

IDENTIFICAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CACAUEIROS AUTOCOMPATÍVEIS SELECIONADOS PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA EM FAZENDAS PRODUTORAS

¹Milton Macoto Yamada, ¹Acassi Batista Flores, ²Fábio G. Faleiro, ¹Gilson Roberto Pires Melo, ¹Mariosvaldo Morais Macedo, ¹Uilson Vanderlei Lopes, ³Ronan Corrêa Xavier, ¹Reinaldo Figueiredo dos Santos

¹CEPLAC/CEPEC/SEGEN, Caixa Postal 07, 45600-970 Itabuna, Bahia, Brasil. ²Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, 73301-970, Planaltina, Distrito Federal. ³UESC, Km 16 Rod. Ilhéus-Itabuna, 45650, Ilhéus, Bahia, Brasil

O objetivo do presente trabalho foi identificar e estudar a diversidade genética das seleções das fazendas para a resistência a vassoura de bruxa, observar o relacionamento com os clones SCA6 e SCA12 e elucidar a origem das árvores autocompatíveis. Os acessos e seleções utilizadas foram: SIC 823, SCA 6, UF 613, SCA 12, ICS1, ICS8, TSH 516, SIC19, ICS 6, IMC 67, SIC 329, PA 150, CA1.4, FSU 01, PS 1319, FSU 77, AC 01, HW 02, PM 02, CA7.1, BJ 11, FSU13, FSU18, FB 17, RVID 05, SM 06, PH 16, HW 25, VB 1128, SJ 02, SM 02, FB 206 e CSG 70. Marcadores RAPD foram utilizados e os dados binários foram utilizados para os agrupamentos feito através do método UPGMA. Na análise de agrupamento os acessos autocompatíveis ficaram agrupados em 3 grupos de similaridade. O grupo menor com PS 1319 e FSU 77 agrupando com o IMC 67. Os outros acessos autocompatíveis FSU 01, HW 02, SJ 02, BJ 11, PH 16 e FB 206, CSG 70, HW 25 formaram os outros dois grupos contendo apenas seleções das fazendas. As seleções AC 01, RVID 05 e FB 17 apesar de agruparem com materiais locais SIC 19 e SIC 823, não apresentaram autocompatibilidade. Estes resultados dão um indício de que de fato as seleções autocompatíveis não são descendentes diretos de SCA 6 ou SCA 12. Tais seleções podem ter origem de progênies de TSH 516 ou mesmo cruzamentos como IMC 67 x UF 613 que foram distribuídos no passado. Houve uma dispersão muito grande dos acessos, fato verificado nos trabalhos anteriores. Os resultados do presente trabalho, e dos anteriores, mostram que muitas das seleções autocompatíveis promissoras agruparam distantes de sca6 e de outros progenitores. Tais resultados evidenciam a variabilidade genética e a importância dos acessos selecionados em fazendas considerando a resistência a vassoura-de-bruxa e a autocompatibilidade.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, marcadores moleculares, melhoramento genético.

Identification and genetic variability of self compatible cacao accessions selected for resistance to witches' broom in farms. The objective of the present work was, to identify and to study the genetic diversity of the farm selections for the resistance to witches' broom, to observe the relationship with the clone SCA6 and SCA 12 and to elucidate the origin of selfcompatible trees. The accesses and selections used were: SIC 823, SCA 6, UF 613, SCA 12, ICS1, ICS8, TSH 516, SIC19, ICS 6, IMC 67, SIC 329, PA 150, CA1.4, FSU 01, PS 1319, FSU 77, AC 01, HW 02, PM 02, CA7.1, BJ 11, FSU13, FSU18, FB 17, RVID 05, SM 06, PH 16, HW 25, VB 1128, SJ 02, SM 02, FB 206 e CSG 70. RAPD markers were used and the binary data were used for cluster analysis through UPGMA method. In the cluster analysis the selfcompatible accesses were in three groups of similarity. The smaller group with PS 1319 and FSU 77 grouped with IMC 67. The other selfcompatible accesses FSU 01, HW 02, SJ 02, BJ 11, PH 16, and FB 206, CSG 70, HW 25 formed other two groups just containing farmers selections. The selection AC 01, RVID 05, and FB 17 in spite of group with local materials SIC 19 and SIC 823, they did not present selfcompatibility. The results of this work give an indication that in fact selfcompatible selections are not direct offspring of SCA 6 and SCA 12. Such selections can be originated from TSH 516 or even cross as IMC 67 x UF 613 that was distributed in the past. There were high dispersion of accessions, fact verified in the previous work. The results of the present and previous work, showed that many from the promising selfcompatible selections clustered distant of SCA 6 and other progenitors. The results evidence the genetic variability and the importance of accesses selected in the farms considering witches' broom and selfcompatibility.

