

# Agrotrópica

Volume 17, número único, Janeiro a Dezembro de 2005



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Centro de Pesquisas do Cacau  
Ilhéus - Bahia



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**Ministro:** Luis Carlos Guedes Pinto

**Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC**

**Diretor:** Gustavo Costa de Moura

**Superintendência Regional da Bahia e Espírito Santo (SUBES)**

**Superintendente:** Geraldo Dantas Landim

**Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)**

**Chefe:** Jonas de Souza

**Centro de Extensão (CENEX)**

**Chefe:** Elieser Barros Correia

**Superintendência Regional da Amazônia Ocidental (SUPOC)**

**Superintendente:** Francisco Chagas R. Sobrinho

**Superintendência Regional da Amazônia Oriental (SUPOR)**

**Superintendente:** Aliomar Arapiraca da Silva

Agrotrópica, v. 1, n°1 (1989)  
Ilhéus, BA, Brasil, CEPLAC/CEPEC, 1989

v.

Quadrimestral

Substitui "Revista Theobroma"

1. Agropecuária - Periódico.

CDD 630.5

**AGROTRÓPICA é indexada em**

AGRINDEX; THE BRITISH LIBRARY; CAB (i.e. Horticultural Abstracts, Review of Plant Pathology, Forestry Abstracts); AGROBASE; Agricultural and Environment for Developing regions (TROPAG); ULRICH'S INTERNATIONAL PERIODICALS DIRECTORY (Abstract on Tropical Agriculture, Agricultural Engineering Abstracts, Agroforestry Abstracts, Bibliography of Agriculture, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpt Medical, Food Science & Technology Abstracts, Indice Agricola de América Latina y el Caribe, Nutrition Abstracts, Protozoal. Abstracts, Review of Applied Entomology, Seed Abstracts, Tropical Oil Seeds Abstracts).

## **POLÍTICA EDITORIAL**

AGROTRÓPICA, publicação quadrimestral destinada a veicular trabalhos que constituem contribuição original e real para o desenvolvimento agroecológico e socioeconômico das regiões tropicais úmidas. Tem por objetivo ser veículo aberto à divulgação de trabalhos científicos inéditos que contribuam para o aprimoramento das culturas tropicais, pastagens e outros produtos de interesse econômico.

Publica artigos científicos, notas científicas, revisões bibliográficas relevantes e de natureza crítica, em português, espanhol e inglês e cartas ao editor sobre trabalhos publicados em Agrotrópica.

O autor é o responsável exclusivo pelo conteúdo do trabalho, todavia, o Editor, com a assistência da assessoria científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações que considere necessárias.

## **EDITORIAL POLICY**

AGROTRÓPICA is a Journal published every four months which goal is to divulge papers containing original and real contributions to agroecological and socioeconomical development of humid tropics. Inedited papers leading to the improvement of tropical crops, pastures and other agricultural commodities are welcome. The Journal will publish scientific articles and notes, critical reviews and letters to the Editor written in Portuguese, Spanish and English.

Authors are exclusively responsible for concepts and opinions given in their articles. However the Editor with the help of the Scientific Committee reserves the right to suggest or ask modifications thought to be necessary.



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**CEPLAC - Comissão Executiva do  
Plano da Lavoura Cacaueira**

**AGROTRÓPICA.** Publicação quadromestral do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)/CEPLAC.

**Comissão de Editoração:** José Luiz Bezerra, Miguel A. Moreno Ruiz e Milton Macoto Yamada.

**Editor:** Miguel Antonio Moreno Ruiz

**Assistentes de Editoração:** Jacqueline C.C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

**Normalização de referências bibliográficas:** Maria Christina de C. Faria

**Editoração eletrônica:** Jacqueline C.C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

**Capa:** Gildefran Alves Aquino de Assis

**Assinatura:** R\$ 40,00 (Anual); R\$ 15,00 (número avulso). Instituições ou leitores interessados em obter a publicação por intercâmbio ou assinatura poderão contactar: CEPLAC - Setor de Informação Documental, C.P. 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. E-mail: sidoc@cepec.gov.br

**Endereço para correspondência:**

**AGROTRÓPICA**, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), C.P. 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

