

RELAÇÃO ENTRE INCOMPATIBILIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA COM BASE EM MARCADORES RAPD EM CLONES DE CACAUEIRO

Milton Macoto Yamada¹, Fábio Gelape Faleiro², Brena Faria Santos¹, Mônica Menezes Passinho¹

¹Ceplac/Cepec/ Seção de Genética, Biotecnologia, caixa postal 7, Itabuna, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.
E-mail: macoto@cepec.gov.br. ²Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, caixa postal 08223, 73301-970, Planaltina, Distrito Federal, Brasil.

Neste trabalho objetivou-se analisar a variabilidade genética entre clones de cacaueiro das séries EET e UF Equatoriano e analisar a relação entre tal variabilidade genética e os diferentes fenótipos de incompatibilidade. Foram analisados um total de 23 clones, dos quais 8 da série UF, 6 da série EET e 9 de outras séries. Os marcadores RAPD utilizados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram calculadas distâncias genéticas. A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método de UPGMA como critério de agrupamento e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS. Na análise de agrupamento houve a formação de um grupo de similaridade contendo os clones EET 59, EET 62, EET 96, UF 20, UF 705, EET 103, UF 703, EET 228, UF 29 e UF 242, ao nível inferior a 0,10 de distância genética. Este relacionamento genético entre estes clones das séries UF e EET, com base em marcadores moleculares, corroboram com o relacionamento genético obtido com base nos estudos de incompatibilidade. Alguns clones das séries EET e UF (UF 613, UF 666 e EET 53) não se agruparam com os demais clones dessas séries. O não agrupamento do UF 613 pode ser explicado por sua origem não Equatoriana. Os resultados deste trabalho indicam uma relação entre a variabilidade genética e os alelos de incompatibilidade em cacau. Possivelmente existam diferentes e vários alelos de incompatibilidade em cacau, os quais podem complementar os estudos de variabilidade genética e serem utilizados como marcadores genéticos para determinar a origem genética de diferentes clones.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, origem genética, paternidade

Relationship between incompatibility and genetic variability based on RAPD markers in cacao clones. The objective of this work was to analyze the genetic variability among cocoa clones tree of the EET and UF Ecuadorian series and to analyze the relationship between a genetic variability and the different incompatibility phenotypes. A total of 23 clones were analyzed, of the which 8 of the series UF, 6 of the EET series and 9 of other series. The RAPD markers used were converted a matrix of binary data, in which genetic distances were calculated. The matrix of genetic distances was used for cluster analysis through dendrogram, using UPGMA method as grouping criterion and the graphic dispersion based on multidimensional scales using the method of the main coordinates, with SAS Program. In the cluster analysis there was the formation of a similarity group containing the clone EET 59, EET 62, EET 96, UF 20, UF 705, EET 103, UF 703, EET 228, UF 29 and UF 242, at the level 0,10 of genetic distance. This genetic relationship among these clones of the UF and EET series, with base in molecular markers, corroborate with the genetic relationship obtained with base in the incompatibility studies. Some clones of the EET and UF series (UF 613, UF 666 and EET 53) they did not cluster with the other clones of those series. The clone UF 613 can be explained because of no Ecuadorian origin. The results of this work indicate a relationship between the genetic variability and the incompatibility alleles in cocoa. Possibly exist several incompatibility alleles in cocoa, which can complement the studies of genetic variability and they can be used as genetic markers to determine the genetic origin of different clones.

Key words: Molecular markers, genetic origin, paternity

Introdução

Os estudos de variabilidade genética com base em marcadores moleculares são ferramentas importantes para indicar quais materiais são relacionados geneticamente, tendo importantes aplicações em programas de melhoramento genético e de conservação e caracterização de recursos genéticos (Faleiro, 2007). Outra metodologia para estimar o relacionamento genético entre clones de cacau é por meio de estudos de incompatibilidade. Os clones que possuem pelo menos um alelo dominante de incompatibilidade em comum, tendem a ser incompatíveis em cruzamentos, mostrando em certos casos a origem genética comum.