Key words: *Theobroma cacao*, molecular markers, breeding.

Introdução

O cacau foi introduzido na Bahia em 1746. Tal material genético procedente do Pará era relativamente homozigoto, sendo plantados durante muitos anos com sucessivas seleções realizada pelos fazendeiros a cada ciclo de cultura. As Instituições de Pesquisas também fizeram as seleções dentro desses materiais, resultando nos acessos das séries SIC, SIAL e EEG, sendo a sigla dada de acordo com a Instituição que fez a seleção (Vello et al., 1969). Posteriormente, para aumentar a variabilidade genética o Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da CEPLAC, criado em 1963, introduziu clones de outros países. Naquela época os híbridos interclonais eram utilizados em grande parte do mundo. A CEPLAC começou a obter, avaliar e distribuir híbridos interclonais originados de cruzamentos entre acessos locais, entre acessos introduzidos e entre acessos locais e introduzidos. O programa de melhoramento visava principalmente a produtividade, resistência a *Phytophthora* sp. e a qualidade da amêndoa. Apesar do problema de incompatibilidade no cacauzeiro, principalmente nos acessos Amazônicos, o problema era contornado com o uso de mistura de grande número de híbridos.

Com a chegada da doença vassoura-de-bruxa na Bahia em 1989 (Pereira et al., 1989), foi dada a ênfase para melhoramento visando resistência a essa doença. Métodos culturais para redução da fonte de inóculo, como a remoção da vassoura, foram recomendados, e isto onerava muito os custos de produção. Os acessos locais ainda predominavam em muitas propriedades e por serem relativamente homozigotos e susceptíveis, em algumas propriedades a cultura do cacau foi dizimada. A CEPLAC iniciou, em 1993, a seleção para resistência a vassoura de bruxa nas fazendas altamente atacadas pela vassoura-de-bruxa, principalmente na área de híbridos onde os clones SCA 6 e SCA 12, tradicionais fontes de resistência, foram usados como um dos progenitores de híbridos. Essas seleções realizadas pela CEPLAC ficaram conhecidas como seleções VB. Posteriormente, foi sugerido que os produtores identificassem árvores livres de vassouras, para posterior acompanhamento dos pesquisadores e extensionistas da CEPLAC. Tais seleções estão sendo codificadas com as iniciais dos nomes de produtores ou de quem selecionou as plantas ou em certos casos dos nomes das fazendas. Considerando que os clones SCA6 e SCA 12 e outros acessos Alto Amazônicos são materiais auto-incompatíveis, esperava-se que muitas dessas seleções fossem auto-incompatíveis. Fortuitamente, foram identificadas algumas dessas seleções como genótipos autocompatíveis. A presença de árvores autocompatíveis nessas seleções não era

esperada com frequência em razão dos clones SCA 6 e SCA 12 não possuírem alelos para autocompatibilidade.

A incompatibilidade foi descoberta por Pound (1932). Este pesquisador verificou que a mudança da auto-incompatibilidade para auto compatibilidade poderia ocorrer em certos períodos do ano. A ocorrência de cruzamentos incompatíveis foi demonstrado por Pound (1932) em genótipos trinitários e posteriormente por Posnette (1945) em materiais alto amazônicos.

