de agarose 1,5%, utilizando-se 2 μ l da reação mais 3 μ l de tampão de carregamento 3X. Foram seqüenciados 828 clones potencialmente contendo seqüências microssatélites. Deste total, observou-se que:

- (a) 643 clones não apresentaram seqüências repetitivas;
- (b) 20 clones apresentaram seqüências repetitivas com menos de 6 repetições;
- (c) 165 clones apresentaram seqüências repetitivas com mais de seis repetições, sendo que destas, 10 apresentaram redundância de seqüência (Figura 8).

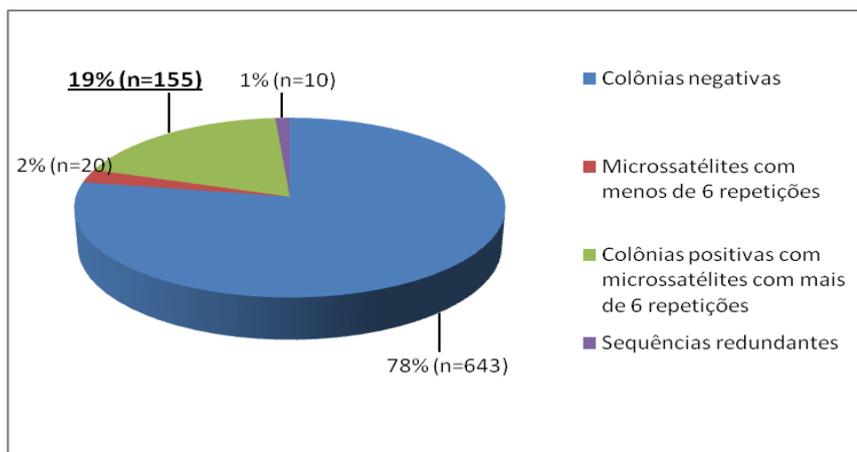


Figura 8. Distribuição percentual dos clones sequenciados contendo seqüências repetitivas com menos de seis repetições do motivo, seqüências repetitivas com mais de seis repetições do motivo, seqüências redundantes e ausência de seqüências repetitivas.

Contudo, apenas 100 clones evidenciaram regiões para desenho de iniciadores *forward* e *reverse*, sendo que, para os 65 clones restantes, foi necessário o sequenciamento da fita anti-senso para que fosse possível o desenho de ambos os iniciadores. Com esses dados, observou-se um rendimento de aproximadamente 18,7% entre o número de colônias sequenciadas e a quantidade de seqüências microssatélites encontradas (excluindo-se as seqüências redundantes). Estes dados são compatíveis com outros estudos utilizando bibliotecas enriquecidas de marcadores microssatélites em plantas. Oliveira (2006) obteve rendimento de 11,3% em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Ciampi et al. (1997) obtiveram 14,4% em *Caryocar brasiliense*, e Ciampi et al. (2000), 16% em *Copaifera langsdorffii*. Dentre as 828 seqüências obtidas de cajueiro, foi observada a freqüência de 5% de redundância entre elas, ou seja, 10 das seqüências eram repetidas e foram excluídas do processo de análise.

Os 100 pares de iniciadores desenhados foram otimizados para amplificação de fragmentos via PCR. Todos os marcadores com temperaturas de anelamento ajustadas amplificaram fragmentos visíveis em gel de agarose 3,5 % corados com brometo de etídeo (Figura 9). A Tabela 2 apresenta a seqüência de DNA e os iniciadores *forward* e *reverse* para cada um dos 100 novos marcadores microssatélites de cajueiro.

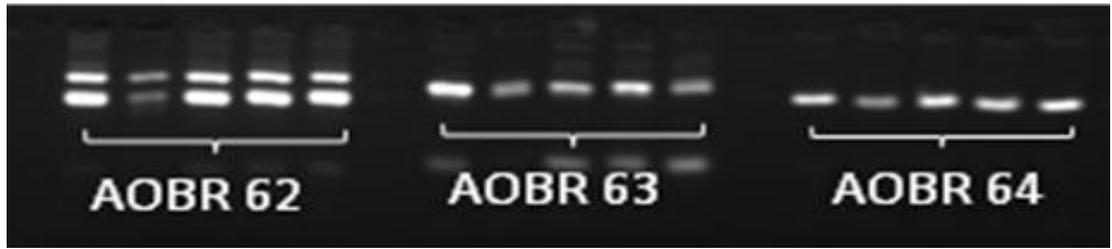


Figura 9. Marcadores AOBR 62, AOBR 63 e AOBR 64 mostrando fragmentos de amplificação em 5 acessos diferentes de cajueiro.

Tabela 2. Iniciadores (“primers”), sequências, motivo, tipo de microsatélite e temperaturas de anelamento (°C).

<i>Primer:</i>	<i>Sequências:</i>	<i>Motivo:</i>	<i>Classificação:</i>	<i>TA:</i>
AOBR1	F GCAAAACCCCATCAGGTAAA R CTTCAAGGGAGTTTTTGTGTTG	(AC) ₄ (CT) ₉	Composto	56°C
AOBR2	F TGAGCGAGGATTGTGTTTGT R AGAGATGAAGACGGCAGAGC	(AG) ₁₅	Perfeito	58°C
AOBR3	F TCAGAAGAACTTCAGAGGAAGAGA R AAGAGGGCTAAGGAAGTTAGGG	(AG) ₂₂	Perfeito	58°C
AOBR4	F TCCCTGGAAAGTCAGAAGAGA R GAAAGAAATGGAGGCAGTGG	(AG) ₁₉	Perfeito	58°C
AOBR5	F TTCGCGAAATTCAACAAAAG R CCGACGGTCTACAATGATCC	(AG) ₉	Perfeito	56°C
AOBR6	F GATCAACATGCATGAAGCTCTAA R CCCATTCATAAAGCCACCAA	(AG) ₁₆	Perfeito	58°C
AOBR7	F TGAGCGAGGATTGTGTTTGT R AGAGATGAAGACGGCAGAGC	(AG) ₁₇	Perfeito	56°C
AOBR8	F TCGAATCCCTGTGTTTCATCA R GGGCTTGATTTTCTGCAAAC	(TA) ₂ C (TA) ₂ TG (TA) ₄	Imperfeito e Composto	56°C
AOBR9	F CGAGGAAGAAAGTACGGAAGAA R TGTGGGAGTTGTCAGTTGGA	(AG) ₁₉	Perfeito	56°C
AOBR10	F TCTGGGTTATAGATTTGGGTGAA R CATAGAGATTCGGCATCTTGG	(AT) ₆	Perfeito	58°C
AOBR11	F TACAGATCTCCCCTGCATTG R AATCCCCGACCTCAAACCTCT	(GA) ₆	Perfeito	56°C

AOBR12	F	AAAATTATCAGTGGCTCATGC	(GA) ₁₄	Perfeito	58°C
	R	AACTCACACTGTGTCTTTCACT			
AOBR13	F	AATGAGCCCATCTGGCTTTT	(TA) ₆	Perfeito	58°C
	R	AGAGAGGACCCACACACACC			
AOBR14	F	TGCTTGGGTATTGAGGGAAG	(CA) ₅	Perfeito	62°C
	R	ACAATGACCACACAGGTCCA			
AOBR15	F	AGTGATTGTTGAATGCATCA	(GA) ₁₈	Perfeito	58°C
	R	TGCAAAGTCATCGATCCAGT			
AOBR16	F	TACGCAATATGCTGGAAACG	(TC) ₅	Perfeito	60°C
	R	TAGGCGTGAAATCCAGCTTC			
AOBR17	F	AACACATCAAGTTTTCTCACACT	(AC) ₅	Perfeito	56°C
	R	TTCCCAGCTTGTTTGATGTG			
AOBR18	F	TGTGCAAGAACAAGCTTACTTACC	(TC) ₂₂	Perfeito	58°C
	R	TGTTTGTTGATTGTAGTTGTTTG			
AOBR19	F	CAACTTGCCACCAGGTCTTA	(TC) ₂₁ (TG) ₂ (TA) ₆ TG(CA) ₆	Imperfeito e composto	58°C
	R	CAGAGCGAACACCTATGTCC			
AOBR20	F	TCCAGCTTGTTTGATGTGAT	(TG) ₅	Perfeito	56°C
	R	ACACATCAAGTTTTCTCACACT			
AOBR21	F	GGTCCAGAAAAGCACGTAGGA	(AG) ₁₈	Perfeito	56°C
	R	CAGCAAAGAAATCACTGTGAGC			
AOBR22	F	GTGGTGAGCAAGGGAGAAAA	(AG) ₁₆	Perfeito	56°C
	R	CATCGACCACCACCATAG			
AOBR23	F	GAGGAAAAAGAAACGAGGAAGA	(AG) ₁₉	Perfeito	56°C
	R	CATTGTGGGTGTTGGAGTTG			

AOBR24	F	ACATAATTGGGCGTGATCGT	(AG) ₆	Perfeito	58°C
	R	GGCTTGAAACACTTACCTCTAAGC			
AOBR25	F	ACGGGCTCCTAAACTCCAT	(GA) ₂₁	Perfeito	60°C
	R	TGGGCAAATTCCATCATTCT			
AOBR26	F	ATTTGGGCGAATTCTACACG	(AG) ₁₆	Perfeito	56°C
	R	CGACAGCCAAACAAAACTGA			
AOBR27	F	ATCATGCCACTCGACAAAATG	(TC) ₆ TT(TC) ₁₆	Imperfeito	60 °C
	R	AAGGATAACTCAACATACCCGTCT			
AOBR29	F	CAGAAACCGCTCTCTCTGCT	(TC) ₉	Perfeito	60 °C
	R	GCGAGTTCGAAATGGGTAAA			
AOBR30	F	ATTTGGGCGAATTCTACACG	(AG) ₁₅	Perfeito	50 °C
	R	ACGCATCTCAAGGGATCTCA			
AOBR31	F	TGCGTGTCTTGTGCAAAAAT	(AG) ₁₇	Perfeito	58°C
	R	GCGTTTCTCACCATATCCA			
AOBR32	F	TCCGCGTTTTTATACAGTTTGC	(AG) ₁₆	Perfeito	50 °C
	R	TCCCATCATTGTTTCCCTCT			
AOBR33	F	ACCCATCAACAAAAGAACCA	(GT) ₁₄	Perfeito	48°C
	R	CTAATGGCGGCTAAAGATCG			
AOBR34	F	TAATGGGAAAAGAACGCGAAA	(AG) ₂₂	Perfeito	56 °C
	R	GCCGCCCAAGTTTTCTCT			
AOBR35	F	CAATCAAGGGACCACGAGTT	(AG) ₁₅	Perfeito	60 °C
	R	AAAGGATGAACCAGCGTGAC			
AOBR36	F	TTTAGCAGCAGGGGTATTTCG	(AG) ₁₇ AA (AG) ₆	Imperfeito	60°C
	R	ATATTCACTAAGCACAAAGCCTATCAA			

AOBR37	F	TTCAGAAGCAGGGTACTCG	(AG) ₉	Perfeito	56°C
	R	GCATCATCCCAATTACAACAA			
AOBR38	F	AGGGAGAGGGATAGGGAGGT	(AG) ₄ AA (AG) ₁₀	Imperfeito	60 °C
	R	ACTCATTCATTTGCAGCAG			
AOBR39	F	AAGGTGGAGATTCTTGTGTATAA	(AG) ₁₁	Perfeito	60°C
	R	CCAGCCAGCAGCTACATAGA			
AOBR40	F	AGAGATGAAGACGGCAGAGC	(TC) ₁₆	Perfeito	50°C
	R	GCGAGGATTGTGTTTGTAGC			
AOBR41	F	CCTTTGTAAAGCCTGAAAATGC	(AG) ₁₃	Perfeito	58°C
	R	AACTCAGGCTCAGCAAAACC			
AOBR42	F	GCCACCAGGTTTTAGGGTTT	(TC) ₉ CC (TC) ₁₂ TG (TA) ₆ TGTA (CA) ₆	Imperfeito e Composto	56°C
	R	ATAGCGGACCAGGACTCATC			
AOBR43	F	GACCAAACCCCAACAAACAC	(AG) ₂₁	Perfeito	48°C
	R	AGACCACCCTTTTTCTGAGG			
AOBR44	F	TTCTCTCTTCCATGGGAACC	(TC) ₉	Perfeito	60°C
	R	TCTGGGAAATTTTCGAGGTG			
AOBR45	F	GGGAGTGATAATGGAAGAAGGTT	(AG) ₁₅	Perfeito	48°C
	R	TACTTGATCCCCACGCTCTC			
AOBR46	F	AAATAGTAGACCCCCATGAGCA	(AC) ₁₃	Perfeito	50°C
	R	CAGCCTCATATGGTGGATGTT			
AOBR47	F	AAATCTTACCGGGAGGGAGA	(AG) ₁₅	Perfeito	60°C
	R	GAGGGGTCCAAGAATTATCCA			
AOBR48	F	ACAATACAAACAAATAGAATGACTGG	(AG) ₁₆	Perfeito	60°C
	R	AACAATGAACAACACTCTACAAAAGA			

AOBR49	F	GGGTAAATACAAAGGGGCACT	(AG) ₂₂	Perfeito	58°C
	R	GCACACCAGTCTCTCCCTCT			
AOBR50	F	TCTGATGTGCCTTTGCTTTG	(TC) ₁₆	Perfeito	58°C
	R	GGCCTCATTCATATTTTCACAA			
AOBR51	F	GAGGGTTGAATGGGTCAAAA	(AG) ₁₇	Perfeito	52°C
	R	TGCTTATTCATCCATCCAGTTG			
AOBR52	F	TGACGATGAAGACGAAGACG	(AG) ₁₂	Perfeito	52°C
	R	CAACAACGGTCACTTCCTCA			
AOBR53	F	GAGGAAAAAGAAACGAGGAAGA	(AG) ₁₉	Perfeito	52°C
	R	TTGGAGCTAGAATGGAGTGG			
AOBR54	F	AAAGATGCAAGCTGGGAAAA	(AG) ₂₂ A (AG) ₂	Imperfeito	58°C
	R	TGTGCAAGAACAAGCTCACC			
AOBR55	F	CACACGCCCTTTCTGATGTA	(AT) ₁₁	Perfeito	58°C
	R	TGAAATGTACAATGAGCCCAAC			
AOBR56	F	CATCAAACAACAGTACTGCCAAA	(AG) ₆ AA (AG) AA (AG) ₃ CG (AG) ₁₆	Imperfeito	58°C
	R	TCGTTCATATGCCTTAGTTGGA			
AOBR57	F	GCCACCAGGTTTTAGGGTTT	(TC) ₂₂ TG (TA) ₆ TGTA (CA) ₆	Imperfeito e composto	58°C
	R	AATAGCGGGCCAGGACTC			
AOBR58	F	CACAGAGCATCCGCTAAAACA	(TG) ₆ TACA (TA) ₆ CA (AG) ₂₂	Imperfeito e composto	58°C
	R	GCCACCAGGTTTTAGGGTTT			
AOBR59	F	GGGGCTGTTGTATTGTTTGG	(CCA) ₇	Perfeito	58°C
	R	GCGAAGCTTCTCTCCTTGAA			
AOBR60	F	TGAAAATGAAATGGAACTTTGG	(AG) ₈	Perfeito	58°C
	R	TTCATGTGAAGCACGGAAAA			

AOBR61	F	CTTTCATATGCCTTAGTTGGA	(TC) ₁₉	Perfeito	52°C
	R	CAGTGCTGCCAAAAATACAT			
AOBR62	F	GTGGGTAAGAGTGACAAAACG	(AG) ₂₁	Perfeito	54°C
	R	CTCATCTCTGCTCTGCTCTG			
AOBR63	F	ATTTGGGCGATTCTACACG	(TC) ₇	Perfeito	50°C
	R	TGCATGAAACACACATAGTCG			
AOBR65	F	TAAGGTGGAGATTCTTGTGT	(AG) ₄ AA(AG) ₁₂	Imperfeito e Composto	52°C
	R	GTGTTTTTCTTTTGCTTTTC			
AOBR66	F	GTGTGGGCAAAGCACACG	(AG) ₁₁	Perfeito	58°C
	R	TGTGTCCGTTCCCTTGTAGA			
AOBR67	F	CCTTCCGTCATGGCTACAAT	(TC) ₆	Perfeito	58°C
	R	AATGGGTGAATATGGGCTGA			
AOBR68	F	CAAACGTGAGAAATTGAGGAG	(AG) ₆		54°C
	R	TTTTCTCGCTTCTTACTCCA			
AOBR70	F	TAAGGCACTCCTTGTTTCCAGA	(TC) ₁₅	Perfeito	54°C
	R	GTGATGACGGGGGATTTTAT			
AOBR71	F	CTGAACTTGTTTCCAATCA	(AG) ₁₄	Perfeito	58°C
	R	GAGCTCAGTGGAGTGAGTGA			
AOBR72	F	TTCTGTGAGCGTCTGTGGTT	(GA) ₁₆	Perfeito	58°C
	R	GCCCTCTTCCCCTAGACTCA			
AOBR73	F	TGTTCCAGAAGGACAGGAGCA	(AG) ₁₅	Perfeito	58°C
	R	GGCTGGTGGCTCTTGAATTA			
AOBR74	F	AAGTCAGCAAGAGGGCAAAA	(AG) ₈ AA (AG) ₁₀	Imperfeito e Composto	56°C
	R	AGCTCCCTCTGAGGCTTACC			
AOBR75	F	TGGGCCCAATGTTCTTTATC	(AG) ₁₆	Perfeito	54°C
	R	GTGGTTCGAGGCTGATAGGA			
AOBR76	F	GCACTCGCAGAAAAGAGTTG	(AG) ₁₁	Perfeito	54°C

	R	GAAAATTGAAAAGAGATTGATTTGTG			
AOBR77	F	CACAGAGCATCCGTAACA	(AC) ₅ (AT) ₇	Composto	56°C
	R	ACTTGCCACCAGGTTTTAGG			
AOBR78	F	TGACTGGAAGGATTGTTTGTG	(AT) ₆	Perfeito	56°C
	R	TCAAACCATACTTATTTTTCCCTTATCA			
AOBR79	F	AATGAGCCCATCTGGCTTTT	(AT) ₈ (TG) ₆	Composto	58°C
	R	AGAGAGGACCCACACACACC			
AOBR80	F	TAACCAAAGCTCCCAATAGC	(AC) ₂ (AG) ₁₉	Composto	52°C
	R	ACTTTGCCACCAGGTTTTAG			
AOBR81	F	TCTGCAGCAACAAAGCTACG	(AG) ₁₄	Perfeito	52°C
	R	CAAGCTATGCATCCCAACG			
AOBR82	F	AATGGGAGTGATTTTGGGAAGAA	(AG) ₁₁	Perfeito	52°C
	R	GCTCTCTGGGTGTTTCACCT			
AOBR83	F	AAAACCGCGAGACCAAAAC	(AG) ₁₃	Perfeito	58°C
	R	GGTGGAGCTGTGCATATGATT			
AOBR84	F	CCCTCGACAAATGTCTTCCA	(AG) ₁₆ (GT) ₂	Composto	58°C
	R	ACCCATCAACAAAAGAACCAT			
AOBR85	F	ACGCCTGTCAACTTTGGAGT	(GTT) ₅	Perfeito	58°C
	R	CCCACAGATCCTCCACTTTC			
AOBR86	F	TAAGTACTGGAGGATGTCAGCAA	(AC) ₁₃ (AT) ₆	Composto	58°C
	R	GCCACTTCCCCATCACTATC			
AOBR87	F	TGTAAGCGTGAAAACCCAGA	(AG) ₂₅	Perfeito	58°C
	R	CCTGTCTCCTTTTGCAGGTC			
AOBR88	F	AACTGGGAATCTCTAAAGAGAGCA	(TC) ₁₄	Perfeito	58°C
	R	CAGCATCCCTAACATCGTCA			
AOBR89	F	TCAAGTCAGCAAGAGGGAAAA	(TC) ₁₃	Perfeito	58°C
	R	CCCTCTGATGCTTACCCAAG			

AOBR90	F	AGCAATTCCTCGAAGAACCA	(AT) ₈	Perfeito	58°C
	R	GAAGTTGCATTTTACTGCTCAATG			
AOBR91	F	CAAAAGGGTACTCAAACCTGGATG	(TC) ₂₁	Perfeito	56°C
	R	CCATCCAATAAACAAATATAAAAGG			
AOBR92	F	GATCTCTGTTGCGTGATCCA	(GT) ₇ (AC)(AT) ₆ (AC)(AG) ₂₂	Imperfeito e Composto	58°C
	R	TCTAACAAAGATCAGACATTTTCTTTT			
AOBR93	F	TTAGACCTTATGTATGAGTATCTGCTG	(AT) ₁₀ (AG) ₁₀	Composto	54°C
	R	CTCCGAAACAGGTCTTCACC			
AOBR94	F	TGTTCAGAAGGACAGGAGCA	(AG) ₈	Perfeito	56°C
	R	GTGATGACGGGGGATTTTAT			
AOBR95	F	CTCTTGCCATGGCGTCTG	(AG) ₁₅	Perfeito	56°C
	R	TGTGCCAGGAGAGAGATGAG			
AOBR96	F	GGCTGTAGTAGCAATGAAGCAA	(TC) ₁₂	Perfeito	52°C
	R	TTGGGGGAATTTTACACGTT			
AOBR97	F	GGGAGTGATTTTGGAGAAGG	(AG) ₅ GAA(AG) ₁₂	Imperfeito e Composto	58°C
	R	TACTTGATCCCCACGCTCTC			
AOBR98	F	TTCTGTGAGCGTCTGTGGTT	(AG) ₉	Perfeito	58°C
	R	TGGTGTGTCCCACACTCATC			
AOBR99	F	GGAGGCTGAGAGAAAAGCAA	(TC) ₈	Perfeito	58°C
	R	TCTCACTCACACCATTTGCAG			
AOBR100	F	TCAGTTCCGATCAGACACAC	(AG) ₁₀	Perfeito	56°C
	R	GCTTAGTGCTCAAAGCAACA			
AOBR101	F	TGTTGTTTGAGGGACAAGG	(AC) ₇	Perfeito	54°C
	R	ACAGTTGCTCCTCCTTCTA			
AOBR102	F	AAGAGAAGAAGTTGAAGAGAAGAGA	(TC) ₁₁	Perfeito	54°C
	R	ACATGCCCACGACAATTAT			
AOBR103	F	TCTGACACCAGTCAAATCGT	(TA) ₃ (GAA) ₂ (GA) ₁₆	Composto	50°C
	R	CTAGTGAATTTGGGCGAGTT			

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE CAJUEIRO

Entre os 100 novos marcadores microssatélites de cajueiro, quatorze foram selecionados para a obtenção de parâmetros genéticos (Figura 9) com base na genotipagem de 36 acessos do Banco de Germoplasma de Cajueiro. Os parâmetros genéticos estimados incluem número de alelos por loco, heterozigosidade esperada e observada, valores do PIC e Poder de Exclusão. Exemplos de eletroferogramas identificando alelos de cada um dos 14 locos microssatélites selecionados de três acessos de cajueiro (CCP 1001, CP 96 e CP 77) são apresentados na Figura 10.