**Telefone:** (73) 3214 -3219

**Fax:** (73) 3214 - 3218

**E-mail:** agrotrop@cepec.gov.br

**Tiragem:** 500 exemplares

## CONTEÚDO

### ARTIGOS

- 1 Correlações fenotípica e genotípica entre características do fruto de cultivares de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **W. M. Aragão, C. M. Loiola, F. B. Aragão, A. M. Ramos.**
- 5 Avaliação de microorganismos associados com a camada coesa em solo de Tabuleiros Costeiros no Brasil (em inglês). **Q. R. Araújo, N. B. Comerford, J. L. Bezerra, F. G. Faleiro, A. V. Ogram, A. Al-Agely, K. M. T. Bezerra, P. V. Menezes, L. P. Santos Filho, J. G. Santos, A. S. G. Faleiro.**
- 17 Identificação e variabilidade genética de acessos de cacauzeiros autocompatíveis selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa em fazendas produtoras. **M. M. Yamada, A. B. Flores, F. G. Faleiro, G. R. P. Melo, M. M. Macedo, U. V. Lopes, R. C. Xavier, R. F. dos Santos.**
- 23 Isolamento de bactérias associadas à palma e prospecção do potencial de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. **F. E. C. Costa, I. S. de Melo.**
- 27 Adaptabilidade e estabilidade de variedades e linhagens de feijoeiro comum no nordeste brasileiro. **H. W. L. de Carvalho, D. R. N. Warwick, M. M. de Albuquerque, M. J. Del Peloso, L. C. de Faria, L. C. Melo, J. G. da Costa.**
- 33 Metodologia de inoculação para avaliar resistência à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) em condições de campo. **M. L. de Oliveira, V. R. da Silva.**
- 39 Performance fenotípica de cultivares de milho no Meio-norte brasileiro. **M. J. Cardoso, H. W. L. de Carvalho, M. de L. da S. Leal, P. E. de O. Guimarães, E. M. de Souza.**
- 47 Estimativas de parâmetros genéticos na população de milho CPATC-3 no Nordeste brasileiro. **H. W. L. de Carvalho; M. X. dos Santos, M. de L. da S. Leal.**
- 53 Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis perniciosa* originários da Região Cacaueira da Bahia. **M. L. de Oliveira, K. P. Gramacho, V. R. da Silva.**
- 61 Desenvolvimento de marcadores microsatélite para análise genética de *Crinipellis perniciosa* (em inglês). **K. P. Gramacho, A. M. Risterucci, C. Lanaud, R. de C. Bahia, U. V. Lopes, A. da S. Gesteira, M. R. Araújo.**
- 65 Filogeografia do patógeno vassoura-de-bruxa na Bahia (em inglês). **K. P. Gramacho, U. V. Lopes, J. L. Pires, J. R. M. Lopes, R. de C. Bahia, L. Mahé.**
- 73 Assalariamento, agricultura familiar e sociabilidade na fruticultura irrigada nordestina. **J. S. B. Calvacanti, D. M. da Mota.**

### NOTA CIENTÍFICA

- 81 Identificação do gene deletério “Luteus-Pa” em outros acessos de *Theobroma cacao* L. da série Parinari (Pa). **M. M. Yamada, R. C. Santos.**
- 83 Distribuição geográfica da murcha-de-ceratocystis do cacauzeiro na Bahia, Brasil. **L. C. C. de Almeida, A. Z. de M. Costa, J. R. M. Lopes, J. L. Bezerra.**



**MINISTRY OF AGRICULTURE  
LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY**

**CEPLAC - Executive Commission of  
the Cacao Agriculture Plan**

**AGROTRÓPICA.** Published every four months by the Cacao Research Center (CEPEC)/CEPLAC.

**Editorial Committee:** José Luiz Bezerra, Miguel A. Moreno Ruiz and Milton Macoto Yamada.

**Editor:** Miguel Antonio Moreno Ruiz

**Editorial assistant:** Jacqueline C.C. do Amaral and Selenê Cristina Badaró.

**Revision of bibliographical references:**  
Maria Christina de C. Faria

**Desktop publish:** Jacqueline C.C. do Amaral and Selenê Cristina Badaró.

**Cover:** Gildefran Alves Aquino de Assis

**Subscription:** annual (outside Brasil) - US\$ 60.00 (surface mail); single copy - US\$ 15.00 (surface mail). Institutions or individuals interested in obtaining the publication for exchange or subscription should contact: CEPLAC - Setor de Informação Documental, P.O.Box 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. E-mail: sidoc@cepec.gov.br