Considerando que existem *n* alelos de incompatibilidade, seria difícil encontrar os mesmos alelos de incompatibilidade, em materiais geneticamente distantes. Estudos dessa natureza foram feitos por Yamada et al., (2004) com os clones das séries EET e UF Equatoriano. A maioria dos clones da série EET foram autocompatíveis, entretanto, o clone EET 59 foi auto-incompatível e, incompatível com clones UF, formando um grupo fenotípico de incompatibilidade (Tabela 1 e Yamada et al. 2004).

Neste trabalho, objetivou-se analisar a variabilidade genética entre os clones de cacau das séries EET e UF Equatoriano e analisar a relação entre tal variabilidade genética e os diferentes fenótipos de incompatibilidade.

Materiais e Métodos

Material genético: Foram analisados um total de 23 clones, sendo 8 clones da série UF, 6 clones da série EET, 9 clones de outras séries que podem ou não estar associados a essas duas séries (Tabela 1). Os clones numerados até 14 foram os mesmos utilizados por Yamada et al. (2004) nos estudos de incompatibilidade. Os outros 9 foram utilizados para ver se estão relacionados com essas duas séries, e também alguns utilizados como testemunha.

Extração do DNA: Folhas dos 23 clones foram coletadas para extração do DNA 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 indicadores 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 pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um "primer" decâmero, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Foram utilizados onze primers decâmeros (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) (Tabela 2) para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 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%) e água (39,75%). 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.

Análises estatísticas: 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 e Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 2001). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (Unweighted pair-group

Tabela 1. Clones analisados e resultados de compatibilidade do estudo anterior.

Clones	Compatibilidade	Cruzamento com EET 59
1- EET 59	AI	I
2- EET 228	AC	C
3- UF 20	AI	I
4- UF 705	AI	I
5- UF 36	AI	I
6- UF 666	AI	I
7- EET 53	AC	C
8- EET 62	AC	C
9- EET 96	AC	C
10- EET 103	AI	C
11- UF 29	AC	
12- UF 242	AC	
13- UF 703	AC	C
14- JA 5.46	AC	C
15- ICS 75		
16- ICS 89		
17- ICS 40		
18- EQX 107		
19- UF 613		
20- CEPEC 508		
21- EQX 68		
22- EQX J5		
23- ICS 39		

AI = auto-incompatível AC - autocompatível

Tabela 2. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

<i>Primer</i>	Sequência 5' 3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPJ-18	CATACCGTGG	6	1
OPT-08	AACGGCGACA	11	3
OPH-08	GAAACACCCC	3	2
OPT-12	GGGTGTGTAG	3	2
OPA-01	CAGGCCCTTC	2	1
OPA-13	CAGCACCCAC	2	1
OPD-13	GGGGTGACGA	11	0
OPE-15	ACGCACAACC	2	3
OPF-04	GGTGATCAGG	1	2
OPF-05	CCGAATTCCC	8	0
OPF-07	CCGATATCCC	1	1
TOTAL		50	16

arithmetic average) como critério de agrupamento e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS Institute Inc., 1989) e Statistica (Statsoft Inc., 1999).

Resultados e Discussão

Os 11 *primers* decâmeros utilizados permitiram a obtenção de um total de 66 bandas, perfazendo uma média de 6 bandas por *primer*. Das 66 bandas, 50 foram polimórficas (Tabela 2), o que corresponde a 75,7%.

Na análise de agrupamento (Figura 1), pode-se verificar a formação de um grupo de similaridade contendo os clone EET 59, EET 62, EET 96, UF 20, UF 705, EET 103, UF 703, EET 228, UF 29 e UF 242, em nível inferior a 0,10 de distância genética. Esses clones estão dentro dos 14 primeiros clones (Tabela 1) que indicaram serem relacionados (Yamada et al. 2004). Este relacionamento genético entre estes clones das séries UF e EET, com base em marcadores moleculares, corroboram com o relacionamento genético obtido com base nos estudos de incompatibilidade. Esse relacionamento foi evidenciado na incompatibilidade quando fez o cruzamento de EET 59 com os clones UF resultando cruzamentos incompatíveis (Tabela 1) e Yamada et al. (2004). O gráfico de dispersão (Figura 2) evidencia o agrupamento entre os clones das séries UF e EET, os quais ocuparam, com algumas exceções, a mesma região gráfica.