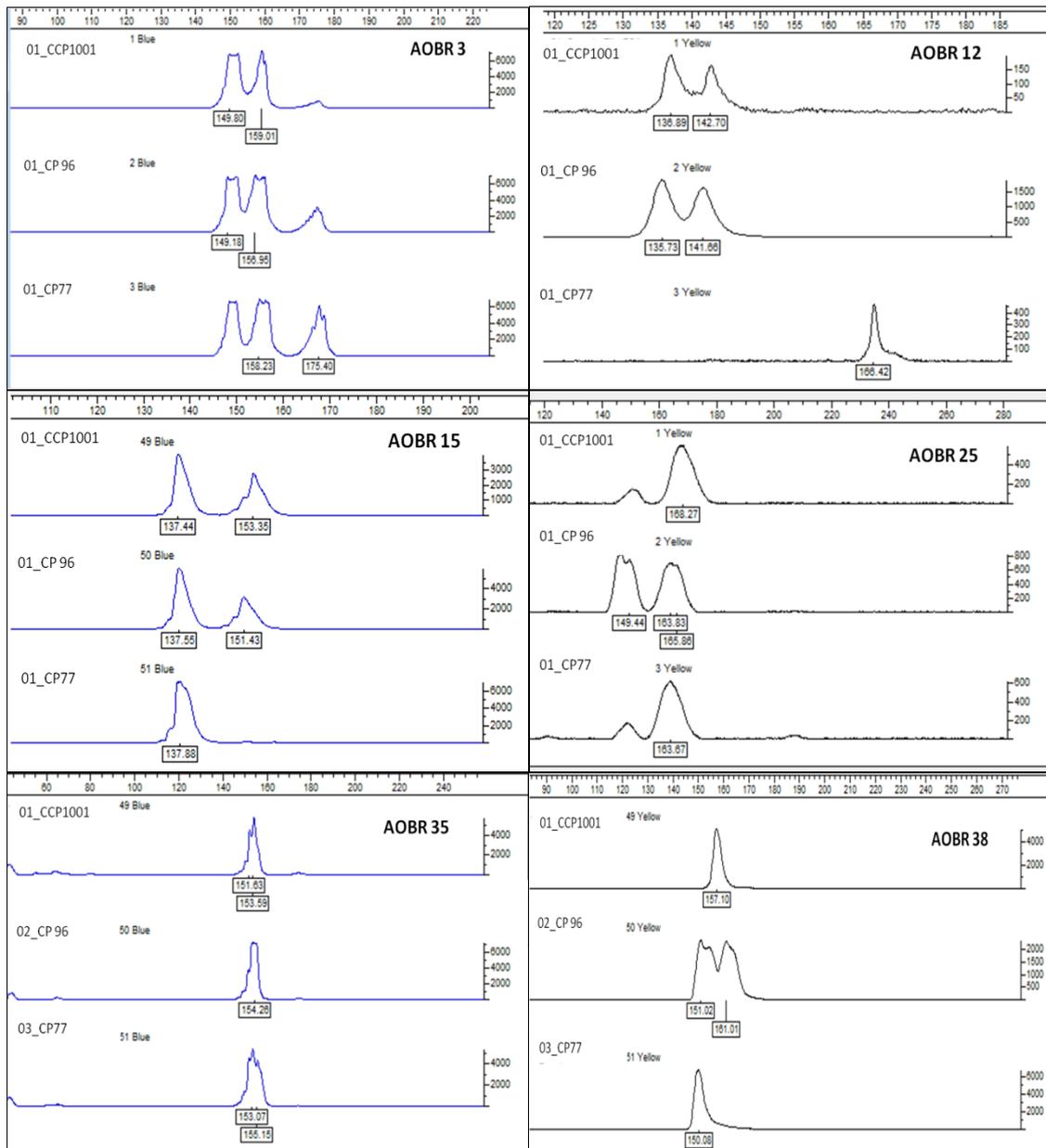


Figura 10. Eletroferogramas de 14 marcadores microssatélites de cajueiro apresentando os genótipos de três acessos (CCP1001, CP96 e CP77), selecionados para a obtenção de parâmetros genéticos.

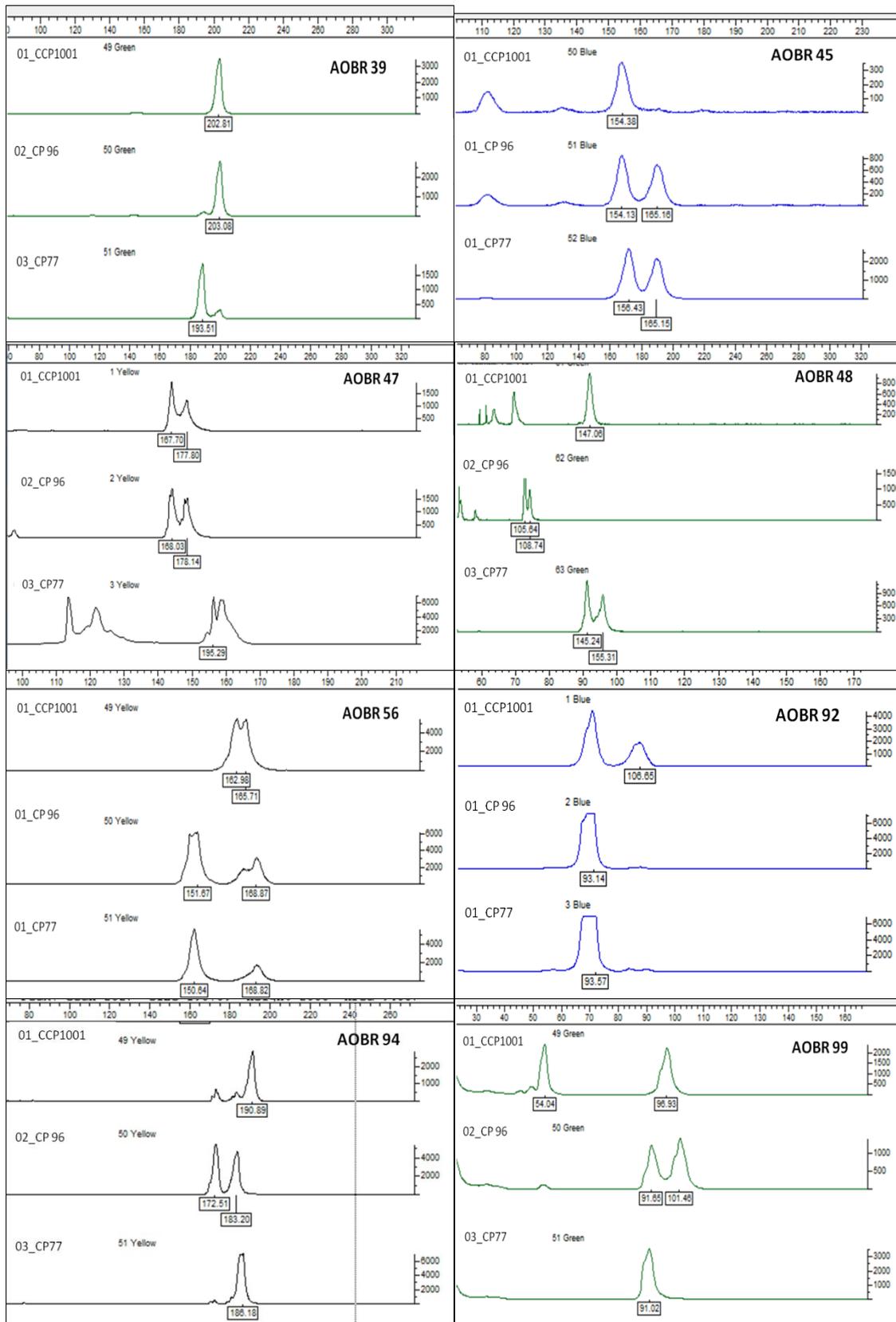


Figura 10. Continuação.

A distribuição de frequência alélica de cada marcador microssatélite é apresentada na Figura 11. Foi observado que:

- a) Alguns marcadores microssatélites, como AOBR 48, apresentam distribuição de frequência mais equitativa. Nestes locos a maioria dos alelos apresenta frequência similar e nenhum alelo possui mais do que 40% de frequência. Tais marcadores podem ser considerados mais informativos para estudos de diversidade;
- b) Os marcadores deste tipo, em geral, apresentaram os maiores valores de PIC;
- c) Alguns marcadores apresentaram distribuição de frequência desequilibrada, onde observa-se a predominância de um ou outro alelo, geralmente com frequência acima de 60% na amostra testada. É o caso, por exemplo, dos marcadores AOBR 12 e AOBR 15. Não são, portanto, os marcadores mais adequados para estudos genéticos, fato corroborado por terem sido dois dos quatro marcadores com os menores valores de PIC e de Poder de Exclusão.
- d) A distribuição de frequência alélica depende, naturalmente, das relações de vínculo genético entre as amostras analisadas. O estudo foi realizado sem que se tivesse conhecimento *a priori* do vínculo genético entre os 35 acessos de *A. occidentale* analisados com os 14 marcadores microssatélites.

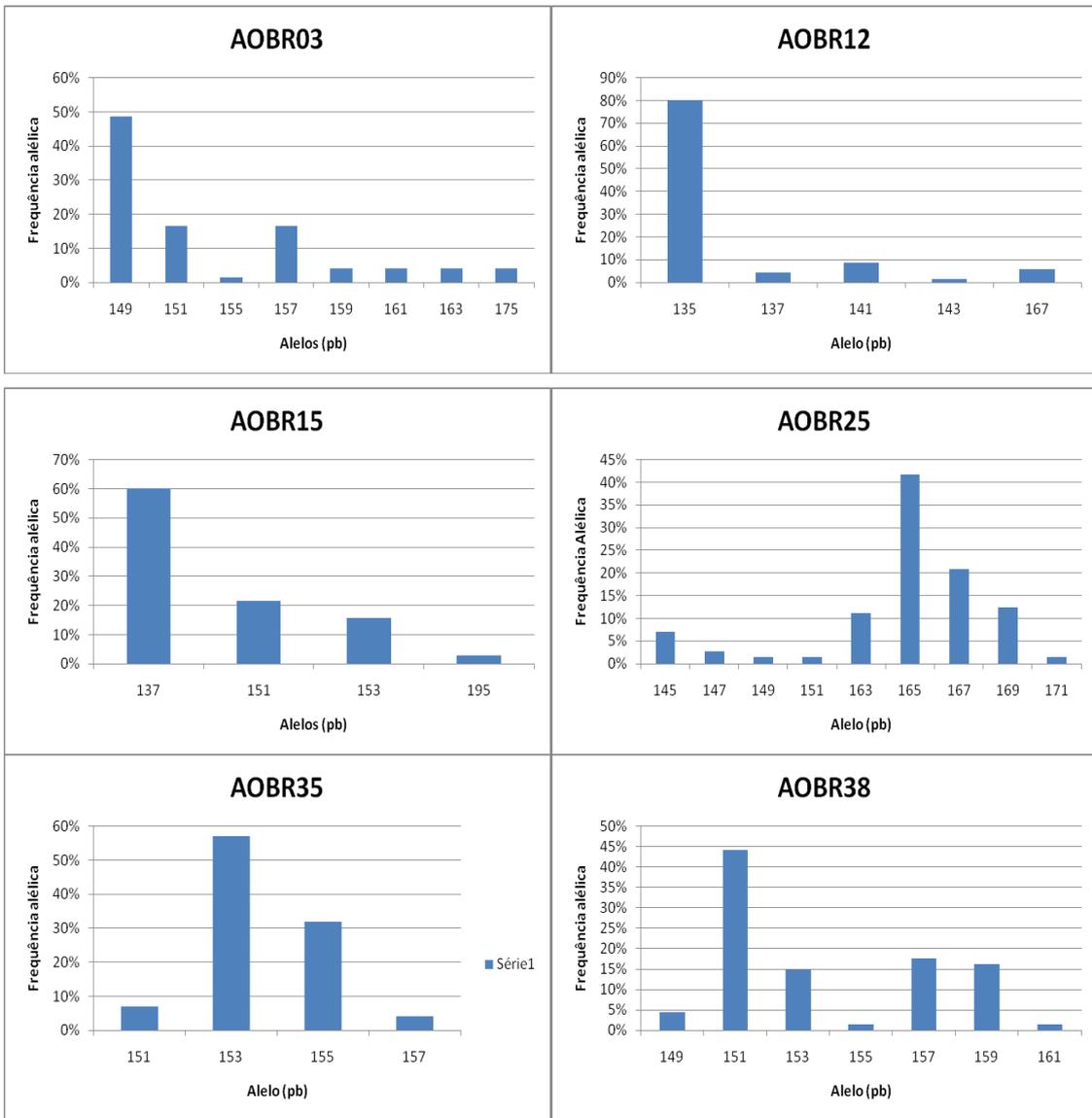


Figura 11. Distribuição de frequência alélica dos 14 marcadores microsatélites selecionados para estimativa de parâmetros genéticos.

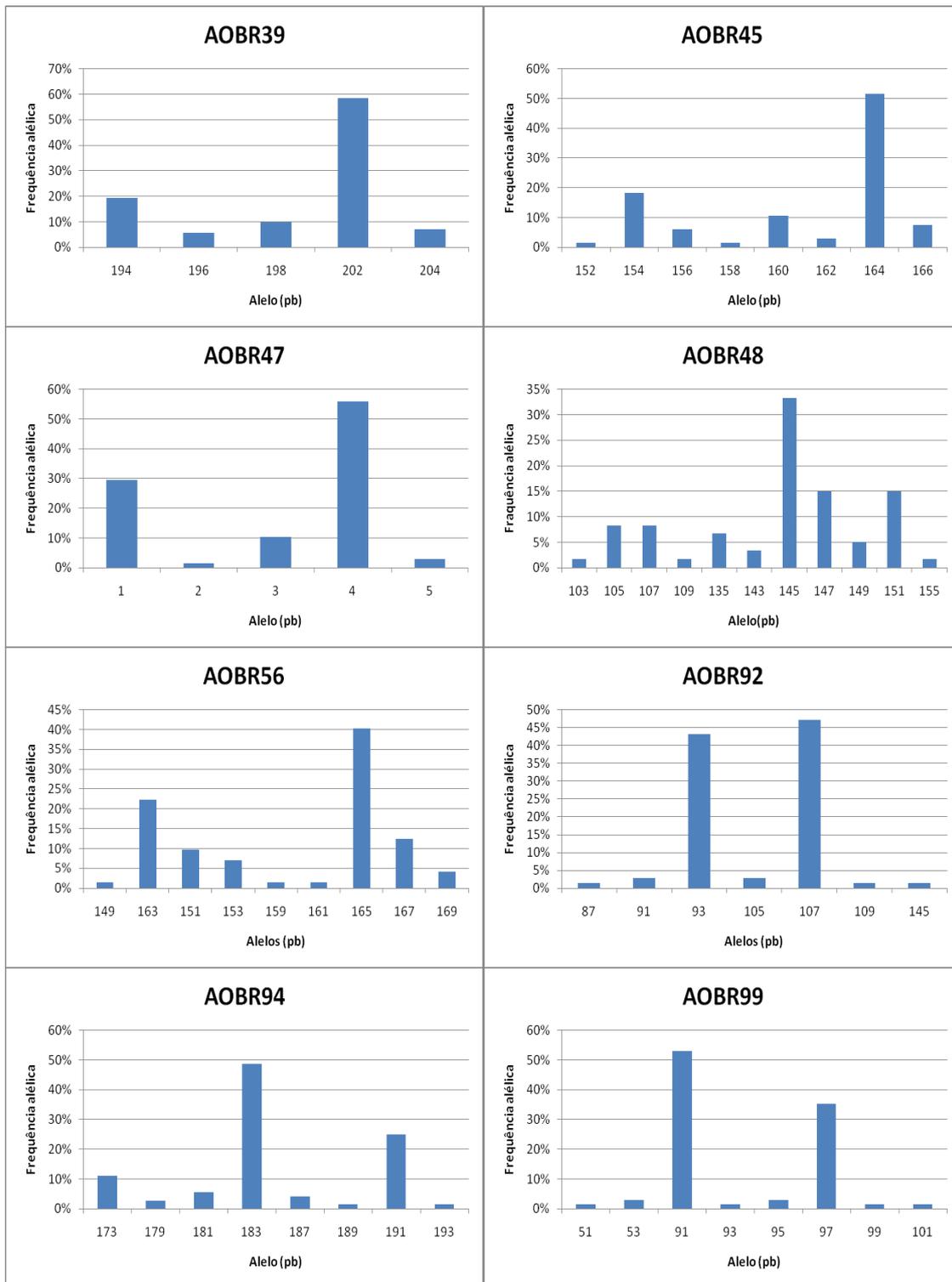


Figura 11. Continuação

A média de número de alelos encontrados nos locos testados foi de 7, variando de 4 alelos, encontrados para os marcadores AOB 15 e AOB35, a 11 alelos, encontrados para o loco AOB48. Para os 14 marcadores testados a média de PIC obtida foi 0,62, e os marcadores que apresentaram maior

conteúdo de informação de polimorfismo foram AOB48 (0,830) e AOB56 (0,732), enquanto o de menor PIC foi AOB12 (0,396)(Tabela 3).

A Heterozigosidade média observada (H_o) foi baixa (0,470643) nos 36 acessos estudados, comparado aos valores da Heterozigosidade esperada ($H_e = 0,648857$), considerando que valores próximos a 1,0 indicam um alto nível de indivíduos heterozigotos na amostra testada. Esse baixo valor de heterozigosidade observada pode ser resultante da amostra de germoplasma selecionada para análise, uma vez que boa parte dos acessos testados é composta por clones em uso no programa de melhoramento, os quais não necessariamente compõem uma amostra representativa da diversidade genética da espécie.