**Address for correspondence:**

**AGROTRÓPICA**, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), P.O.Box 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

**Telephone:** 55 (73) 3214 - 3219

**Fax:** 55 (73) 3214-3218

**E-mail:** agrotrop@cepec.gov.br

**Circulation:** 500 copies.

# AGROTRÓPICA

V.17

January - December 2005

Single number

## CONTENTS

### ARTICLE

- 1 Phenotypic and genotypic correlation among fruit characters of coconut cultivars. (in Portuguese). **W. M. Aragão, C. M. Loiola, F. B. Aragão, A. M. Ramos.**
- 5 Microbial evaluation associated with the coeso layer in Brazilian Coastal Tableland Soil. **Q. R. Araujo, N. B. Comerford, J. L. Bezerra, F. G. Faleiro, A. V. Ogram, A. Al-Agely, K. M. T. Bezerra, P. V. Menezes, L. P. Santos Filho, J. G. Santos, A. S. G. Faleiro.**
- 17 Identification and genetic variability of self compatible cacao accessions selected for resistance to witches' broom in farms (in Portuguese). **M. M. Yamada, A. B. Flores, F. G. Faleiro, G. R. P. Melo, M. M. Macedo, U. V. Lopes, R. C. Xavier, R. F. dos Santos.**
- 23 Isolation of bactéria associated to forrage palm and study of their potential to solubilize fosfates and fix nitrogen (in Portuguese). **F. E. C. Costa, I. S. de Melo.**
- 27 Adaptability and stability of bean breeding lines and cultivars in the Brazilian Northeast Region (in Portuguese). **H. W. L. de Carvalho, D. R. N. Warwick, M. M. de Albuquerque, M. J. Del Peloso, L. C. de Faria, L. C. Melo, J. G. da Costa.**
- 33 Methodology of inoculation to evaluate resistance to witches'broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) under field conditions (in Portuguese). **M. L. de Oliveira, V. R. da Silva.**
- 39 Corn cultivars phenotype performance in the Brasilian Middle North Region (in Portuguese). **M. J. Cardoso, H. W. L. de Carvalho, M. de L. da S. Leal, P. E. de O. Guimarães, E. M. de Souza.**
- 47 Estimates of Genetic Parameters for 'CPATC-3' Maize Population in Northeast Region of Brazil (in Portuguese). **H. W. L. de Carvalho, M. X. dos Santos, M. de L. da S. Leal.**
- 53 Somatic compatibility among isolates of *Crinipellis perniciosa* from the cacao-growing region of Bahia, Brazil (in Portuguese). **M. L. de Oliveira, K. P. Gramacho, V. R. da Silva.**
- 61 Development of Microsatellite Markers for the Genetic Analysis of *Crinipellis perniciosa*. **K. P. Gramacho, A. M. Risterucci, C. Lanaud, R. de C. Bahia, U. V. Lopes, A. da S. Gesteira, M. R. Araújo.**
- 65 Phylogeography of the witches' broom pathogen in Bahia. **K. P. Gramacho, U. V. Lopes; J. L. Pires, J. R. M. Lopes, R. de C. Bahia, L. Mahé.**
- 73 Workers, family farming and sociability in the Brazilian Northeast irrigated fruit production (in Portuguese). **J. S. B. Calvacanti, D. M. da Mota.**

### SCIENTIFIC NOTE

- 81 Identification of lethal gene "Luteus – PA" in accessions of *Theobroma cacao* L. in the Parinari series (in Portuguese). **M. M. Yamada, R. C. Santos.**
- 83 Geographical distribution of cacao Ceratocystis wilt disease in Bahia State, Brazil (in Portuguese). **L. C. C. de Almeida, A. Z. de M. Costa, J. R. M. Lopes, J. L. Bezerra.**

# Instruções aos Autores

**1.** O original para publicação em português, inglês ou espanhol, deve ter no máximo 18 páginas numeradas, em formato A4 (21,0 x 29,7 cm), fonte Times New Roman, corpo 12, espaço 1,5 (exceto Resumo e Abstract, em espaço simples), digitado em Word. O artigo deverá ser encaminhado à Comissão Editorial da revista em 4 vias impressas e também em disquete 3,5'. No rodapé da primeira página deverão constar o endereço postal completo e o endereço eletrônico do(s) autor(s). Em três das quatro vias impressas, deverão ser omitidos o(s) nome(s) do autor(es) e agradecimentos, pois essas vias serão enviadas a assessores científicos para análise. As figuras e tabelas devem vir à parte.