A explicação genética da auto-incompatibilidade foi proposta pela primeira vez por Knight and Rogers (1955). Foi explicado como sistema esporofítico de incompatibilidade controlado por um simples loco com 5 alelos na seguinte ordem de dominância: $S1>S2=S3>S4>S5$, sendo a mesma ordem do lado do progenitor masculino como feminino. Depois, Cope (1962) usando algumas das mesmas árvores de Knight e Rogers e muitos dos clones ICS, encontrou resultados que não poderiam ser explicados pelas teorias apresentadas. Os clones ICS 1 e ICS 45 foram autocompatíveis e quando cruzado um com outro originaram progênies que foram auto-incompatíveis. Ele concluiu que a incompatibilidade em cacau é determinada por 3 locos independentes, sendo um dos locos o S.

Estudos anteriores mostraram que as progênies de alguns clones como PA 150 (Yamada et al., 1988) UF 613 (Bartley e Yamada, 1982) e TSH (progênies de ICS 1x SCA6) podem segregar para autocompatibilidade.

Estudos feitos nas seleções das fazendas (Faleiro, F.G. et al., 2004; Faleiro, A.S.G. et al., 2004; Yamada et al., 2003) indicaram grande diversidade genética dos acessos, alguns dos quais não agruparam com SCA 6 e SCA 12.

O objetivo do presente trabalho foi identificar e estudar a diversidade genética das seleções das fazendas para a resistência a vassoura de bruxa, observar o relacionamento com os clones SCA 6 e SCA 12 e elucidar a origem das árvores autocompatíveis.

Material e Métodos

Material genético:

Para o estudo de identificação de plantas autocompatíveis, foram realizadas autofecundações em aproximadamente 250 seleções, para resistência à vassoura-de-bruxa, em várias fazendas no estado da Bahia.

No estudo da variabilidade genética, os acessos autocompatíveis foram analisados juntamente com os clones utilizados como progenitores de híbridos distribuídos pela CEPLAC que poderiam segregar para as plantas autocompatíveis. Foram também incluídos no

presente estudo os acessos SCA 6 e SCA 12 por serem as principais fontes de resistência à vassoura-de-bruxa. Os acessos analisados, progenitores e seleções autocompatíveis estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista dos acessos de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) utilizados no presente estudo e respectivas procedências.

Num	Acesso	Procedência	Num	Acesso	Procedência
1	SIC 823	Brasil	17	AC 01	Faz Santa Vitória- Itajuípe
2	SCA 6	Perú	18	HW 02	Faz Hawai- Ilhéus
3	UF 613	Costa Rica	19	PM 02	
4	SCA 12	Perú	20	CA 7.1	
5	ICS 1	Trinidad	21	BJ 11	Faz Bom Jesus- Itajuípe
6	ICS 8	Trinidad	22	FSU 13	Idem ao 14
7	TSH 516	Trinidad	23	FSU 18	Idem ao 14
8	SIC 19	Brasil	24	FB 17	Faz Brasileira- Uruçuca
9	ICS 6	Trinidad	25	RVID 05	Faz Bom Jesus- Uruçuca
10	IMC 67	Perú	26	SM 06	Faz Santa Mônica- camacã
11	SIC 329	Brasil	27	PH 16	Faz Porto Híbrido- São José do Vitória
12	PA 150	Perú	28	HW 25	Idem ao 18
13	CA1.4		29	VB 1128	Faz Brasileira- Uruçuca
14	FSU 01	Faz Sta. Ursula- Camacã	30	SJ 02	Faz São José- Itajuípe
15	PS 1319	Faz Porto Seguro- Ilhéus	31	SM 02	Idem ao 26
16	FSU 77	Idem ao 14	32	FB 206	Idem ao 24
			33	CSG 70	Faz conjunto Serra Grande- Ilhéus

Extração do DNA:

Folhas de cada um dos acessos foram coletadas para extração do DNA genômico utilizando-se o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro *et al.*, 2002). Após a extração, a concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% foram usadas como indicadoras da integridade e da pureza do DNA extraído. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10ng/μL.