Os valores do PIC refletem o potencial do emprego do marcador na detecção de polimorfismo entre as amostras testadas (Blair et al., 2002), e o PIC médio foi considerado alto (0,620). Valor semelhante de PIC foi encontrado em cacau (*Moniliophthora perniciosa*), com média também de 0,62. Em avelã (*Corylus avellana* L), obteve-se como a média de PIC 0,73, maior que o encontrado no atual estudo. Estes resultados indicam a potencial eficiência do emprego de marcadores microssatélites em estudos de mapeamento genético do cajueiro.

Baterias de marcadores microssatélites selecionados para alto Poder de Exclusão, como os marcadores AOB 48 (0,7153) e AOB56 (0,5739) possuem a aplicabilidade em testes de identidade genética para a discriminação de acessos de cajueiro (Tabela 3).

Tabela 3. Número de indivíduos analisados (N), número de alelos (A), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e Poder de Exclusão (PE) estimados para os 14 locos microssatélites selecionados com base na genotipagem de 36 acessos de *Anacardium occidentale* L.

Marcador	N	A	He	Ho	PIC	PE
AOBR3	36	8	0,711	0,694	0.667	0,509123
AOBR12	35	5	0,352	0,142	0.396	0,230276
AOBR15	35	4	0,577	0,514	0.534	0,372682
AOBR25	35	9	0,741	0,200	0.725	0,568316
AOBR35	36	4	0,575	0,389	0.497	0,326647
AOBR38	34	7	0,735	0,588	0.711	0,566700
AOBR39	36	5	0,613	0,111	0.572	0,398539
AOBR45	33	8	0,689	0,515	0.697	0,544811
AOBR47	34	5	0,598	0,471	0.591	0,408445
AOBR48	30	11	0,835	0,433	0.830	0,715345
AOBR56	36	9	0,767	0,833	0.732	0,573954
AOBR92	36	7	0,598	0,444	0.518	0,336765
AOBR99	34	8	0,601	0,588	0.567	0,405921
AOBR94	36	8	0,692	0,667	0.647	0,482741
Média	34,71429	7	0,648857	0,470643	0.620	0,460019

Para fins comparativos, os mesmos parâmetros genéticos foram estimados utilizando-se apenas os 8 acessos de cajueiro comum (Tabela 4) e, noutra vertente, todos os 29 acessos de cajueiro anão precoce (Tabela 5), além de 8 acessos de cajueiro anão precoce sorteados (Tabela 6). Estes parâmetros foram utilizados para se comparar os resultados entre as diferentes amostras, com vistas a detectar potenciais padrões biológicos ou ainda divergências que podem ocorrer por desconhecimento de vínculo genético entre os acessos utilizados na análise.

Tabela 4. Número de alelos por loco (A), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), estimados para cada um dos 14 locos microssatélites analisados com base na genotipagem de 8 acessos de cajueiro comum.

Locus	A	He	Ho	PIC
AOBR3	6	0,778947	1,000000	0,702525
AOBR56	7	0,873684	1,000000	0,807825
AOBR15	2	0,268421	0,300000	0,222488
AOBR12	3	0,589474	0,200000	0,499200
AOBR45	4	0,607843	0,666667	0,589688
AOBR25	7	0,815789	0,500000	0,743913
AOBR35	2	0,521053	0,500000	0,372488
AOBR38	6	0,616667	0,375000	0,658125
AOBR39	4	0,721053	0,200000	0,626988
AOBR47	3	0,522876	0,444444	0,535000
AOBR48	6	0,878788	0,666667	0,743925
AOBR92	5	0,442105	0,400000	0,400125
AOBR99	4	0,591667	0,250000	0,634088
AOBR94	6	0,826316	0,700000	0,756188
Média	4,642857	0,646763	0,514484	0,592326

Tabela 5. Número de alelos por loco (A), Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), estimados para cada um dos 14 locos microssatélites analisados com base na genotipagem de 29 acessos de cajueiro anão precoce.

Locus	Alelos	He	Ho	PIC
AOBR3	6	0,816667	0,750000	0,730286
AOBR56	6	0,783333	0,875000	0,702209
AOBR15	4	0,708333	0,500000	0,616425
AOBR12	4	0,571429	0,285714	0,585999
AOBR45	5	0,666667	0,666667	0,680481
AOBR25	3	0,483516	0,000000	0,524414
AOBR35	3	0,341667	0,375000	0,294403
AOBR38	4	0,708333	0,500000	0,616425
AOBR39	4	0,525000	0,125000	0,458221

AOBR47	4	0,691667	0,750000	0,581512
AOBR48	6	0,757576	0,500000	0,734680
AOBR92	3	0,641667	0,375000	0,516327
AOBR99	3	0,633333	0,625000	0,511231
AOBR94	5	0,700000	0,500000	0,509827
Média	4,285714	0,644942	0,487670	0,5758885

Tabela 6. Número de alelos por loco (A), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), estimados para cada um dos 14 locos microssatélites analisados com base na genotipagem de 8 acessos sorteados de cajueiro anão precoce.

Locus	Alelos	He	Ho	PIC
AOBR3	8	0,636501	0,576923	0,5948107
AOBR56	7	0,687783	0,769231	0,6276549
AOBR15	4	0,65551	0,600000	0,6158767
AOBR12	4	0,22449	0,120000	0,2678059
AOBR45	8	0,638298	0,458333	0,6530217
AOBR25	6	0,553469	0,080000	0,5396853
AOBR35	4	0,566365	0,346154	0,5042143
AOBR38	5	0,746606	0,653846	0,6873429
AOBR39	5	0,52187	0,076923	0,4792839
AOBR47	4	0,619592	0,480000	0,5741830
AOBR48	11	0,804965	0,375000	0,7945351
AOBR92	4	0,555053	0,461538	0,4619323
AOBR99	6	0,595777	0,692308	0,5006308
AOBR94	7	0,61991	0,653846	0,5529068
Média	5,928571	0,601871	0,45315	0,5609918

A comparação dos dados das Tabelas 3, 4, 5 e 6 indica que o maior valor de He foi encontrado utilizando todos os 35 acessos. No entanto, ao se comparar os resultados dos dois tipos morfológicos distintos de cajueiro em amostras de mesmo tamanho, foi observado que os valores médios de Ho e PIC entre os acessos de cajueiro com são maiores. Isso parece indicar maior endogamia entre os acessos de cajueiro anão precoce do que entre os acessos de cajueiro anão. A exploração dos dados de genotipagem, bem como análise de um maior número de acessos, poderá confirmar essa observação.

Foi feita uma tentativa de estabelecimento de uma bateria mínima de marcadores microssatélites de cajueiro com base no Poder de Exclusão individual (Tabela 3). Para isso, selecionou-se oito marcadores que apresentaram os maiores valores de PE (AOBR 3, AOBR 25, AOBR 38, AOBR 45, AOBR 47, AOBR 48, AOBR 56 e AOBR 94). O Poder de Exclusão combinado desta bateria totalizou 99,8529%, enquanto o PE combinado dos 14 marcadores foi 99,9994%. Esta seleção representa, portanto, uma bateria informativa de marcadores, adequada a estudos de vínculo genético, em particular em testes de identidade genética. Utilizando-se apenas os oito marcadores selecionados, têm-se um resultado similar ao uso de todos os marcadores testados, porém com menor tempo e custo para a geração de informação.

5.3. ANÁLISE DE VÍNCULO GENÉTICO ENTRE AMOSTRAS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE CAJUEIRO.

Para avaliar as relações de vínculo genético entre as 36 amostras de *A. occidentale* e uma amostra de *A. microcarpum* genotipadas neste estudo, foi realizada uma análise de similaridade genética com base no coeficiente de banda (*band coefficient*). Os dados apontam as relações de vínculo genético entre os acessos de cajueiro considerados na análise através de agrupamentos entre os mesmos na forma de dendrograma (Figura 12). Deve ser mencionado que foram observadas probabilidades similares de ocorrência de diferentes topologias para algumas ramificações do dendrograma. Os dados de similaridade genética indicam que é possível distinguir os diferentes acessos de cajueiro utilizando-se a bateria de marcadores microssatélites empregada neste estudo, e que há clara aglutinação de alguns grupos de acessos entre si devido à alta similaridade genética.

Foi observada, inicialmente, a formação de dois grupos principais, com a similaridade de 36% (Figura 12). O primeiro grupo caracteriza-se por ser formado por todos os acessos de cajueiro anão precoce, apresentando subgrupos de alta similaridade genética (CCP 76 e BRS 253). O acesso BRS 275, resultante do cruzamento entre um cajueiro anão precoce e um cajueiro

comum, também foi incluído neste conjunto. O segundo grupo é formado pelos acessos de cajueiro comum e um acesso da espécie *Anacardium microcarpum*. Os acessos de cajueiro comum testados são bem mais diversos que os de cajueiro anão, com a máxima similaridade de aproximadamente 66% (CP 18 e C36), e a mínima de aproximadamente 40%, corroborando os resultados observados de PIC e Ho apresentados anteriormente. É interessante observar que o acesso de cajueiro comum BRS 274 não foi agrupado nem com os acessos de cajueiro comum nem com os acessos de cajueiro anão precoce.

Cabe ressaltar os seguintes aspectos:

(a) foram observados dois agrupamentos principais dos acessos do Banco de Germoplasma. Um grupo inclui 29 acessos de cajueiro anão precoce, que apresentaram a similaridade máxima de 80% entre os acessos (AA 119-3 e CAPI1) e a maior distância de aproximadamente 44%. O outro agrupamento inclui os acessos de cajueiro comum e o acesso da espécie *Anacardium microcarpum*, com a máxima similaridade de aproximadamente 63% (CP 96 e C28), e mínima de aproximadamente 40%, fato que corrobora os resultados observados de PIC e Heterozigidade observada nos acessos separados por morfotipo.

(b) são fortes os indicativos de que os acessos de cajueiro anão precoce e de cajueiro comum são originários de populações distintas, visto que aglutinam-se em grupos distintos com base nos valores de coeficiente de similaridade estimados par-a-par;

(c) o acesso representativo da espécie *Anacardium microcarpum* foi agrupado juntamente com acessos de cajueiro comum. Esperava-se que este acesso, por se tratar de espécie distinta, atuasse como *outgroup*, ou grupo externo aos dois grupos detectados (comum e anão precoce). Após esta constatação do agrupamento com acessos de cajueiro comum, há de se verificar as características que distinguem as espécies *Anacardium microcarpum* e *Anacardium occidentale* que, ao invés de espécies distintas, poderiam pertencer a um mesmo complexo de espécies, uma vez que cruzam entre si e são semelhantes morfologicamente.

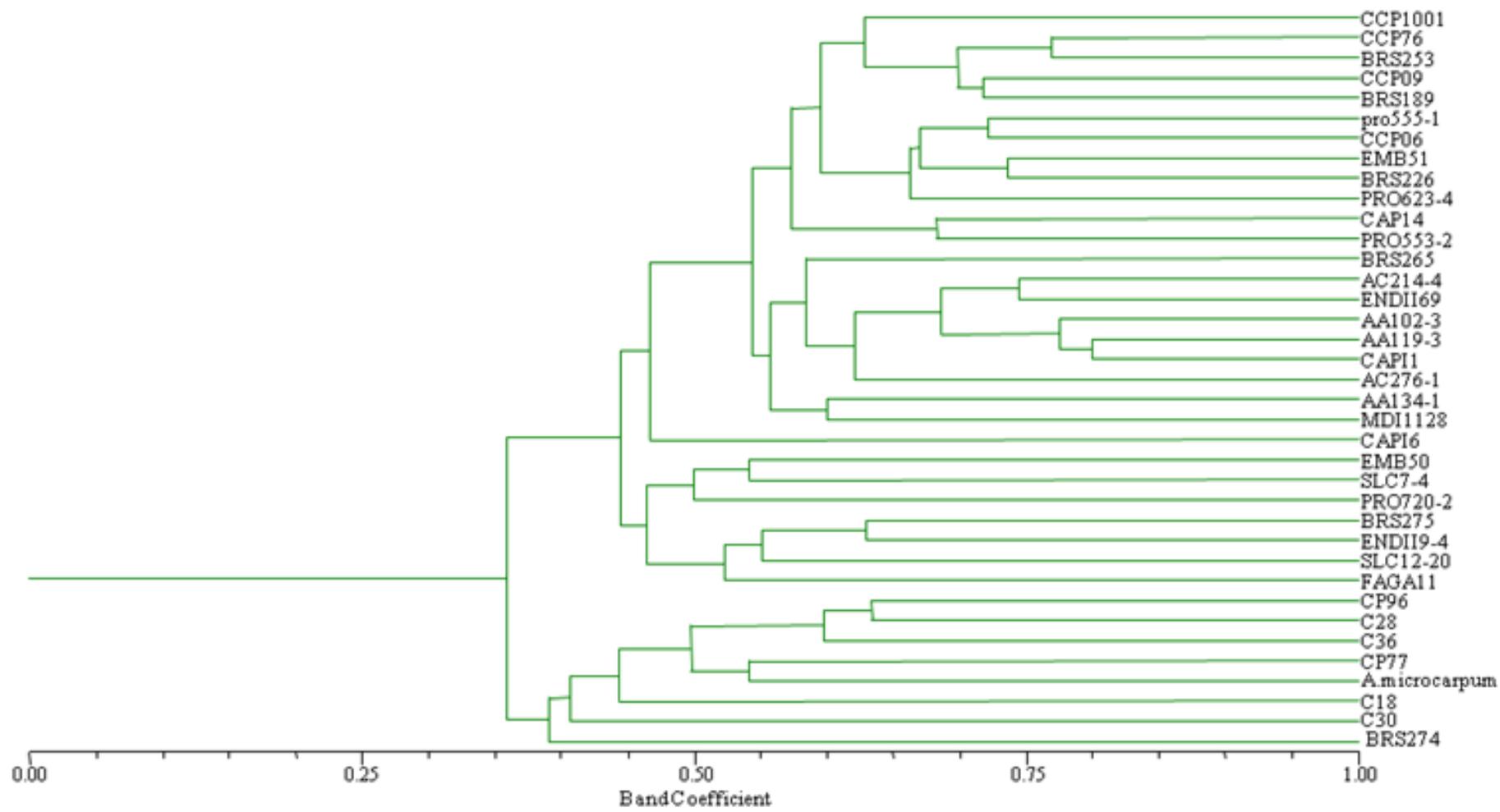


Figura 12. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, baseado em distâncias genéticas entre cada par de acessos calculado pelo coeficiente BAND, entre 36 acessos de cajueiro (*A. occidentale*) e um acesso de *A. microcarpum*.

5.4 CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO INCLUINDO NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES DE CAJUEIRO

Entre os 100 novos marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, 11 apresentaram segregação de alelos do genitor cajueiro anão precoce (CCP 1001) na população F1. Estes marcadores foram empregados em análise de mapa, juntamente com os dados de genotipagem utilizados em trabalho anterior (Cavalcanti & Wilkinson, 2007). Da mesma forma, outros 21 marcadores microssatélites apresentaram segregação de alelos do cajueiro comum (CP 96) na população F1, e foram utilizados para construir um mapa genético deste genitor. Somente três dos 100 marcadores testados (Figura 13) apresentaram segregação de alelos dos dois genitores na população F1 (Tabela 7), totalizando 29 marcadores passíveis de mapeamento nesta população. Cavalcanti & Wilkinson (2007) observaram que apenas 8,3% dos marcadores microssatélites apresentaram segregação de alelos dos dois genitores na população F1, 25% para o genitor CCP1001 e 67% para o genitor CP 96.

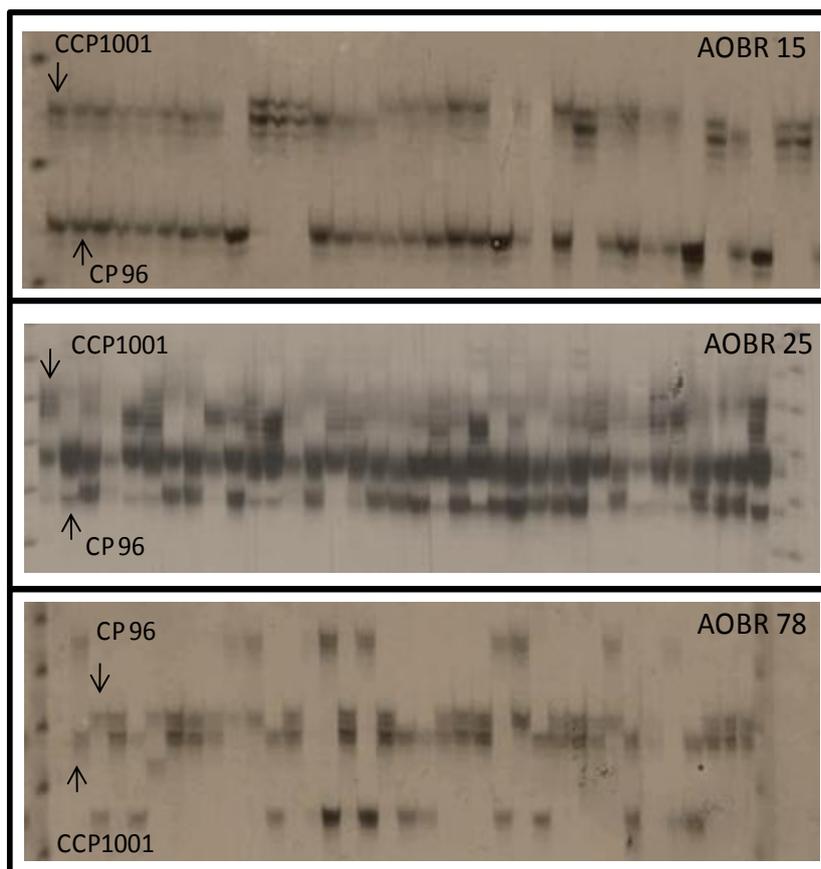


Figura 13. Marcador microsatélite AOB 78 apresentando segregação de alelos de ambos os genitores (CCP 1001 e CP 96) na população F1 em gel de eletroforese vertical em poliacrilamida a 5% de concentração em condições desnaturantes e corados com nitrato de prata

Tabela 7. Nome do novo marcador microsatélite, genitor cujos alelos segregam na população F1, evidência de distorção de segregação mendeliana significativa (valor chi-quadrado) e presença ou ausência no mapa saturado.

Marcador	Genitor cujos alelos segregam na população F1		Distorção	Mapa
	CCP1001 (Mãe)	CP 96 (Pai)		
AOBR 1	-	X	-	X
AOBR 3	-	X	-	-
AOBR 12	-	X	-	X
AOBR 15	X	X	-	-
AOBR 25	X	X	-	-
AOBR 35	X	-	-	X
AOBR38	-	X	-	-
AOBR 39	-	X	-	-

AOBR 45	X	-	-	-
AOBR 47	-	X	-	-
AOBR 48	-	X	-	-
AOBR 49	X	-	-	X
AOBR 56	-	X	-	-
AOBR 58	-	X	-	-
AOBR 59	-	X	-	-
AOBR 60	X	-	-	-
AOBR 61	-	X	X	-
AOBR 66	X	-	-	X
AOBR 70	-	X	-	X
AOBR 72	X	-	-	-
AOBR 73	-	X	-	X
AOBR 76	-	X	X	X
AOBR 77	X	-	-	-
AOBR 78*	X	X	x	X
AOBR 83	-	X	-	X
AOBR 90	-	X	-	X
AOBR 92	X	-	X	-
AOBR 94	-	X	-	-
AOBR 99	-	X	-	-

Marcadores em negrito indicam segregação para ambos os parentais. * Marcador que foi incorporado ao mapa de ambos os parentais.

Foram gerados dois mapas genéticos: um para o genitor anão precoce CCP 1001(feminino) (Figura 14) e outro para o genitor tipo comum CP 96 (masculino) (Figura 15). A partir desta informação, foram mapeados os QTLs de três características para os dois mapas: resistência a mofo-preto, altura da planta e diâmetro da copa.