**2.** Os artigos devem conter: título, resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e literatura citada.

**3.** Os artigos científicos e notas científicas devem conter introdução que destaque os antecedentes, a importância do tópico e revisão de literatura. Nos materiais e métodos deve-se descrever os materiais e métodos usados, incluindo informações sobre localização, época, clima, solo etc., bem como nomes científicos se possível completos de plantas, animais, patógenos etc., o desenho experimental e recursos de análise estatística empregados. Os resultados e discussão poderão vir juntos ou separados e devem incluir tabelas e figuras com suas respectivas análises estatísticas. As conclusões devem ser frases curtas, com o verbo no presente do indicativo, sem comentários adicionais e derivadas dos objetivos do artigo.

**4. Título** - Deve ser conciso e expressar com exatidão o conteúdo do trabalho, com no máximo 15 palavras.

**5. Resumo e Abstract** - Devem conter no máximo 200 palavras; Abstract deve ser tradução fiel do resumo.

**6. Palavras-chave** - Devem ser no máximo de seis, sem estar contidas no título.

**7. Unidades de medida** - Usar exclusivamente o Sistema Internacional (S.I.).

**8. Figuras** - (gráficos, desenhos, mapas) devem ser apresentadas com qualidade que permita boa reprodução gráfica; devem ter 8,2 cm ou 17 cm de largura; as fotografias devem ser escaneadas com 300 dpi e gravadas em arquivo TIF, separadas do texto.

**9. Tabelas** - As tabelas devem ser apresentadas em Word ou Excel, e os dados digitados em Times New Roman 12.

**10. Literatura Citada** - No texto as referências devem ser citadas da seguinte forma: Silva (1990) ou (Silva,

1990). A normalização das referências deve seguir os exemplos abaixo:

## PERIÓDICO

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. Agrotrópica (Brasil) 8(2): 39 - 44.

## LIVRO

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forrages. Atlanta, PPI. 256p.

## PARTE DE LIVRO

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4ed. London, Longman. pp.366-443.

## DISSERTAÇÃO

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

## TESE

ROHDE, G. M. 2003. Economiaecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoietica da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

## MONOGRAFIA SERIADA

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n° 180. 19p.

## PARTE DE EVENTO

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

A literatura citada deverá referir-se unicamente a trabalhos completos publicados nos últimos 5 anos.

Após as correções sugeridas pela assessoria científica, o autor deverá retornar ao editor da revista, uma cópia impressa da versão corrigida, acompanhada de uma cópia em disquete ou CD.

Os autores receberão 10 separatas do seu artigo publicado.

# Guidelines to Authors

**1** - The manuscript for publication in Portuguese, English or Spanish, not exceed 18 numbered pages, format A4 (21.0 x 20.7 cm), in Times New Roman, 12, 1.5 spaced (except Resumo and Abstract, simple spaced) typed in Word. The article must be addressed to the Editorial Comission in 4 printed copies and also in disket 3.5'. Complete mailing address and e-mail of the author(s) must appear at the bottom of first page. Three out of the four copies should not state the author's name or acknowledgements, since these copies will go to reviewes. Figures (drawings, maps, pictures and graphs) and tables should be sent separately and ready for publication;

**2** - Articles must contain: title, abstract, introduction, material and methods, results and discussion, conclusions, acknowledgements and literature cited (references);

**3** - Scientific articles and notes must include an introduction highlighting the background and importance of the subject and literature review. Under materials and methods one must mention informations about locations, time, climate, soil, etc. and furnish latin names of plants, animals, pathogens, etc., as well experimental designs and statistical analysis used. Conclusions must be objective and derived from relevant results of the research.

**4 - Title** - It must be concise (not exceed 15 words) and express the real scope of the work.

**5 - Abstract** - No more than 200 words.

**6 - Kew words** - Six at most, and should not be present in the title.

**7 - Measurement units** - Use only the International System.

**8 - Figures** (drawings, maps, pictures and graphs) - They must possess good quality for graphic reproduction; size 8.2 cm or 17 cm wide; photos should be scanned at 300 dpi and recorded, out of the text, in TIF file.

**9 - Tables** - It should be present in Word or Excel and data typed in Times New Roman, 12.

**10 - References** - literature cited in the text must be written as follows: Silva (1990) or (Silva, 1990). Citation should be given as follows.