Obtenção dos marcadores RAPD:

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas via PCR (Polimerase Chain Reaction) para obtenção de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25μL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 mM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 mM de um *primer* decâmero, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Foram utilizados os seguintes *primers* decâmeros: A04, A08, I16, N04 e F02 para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em

termociclador, programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram calculadas distâncias genéticas baseadas no complemento do coeficiente de similaridade (D) de Nei and Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método de UPGMA (Unweighted pair-group arithmetic average) como critério de agrupamento. Foi feita a conversão das distâncias genéticas em distâncias gráficas com base em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do programa SAS (SAS, 1989) e do programa Statistica (STATSOFT, 1999).

Resultados e Discussão

Entre os 250 acessos analisados no presente projeto, dez seleções autocompatíveis com características interessantes de produtividade e resistência a vassoura-de-bruxa foram encontrados: PS 1319, FSU 77, FSU 01, HW 02, SJ 02, BJ 11, PH 16, FB 206, CSG 70 e HW 25. Tais acessos foram utilizados no estudo de diversidade genética juntamente com outros 11 com base em marcadores moleculares.

Para o estudo da diversidade foram obtidos 51 marcadores RAPD, dos quais 11 foram monomórficos. As distâncias genéticas variaram de 0,02 entre FB 206 e CSG 70 a 0,35 entre ICS 6 e CA7.1 (dados não apresentados). Resultado bem próximos foi verificado por Faleiro et al. (2004) que encontrou distância genética variando entre 0,04 e 0,41 entre as seleções das fazendas usando RAPD. Muitas das seleções analisadas por Faleiro et al. 2004 foram feitas pela CEPLAC e receberam a sigla VB. Neste trabalho, as seleções foram realizadas junto com os fazendeiros.

Na análise de agrupamento (Figura 1), pode-se observar que os acessos autocompatíveis ficaram em 3 grupos de similaridade. O grupo menor com PS 1319 e FSU 77 agrupando com IMC 67. Os outros acessos autocompatíveis FSU 01, HW 02, SJ 02, BJ 11, PH 16 e FB 206, CSG 70 e HW 25 formaram os outros dois grupos contendo apenas seleções das fazendas. As seleções AC 01, RVID 05 e FB 17 apesar de agruparem com materiais locais SIC 19 e SIC 823, não apresentaram autocompatibilidade. Os

resultados deste trabalho dão um indício que de fato as seleções autocompatíveis não são descendentes diretas de SCA 6 ou SCA 12. Tais seleções podem ter origem de progênies de TSH 516 ou mesmo cruzamentos como IMC 67 x UF 613 que foram distribuídos no passado.

Algumas dessas seleções como SJ02, PH 16, e PS 1319 em estudos anteriores (Faleiro, F.G. et al., 2004; Faleiro, A. S.G. et al., 2004) também não se agruparam com SCA 6 indicando que esses materiais podem ter origem de cruzamentos envolvendo material geneticamente distante de SCA 6 ou progênies de TSH como demonstrado por Yamada et al. (2003). A possibilidade dos acessos SJ-02, PH 16 e PS1319 terem origem direta do SCA 6 é muito pequena porque este clone possui os alelos S2 S3 e não segregaria para as plantas autocompatíveis. Talvez isto seja possível para as seleções auto-incompatíveis. Outra possibilidade, é que sejam progênies de outros materiais como PA 150 ou IMC 67 como indicado nos estudos de paternidade (Yamada e Lopes, 1999).

Houve uma dispersão muito grande dos acessos (Figura 2), fato já verificado em trabalhos anteriores (Faleiro, F.G. et al., 2004, Faleiro, A.S.G. et al., 2004, Yamada et al. 2003). Os resultados do presente trabalho, e dos trabalhos anteriores, mostram que muitas das seleções autocompatíveis promissoras agruparam distantes de SCA 6 e de outros progenitores. Tais resultados evidenciam a variabilidade genética e a importância dos acessos selecionados em fazendas considerando a resistência a vassoura-de-bruxa e a autocompatibilidade.