5.4.1 Mapa genético do genitor masculino (tipo comum CP 96):

No mapa genético do genitor masculino (Figura 14), observou-se que dos 20 novos marcadores microssatélites passíveis de mapeamento, 8 foram incorporados nos diferentes grupos de ligação (AOBR1, AOBR 12, AOBR 70, AOBR 73, AOBR 78, AOBR 83 e AOBR 90). O mapa é composto por 106 marcadores moleculares (AFLP e microssatélites) distribuídos em 25 grupos de ligação totalizando 1.133,6 cM. A distância média entre marcadores é de 10,7 cM. A maior distância entre dois marcadores foi de 36,4 cM (grupo de ligação M7a). Observou-se que a distância média entre os marcadores foi maior que a encontrada em Cavalcanti & Wilkinson (2007), provavelmente porque o valor mínimo de LOD utilizado no presente trabalho foi igual a 5,0, numa condição estatística mais estridente do que no estudo anterior. O número de marcadores por grupo de ligação variou de dois (M9, M10, M13, M16, M18, M19b, M19b e M22) a 13 (M1). O comprimento dos grupos de ligação variou de 9,6 cM (M16) a 159 cM (M1).

Os grupos de ligação mais densos em marcadores moleculares foram M1 e M15, com distância média entre marcadores de 12,33 cM e 9,25 cM, respectivamente. A análise possibilitou a obtenção de 25 grupos de ligação, em contraste com os 23 obtidos por Cavalcanti and Wilkinson (2007). O motivo provável dessa diferença é que os grupamentos M11 e M19 do mapa de referência foram quebrados em dois grupos de ligação no atual trabalho (M11a e M11b e M19a e M19b). Mesmo utilizando um valor de LOD igual a 3,0 não foi possível aglutinar os segmentos de marcadores desses subgrupos.

No presente trabalho foi necessária a utilização de um valor de LOD igual a 4,0 para a obtenção dos grupos de ligação M5, M6, M7, M18 e M23, que apresentam composição e ordem de marcadores semelhantes aos grupos do mapa já publicado. Observou-se que os grupos M1, M2b, M3, M6, M7 e M8 apresentam inversões na ordem de dois locos (Figura 13- sublinhados).

Por outro lado, os grupos de ligação M4, M5, M12, M16, M21 e M22 não tiveram alterações na ordem ou composição do grupo, apesar das distâncias em cM terem sido modificadas devido ao uso de diferentes funções de mapa no

presente trabalho (Kosambi) e no estudo anterior (Cavalcanti et al, 2007 – função Haldane).

Os grupos de ligação que mais apresentaram modificações foram M15, onde 7 marcadores não foram agrupados e houve modificação na ordem dos locos, e M10, onde não foi observada evidência de ligação para os marcadores que o compõem (Cavalcanti and Wilkinson (2007). Nos grupos M14 e M18 apenas um marcador não foi incluído (respectivamente 13CG112 e 02CY055), enquanto três marcadores não foram incluídos no grupo M2b (22By086, Aocc55 e 04CG163)

Dois locos (AOBR 76 e AOBR 78) mapeados no mapa genético do genitor masculino (tipo comum CP96) apresentaram evidência de distorção mendeliana. Segundo Liu (1998), os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos, ou seja, a inclusão de marcadores em uma região do genoma, quando na realidade ele não mapeia naquela região. Alguns autores recomendam o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (Yao et al., 1999; Bearzoti, 2000). No entanto, há relatos do uso de marcadores com distorções mendelianas na construção de mapas de ligação em inúmeros estudos. Mecanismos de seleção pré- ou pós zigóticos explicam, em parte, tais desvios (Kubisiak et al.,1995; Conner et al., 1997; Heusden et al., 2000, Cavalcanti et.al., 2007). Além disso, segundo Liebhart et al.(2003), descartar tais marcadores significam perda de informação valiosa. Portanto, apesar de serem distorcidos a 5% de significância, marcadores AOBR 76 e AOBR 78 foram integrados a grupos já existentes e ligados a marcadores não distorcidos para a segregação mendeliana.

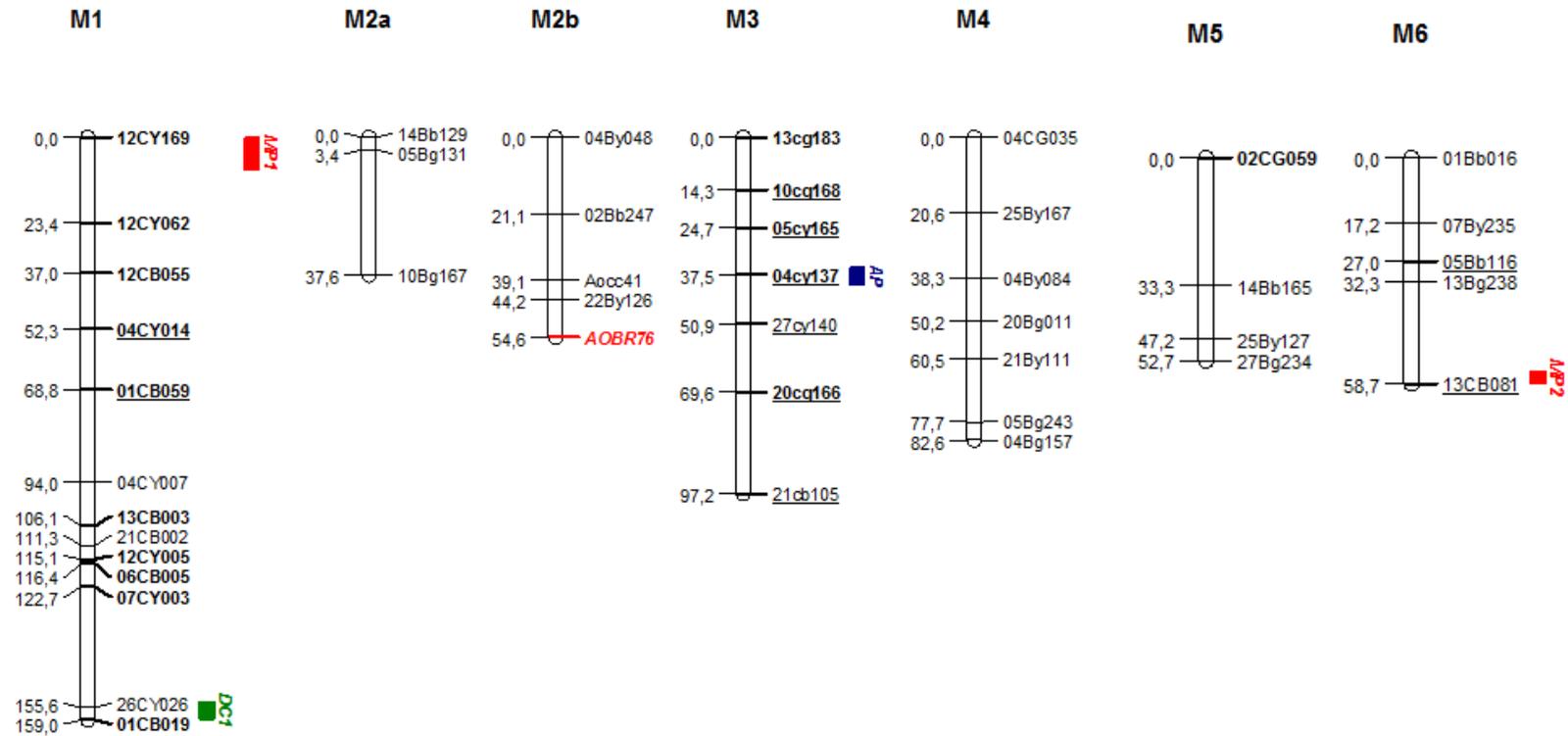


Figura 14. Mapa genético do genitor masculino (CP 96), desenvolvido com base em população F1 derivada do cruzamento entre o cajueiro anão precoce (CCP 1001) e o cajueiro comum (CP 96). Cada grupo de ligação é representado por uma barra, com os marcadores identificados à direita e a ordem e as distâncias de recombinação (cM) à esquerda. Os grupos de ligação são identificados de acordo com mapa anterior desenvolvido por Cavalcanti & Wilkinson (2007). Os locos em vermelho representam os marcadores microsatélites desenvolvidos neste trabalho, os sublinhados representam marcadores que tiveram suas posições modificadas em relação ao mapa anterior, e em negrito estão os marcadores comuns aos mapas dos genitores masculino e feminino.

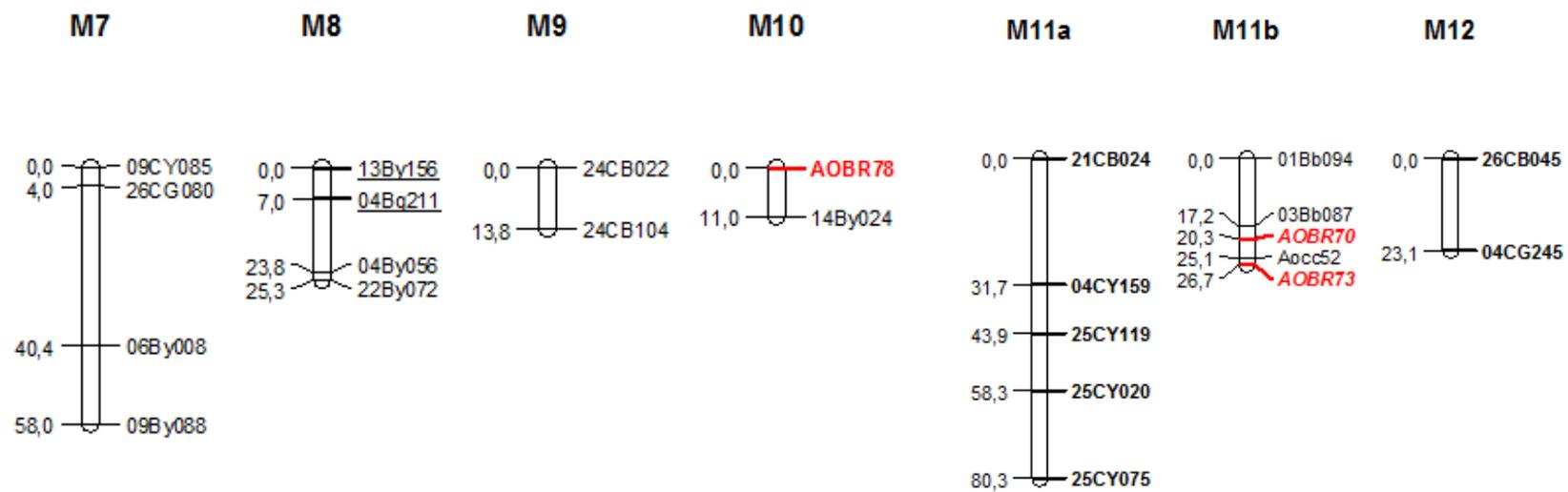


Figura 14.Continuação

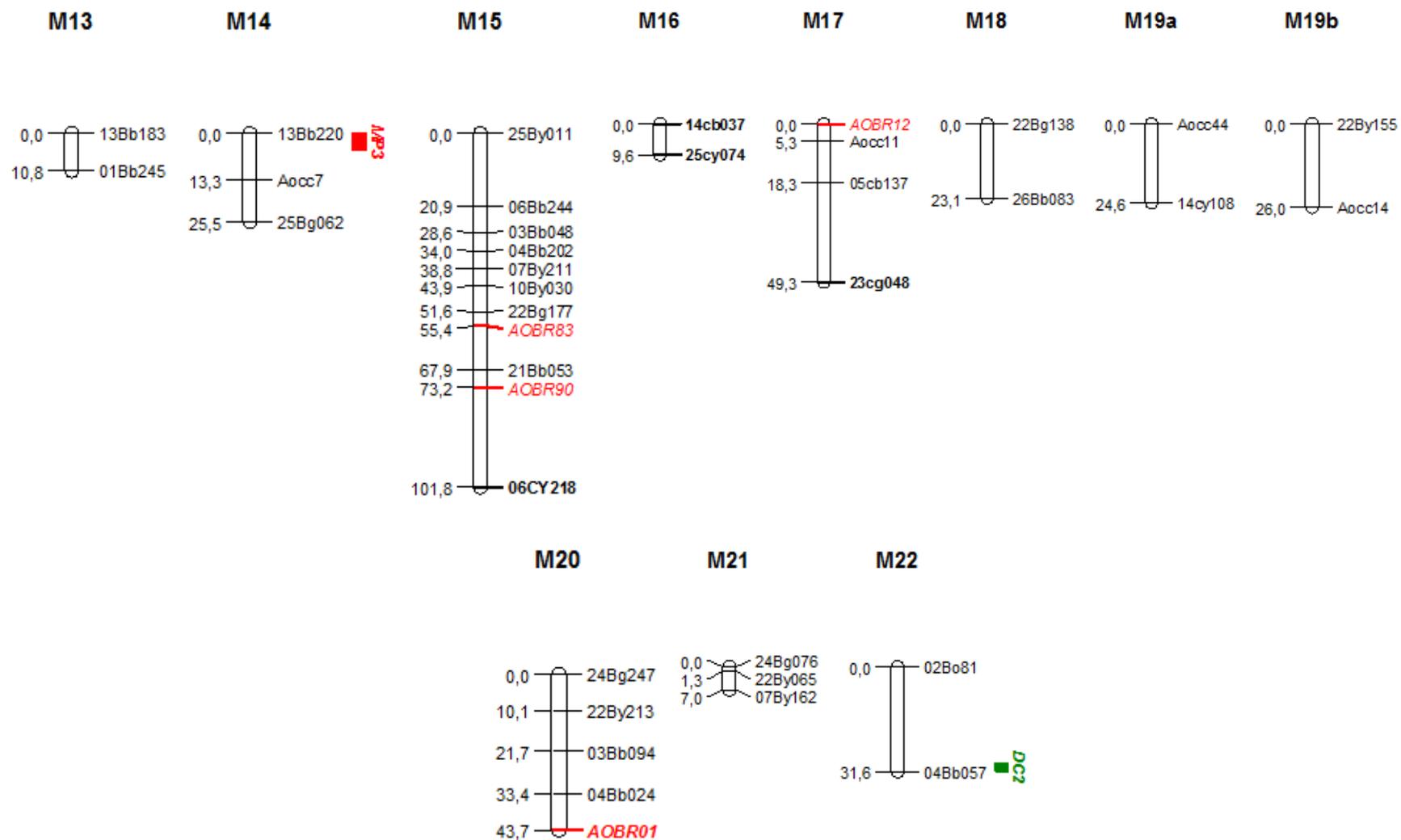


Figura 14.Continuação.

5.4.2 MAPEAMENTO DE QTLs NO GENOMA DO GENITOR MASCULINO (TIPO COMUM- CP 96)

Foram realizadas análises estatísticas para identificação de QTLs associados ao controle genético de resistência ao Mofo-Preto, Diâmetro da Copa e Altura da Planta no genoma do genitor masculino (tipo comum, CP96). Os métodos de detecção de QTLs incluíram a análise de marcas simples, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto.

Altura da planta - foram identificadas quatro regiões do genoma associadas ao controle da característica Altura da Planta pela análise de marcas simples (Tabela 8), próximas aos marcadores 20cg166 (grupo de ligação M3), 07By235 (grupo de ligação M6), 14By024 (grupo de ligação M10) e 26Bb083 (grupo de ligação M18), sendo este último o de maior efeito detectado no fenótipo, explicando 8,79 % da variação.

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTLs de Altura da Planta. No entanto, na análise de mapeamento por intervalo composto, foi detectado apenas um QTL associado a AP (no intervalo do grupo de ligação M3) (Figura 16), utilizando-se o cofator 10. Este QTL explica 5,95% da variação fenotípica.

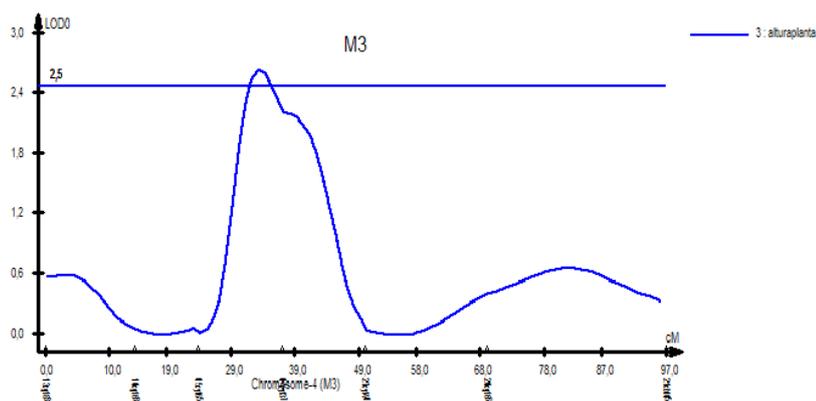


Figura 15. QTL identificado para a característica Altura da Planta, no grupo de ligação M3 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.

Diâmetro da copa - Pela análise de marca simples, foram identificados três marcadores associados à característica Diâmetro da Copa (Tabela 8), incluindo: 01CB019 no grupo de ligação M1, 06CY218 no grupo de ligação M15 e 04Bb057 no grupo de ligação M22. Destes marcadores, 04Bb057 no grupo de ligação M22 foi o que se mostrou mais significante, pois explica 15,18% do QTL (Tabela 8).

Tabela 8- Tabela 8. Marcadores associados às características Altura da Planta (AP), Diâmetro da Copa (DC) e resistência a Mofo-Preto (MP) por análise de marca simples no mapa do genitor masculino do tipo comum.

Característica	Cromossomo	Marcador	LOD	b0	b1	-2ln(I0/I1)	F(1,n-2)	pr(F)	R ² (%)
AP	M3	20cg166	2,5	1,102	0,36	4,734	4,755	0,03227002 *	5,95
AP	M6	07By235	2,5	1,073	0,351	4,15	4,153	0,04499889 *	6,22
AP	M10	14By024	2,5	1,043	0,369	4,014	4,014	0,04864726 *	3,53
AP	M18	26Bb083	2,5	1,004	0,464	7,196	7,344	0,00829299 **	8,79
DC	M1	01CB019	2,5	1,183	-0,293	4,618	4,636	0,03444633 *	6,87
DC	M15	06CY218	2,5	0,821	0,31	4,69	4,71	0,03307024 *	5,9
DC	M22	04Bb057	2,5	1,339	-0,563	18,159	19,899	0,00002744 ****	15,18
MP	M1	12CY062	2,5	0,15	-0,13	4,602	4,618	0,03477547 *	5,62
MP	M1	12CY169	2,5	-0,001	0,156	7,105	7,246	0,00871284 **	8,76
MP	M6	13CB081	2,5	0,195	-0,177	8,083	8,295	0,00514617 **	9,94
MP	M14	13Bb220	2,5	0,143	-0,122	4,108	4,11	0,046098887 *	4,76

*significativo a 5%; **significativo a 1%; ***significativo a 0,1%; ****significativo a 0,01%

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTLs de Diâmetro da Copa. Após a análise de Mapeamento de Intervalo Composto, foram detectados apenas dois QTLs: *DC1* (no intervalo do grupo de ligação M1) e *DC2* (no intervalo do grupo de ligação M22) (Figura 16), utilizando-se o cofator 10. (Figura 15). Estes QTLs explicam 7 e 15% da variação fenotípica, respectivamente.

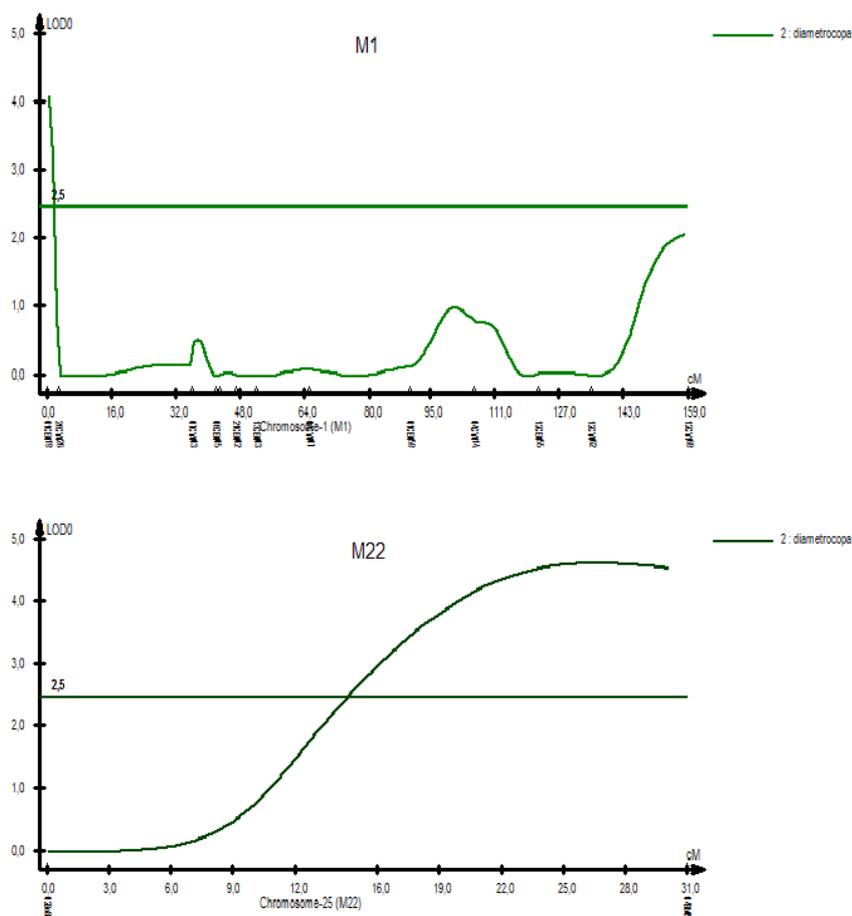


Figura 15. QTLs identificados para Diâmetro da Copa, nos grupos de ligação M1 e M22 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.