Alguns clones das séries EET e UF (UF 613, UF 666 e EET 53) não se agruparam com os demais clones dessas séries. O não agrupamento do UF 613 pode ser explicado por sua origem não Equatoriana (Yamada et al., 2004). O não agrupamento do UF 666 e EET 53 pode ser explicado pelas possíveis variabilidades genéticas intra-série.

Esses resultados mostram a relação entre as reações de incompatibilidade e a menor variabilidade genética entre os clones inter-incompatíveis. Esta menor variabilidade genética pode estar relacionada à origem comum desses clones (Yamada et al., 2004).

Outra implicação importante da reação de incompatibilidade refere-se às fontes de resistência à

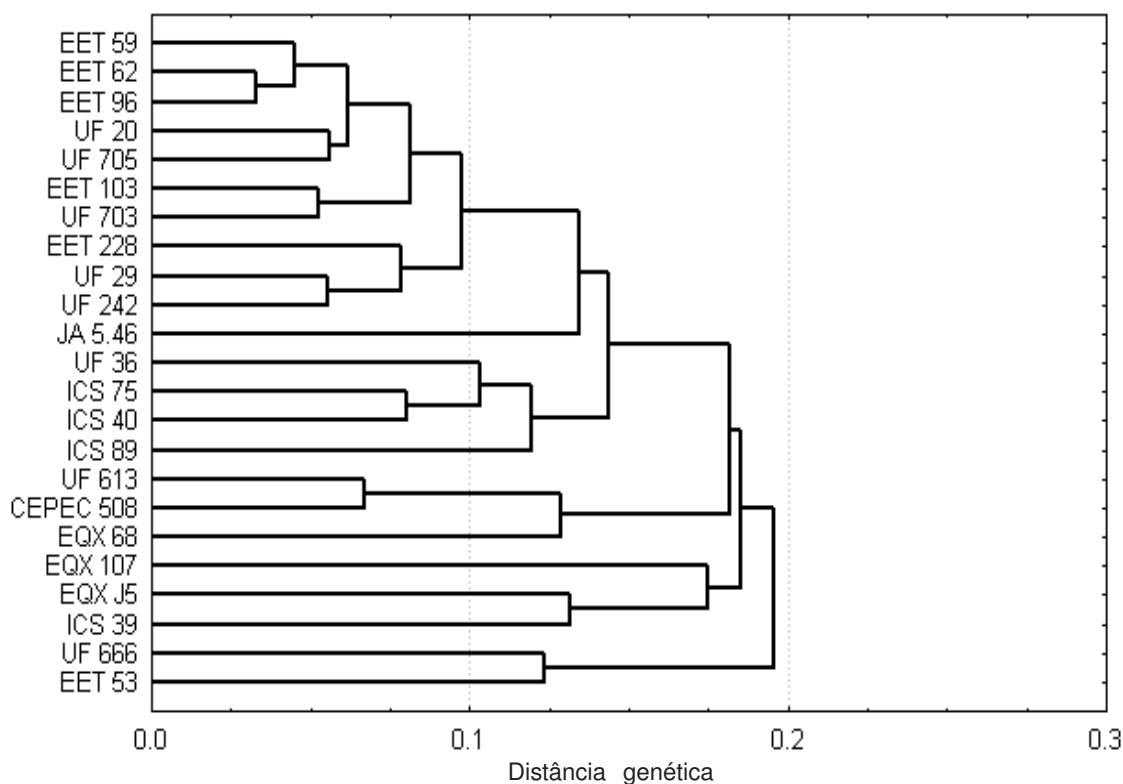


Figura 1. Análise de agrupamento de 23 acessos de cacauero com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 66 bandas RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