## PERIODICALS

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no

desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. Agrotrópica (Brasil) 8(2): 39 - 44.

## BOOKS

BALL, D. M.; HOVELAND, C .S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forages. Atlanta, PPI. 256p.

## BOOK CHAPTERS

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4ed. London, Longman. pp.366-443.

## DISSERTATION

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

## THESIS

ROHDE, G. M. 2003. Economiaecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoietica da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

## SERIATE MONOGRAPHS

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n° 180. 19p.

## PART OF MEETINGS

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

Literature cited should include only published papers in the last 5 years. After attending the corrections of the reviewes the author should return to the Editor a definitive copy of the corrected version and a diskette or CD copy in the software recommended by the editors.

Authors will receive 10 reprints of their published paper.

## CORRELAÇÕES FENOTÍPICA E GENOTÍPICA ENTRE CARACTERÍSTICAS DO FRUTO DE CULTIVARES DE COQUEIRO (*Cocos nucifera L.*)

**Wilson Menezes Aragão<sup>1</sup>, Carina Mendes Loiola<sup>1</sup>, Fernanda Barreto Aragão<sup>2</sup>, Angélica Maria Ramos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros. Av. Beira Mar, 3250. Caixa Postal 44, 49001-970. Aracaju, Sergipe, Brasil. E-mail:  
aragaowm@cpatc.embrapa.br; <sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe.

A estimativa de correlações principalmente genotípica entre pares de caracteres agronômica e econômica, como os caracteres do fruto, é uma estratégia importante para acelerar o programa de melhoramento genético do coqueiro o que se constituiu no objetivo desse trabalho. O ensaio foi conduzido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros na Fazenda Agreste, Platô de Néópolis/SE, empregando o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 4 repetições, 14 cultivares (6 anões e 8 híbridos) e 4 plantas úteis por cultivar. De cada planta colheu-se um fruto nos estádios de desenvolvimento de 1 mês a 12 meses, no qual foram avaliados os seguintes caracteres: peso do fruto (PFR), peso da fibra (PFI), peso da noz (PNO), peso do coque (PCQ), peso do albúmen sólido (PAS) e peso do albúmen líquido (PAL). Os caracteres baseados nas suas médias, foram submetidos à análise de variância e covariância e estimados os coeficientes de correlação fenotípica ( $r_p$ ) e genotípica ( $r_g$ ). As correlações fenotípica e genotípica entre os pares de caracteres do fruto são, normalmente, positivas e altamente significativas, indicando que melhorando o coqueiro para quaisquer das características, peso do fruto, peso da fibra, peso da noz, peso da polpa e peso da água, indiretamente estará se melhorando para as demais características.

**Palavras-chaves:** melhoramento genético, variedade e seleção.

**Phenotypic and genotypic correlation among fruit characters of coconut cultivars.** The study aimed to estimate the correlation mostly phenotypic and genotypic among pairs of agronomic and economic characters, such as fruit characters as an important strategy to accelerate the genetic improvement program in coconut. The trial was carried out by Embrapa Tabuleiros Costeiros at Fazenda Agreste in the Platô de Néópolis/SE in a randomized blocks design with 4 replications and 14 treatments represented by the coconut cultivars (6 dwarfs and 8 hybrids). Parameters were recorded in 4 plants per plot. For each plant one fruit was harvested for each development age of 1 to 12 months and the characters of fruit weight (PFR), husk weight (PFI), net nut weight (PNO), shell weight (PCQ), flesh weight (PAS), and water weight (PAL) were recorded. Data were submitted to variance and covariance analysis and the phenotypic ( $r_p$ ) and genotypic ( $r_g$ ) correlation coefficients were estimated. The phenotypic and genotypic correlation between pairs of fruit characters are normally positives and highly significant, indicating that the improvement of any characteristic of fruit weight, husk weight, net nut weight, flesh weight, and water weight will indirectly improving the remain characteristics.