Resistência ao Mofo-Preto – A análise de marca simples possibilitou a identificação de quatro marcadores associados á característica Resistência a Mofo-Preto (Tabela 13), sendo eles: 12CY062 e 12CY169 no grupo de ligação M1, 13CB081 no grupo de ligação M6 e 13Bb220 no grupo de ligação M14. Destes marcadores, 13CB081 no grupo de ligação M6 foi o que se mostrou mais significativo, pois explica aproximadamente 10% da variação fenotípica para resistência ao mofo-preto(tabela 14- R2).

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTLs de resistência ao Mofo-Preto. No entanto, a análise de Mapeamento de Intervalo Composto possibilitou a detecção de três QTLs: *MP1* (no intervalo do grupo de ligação M1) , *MP2* (no intervalo do grupo de ligação M6) e *MP3* (no intervalo do grupo de ligação M14) (Figura 17), utilizando-se o cofator 10. Estes QTLs explicam 6, 10 e 15% da variação fenotípica, respectivamente.

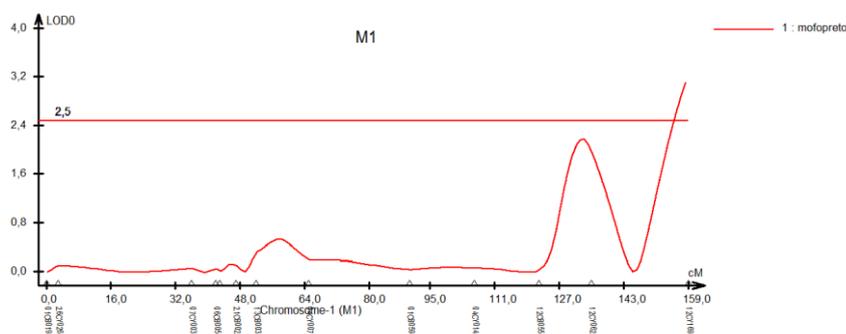


Figura 16. QTL identificado para a característica Resistência a Mofo-Preto, nos grupos de ligação M1, M6 e M14 por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.

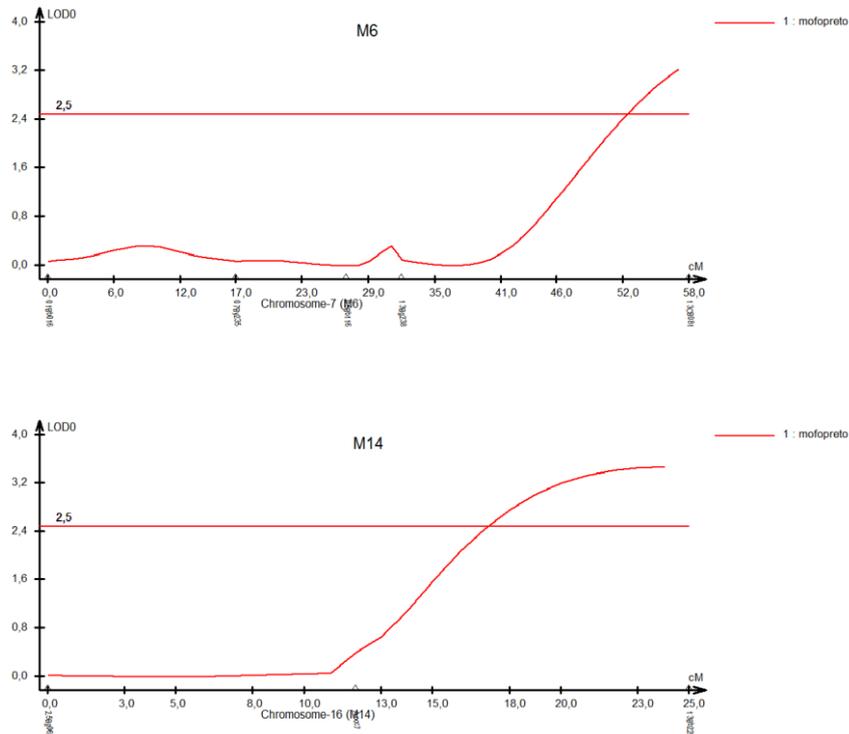


Figura 17. Continuação.

5.4.3 MAPA GENÉTICO DO GENITOR FEMININO (TIPO ANÃO PRECOCE CCP 1001)

No mapa genético do genitor feminino (Figura 18), observou-se que dos 10 marcadores microssatélites passíveis de mapeamento, três foram mapeados (AOBR78, AOBR 66 e AOBR 35). O mapa é composto por 99 marcadores distribuídos em 18 grupos de ligação totalizando 1.065,9 cM. A distância média observada entre marcadores foi 11,8 cM (Figura 18). O mapa anterior, obtido por Cavalcanti & Wilkinson (2007), apresentou distância média de 8,6cM entre marcadores para um total de 122 marcadores mapeados.

A análise possibilitou a obtenção de 20 grupos de ligação, em contraste com os 19 obtidos por Cavalcanti & Wilkinson (2007). Isso pode ser explicado pelo fato da presente análise de mapeamento ter empregado um valor de LOD igual a 5,0, ocasionando a exclusão de alguns marcadores que poderiam ligar os dois subgrupos de ligação, como pode ser observado no grupo de ligação F1. Observou-se também a alteração da ordem dos marcadores, como observado

no grupo F3, ou ainda a inclusão de novos marcadores nos grupos de ligação, como 10CB237 e AOBR 78 nos grupos de ligação F3 e F7, respectivamente

Os grupos de ligação F1, F4, F6, F9, F11, F13 e F16 tiveram seu LOD reduzido a 4 na presente análise, para que fosse possível a formação do grupo de forma semelhante aos grupos do mapa já publicado da espécie. Observou-se que o grupo F2 não apresentou seis marcadores presentes no estudo de Cavalcanti & Wilkinson (2007), mas incluiu 5 novos marcadores, entre eles AOBR 66 e AOBR 49, desenvolvidos no presente trabalho.

Os grupos F3 e F11 mostraram apenas inversões na ordem de dois locos em relação ao estudo anterior, enquanto o grupo F4 não incluiu três marcadores descritos por Cavalcanti & Wilkinson (2007), mas acrescentou um marcador desenvolvido no presente estudo (AOBR 35).

Já o grupo F5 apresentou diferença na ordem dos marcadores e não incluiu um dos marcadores mapeados no primeiro mapa construído (21Ab168). Observou-se que no grupo F6 não foi incluído um marcador (05CY016), no grupo F9 não foram incluídos dois marcadores (24CB022 e 24CB104), no grupo F12 dois marcadores (13Ay019 e 10Ay074), e nos grupos F13 e F15 um marcador (02CG108 e 10Ag054 respectivamente). O grupo de ligação F10 de Cavalcanti & Wilkinson (2007) não foi detectado no presente estudo, nem mesmo quando foi empregado o LOD mínimo (3,0). Por fim, é interessante notar que houve uma substituição de marcadores do grupo F17 (05CB137 por 04CG245).

Os grupos F8, F14, F16 e F19 não revelaram alterações na ordem ou composição do grupo, apesar das distâncias em cM terem sido modificadas, provavelmente devido ao emprego de diferentes funções de mapa no presente trabalho (Kosambi) e no trabalho anterior (Haldane).

No total, 28 marcadores (27 AFLP e 1 microssatélite) estão presentes em ambos os mapas, distribuídos por 9 grupos de ligação. Apesar de ser um marcador co-dominante, os marcadores microssatélites neste tipo de cruzamento segregaram, em sua maioria, para apenas um dos parentais, comportando-se como marcadores dominantes, dificultando a confecção de um mapa integrado.

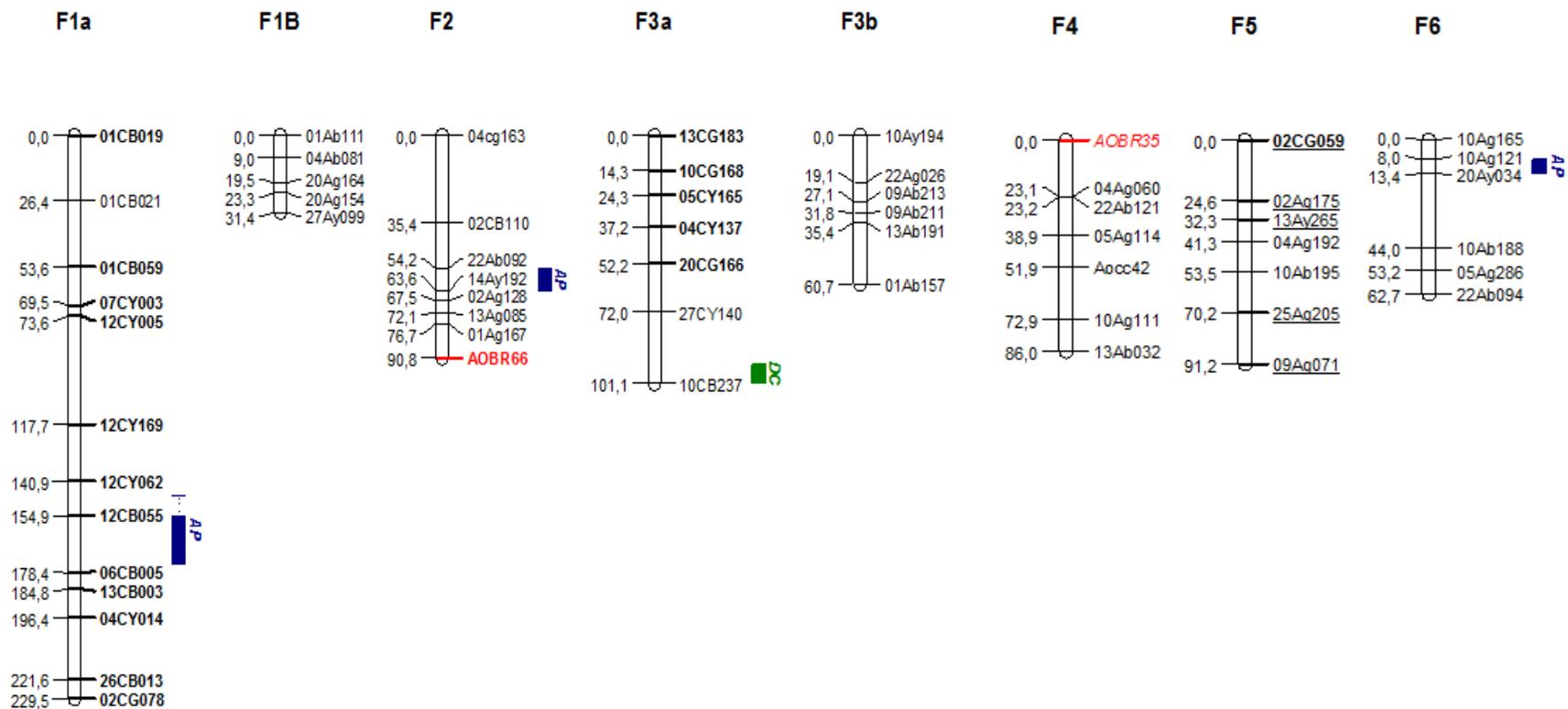


Figura 18. Mapa genético do genitor feminino (CCP 1001), desenvolvido com base em população F1 derivada do cruzamento entre o cajueiro anão precoce (CP 1001) e o cajueiro comum (CP 96). Cada grupo de ligação é representado por uma barra, com os marcadores identificados à direita e a ordem e as distâncias de recombinação (cM) à esquerda. Os grupos de ligação são identificados de acordo com mapa anterior desenvolvido por Cavalcanti & Wilkinson (2007). Os locos em vermelho representam os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, os sublinhados representam marcadores que tiveram suas posições modificadas em relação ao mapa anterior, e em negrito estão os marcadores comuns aos mapas dos genitores masculino e feminino

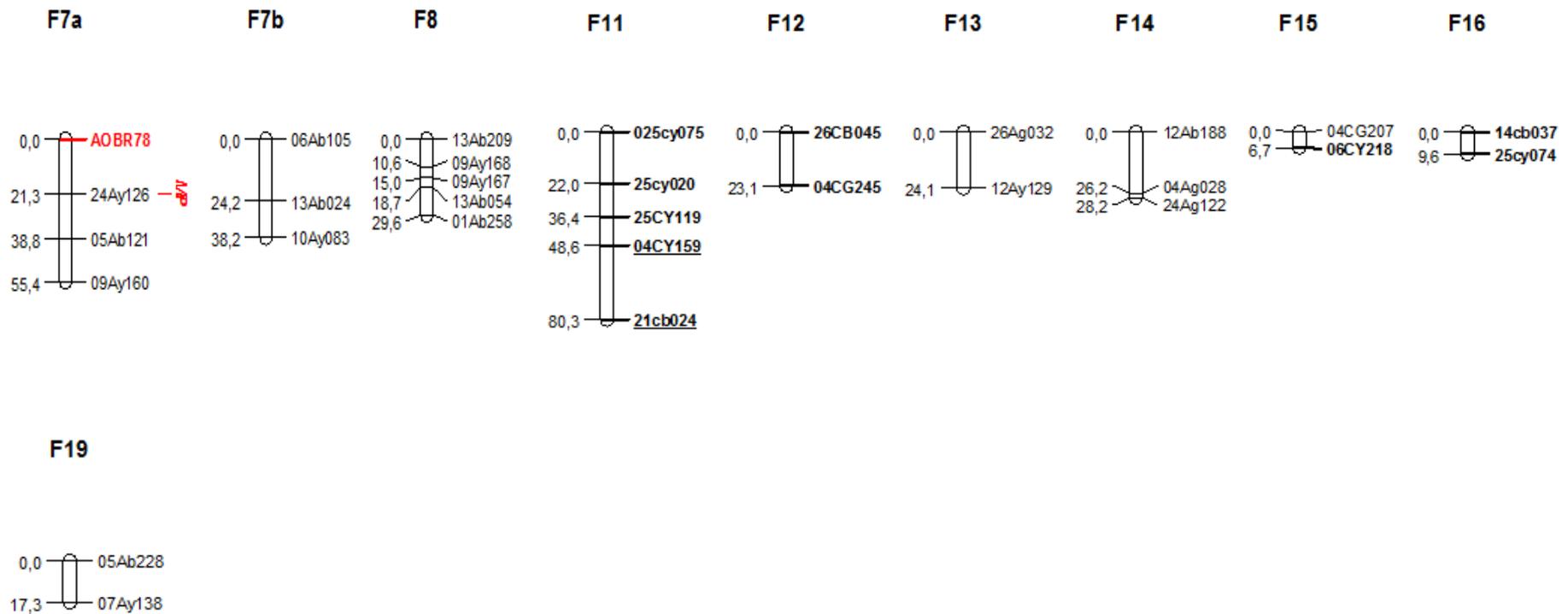


Figura 18: Continuação.

5.4.4 MAPEAMENTO DE QTLS NO GENOMA DO GENITOR FEMININO (TIPO ANÃO PRECOCE- CCP 1001):

Foram realizadas análises estatísticas para identificação de QTLs associados ao controle genético de resistência ao Mofo-Preto, Diâmetro da Copa e Altura da Planta no genoma do genitor feminino (tipo anão precoce – CCP1001). Os métodos de detecção de QTLs incluíram a análise de marcas simples, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto.

Altura da Planta - As análises de marcas simples, intervalo simples e intervalo composto identificaram três regiões do genoma associadas ao controle da característica altura da planta.

A análise de marca simples detectou associação dos marcadores 12CY062, 12CB05 e 06CB005 (grupo de ligação F1a), 22Ab092 e 14Ay192 (grupo de ligação F2), 20Ay034 e 10Ag121 (grupo de ligação F6), com a característica Altura da Planta (Tabela 9).

Tabela 9. Marcadores associados à característica Altura da Planta por análise de marca simples.

Grupo de ligação	Marcador	LOD	b0	b1	-2ln(I0/I1)	F(1,n-2)	pr(F)	R ² (%)
F1a	12CY062	2,5	1,242	-0,287	2,066	2,041	0,157197074*	2,58
F1a	12CB05	2,5	1,225	-0,413	3,781	3,775	0,055682624**	5,6
F1a	06CB005	2,5	1,323	0,087	0,188	0,184	0,669406959*	0,24
F2	22Ab092	2,5	1,405	0,191	1,331	1,308	0,256214771*	1,32
F2	14Ay192	2,5	1,203	-0,201	1,471	1,447	0,23270631*	1,92
F6	20Ay034	2,5	1,162	-0,266	2,61	2,587	0,111863647**	2,74
F6	10Ag121	2,5	1,357	0,114	0,473	0,463	0,498333768*	0,6

*significativo a 5%; **significativo a 1%; ***significativo a 0,1%

Os dados indicam associação com a maior significância estatística na região do marcador 12CB05 no grupo de ligação F1a, que explicaria 5,6% da variação fenotípica (tabela 14).

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTLs de Altura da Planta. No entanto, três QTLs foram identificados para Altura de Planta por Mapeamento de Intervalo Composto: *AP1* (no intervalo 12CY062-06CB005 do grupo de ligação F1a), *AP2* (no intervalo 22Ab092-14Ay192 do grupo de ligação F2) e *AP3* (no intervalo 20Ay034 e 10Ag121 do grupo de ligação F6) (Figura 19), utilizando-se o cofator 10 e LOD 2,5. Estes QTLs explicam 7, 9 e 12% da variação fenotípica, respectivamente.

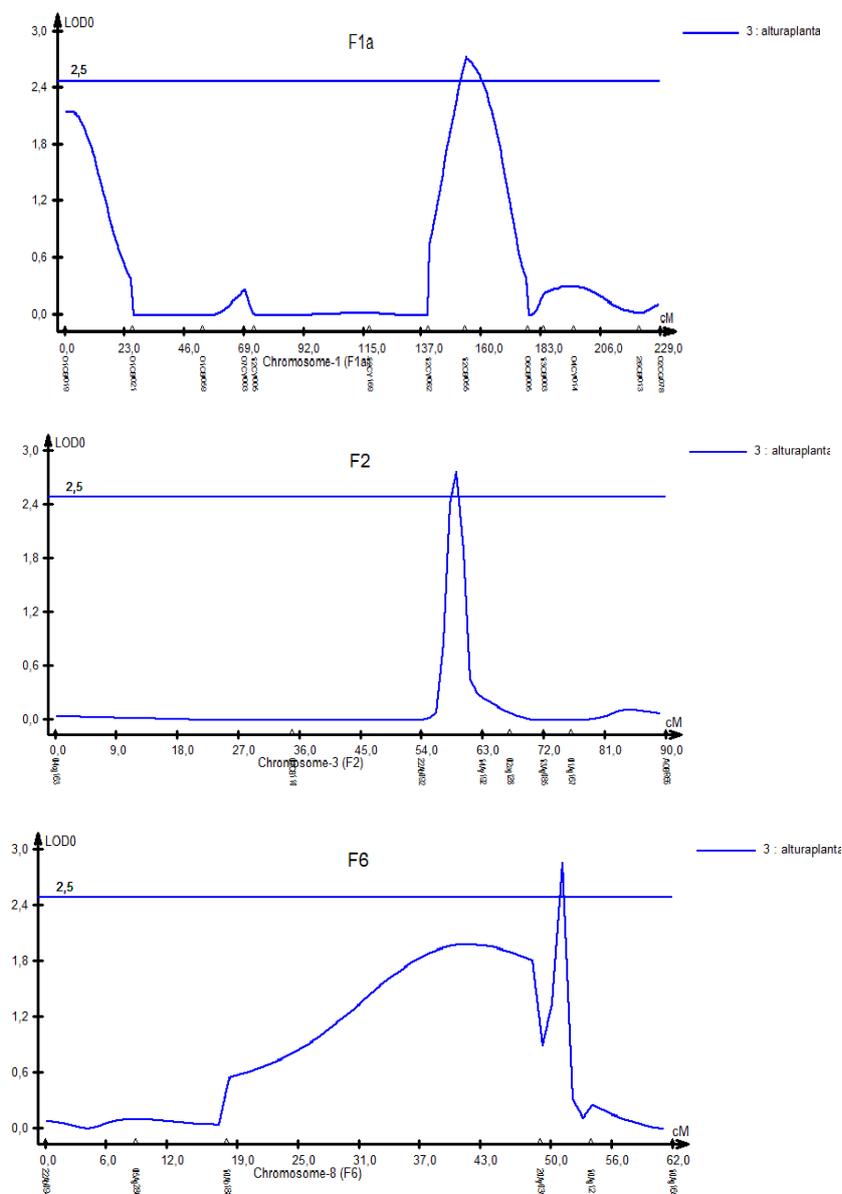


Figura 19. QTLs identificados para Altura da Planta, nos grupos de ligação F1a, F2 e F6, respectivamente, pelo método de mapeamento por

Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.