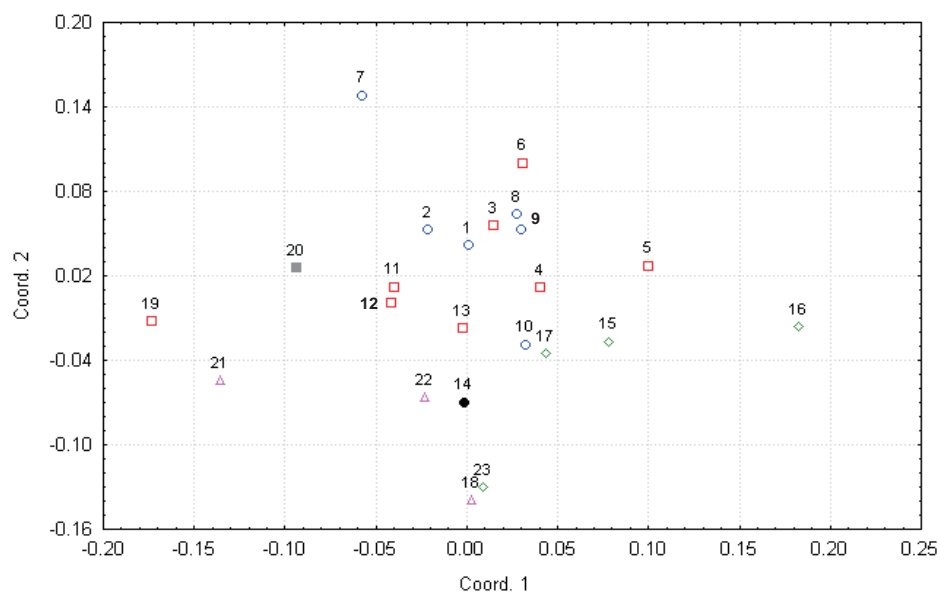


Figura 2. Dispersão gráfica de 23 acessos de cacauero com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 66 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1. Os símbolos correspondem aos acessos das séries EET (○); UF (◻); ICS (◊); EQX (△); JA (●); e CEPEC (■).

vassoura-de-bruxa. Pires et al., (2001) verificaram reação de incompatibilidade no cruzamento entre Scavina 6 e EET 45, o que sugere a proximidade genética entre estes clones e uma possível presença de genes de resistência comuns. Neste aspecto, nem sempre a distância genética com base em marcadores moleculares é um bom parâmetro para determinar a origem genética diferenciada entre clones de cacauero. Um exemplo dessa situação são os clones que não se agrupam com Scavina 6 (Faleiro et al., 2004; Yamada et al., 2009). Tais clones não são, necessariamente, fontes diferentes de genes de resistência à vassoura-de-bruxa, uma vez que podem ser netos de Scavina 6 (Yamada et al., 2009) ou ser híbridos obtidos do cruzamento entre Scavina 6 e outros clones distantes geneticamente do Scavina 6. Por outro lado, um clone incompatível com Scavina 6, tem alta probabilidade de ter a mesma origem genética do Scavina-6.

Em razão disso, os clones selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa nas fazendas apresentam dois grandes grupos fenotípicos de incompatibilidade devido aos 2 alelos do Scavina 6. A determinação da origem genética desses clones selecionados seria mais difícil nos autocompatíveis, que exige outros métodos como teste de paternidade (Yamada et al., 2009).

Os resultados deste trabalho indicam uma relação entre a variabilidade genética e os alelos de incompatibilidade em cacau. Possivelmente existam diferentes e vários alelos de incompatibilidade em cacau, os quais podem complementar os estudos de variabilidade genética e serem utilizados como marcadores genéticos para determinar a origem genética de diferentes clones.

Literatura Citada

- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes. Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG, UFV, 442p
- CRUZ, C. D. 2001. Programa GENES - versão windows. Aplicativo computacional em Genética e Estatística. Viçosa, MG, UFV. v. 1. 648p.
- 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 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 (1): 12-17.
- FALEIRO, F. G. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF, EMBRAPA CERRADOS. 102p.
- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. *Proceedings National Academic Science* 76: 5269 - 5273.
- PIRES, J. L. et al. 2001. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. *In: International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. 2000. *Proceedings*. Sabah, Malaysia. 72-88.
- SAS INSTITUTE INC. 1989. SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory. 653p.
- STATSOFT INC. 1999. Statistics for Windows (computer program manual) Tulsa Stat Soft Inc. 2300 East 14 th street, Tulsa.
- YAMADA, M. M. et al. 2004. The compatibility status of clones descended from the Ecuador Nacional in the CEPEC genebank. *Agrotrópica (Brasil)* 16(2): 47-50.

YAMADA, M. M. et al. 2009. Parent pair analysis of cacao trees selected in farms for resistance to

Moniliophthora perniciosa using microsatellites. *Agrotrópica* (Brasil) 21(2):123-126.

●