**Key Words:** genetic improvement, variety and selection of characters.

## Introdução

O coqueiro é a palmeira de maior importância socioeconômica das regiões intertropicais do Globo, além de apresentar um importante papel na sustentabilidade de ecossistemas frágeis do litoral, principalmente, na região Nordeste. Pela magnitude dos produtos obtidos das diferentes partes da planta, pode-se afirmar que do coqueiro tudo se aproveita. Entretanto, os principais produtos são oriundos dos frutos, como copra, óleo, ácido laúrico, leite de coco, farinha, água-de-coco, fibra, pó de coco e ração animal. Nos países asiáticos, africanos e na maioria dos países da América Latina, o fruto do coqueiro é utilizado basicamente para produção de copra e de óleo. No Brasil, utiliza-se o fruto para o consumo *in natura* do albúmen líquido (água-de-coco) e do albúmen sólido (polpa), e para o uso agroindustrial do albúmen sólido para se obter leite de coco, farinha de coco, e da água-de-coco (Aragão et al., 2002).

Apesar dessa importância, a produção brasileira de frutos é muito baixa, isto é, 30 frutos/planta/ano. Para aumentar essa produção é necessário desenvolver um programa de fomento à cultura do coqueiro com base em cultivares melhoradas. Por outro lado para acelerar o processo de melhoramento de espécies perenes como o coqueiro, uma das estratégias que pode ser utilizada é a estimativa de correlações fenotípicas e, principalmente, genotípicas entre os caracteres de interesse agronômico e econômico.

O estudo da relação entre caracteres é de fundamental importância, pois no melhoramento, preocupa-se em aprimorar o material genético não para caracteres isolados, mas para um conjunto destes, simultaneamente. Essa associação pode ser avaliada no seu modo mais simples, através das correlações fenotípica, genotípica e ambiental (Vencovsky, 1992).

A pleiotropia é, basicamente, a causa de correlação genética. Ligações gênicas são causas transitórias, especialmente em populações derivadas de cruzamento entre linhagens divergentes (Falconer, 1981). Se dois caracteres apresentam correlação genética favorável, é possível obter ganhos para um deles por meio da seleção indireta no outro associado. Em alguns casos, a seleção indireta, com base na resposta correlacionada, pode levar a progressos mais rápidos do que a seleção direta do caráter desejado. Entretanto, se um caráter correlacionar-se negativamente com alguns e positivamente com outros, deve-se tomar o cuidado de, ao selecionar esse, não provocar mudanças indesejáveis em outros (Cruz & Regazzi, 1994). É conveniente salientar que os sinais de correlação fenotípica e genotípica podem ser diferentes, sendo atribuído a erros de amostragem.

Este trabalho objetivou estimar as correlações fenotípicas e genotípicas entre os pares de caracteres do fruto para acelerar o programa de melhoramento de coqueiro.

## Material e Métodos

O ensaio foi conduzida na Fazenda Agreste situada no Platô de Neópolis, SE empregando 14 cultivares de coqueiro, sendo seis de coqueiro anão (Anão Amarelo do Brasil de Gramame – AABrG; Anão Amarelo da Malásia – AAM; Anão Verde do Brasil de Jiquí – AVeBrJ; Anão Vermelho do Brasil de Gramame – AVBrG; Anão Vermelho de Camarões – AVC e Anão Vermelho da Malásia – AVM) e oito de coqueiro híbrido (AABrG X Gigante do Brasil da Praia do Forte – GBrPF; AABrG X Gigante do Oeste Africano – GOA; AABrG X Gigante da Polinésia – GPY; AVBrG X GBrPF; AVBrG X GOA; AVBrG X GPY; AVBrG X Gigante de Rennell – GRL e AVeBrJ X GBrPF).

O clima da região é do tipo A's segundo a classificação de Köeppen, com precipitação média anual normal de 1270 mm, dos quais 71,8 % e 28,2 % ocorrem nos períodos de chuva e seca, respectivamente. A evapotranspiração média anual é de 1770 mm, com temperatura média anual de 24,7 °C, média das máximas de 30 °C e média das mínimas de 19,4 °C. A umidade relativa é de 76,67 %.

O solo é do tipo podzólico Vermelho-Amarelo com baixa fertilidade natural, apresentando na camada de 10 a 20 cm de profundidade a seguinte composição química: pH em água - 5,69; P-515 ppm; K – 30,62 ppm; Ca - 0,90 mcq/100ml; Mg - 0,47 mcq/100ml; Al – 0,12 mcq/100ml e M.O - 0,95 %.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram avaliadas 4 plantas de cada uma das 14 cultivares em cada repetição.