Tabela 10. Marcadores associados às características Diâmetro da copa e Resistência mofo-preto por análise de marca simples.

Característica	Cromossomo	Marcador	LOD	b0	b1	-2ln(I0/I1)	F(1,n-2)	pr(F)	R2(%)
Diâmetro da copa	F1b	04Ab081	2,5	1,179	0,313	5,287	5,329	0,023652786 *	5,81
Diâmetro da copa	F1b	20Ag164	2,5	1,211	0,381	8,226	8,451	0,004764443 **	9,89
Diâmetro da copa	F1b	20Ag154	2,5	1,162	0,281	4,357	4,366	0,039957078*	5,37
Diâmetro da copa	F3a	10CB237	2,5	0,954	-0,294	2,892	2,871	0,094242735*	3,22
Mofo-Preto	F7a	24Ay126	2,5	0,117	0,107	2,902	2,881	0,093669231*	3,47

*significativo a 5%; **significativo a 1%; ***significativo a 0,1%

Diâmetro da Copa - A análise de marca simples permitiu detectar associação dos marcadores 04Ab081, 20Ag164 e 20Ag154 (grupo de ligação F1b), e do marcador 10CB237 (grupo de ligação F3a) com a característica Diâmetro da Copa.

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTLs de Diâmetro da Copa. Pelo Mapeamento de Intervalo Composto, apenas um QTL foi detectado para a característica Diâmetro da Copa (DC - grupo de ligação F3a) (Figura 20), utilizando-se o cofator 10 e LOD 2,5. Este QTL explica 5% da variação fenotípica.

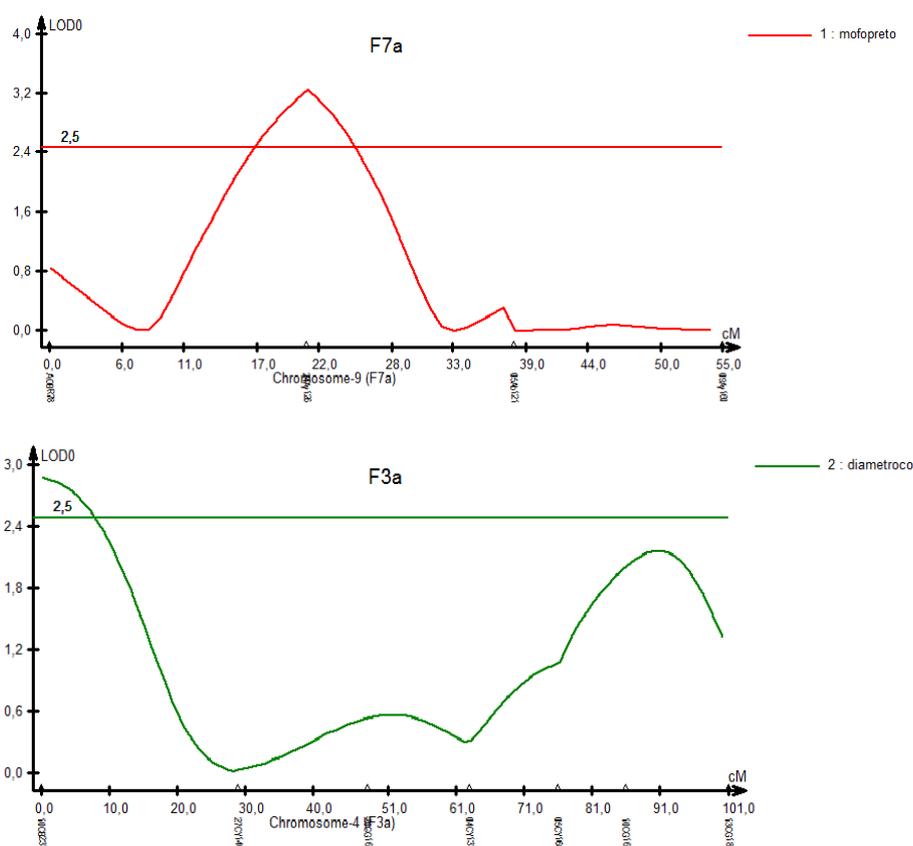


Figura 20. QTLs identificados para as característica Mofo-Preto e Diâmetro da Copa, respectivamente, nos grupos de ligação F7a e F3a, por mapeamento de Intervalo Composto (cof. 10). O valor de LOD crítico utilizado como ponto de corte foi de 2,5, e está representado pela linha horizontal.

Resistência a Mofo-Preto – O método de mapeamento por marca simples permitiu identificar apenas um marcador (24Ay126) associado à característica de resistência a Mofo-Preto, no grupo de ligação F7a (Tabela 10), que explica 3,5% da variação fenotípica.

A análise de mapeamento por intervalo simples não possibilitou a detecção de QTL's de resistência ao Mofo-Preto. No entanto, o mapeamento de Intervalo Composto possibilitou a detecção de um QTL (*MP*) (grupo de ligação F7a) para a característica Mofo Preto, (Figura 20), utilizando-se o cofator 10 e LOD 2,5.

Cabe ressaltar que nenhum dos novos marcadores microssatélites desenvolvidos no presente estudo foi mapeado no intervalo dos QTLs

detectados para as três características analisadas. Não foi observado nos mapas genéticos do genitor feminino e masculino nenhum marcador comum associado às características estudadas. Apenas um marcador (12CY062 nos grupos de ligação M1 e F1a) está relacionado com a característica de resistência a Mofo-Preto no mapa do genitor masculino e a Altura da Planta no mapa do genitor feminino. Estas duas observações podem ser explicadas, em parte, pelo fato dos mapas apresentarem poucos marcadores em comum. Desta forma, observa-se a necessidade de se saturar os mapas com marcadores que segreguem de forma co-dominante com informação completa, para que seja possível integrar os dois mapas.

Os QTLs aqui identificados apresentam grande potencial na seleção assistida por marcadores no programa de melhoramento de cajueiro. No caso do QTL para altura da planta, por exemplo, a seleção precoce pode reduzir significativamente o número de indivíduos muito altos – ou seja, indesejáveis-transferidos para o campo. Portanto, representa um ganho genético expressivo, redução da área experimental, custo e tempo de geração de informação. Ambos os mapas genéticos foram capazes de identificar QTLs relevantes para os traços em questão.

Apesar de serem marcadores dominantes, os AFLPs muito contribuíram para a identificação dos QTLs. No entanto, a saturação dos mapas com marcadores codominantes, como os microssatélites, pode aumentar substancialmente a precisão da análise de QTLs e fornecer melhores informações para a seleção assistida por marcadores moleculares da espécie em questão, apesar a estreita base genética do cajueiro anão precoce.

No entanto, o número de indivíduos utilizados para a análise de QTLs reduziu o poder de análise, sendo que o uso de uma população maior melhora a precisão dos dados obtidos. Estas práticas irão minimizar o viés estatístico devido à influência ambiental e aumentarão o poder de análise genética, tornando a identificação destes mais precisa e eficiente.

Os QTLs encontrados também são importantes para o desenvolvimento de linhagens resistentes, pois mostra-se como o meio de controle mais econômico, efetivo e que traz menor impacto ao ambiente. No entanto, devido à constante evolução do patógeno, é necessária permanente busca por novas fontes de resistência. A piramidação ou associação de genes de resistência em

uma mesma cultivar tem sido proposta como uma forma de se obter uma resistência duradoura e de amplo espectro (Jonhson, 1984; Kelly et al., 2003, Borém, 2001). No processo de piramidação, os marcadores moleculares do DNA constituem uma ferramenta imprescindível, pois permitem o monitoramento simultâneo de vários genes de interesse em um mesmo background genético. Sendo assim, os resultados encontrados facilitarão o acúmulo de genes de resistência vertical, trazendo benefícios ao desenvolvimento da cajucultura, assim como tem sido feito com êxito nas espécies *Oriza sativa* (Singh, 2001), *Phaseolus vulgaris* (Beaver, 2003; Coyne, 2003; Kelly, 2003) e, com uso de transgenia, em *Carica papaya* (Souza, 1999).

5 Conclusão:

O número de marcadores microssatélites desenvolvidos para o cajueiro é ainda muito limitado, e apenas 11 marcadores foram mapeados no genoma da espécie até o momento. Neste trabalho, foram desenvolvidos e testados 100 novos marcadores microssatélites para *Anacardium occidentale* L. Os 100 novos marcadores representam uma amostra do que foi gerada em bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites desenvolvidas no transcórper do estudo, corroborando a eficiência do método de obtenção de novos marcadores microssatélites. Uma amostra de 14 novos marcadores microssatélites foi caracterizada com acessos de *A. occidentale* do Banco de Germoplasma. Os dados permitiram a estimativa de parâmetros genéticos como o número de alelos por loco, a Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e Poder de Exclusão (PE). Observou-se grande variabilidade para performance analítica entre os marcadores testados. Alguns marcadores são altamente informativos, outros não possuem a diversidade alélica e a distribuição de frequência alélica adequadas a estudos genéticos. A análise de acessos do Banco de Germoplasma de Cajueiro com uma amostra dos marcadores permitiu discriminar clones da coleção, identificar acessos idênticos e agrupar acessos de cajueiro anão precoce e cajueiro comum em grupos distintos. Há evidências de que os clones de cajueiro anão precoce possuem menor diversidade genética do que os clones de cajueiro comum. Os dados sugerem ainda a necessidade de estudo mais detalhado das relações filogenéticas entre *A. occidentale* e *A. microcarpum*, visto que a análise

genética com marcadores microssatélites incluiu o acesso testado de *A. microcarpum* no grupo formado por acessos de cajueiro comum. Baterias de marcadores mais informativos podem ser utilizados em testes genéticos. Os marcadores desenvolvidos estão sendo incluídos em mapas genéticos recentemente desenvolvidos. Vários dos novos marcadores segregando em uma população de mapeamento entre cajueiro comum (CP96) e cajueiro anão precoce (CCP 1001) foram localizados em grupos de ligação do genoma de cajueiro. Os mapas genéticos contendo os novos marcadores foram utilizados para mapear QTLs de características de importância econômica como resistência a Mofo-Preto, Altura da Planta e Diâmetro da Copa. Os marcadores moleculares identificados representam importante avanço no desenvolvimento de novas ferramentas de apoio à seleção de genótipos superiores de cajueiro pelos programas de melhoramento genético.

6 Perspectivas:

Além da biblioteca enriquecida com sequências repetitivas utilizada nesse trabalho, outras bibliotecas enriquecidas com sequências microssatélites construídas no presente estudo e não utilizadas na análise possibilitam o desenvolvimento adicional de marcadores microssatélites. Os novos marcadores podem ser empregados em grande quantidade de temas de genética e melhoramento. Vislumbra-se, a curto prazo, por exemplo, o emprego dos novos marcadores no mapeamento genético do cajueiro, possibilitando a saturação de mapas genéticos e aumento da acurácia no mapeamento de QTLs de diferentes características de importância econômica, como o aumento do rendimento e qualidade de frutos e pseudofrutos, além de resistência a doenças. A identificação de duplicatas entre os clones de cajueiro da coleção, o estudo da diversidade genética de populações naturais, ou de identidade genética entre acessos representam outras importantes perspectivas de uso desta tecnologia no desenvolvimento de novos e melhores clones de cajueiro.

8. Referências bibliográficas

AKKAYA, M.S., BUYUKUNAL-BAL; E.B. **Assesment of genetic variation of bread Wheat varieties using microsatellite markers**. Euphytica 135:179-185.

ARAÚJO, J. P. P; e SILVA, V. V. (Orgs.) **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa, CNPAT, 1995. 292p.

BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. (Org.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1995. p. 73-93.

BARROS, L.M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 256p. (Tese de Doutorado).

BARROS, L.M; PAIVA, J.R; CAVALCANTI, J.J.V; Recursos genéticos de cajueiro: situação atual e estratégias para o futuro. *In Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro*; (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livroorg/>. ISBN 85-7405-001-6. Consultado dia 16/09/2008 às 20h15min.

BARROS, L.M.; CAVALCANTI, J.J.V.; PAIVA, J.R.; CRISÓSTOMO, CORRÊA, M.P.F.; LIMA, A.C. **Seleção de clones de cajueiro anão para o plantio comercial no Estado do Ceará**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, n.11, p.2197-2204. 2000.

BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ARAÚJO, J.P.P. Cajueiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p. 159-176.

BATESON, W. & SAUNDERS, E. R. **Experimental Studies in the Physiology of Heredity**. Reports to the Evolutions Committee of the Royal Society. London, v.1, p.1-160, 1902.

BEAVER, J.S., ROSAS, J.C., MYERS, J., ACOSTA, J., KELLY, J.D., NCHIMBI-MSOLLA, S., MISANGU, R., BOKOSI, J., TEMPLE, S., ARNAUD-SANTANA, E., COYNE, D.P. **Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean**. Field Crops Research, 82:87-102, 2003

BORÉM, A; & MIRANDA, G.V; Marcadores Moleculares; *In Melhoramento de Plantas*; 4ª. ed. – Viçosa; UFV; 2005. p. 441 – 457.

BRIDGES, C. B. **Direct proof through nondisjunction that the sex-linked genes of *Drosophila* are borne on the X chromosome**. Science, v.40, p.107-109, 1914.

BRIDGES, C. B. **Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity**. Genetics, v.1, n.2, p.107-163, 1916.

BROMAN, K. W. **The Genomes of Recombinant Inbred Lines**. Genetics, v.169, n.2, p.1133-1146, 2005.

BRONDANI, R.P.V; BRONDANI, C; GRATTAPAGLIA D; **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 2007. 111p.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C. & GRATTAPAGLIA, D. **Towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers**. Molecular Genetics and Genomics, v.267, n.3, p.338-347, 2002.

BRONDANI, R. P. & GRATTAPAGLIA, D. **Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing.** *Biotechniques*, v.793, n.5, p.798 - 800 2001.

BUSO, G.S.C; CIAMPI, A.Y; MORETZSOHN, M.C; AMARAL. Z.P.S; **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites.** Circular Técnica, 20. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Setembro, 2003.

CARNEIRO, M. S. & VIEIRA, M. L. C. **Mapas genéticos em plantas.** *Bragantia*, v.61, n.2, p.89-100, 2002.

CASTELO, A; MARTINS W; GAO, G; TROLL - Tandem Repeat Occurrence Locator, **Bioinformatics Journal**, 2002.

CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M. **Avanços, desafios, e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil.** In: I Simpósio Nordestino de Genética e Melhoramento de Plantas. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2009. 210P.

CAVALCANTI, J.J.V; WILKINSON, E. M. J. **The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale L.*).** *Euphytica* (2007) 157:131–143, 2007.

CAVALCANTI, J.J.V; **Biotecnologia aplicada ao melhoramento do cajueiro.** Embrapa, CNPAT. 2005.

CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. **Microsatellites: consensus and controversy.** *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v.126, n.4, p.455-476, 2000.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G. & MCCOUCH, S. R. **Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa L.*).** *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS*, v.95, n.4, p.553-567, 1997.

CHURCHILL, G. A. & DOERGE, R. W. **Empirical threshold values for quantitative trait mapping.** *Genetics* v.138, n.3, p.963-971, 1994.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado.** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. 1999 (Tese de doutorado).

CIAMPI, A. Y. ; BRONDANI, R. P. V. ; COLLEVATTI, R. G. ; GRATTAPAGLIA, D. **Development of simple sequence repeat (microsatellite) markers in tropical trees.** In: 43 Congresso Nacional de Genética, 1997, Goiânia. Resumos do 43 Congresso Nacional de Genética. Goiânia : Editora da Sociedade brasileira de genética, p. 254. 1997.

COELHO, A. S. G. & SILVA, H. D. **Construção de Mapas Genéticos e Mapeamento de QTL's.** Piracicaba: ESALQ. 2002. 77 p.

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B. & PANG, E. C. K. **An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts.** Euphytica, v.142, p.169-196, 2005.

CONNER, P.J.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. **Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars.** *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.122, n.3, p.350-359, 1997.

COYNE, D.P., STEADMAN, J.R., GODOY-LUTZ, G., GILBERTSON, R., ARNAUD-SANTANA, E., BEAVER, J.S., MYERS, J.R. **Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to management of bean diseases.** *Field Crops Research*, 82:155-168, 2003.

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.

CRISÓSTOMO, J.R; BARROS, L.M; PAIVA, J.R; CAVALCANTI, J.J.V; Melhoramento genético do cajueiro; **in Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**; (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/>. ISBN 85-7405-001-6. Consultado dia 16/09/2008 às 16h50min.

CROXFORD, A. E.; ROBSON M.; WILKINSON, M. J. **Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci in cashew (*Anacardium occidentale* L.) and their cross-species utilization.** *Molecular Ecology Notes*, v.6, p 249–251, 2006.

DAKIN, E. E. & AVISE, J. C. **Microsatellite null alleles in parentage analysis.** *Heredity*, v.93, n.5, p.504-509, 2004.

DEPEIGES, A.; GOUBELY, C.; LENOIR, A.; COCHEREL, S.; PICARD, G.; RAYNAL, M.; GRELLET, F. & DELSENY, M. **Identification of the most represented repeated motifs in arabis-thaliana microsatellite loci.** *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS*, v.91, n.1, p.160-168, 1995.

DOERGE, R. W. & CHURCHILL, G. A. **Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character.** *Genetics*, v.142, n.1, p.285-294, 1996.

FERRÃO, J. E. M; **O Cajueiro.** Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1995. 299p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª edição. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 1998. pp. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E.; Mapeamento físico e clonagem posicional em plantas. In: BORÉM, A; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV,2006. p. 231-272.

FROTA, P.C.E., PARENTE, J.I.G. Clima e Fenologia. In: ARAÚJO, J.P.P., SILVA, V.V. (Orgs). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1995. p.43-54.

GOLDSTEIN, D. B. & CLARK, A. G. **Microsatellite variation in north-american populations of drosophila-melanogaster**. Nucleic Acids Research, v.23, n.19, p.3882-3886, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. Pseudo-Testcross Mapping Strategy Using RAPD Markers. In: BOVA, R.; MICHELI, M.R. (Eds.) **Fingerprint Methods Based on Arbitrarily Primed PCR**. Berlim: Springer, 1997. p. 201-218

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R.R. **Genetic linkage map of Eucaliptus grandis and E. urophylla using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers**. Genetics, 137: 1127-1137. 1994

HEARNE, C. M.; GHOSH, S. & TODD, J. A. **Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits**. Trends in Genetics, v.8, n.8, p.288-294, 1992.

HEUSDEN, A.W. van; OOIJEN, J.W. van; VRIELINK-VAN GINKEL, R.; VERBEEK W.H.J.; WIETSMA, W.A.; KIK, C. **A genetic map of an interspecific cross in Allium based on amplified fragment length polymorphism (AFLP (TM)) markers**. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.100, n.1, p.118-126, 2000.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R. & GIMENES, M. A. **Marcador microssatélite na conservação do germoplasma vegetal**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.5, n.29, p.146-150, 2002.

HUMMEL, S. & SCHULTES, T. **From skeletons to fingerprints - STR typing of ancient DNA**. Ancient Biomolecules, v.3, p.103-116, 2000.

JANSEN, R. C. **INTERVAL MAPPING OF MULTIPLE QUANTITATIVE TRAIT LOCI**. *Genetics*, v.135, n.1, p.205-211, Sep, 1993.