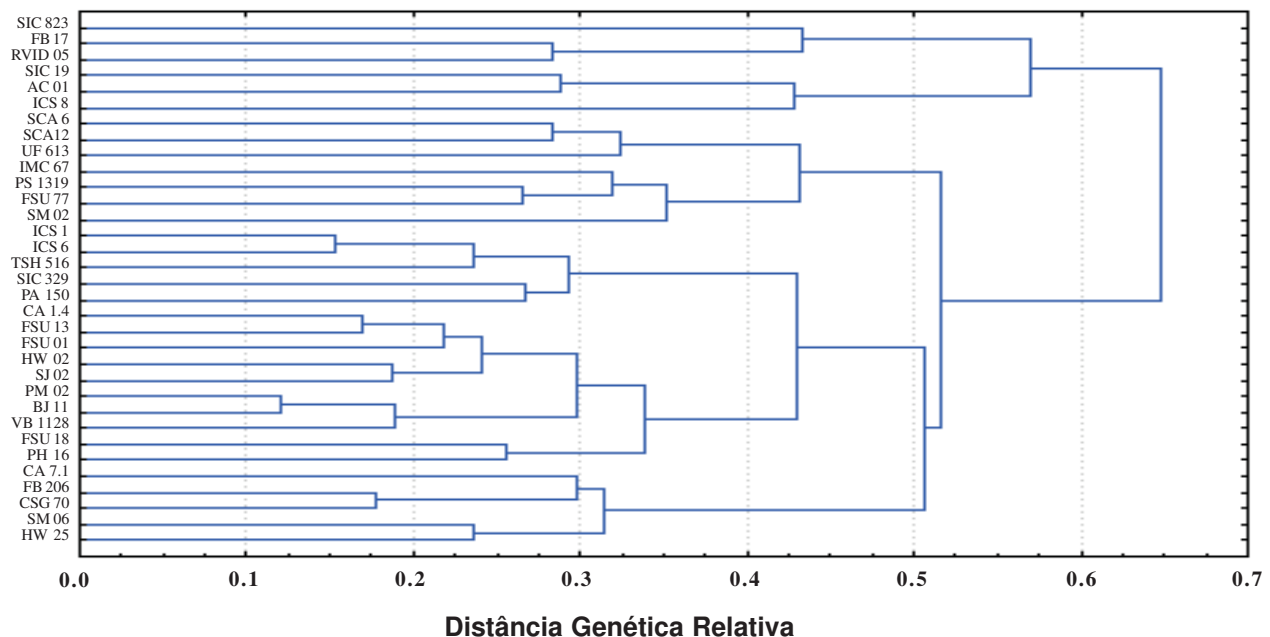


Figura 1. Análise de agrupamento de 33 acessos de cacauero, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 51 marcas. O método do UPGMA foi adotado como critério de agrupamento.