Para avaliação dos frutos e de seus componentes nas idades desejadas de 0 (momento da abertura natural da inflorescência) a 12 meses, o pecíolo das folhas correspondente às inflorescências foi datado no dia da sua abertura natural por um período de um ano. Após a colheita dos frutos, foram feitas as seguintes avaliações (em g): peso do fruto (PFR), peso da noz (PNO), peso do coque (PCq), peso do albúmen sólido (PAS) e peso do albúmen líquido (PAL). O peso da fibra (PFI) foi obtido pela diferença entre PFR e PNO.

De acordo com o modelo de Cruz & Regazzi (1994) foram estimadas as correlações fenotípica e genotípica.

## Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão apresentados as estimativas das correlações fenotípica ( $r_f$ ) e genotípica ( $r_g$ ) entre os

diversos pares de caracteres avaliados nos frutos das cultivares de coqueiro. Observa-se nessa Tabela que as correlações foram positivas e normalmente altamente significativas entre os pares de caracteres PFR/PFI , PFR/PNO, PFR/PCQ, PFR/PAL , PNO/PFI , PCQ/PFI , PAL/PFI, PNO/PCQ, PNO/PAL e PCQ/PAL nos frutos

colhidos nas idades para consumo da água-de-coco (em torno de 7 meses) e de frutos secos (11 e 12 meses) para uso agroindustrial do albúmen sólido, fibra, entre outras características; e entre PFR/PAS, PAS/PFI, PNO/PAS e PCQ/PAS nos frutos colhidos a partir, normalmente, do nono mês de idade e, principalmente, nas idades de frutos secos.

Tabela 1. Correlações fenotípica e genotípica entre os pares de caracteres: peso do fruto (PFR), peso da noz (PNO), peso do coque (PCQ), peso do albúmen sólido (PAS), peso do Albúmen líquido (PAL) e peso da fibra (PFI), avaliados em cultivares de coqueiro, Aracaju, SE, 2004.

Caracteres	Correlação	Mês											
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PFR/PFI	$r_f$					0,64*	0,96**	0,99**	0,99**	0,99**	0,98**	0,99**	
	$r_g$					-	1,00**	0,99**	0,99**	1,00**	0,99**	0,99**	
PFR/PNO	$r_f$				0,16 <sup>NS</sup>	0,66*	0,93**	0,92**	0,88**	0,89**	0,91**		
	$r_g$				-	0,89**	0,97**	0,94**	0,93**	0,95**	0,93**		
PFR/PCQ	$r_f$				0,30 <sup>NS</sup>	0,80**	0,96**	0,97**	0,95**	0,97**	0,96**		
	$r_g$				0,06 <sup>NS</sup>	0,96**	0,99**	0,99**	0,98**	1,00**	0,97**		
PFR/PAS	$r_f$				-0,11 <sup>NS</sup>	-0,46*	0,47*	0,64*	0,75**	0,80**	0,82**		
	$r_g$				-	-0,64*	0,53*	0,89**	0,92**	0,88**	0,86**		
PFR/PAL	$r_f$	0,3 <sup>NS</sup>	0,66*	0,94**	0,56*	0,12 <sup>NS</sup>	0,68*	0,92**	0,87**	0,80**	0,82**	0,78**	
	$r_g$	-	0,64*	0,95**	-	-	0,91**	1,00**	0,89**	0,89**	0,90**	0,87**	
PNO/PFI	$r_f$					-0,36 <sup>NS</sup>	0,47*	0,88**	0,86**	0,81**	0,76**	0,82**	
	$r_g$					-0,91**	0,86**	0,93**	0,89**	0,89**	0,90**	0,86**	
PCQ/PFI	$r_f$					-0,18 <sup>NS</sup>	0,67*	0,92**	0,94**	0,92**	0,91**	0,92**	
	$r_g$					-0,35 <sup>NS</sup>	1,00**	0,97**	0,97**	0,95**	1,00**	0,93**	
PAS/PFI	$r_f$					-0,69*	-0,56*	0,37 <sup>NS</sup>	0,57*	0,67*	0,65*	0,72**	
	$r_g$					-0,99**	-0,71**	0,43*	0,83**	0,88**	0,81**	0,78**	
PAL/PFI	$r_f$					-0,37 <sup>NS</sup>	0,53*	0,88**	0,80**	0,72**	0,68*	0,68*	
	$r_g$					-	0,88**	0,97**	0,84**	0,84**	0,83**	0,80**	
PNO/PCQ	$r_f$					0,93**	0,92**	0,96**	0,95**	0,94**	0,93**	0,94**	
	$r_g$					-	1,00**	0,98**	0,96**	0,99**	0,96**	0,97**	
PNO/PAS	$r_f$					0,77**	-0,01 <sup>NS</sup>	0,64*	0,80**	0,93**	0,98**	0,97**	
	$r_g$					1,00**	-0,50*	0,73**	1,00**	1,00**	0,99**	0,99**	
PNO/PAL	$r_f$					0,77**	0,92**	0,98**	0,98**	0,98**	0,98**	0,92**	
	$r_g$					-	0,93**	1,00**	1,00**	1,00**	1,00**	0,97**	
PCQ/PAS	$r_f$					0,70**	-0,09 <sup>NS</sup>	0,50*	0,69*	0,81**	0,85**	0,89**	
	$r_g$					0,76**	-0,53*	0,58*	0,88**	0,97**	0,89**	0,94**	
PCQ/PAL	$r_f$					0,56*	0,80**	0,93**	0,89**	0,86**	0,85**	0,77**	
	$r_g$					-	1,00**	1,00**	0,93**	0,99**	0,92**	0,89**	
PAS/PAL	$r_f$					0,46*	-0,35 <sup>NS</sup>	0,49*	0,73**	0,89**	0,97**	0,86**	
	$r_g$					-	-	-	-	-	0,10 <sup>NS</sup>	0,21 <sup>NS</sup>	