JARNE, P. & LAGODA, P. J. L. **Microsatellites, from molecules to populations and back**. *Trends in Ecology & Evolution*, v.11, n.10, p.424-429, 1996.

JONES, N.; OUGHAM, H. & THOMAS, H. **Markers and mapping: we are all geneticists now**. *New Phytologist*, v.137, n.1, p.165-177, 1997.

KELLY, J.D., GEPTS, P., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. **Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea**. *Field Crops Research*, 82:135-154, 2003.

KRUGLYAK, S.; DURRETT, R. T.; SCHUG, M. D. & AQUADRO, C. F. **Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, n.18, p.10774-10778, 1998.

KUBISIAK, T.C.; NELSON, C.D.; NANCE, W.L.; STINE, M. **RAPD linkage mapping in a longleaf pine x slash pine F1 family**. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.90, n.7/8, p.1119-1127, 1995.

LANDER, E. S. & BOTSTEIN, D. **MAPPING MENDELIAN FACTORS UNDERLYING QUANTITATIVE TRAITS USING RFLP LINKAGE MAPS**. *Genetics*, v.121, n.1, p.185-199, 1989.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E. & NEWBERG, L. A. **MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations (vol 1 pg 174, 1987)**. *Genomics*, v.93, n.4, p.398-398, Apr, 2009.

LEVINSON, G. & GUTMAN, G. A. **SLIPPED-STRAND MISPAIRING - A MAJOR MECHANISM FOR DNA-SEQUENCE EVOLUTION**. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, n.3, p.203-221, 1987.

Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C (2003). **Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome.** Theor Appl Genet 106:1497–1508

LIMA, V.P.M.S. **Fruteiras: uma opção para o reflorestamento do Nordeste.** Fortaleza: Bnb/Etene, 1986. 95p.

LIU, B.H. **Statistical genomics.** New York: CRC, 1998. 610p.

LIU, K. & MUSE, S. V. **PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis.** Bioinformatics, v.9, n.21, p.2128 - 2129, 2005.

LITT, M. & LUTY, J. A. **A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene.** American Journal of Human Genetics, v.44, n.3, p.397-401, 1989.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIQUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. **Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos técnicos e interpretação genética.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 5(29): 56 – 60. 2002.

MILLACH, S.C.K; **Marcadores de DNA: Aplicações no melhoramento de plantas.** Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 1(5): 14-17. 1998.

MILLACH, S.C.K; **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas; in Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro; (on line).** Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/>. ISBN 85-7405-001-6. Consultado dia 23/09/2008 às 23h42min.

MONTENEGRO, A.A.T; CARBAJAL, A.C.R; MESQUITA, A.L.M; AQUINO, A.R.L; FREIRE, F.C.O; PAIVA, J.R; **Cultivo do Cajueiro**, Embrapa Agroindústria Tropical, Sistemas de Produção, 1 ISSN 1678-8702, Versão eletrônica, Jan/2003.

MOREIRA, A. A; **O cajueiro: Vida, usos e estórias**. Fortaleza, 2002. 160p.

MORGAN, T. H. **The Physical Basis of Heredity**. J. B. Lippincott Company. 1919. 305 p.

MORGAN, T. H.; STURTEVANT, A. H.; MULLER, H. J. & BRIDGES, C. B. **The Mechanism of Mendelian Heredity**. New York: Henry Holt and Company. 1915. 262 p.

MOURA, C.F.M. **Qualidade de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) irrigados**. 1998. 96p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

NETO, J.C.A. **Competitividade na pequena produção agroindustrial: estudo na agroindústria da castanha de caju**. 2006. 91f. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

OLIVEIRA, V.H.; ANDRADE, A.P.S. **Produção integrada de caju**. Disponível em <<http://caju.cnpat.embrapa.br/pif/artigo1.pdf>> acesso em 10 out. 2008.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para a construção e integração de mapas genéticos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, Piracicaba, 2006b. (Tese de doutorado).

OLIVEIRA, V.H; **Cajucultura**; Revista Brasileira de Fruticultura; v. 30, n. 1, p. 001-284, 2000.

OLIVEIRA, V.H.; MONTENEGRO, A.A.T.; CARBAJAL, A.C.R.; MESQUITA, A.L.M.; AQUINO, A.R.L.; FREIRE, F.C.O.; OLIVEIRA, F.N.S.; ARAÚJO FILHO, G.C.; PAIVA, J.R.; PAZ, J. S.; PARENTE, J.I.G.; MOSCA, J.L.; BARROS, L. M.; CRISOSTOMO, L.A.; PESSOA, P.F.A.P.; SILVEIRA, S.S. **Cultivo do cajueiro**

anão precoce. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002 (Sistemas de Produção 1).

PAIVA, J.R.; BARROS, L.M.; CAVALCANTI, J.J.V. **Seleção de clones de cajueiro anão precoce para o cultivo em sequeiro na Região Nordeste.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 84).

PAIVA, J. R; BARROS, L. M; **Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas;** Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 26 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 82).

PETIT, R. J.; DEGUILLOUX, M. F.; CHAT, J.; GRIVET, D.; GARNIER-GERE, P. & VENDRAMIN, G. G. **Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity.** *Molecular Ecology*, v.14, n.3, p.885-890, 2005.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. & HUGHES, C. R. **Microsatellites and kinship.** *Trends in Ecology & Evolution*, v.8, n.8, p.285-&, 1993.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

ROSSETTI, A.G.; AQUINO, A.R.L. Influência do tipo de ramo sobre o crescimento e produção do cajueiro-anão-precoce de copa substituída. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, 2002.

ROHLF, FJ., 2000. NTSYS-PC: **numerical taxonomy and multivariate analysis system - version 2.1.** Exeter Software, New York.

ROZEN, S; SKALETSKY, H.J; Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.** Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. 2000.

SCHLOTTERER, C. & TAUTZ, D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA**. Nucl. Acids Res., v.20, n.2, p.211-215, 1992.

SINGH, S.; SIDHU, J.S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D.S.; DHALIWAL, H.S.; KHUSH, G.S. **Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106**. Theoretical and Applied Genetics, Volume 102, Numbers 6-7, 1011-1015, 2001.

SLATKIN, M. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies**. Genetics, v.139, n.1, p.457-462, 1995.

SOUZA, JR.; M. T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV. Brazil. Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil**. (Ph. D. Dissertation). Ithaca, Cornell University. 1999

SOUZA, A.P; *Biologia Molecular aplicada ao melhoramento; in* NASS, L.L; VALOIS, A.F.C; MELO, I.S; VALADARES-INGLIS, M.C. (orgs.); **Recursos genéticos e melhoramento – Plantas**. Rondonópolis, Fundação MT, p. 939 – 965. 2001.

STURTEVANT, A. H. **The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association**. Journal of Experimental Zoology, v.14, p.43-59, 1913.

TANKSLEY, S. D.; MILLER, J.; PATERSON, A. & BERNATSKY, R. **Molecular mapping of plant chromosomes**. In: GUSTAFSON, J. P. & APPELS, R. (Ed.). New York: Plenum Press, p.157-173, 1988.

TAUTZ, D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic dna markers**. Nucleic Acids Research, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

VALDES, A. M.; SLATKIN, M. & FREIMER, N. B. **Allele frequencies at microsatellite loci - the stepwise mutation model revisited.** Genetics, v.133, n.3, p.737-749, 1993.

WEBER, J. L. **Informativeness of human (dc-da)_n.(dg-dt)_n polymorphisms.** Genomics, v.7, n.4, p.524-530, 1990.

WEBER, J. L. & MAY, P. E. **Abundant class of human dna polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction.** American Journal of Human Genetics, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

WU, S.; YANG, J.; HUANG, Y.; LI, Y.; WULLSCHLEGER, S.D.; TUSKAN, G.A.; WU, R. **An improved approach for mapping quantitative trait loci in a pseudo-testcross: Revisiting a poplar mapping study.** Bioinformatics and biology insights. v.2010, n.4, p.1-8, 2010.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A – Genótipos de locos AFLP e microsatélite dos 79 acessos da população F1 referentes aos marcadores segregantes para genitor feminino (CCP 1001) para análise no programa WinQTLcartographer e MAPMAKER. Com exceção dos genótipos dos novos marcadores microsatélites desenvolvidos neste trabalho, os demais genótipos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jaime Cavalcanti, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará

11	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	*	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	*	1	*	1	1	1	2	1
	2	*	2	2	1	*	*	2				
12	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	*	1	2	*	2	1	2	2	2	2	2	*
	*	2	2	1	1	1	1	2	*	1	*	2
	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	*	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	1				
13	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1
	1	2	1	1	2	2	2	*	2	1	1	*
	*	1	1	1	2	2	2	2	*	1	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	1	2	*	2	2	2	2	2	1	2
	1	1	1	1	2	2	1	2				
14	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	*	1	2	2	1	1	1	*	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	*	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2				
15	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	*	2	*	2	2	1	1	*	2	1	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	*	1	1	*
	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2
	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	*	1	*	*	*	2	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	*	2	2				
16	1	1	1	*	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	*	1	1	1	1

	1	2	2	1	2	2	*	1	*	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	*	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	2	1				
17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	*	2
	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	1	2	*	1	*	1	1	2	2
	2	2	*	1	1	1	1	2	*	1	1	2
	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
	*	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	*	2	2	2	2	2
	1	*	2	2	1	1	2	2				
18	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	*	2	*	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	1	1	2	1	1	*	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	*	2	*	2	1	2
	*	*	2	1	1	2	*	1	1	2	2	1
	*	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	*	1	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	1	1				
19	2	*	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	*	1	1	1	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	1	*	2	2	*	2	1	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	*	1	2	*
	1	*	1	2	2	2	*	1	2	1	*	2
	*	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	*	*	1	2	2	1
	2	2	1	*	2	2	1	1				
20	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	2	1	2	2	*	2	1	1	*
	*	1	1	1	2	2	1	2	*	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2
	1	1	2	1	*	1	2	1	1	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	1	1				
51	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	1	2	1	*	*	1	1	2	*
	*	2	2	1	2	2	2	1	*	1	2	*
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	1	*	*	*	2	2	1	1	2
	1	1	1	1	1	*	1	1				
52	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	*	2	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	*	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	1	*	1	*	2	2	1	1	1
	2	2	1	1	2	*	1	1				
53	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	*	2	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	*	2	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1

	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2
	2	1	2	2	1	*	*	2	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
54	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	1	1	2	*	*	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	*	1	1	2
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	*
	*	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2
	1	*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
55	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	*	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	*	*	2	2	2	1	1	2
	1	*	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2
56	2	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	*	2	1	2	1	1	1
	1	2	1	2	2	2	2	*	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1
	*	2	1	*	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	*	1	1	1	1	2	*	2	2	2	2
57	*	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
58	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	*
	*	2	2	*	2	2	2	1	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	*
	1	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
59	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	*
	*	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	*	1	1	2	2	2
	1	1	1	1	1	*	2	2	2	2	2	2
60	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	*	1	2	2	2	2	2	2	2	1	*	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2

	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	1	1				
82	*	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	*	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	2	1				
83	2	1	2	2	2	1	2	*	2	1	*	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	*	2	2	1
	2	1	1	2	2	*	*	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	*	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	2	*	1	1	1	2	1	2
	1	2	1	2	1	1	1	*	1	2	1	2
	2	1	2	*	2	2	1	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2				
84	1	1	*	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	*	2	2	2	1	1
	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	*	1				
85	*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	1	*	2	1	1	1	1
	1	2	2	*	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	1	1	2	2				
86	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	*
	*	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	*
	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
87	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	*
	*	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	1	1				
88	*	*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	*
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	*	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2
	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1
	2	1	2	2	2	2	2	2				

89	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	*	1	1	2	2	1
	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	2	2	2	2	2				
90	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	*
	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	*	1	*	1
	2	2	2	2	2	2	1	1				
103	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	*	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	*
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	2	2	1	1	2	2	1	1				
104	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	*
	*	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2
	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	1	2				
105	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	*
	*	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	1	2	1	2	1	1	*	*	2	1
	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2
	1	1	1	*	2	2	2	2				
106	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
107	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	*
	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	2	1	2	2	2	2	2	*	1	1	1
	2	2	1	*	2	2	2	2				
108	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1
	1	2	*	2	2	2	1	2	2	1	1	1

	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2
	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	1	2	1	2	1	1	2	*	*	1	2
	2	2	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	1	1	2	1				
109	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	*
	2	1	2	2	2	2	2	2	*	2	2	2
	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	*	1
	2	2	2	2	2	2	2	2				
110	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	*	1	2	2	2	2	2	2	*	2	2	2
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	*	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	2	*	1	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	1	2	2	1	2	1	1				
118	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	*	2
	2	1	2	2	2	2	2	*	1	2	2	2
	2	1	2	1	1	*	*	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	*	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	1	1	2	2	2				
120	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	*	2
	*	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	*	1	*	*	1	1	1	1	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1
	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	*	2	2	2	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	1	1	2	2				
121	1	2	2	*	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	*	1	1	2	1	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	*	1	1	1	1	*
	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	*	2	2	2	*				
122	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	2	1	*	1	1	*	1	1	*	1	2	*
	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	*	*
	*	2	2	2	1	*	2	1	2	1	*	1
	2	2	1	1	1	*	2	1	*	1	1	1
	*	1	*	2	*	1	2	1	*	*	1	1
	2	*	1	1	1	*	1	1	1	1	1	1
	2	1	2	1	1	2	*	2				
123	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	*
	*	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2

	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	2	2	1	1	2	1				
124	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	*
	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
	2	2	*	1	2	1	2	1	1	2	*	1
	1	2	*	2	1	1	2	2	1	1	1	2
	*	1	1	1	1	1	2	*	*	2	*	1
	2	2	1	2	*	2	1	*	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2
	1	1	1	1	1	1	1	1				
125	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	1	*	2	2	2	2	2	2	*	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	*	1	2	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	*	1	1	1	2	1	2
	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
126	2	2	1	1	1	1	1	1				
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	1	1				
127	1	2	2	1	1	*	1	1	1	1	1	2
	1	2	*	2	1	1	1	2	1	*	*	*
	*	2	*	1	1	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1
	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	*	1
	*	1	1	1	2	2	2	1	*	*	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	*	2	1	1	2
128	1	1	2	1	2	2	2	2				
	1	1	1	*	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	1	1	2	*	2	2	2	2	2	2	1	1
	1	1	1	*	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2
129	1	1	2	2	2	2	1	*				
	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2
	*	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1
	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
151	1	2	2	2	2	2	2	2				
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	*
	*	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2

	1	1	2	2	2	2	*	2	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2
152	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	*	2	2	2	1	1	1	2	1	1
	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	1				
154	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	*	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	1	1				
155	2	1	2	2	2	2	2	2	2	*	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	*	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	1	*	2	1
	1	1	*	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	*	2	2	*	1	2	*	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	1				
156	*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	1	1				
157	*	1	1	1	1	1	2	2	*	1	1	2
	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	*
	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1
	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	*	1	*	2	1	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	1	1	2	1				
158	2	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	*	1	*	1	2	1	1	1	*
	*	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	1	1	2	2	1	*				
159	*	*	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
	2	*	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	*	2	2	2	2	*
	*	1	2	2	1	1	*	2	2	*	*	1
	1	1	1	2	2	1	*	2	2	1	1	2
	1	*	2	2	*	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	*	2				

160	*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	1	2	2	1	1	2	2				
191	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
	1	1	2	2	1	1	2	2				
192	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	*	2	1	2	1	1	1
	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2				
193	2	2	2	2	2	2	1	*	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	2	2				
194	2	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	*	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1
	2	1	2	2	1	1	2	*				
195	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1
	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	1	2	2				
196	2	2	2	2	2	1	1	2	2	*	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	*
	*	1	2	2	1	2	2	2	2	1	*	*
	*	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
	1	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1
	*	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2
	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1
	2	2	1	2	2	2	*	1				
197	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1

	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	*
	*	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2
	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2				
198	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	1	1				
199	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	*	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	2	1	*	*	1	1	2	2	*
	*	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2
	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	*	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	2	1	1	2	2	1	1				
256/1	2	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	*	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	*				
256/2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	*	2
	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
	1	*	2	2	2	*	*	1	1	2	1	1
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1
	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	2	1	1	*	2	1	1	2
	2	2	2	*	1	1	2	1	1	1	2	1
	2	1	2	1	2	1	1	1				
256/3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	*	2	2	2	2	1
	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	*
	*	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1
	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	2	1	2	1	2	1	1	1				
256/4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	1				
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	*
	*	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	2				
239/1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1

	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
	1	2	2	2	2	2	1	1				
239/2	*	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	1	1	1	2				
239/3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2
	1	1	1	1	2	2	1	1				
239/5	1	1	2	*	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	*	1	2	2	1	1	1
	1	*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1
	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2			
213/1	*	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1
	1	1	*	2	2	1	2	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	1	1				
213/2	1	*	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	*	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	*	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2			
213/3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	*	*
	2	2	*	1	1	1	*	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	*	2	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1
	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	1	*	1	1	1	1	*	2	*	1
	2	2	1	1	2	2	1	1				
213/4	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	*
	*	1	1	*	2	2	2	1	2	2	1	1
	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	1	1	2	2	1	2	*	*	1	1

	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	1				
213/5	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	1	1	*	1	1	1	2	2	*
	*	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2
	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2
	1	1	2	2	2	1	1	2				

APÊNDICE B – Genótipos de marcadores AFLP e microssatélites dos 79 acessos da população F1 referentes aos marcadores segregantes para genitor masculino (CP 96) para entrada no programa WinQTLcartographer e MAPMAKER. Com exceção dos genótipos dos novos marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, os demais genótipos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jaime Cavalcanti, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará.