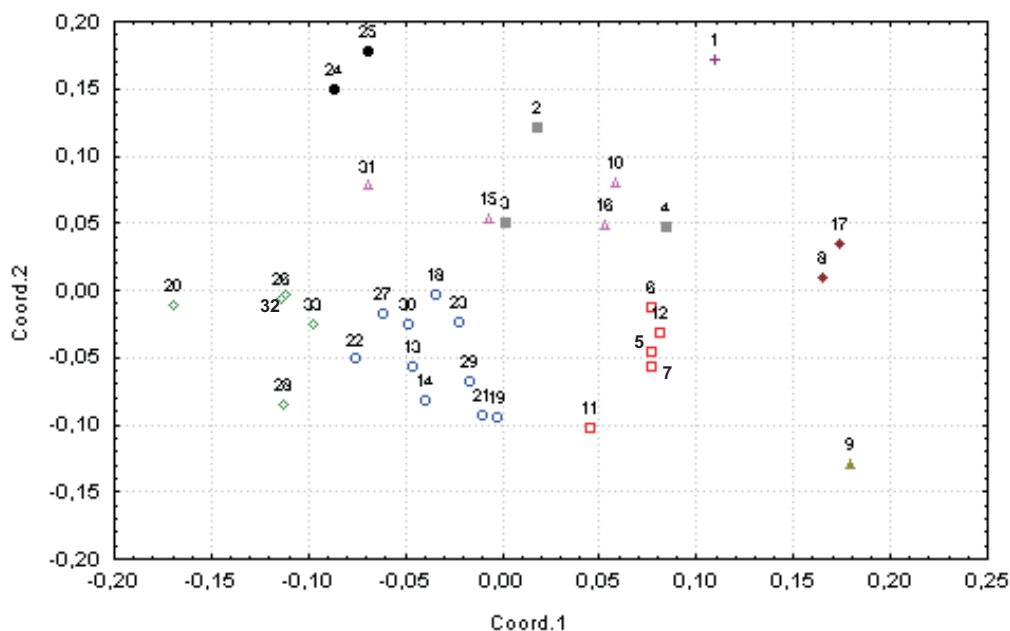


Figura 2. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 33 acessos de cacauzeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas usando 51 marcadores RAPD. O critério de agrupamento foi baseado no ponto de corte a 0,40 de distância genética relativa na Figure 1.

Literatura Citada

- BARTLEY, B.G.D; YAMADA, M.M. 1982. Efeito da incompatibilidade sobre a produtividade. Ilhéus, Ceplac/Cepec. Informe Técnico. 1982. pp.14-15.
- COPE, F.W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 17:157-182.
- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes. Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG, UFV.442p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- FALEIRO, F.G et al. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. Agrotrópica (Brasil) 14: 31-34.
- FALEIRO, F.G et al. 2004. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology 4:12-17.
- FALEIRO, A.S.G.et al. 2004. Diversidade genética de acessos de *Theobroma cacao* L. selecionados por produtores para a resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites. Crop Breeding and Applied Biotechnology 4: 290-297.
- KNIGHT, R.; ROGERS, H.H. 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity 9: 69-77.
- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. Proceedings of National Academy of Sciences 76: 5269- 5273.
- PEREIRA, J.L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotrópica (Brasil) 1(1): 79-81.
- POSNETTE, A. F. 1945. Incompatibility in Amazon cacao. Tropical Agriculture 22:184-187.
- POUND, F.J. 1932. Studies of fruitfulness in cacao. 2. Evidence for partial sterility. First Annual Report on Cacao Research (Trinidad). pp.26-28.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York; Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory. 653p.
- SAS Institute Inc. 1989. SAS/ STAT user's guide, version 6.4 ed. SAS Institute. North Caroline, Cary.
- STATSOFT Inc.1999. Statistics for Windows (Computer program manual) Tulsa. OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th street, Tulsa.
- TERREROS, J.R.; CHAVARRO, G; OCAMPO, R.F. 1983. Determinacion de los genotipo de incompatibilidad o compatibilidad en varios clones de cacao (*Theobroma cacao* L). El Cacaotero Colombiano 24: 27-37.
- VELLO, F. et al. 1969. O programa de melhoramento

- genético do cacau na Bahia. *In Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau*, 2. 1967. Salvador, Itabuna. Memórias. São Paulo, Impress. pp. 43-55.
- YAMADA, M.M. et al. 1988. Determinação dos genótipos de compatibilidade nos clones PA 150 e PA 16 da família Parinari. *In Conferencia Internacional de Investigación en Cacao*, 10. Santo Domingo, República Dominicana. 1987. Anais. Lagos, Nigéria, Cocoa Producers' Alliance. pp. 569-571.
- YAMADA, M.M; LOPES, U.V.L. 1999. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom disease in plantations of Bahia, Brazil. *Agrotropica (Brasil)*. 11:83-88.
- YAMADA, M. M. et al. 2003. Diversidade e origem das seleções de cacau (*Theobroma cacao* L.) feitas nas fazendas para a resistência a vassoura-de-bruxa. *In Congresso de Melhoramento de Plantas*, 2, 2003. Porto Seguro. Anais.