11	1	2	1	1	2	2	2	*	*	1	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2
	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	1
	2	1	2	*	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2
	1	2	2	*	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	*	*	1	1	*	1	1	1	2	1
	*	*	*	1	2	2	1	1	2	*	2	2
	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1
	2											
12	1	2	2	2	2	1	1	1	*	2	1	1
	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2
	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	*	1	2	1	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2
	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	*	2	*	1	1	2	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	*	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2
	2											
13	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1

	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2
	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	1	2	1	*	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	*	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2
	2	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
14	2	1	1	*	2	1	1	2	1	2	2	1
	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1
	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2
	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1
	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	1	2	1	1	2	2	1	2	*	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2
	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2
15	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1
	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	1	*	*	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	*	1	1	1
	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1
	1	2	2	*	1	1	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
16	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2
	1	1	2	1	2	2	1	1	*	2	1	*
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	*	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	*	*	1	2	1	2	*
	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2
	1	*	*	*	*	*	2	2	1	2	2	2
	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2

	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2
	2											
17	1	2	1	1	1	2	1	2	2	1	1	2
	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1
	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2
	*	1	*	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	1	2	2	1	1	1	2	2	2	*	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	*	1	2	2	1	2	*
	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	*
	*	*	2	1	*	*	2	1	1	2	2	2
	1	*	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2
	1											
18	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1
	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	1	1	2	1	2	2	1	*	2	2
	1	2	1	2	2	*	*	*	1	1	2	1
	2	1	*	1	1	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	1	2	1	*	*	1	1	2	*	2
	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2
	1	2	2	2	1	1	2	2	1	*	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	*
	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1
	2	*	2	1	2	*	1	1	1	1	2	2
	2	*	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1
	2											
19	*	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2
	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2
	*	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1
	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	*	*
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	*	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	*	2	1
	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	*	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	2	*	*	2	*	*	1	*	1	2	2	2
	2	*	2	2	1	2	2	1	2	2	*	1
	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2
	2											
20	2	1	1	1	1	2	2	*	1	2	2	1
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	2	1	*	2	2

	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	1	2	*	1	1	2	2	2	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2
	*	*	2	*	*	*	1	1	1	1	1	1
	2	2	*	1	1	2	2	1	1	2	2	2
	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1
	1											
51	2	2	2	2	2	2	1	2	*	2	1	1
	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1
	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1
	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2
	*	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	1	2	1	2	2	1	*	1	1
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1
	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1
	2	*	1	2	2	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	1	2	2	2	1	2	1	2
	1	1	*	2	2	1	1	2	2	1	2	1
	2											
52	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1
	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2
	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	*	1	1
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2
	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	*
	*	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1
	*	*	*	1	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2
	2											
53	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2
	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	2	2	*	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	2	1	2	*	1	1
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1
	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	*	*	2	*	*	*	1	2	1	1	*	*
	2	*	1	*	2	2	2	1	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1
	2											
54	1	1	1	1	1	1	1	*	2	2	2	2
	1	1	2	1	*	1	1	2	2	2	2	2

	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1
	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	*	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
	2	2	*	1	1	1	1	2	2	2	1	1
	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	*
	*	*	2	*	*	*	2	2	1	1	2	1
	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
55	*	1	*	2	2	2	1	2	2	1	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2
	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	*
	*	*	2	1	2	*	1	1	2	1	2	*
	2	2	*	2	1	2	2	2	1	2	2	1
	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
56	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2
	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	*	2	2	*	2	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1
	2	2	1	2	1	*	*	*	*	*	2	1
	2	1	2	2	2	1	2	1	1	*	1	1
	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2
	2	*	2	1	*	*	2	1	2	2	1	2
	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2
57	1	2	2	2	1	2	2	1	*	1	1	2
	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	*
	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2

	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1
	1											
58	2	2	*	1	2	1	2	1	1	2	1	2
	1	2	1	2	*	2	2	1	2	1	2	1
	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	*	1	1	2	2	1	2	1	2	1
	*											
59	1	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1
	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2
	*	*	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
	2											
60	1	1	*	2	2	1	1	1	2	2	2	*
	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	*	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1
	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2
	2											
82	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1	*
	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1

	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2
	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1
	2											
83	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1
	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	*	*	*	*	*	1	1	2	2	1	*	*
	*	*	1	2	1	2	2	2	2	2	2	*
	*	*	*	*	1	1	1	*	1	1	2	*
	*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	*
	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1
	*	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	*	2	2	1	2	1	2	1	1	2
	*											
84	1	2	2	2	2	2	2	2	1	*	1	1
	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1
	1	*	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	2	1	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	*	2	2	*	2	1	*	*	2	1	2
	*	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1
	1	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1
	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	1											
85	2	1	1	*	1	1	1	1	1	1	2	1
	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	*
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
	*	*	*	*	1	1	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	2	1	*	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	*	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	1											

86	2	1	*	*	1	2	2	2	1	2	2	1
	1	1	2	2	*	2	2	1	2	1	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1
	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2											
87	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	1	1	2	2	1	*	2	2	2	1	1
	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2
	2											
88	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1
	1	2	2	1	2	2	2	2	*	2	2	*
	*	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
	*	2	1	2	2	1	1	*	2	1	2	1
	2	2	2	2	*	*	2	1	2	2	2	1
	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1
	2	*	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2
	2	*	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1
	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1
	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	*	1	2	1	2	1	2	1	2
	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	1
	2	1	2	1	2	1	1	2	2	*	1	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1
	1											
89	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1
	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	2
	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2
	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1

	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1
	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1
	2											
90	2	1	*	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2
	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2
	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2
	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2
	2	2	2	1	*	*	*	*	*	*	1	2
	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1	2
	1											
103	*	*	*	1	2	2	2	2	1	2	1	2
	1	*	2	1	*	*	*	*	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	2											
104	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	*	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1
	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	*	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	*	2	2	2	2	1	1
	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1
	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2
	2											
105	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
	2	1	2	2	1	1	1	1	2	*	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	*	1
	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2

	*	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	1
	2											
109	2	1	1	1	1	2	1	1	*	2	2	1
	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1
	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1
	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1
	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2
	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2
	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2
	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1
	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2
	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2
	2	2	2	2	1	*	1	2	1	1	1	2
	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1
	2											
110	2	1	2	1	1	*	2	2	1	1	2	2
	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	*	2	2
	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	1											
118	*	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2
	2	2	*	*	1	*	*	2	2	2	2	2
	*	*	*	*	*	1	2	2	2	1	*	*
	*	*	2	1	2	2	2	2	2	1	2	*
	*	*	*	*	1	2	1	*	2	1	2	*
	*	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2
	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2
	2	1	*	1	2	1	2	1	1	1	2	2
	*											
120	*	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	1	*	2	1
	*	*	*	*	*	2	2	2	2	1	*	*
	*	*	2	1	1	1	2	1	2	2	2	*
	*	*	*	*	2	2	1	*	2	2	1	*
	*	1	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2
	1	*	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2

	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2
	1	1	2	*	2	2	2	2	1	1	2	2
	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1
	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2
	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	*	*	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	*											
121	*	*	1	2	2	2	1	2	*	1	1	1
	*	*	2	*	*	*	*	*	2	2	2	1
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	*	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	1	1	*	*	*	*	*	*	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1
	2	2	1	2	2	*	2	2	1	2	1	2
	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1
	2											
122	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1
	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	2	1	*	1	2	2	1	*	1	2	2	2
	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1
	1	2	*	1	1	2	2	1	1	2	1	1
	1	1	1	1	*	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	*	1
	*	*	*	1	1	1	2	2	1	2	1	1
	1	2	2	1	2	1	2	1	*	1	1	2
	1	*	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1
	1	2	2	*	1	1	2	1	1	2	2	1
	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	1	2	*	2	2	1	1	1	1	*	*
	2	1	1	2	1	1	1	1	1	*	1	2
	*	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1
	2											
123	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	2	2	2	*	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2
	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2
	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1
	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2
	2											
124	1	*	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1

	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	1	2	1	1	1	2	2	*	1	1	2
	1	2	1	2	2	*	*	1	2	1	1	1
	1	*	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1
	2	2	2	1	1	2	*	1	1	1	1	2
	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	2	1	1	*	1	2	1	2	*	*	1	1
	1	2	1	1	1	*	1	2	2	2	1	1
	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
	2											
125	*	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1
	1	1	2	1	1	1	*	1	2	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1
	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2
	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2
	1											
126	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2
	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2
	2	*	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1
	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1
	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1
	2											
127	1	1	2	2	1	1	1	2	*	2	*	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1
	2	2	*	1	1	*	2	1	1	1	*	2
	2	2	1	1	1	*	*	*	1	2	1	2
	1	*	*	2	1	2	1	1	2	2	*	2
	1	2	2	1	1	2	*	1	2	1	1	1
	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
	1	2	2	1	1	*	2	*	*	2	1	1
	1	1	1	1	*	2	2	1	1	2	1	2
	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2

	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1
	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1	1	2
	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1
	2											
128	1	2	*	1	*	1	2	2	*	1	1	1
	2	*	*	1	1	1	2	2	1	2	1	1
	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
	2	1	2	1	2	*	*	*	*	*	1	1
	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2
	1	*	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1
	1											
129	2	1	2	*	1	1	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	1	2	*	2	1	2	1	2	1
	1	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2
	2	*	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2											
151	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2
	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2
	2	*	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	2											
152	2	2	1	1	1	1	1	1	1	*	1	2
	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2

	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1
	2	*	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1
	2											
154	2	2	*	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2
	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1
	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	*	2	2	1	2	*	1	2	2	1	2
	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2
	1	*	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2
	2											
155	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1
	1	2	*	2	2	2	2	1	1	1	2	2
	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2
	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	2	*	*	1	2	*	*	*
	*	2	2	*	2	1	2	1	2	1	1	2
	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	2											
156	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	*
	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1
	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2

157	*	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	*	1	*
	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	2	2	1	1	2	2	2	1	*	2	*	2
	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2
	2	2	2	1	1	2	*	1	2	2	2	2
	*	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2
	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1
	2											
158	1	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1
	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	*	*	2	1	2	1	1	2	1
	2	1	1	*	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	2	*	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	1	*	*	*	*	*	2	2
	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2
	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1
	2	*	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	1											
159	2	1	*	1	1	1	2	2	*	2	1	2
	1	1	2	2	1	2	2	1	*	2	2	*
	*	1	1	2	*	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	1	2	2	1	2	*	1	2	1	2
	2	2	*	*	2	1	2	1	2	2	1	1
	1	2	2	1	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2
	2	1	2	2	*	*	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	*	1	1	1	2	1	2
	1	*	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1
	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	*	2	2
	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
	2											
160	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1
	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	*
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2
	2	1	2	*	2	2	2	2	1	2	2	1
	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2
	1	1	*	1	2	1	1	1	1	2	1	2
	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2

	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2
	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2
	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	2											
191	1	2	1	1	*	2	1	2	2	2	1	2
	1	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1
	2	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1
	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1
	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2
	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2
	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	*
	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
	2											
192	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2
	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2
	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1
	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	*	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1
	2											
193	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1
	*	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1
	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	2											
194	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2

	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	*	*	*	*	*	1	2
	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2
	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1
	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1
195	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	*	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2
196	1	*	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1
	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	*
	2	2	2	1	2	*	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1
	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	1	1	1	2	2	1	*	*	2
	1	1	2	*	2	2	1	1	2	2	2	2
	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	*	2	1	1	*	1	2	1	1
	2	1	2	1	1	1	*	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
197	1	*	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2
	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1
	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1
	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	2	1	*	2	2	1	1	1	2	2	2	1
	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1

	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2
	2											
198	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1
	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1
	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	*
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1
	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	*
	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1
	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
	2											
199	2	*	2	2	1	2	1	2	1	1	2	1
	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1
	*	*	*	*	*	2	2	2	2	2	*	*
	*	*	2	2	2	1	2	2	2	1	2	*
	*	*	*	*	1	1	2	*	2	2	2	*
	*	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2
	2	*	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2
	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	*	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	*											
256/1	2	*	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1
	2	1	1	2	*	1	1	1	1	2	2	2
	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	*	1	2	2	2	*	*	*	*	*	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2
	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	*	1	1	*	*	*	*	2
	1	1	1	*	1	2	2	2	1	2	1	2
	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1
	2	2	*	1	2	2	2	2	2	2	2	1
	*											
256/2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	*
	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	*	*	*	*	*	1	1	*	1	1	*	*
	*	*	2	2	1	1	2	1	2	2	1	*
	*	*	*	*	1	1	1	*	2	2	2	*
	*	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2
	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1

	2	1	2	1	1	2	1	*	1	1	1	2
	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2
	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1
	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1
	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1
	1	2	*	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	*											
256/3	*	2	1	1	1	1	1	1	2	1	*	*
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	*
	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	*	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2
	2	1	1	2	2	*	2	1	1	2	1	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2
	2											
256/4	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	*
	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1
	1	2	1	*	2	2	1	2	2	2	2	2
	*	*	*	*	1	2	1	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1
	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2
	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	*	2
	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1
	2											
239/1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	*
	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1
	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1
	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	*
	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1
	2	2	*	1	2	2	2	1	2	1	2	1
	*											
239/2	1	2	1	1	1	2	2	2	*	2	1	*
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	*

	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2
	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	*	*	*	*	*	1	2
	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2
	1	2	1	1	*	*	*	*	*	*	1	2
	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1
	2											
239/3	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	*
	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2
	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	1	2	2	*	2	2	2	2	2	1	2
	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2
	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2
	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2
	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	1	2	*	2	1	1	1	1	2	1	1	1
	*											
239/5	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	*
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	*	*	*	*	*	2	*
	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2
	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2
	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2
	2	2	1	2	1	2	2	2	2	*	1	1
	2	2	*	1	2	2	2	1	1	2	1	1
	*											
213/1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	*
	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	*
	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	*
	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1
	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1
	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1
	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2

	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1
	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2
	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
	1											
213/2	*	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	*
	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1
	*	2	2	2	1	2	*	2	1	2	2	1
	2	1	1	2	2	1	2	2	1	*	2	2
	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2
	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2
	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2
	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2
	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2
	2											
213/3	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	*
	2	2	2	1	2	1	2	1	2	*	2	2
	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
	2	1	1	1	1	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	2	2	2	1	*	*	1	1	*
	*	*	*	*	2	2	2	1	1	2	1	2
	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2
	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2
	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2
	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2
	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
	2	1	1	2	*	*	*	*	*	*	2	2
	1	2	*	2	2	1	2	2	2	1	2	2
	*											
213/4	2	1	1	1	1	1	1	2	*	2	*	*
	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1
	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	*
	1	1	2	2	2	2	1	*	1	1	2	1
	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	*
	1	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	1	2	1	*	1	2	1
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2
	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2
	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2
	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1
	2											
213/5	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	*
	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1
	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2
	1	1	2	2	2	2	1	1	1	*	2	1
	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1
	1	1	*	2	2	1	1	1	2	2	2	2

1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2
1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1
1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2
1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2
1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2
2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1
2	1	*	2	1	2	1	2	2	2	1	2

APÊNDICE C – Fenótipos dos 79 acessos da população F1 referentes às três características estudadas (Mofo-Preto, Diâmetro da Copa e Altura da Planta) para mapeamento de QTLs, gentilmente cedidos pelo Dr. Jaime Cavalcanti, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará

INDLABE	mofopreto	diametrocopa	alturaplanta
11	0,8	1,8	2,2
12	0,85	1,5	1,5
13	0,55	1,45	1,5
14	0,75	1,7	1,4
15	0,8	1,3	1,8
16	0,4	1,7	2
17	0,35	1,6	2,1
18	0,6	1,1	2
19	0,4	1,8	2,2
20	0,55	2	2,4
51	1,65	1,8	1,7
52	1,1	0,9	1,5
53	1,2	1,5	1,2
54	0,7	1,8	1,4
55	1,65	2,4	2,1
56	0,6	1,6	1,9
57	0,85	1,9	2,2
58	0,3	2,3	2,7
59	0,5	2,5	2,4
60	0,6	1,5	2,6
82	0,35	1,9	1,9
83	0,45	2,1	2
84	0,85	1,2	2,1
85	0,35	1,2	2,3
86	0,2	2,05	2
87	0,75	1,6	1,7
88	0,35	1,2	2
89	0,65	1,5	2,1
90	0,7	1,05	2,1
103	1	1,5	2,2

104	0,9	2,3	2,2
105	0,55	1,4	1,6
106	0,4	1,6	2,1
107	0,45	1,9	1,6
108	0,3	1,8	2
109	0,9	1,6	2,2
110	0,9	1,2	1,7
118	0,3	1,4	1,6
120	0,65	1,2	1,6
121	0,65	1,1	1,6
122	0,5	1,6	2,3
123	0,9	1,8	2
124	0,45	1,55	1,9
125	0,7	2,3	2,1
126	1,1	1,7	1,9
127	0,5	2,2	1,7
128	0,55	1,6	1,7
129	0,25	1,7	1,6
151	0,9	1,6	1,5
152	0,4	1,8	1,9
154	0,55	1,6	2,3
155	0,2	1,8	2,4
156	0,65	1,8	2,1
157	0,05	2	2,6
158	0,45	1,7	2,5
159	0,35	2,2	1,9
160	0,3	1,55	2,45
191	0,15	1,3	1,55
192	0,55	2,4	2,05
193	0,2	1,7	1,85
194	0,6	1,5	2,15
195	0,45	1,9	2,4
196	0,15	2,1	2,4
197	0,15	1,7	1,8
198	0,25	2,25	1,9
199	0,6	2,05	2,35
256/1	-	-	-
256/2	-	-	-
256/3	-	-	-
256/4	-	-	-
239/1	-	-	-
239/2	-	-	-
239/3	-	-	-
239/5	-	-	-
213/1	-	-	-
213/2	-	-	-

213/3	-	-	-
213/4	-	-	-
213/5	-	-	-

APÊNDICE D – Genótipos de 36 acessos de *A. occidentale* e 1 acesso de *A. microcarpum* do banco de germoplasma referentes aos 14 marcadores microssatélites caracterizados neste trabalho.

AOBR3

149/159	149/157	157/175	149/157	149/157
149/157	151/157	151/161	149/161	157/159
151/157	149/151	149/151	149/149	149/159
149/163	149/149	149/149	151/151	149/163
151/175	151/157	151/175	149/149	149/149
149/157	149/149	149/149	149/149	151/157
149/151	149/163	149/157	155/161	149/149
149/149	149/157			

AOBR12

137/143	135/141	167/167	135/135	135/141
141/141	167/167	135/135	135/135	135/135
135/135	135/135	135/135	135/135	135/135
135/141	135/135	135/135	0/0	137/137
135/135	135/135	135/135	135/135	135/135
135/135	135/141	135/135	135/135	135/135
135/135	135/135	135/135	135/135	135/135
135/135	133/141			

AOBR15

137/153	137/151	137/137	137/151	137/137
137/137	137/137	137/137	137/137	137/137
137/151	137/153	137/153	153/153	137/151
137/151	137/151	0/0	195/195	137/153
151/151	137/153	137/153	137/137	137/151
151/151	137/137	137/153	137/137	137/137
137/137	137/151	137/151	137/151	137/151
153/153	137/137			

AOBR25

0/0	145/163	163/163	145/145	163/169
167/167	151/171	147/169	163/169	145/145
163/163	165/165	167/167	165/165	165/165
167/167	165/165	165/165	169/169	165/165
165/165	165/165	165/165	165/165	165/165
165/165	165/165	165/165	169/169	167/167
169/169	147/163	165/165	149/167	165/165
167/167	163/163			

AOBR35

151/153	155/155	153/155	155/155	155/155
153/155	153/153	153/155	153/155	153/153
153/155	153/153	153/155	153/153	151/153
153/153	153/153	153/155	153/153	153/153
153/153	153/157	153/157	153/155	151/151
153/155	153/153	153/153	153/153	153/153

	151/157 155/155	153/153 155/155	155/155	155/155	155/155
AOBR38	157/157 149/149 0/0 151/151 151/151 153/159 151/151 153/159	151/161 151/151 151/157 151/157 153/159 153/157 151/159 151/151	151/151 153/155 157/157 151/157 153/159 153/159 151/157	151/151 151/151 157/157 151/151 153/159 149/151 151/151	0/0 151/157 151/159 151/159 153/159 151/151 153/159
AOBR39	202/202 194/202 202/202 198/198 202/202 202/202 194/194 202/202	204/204 196/196 202/202 202/202 198/204 202/202 202/202 194/194	194/194 194/196 202/202 202/202 202/202 204/204 202/202	194/194 194/194 202/202 194/194 202/202 194/194 198/198 198/198	202/202 202/202 202/202 196/202 202/202 198/198 202/202
AOBR45	0/0 154/154 160/164 160/164 160/164 154/166 152/166 164/164	154/154 154/154 164/164 156/160 160/166 154/164 162/162 160/160	154/164 154/164 164/164 164/164 164/164 164/164 160/164	156/164 154/164 164/164 156/164 166/166 164/164 164/164 164/164	154/164 0/0 164/164 0/0 164/164 156/158 160/164
AOBR47	168/178 178/178 168/178 168/168 168/178 178/178 0/0 176/176	168/178 168/178 168/178 168/178 178/178 168/176 178/178 168/174	196/196 0/0 178/178 168/178 168/178 174/176 178/178 168/178	178/178 178/178 168/168 178/178 176/178 178/178 178/178 178/178	178/178 168/178 168/168 168/178 168/178 168/178 176/176
AOBR48	145/145 135/151 0/0 147/147 0/0 105/105 149/149 151/151	0/0 145/145 147/147 147/147 145/151 103/105 107/107 0/0	107/107 135/151 105/109 147/151 145/145 145/145 145/145	0/0 105/107 145/155 143/151 145/145 147/147 145/151	135/143 0/0 145/145 149/151 145/145 0/0 135/145
AOBR56	163/165 151/165 165/167 165/165	151/169 159/169 163/165 167/167	151/169 151/153 163/165 163/165	151/153 163/165 163/165 165/167	153/163 165/167 161/165 163/165

163/167	163/165	151/165	165/165	165/165
153/165	165/165	163/165	167/167	151/153
163/165	163/165	163/165	163/167	163/165
149/165	163/169			

AOBR92

107/107	93/93	93/93	93/109	93/93
87/145	93/93	93/93	93/107	93/93
93/107	91/107	93/107	93/107	105/105
107/107	93/107	107/107	93/107	93/107
93/107	107/107	93/93	93/107	107/107
93/93	93/93	93/107	107/107	107/107
107/107	93/93	93/107	93/107	107/107
91/107	93/105			

AOBR94

191/191	173/183	187/187	173/181	181/181
173/191	179/183	183/183	173/183	183/191
179/183	183/191	183/191	183/191	183/189
173/183	183/193	183/183	191/191	183/183
181/183	183/191	187/191	183/191	183/191
173/183	183/183	183/183	183/183	183/191
183/191	183/183	173/183	173/183	183/191
191/191	179/183			

AOBR99

53/97	91/101	91/91	91/91	0/0
91/91	91/91	95/95	0/0	91/97
97/97	91/97	97/97	97/97	91/97
91/91	91/97	93/99	91/91	91/97
97/97	91/97	91/97	91/97	91/97
91/97	91/91	91/97	91/91	53/91
91/91	91/97	51/91	91/97	91/97
91/97	91/91			