Legenda: <sup>NS</sup> Não Significativo;

\* Significativo a 5%.;

\*\* Altamente significativo a 1%.

Esses resultados indicam que melhorando o coqueiro para qualquer característica do fruto, por exemplo, para peso do fruto, indiretamente estará se melhorando a produção de fibra, de coque, da noz e dos albúmens sólido e líquido. Segundo Gopimony & Mathew (1991), altos valores de correlações genotípicas entre pares de caracteres indicam predominância de genes aditivos governando a expressão desses caracteres e essas correlações genéticas envolvendo associação de natureza herdável, podem, por conseguinte, ser utilizada na seleção indireta em programa de melhoramento (Cruz & Regazzi, 1994).

Os resultados acima estão de acordo com Satyabalan & Mathew (1984), os quais estimaram correlações altamente significativas entre: PFR/PFI; PFR/PNO; PNO/PCQ; PFR/PAS; PFR/PCO; PNO/PAS; PNO/PCQ; PNO/PCO; PAS/PCQ; PAS/PCO. Também Cooke (1934), estimou correlações positivas e altamente significativas entre PFR/PAS e PAS/PNO. Harland, citado por Satyabalan & Mathew, observou que variedades com noz grande tinham um alto peso de copra por fruto e considerou a correlação entre peso da noz e peso da copra por fruto como a mais importante.

## Conclusões

- As correlações entre todos os pares de caracteres do fruto são, normalmente, positivas e altamente significativas.
- A seleção para qualquer característica do fruto como peso do fruto, peso da fibra, peso da noz, peso do álbumen sólido e peso do álbumen líquido, indiretamente resulta em seleção para as demais características.

## Literatura Citada

- ARAGÃO, W. M. 2002. Coco pós-colheita. Brasília, Embrapa. 76p.
- COOKE, F. C. 1934. The relationship between weights of coconuts, husked nuts and meat. *Malayan Agricultural Journal*, 22:539-40.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. 1994. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. 390p.
- FALCONER, D. S. 1987. Introdução à genética quantitativa. Viçosa, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. 279p.
- MATHEW, T.; GOPIMONY, R. 1988. Heritability and correlations in west coast tall coconut palms. In: Silas, E. G.; Aravindakshan, M.; Jose, A. I. (eds) *Coconut Breeding and Management*. Vellanikkara: Kerala Agricultural University. pp. 103-105.
- MEUNIER, J.; ROGNOM, F.; LAMOTHE, M. de N. de. 1977. L'analyse des composantes de la noix du cocotier – Étude de l'échantillonage. *Oléagineux*. 32:13-14.
- SATYABALAN, K; MATHEW, J. 1984. Correlation studies on the nut and copra characters of west coast tall coconuts harvest during different months of the year. *Journal of Plantation Crops* 12 (1): 17-22.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. 1992. Genética Biométrica no Fitomelhoramento. Sociedade Brasileira de Genética. 496 p.
- VENCOVSKY, R. 1987. Herança Quantitativa. In: Parteniani, E; Viégas, G. P. Melhoramento e produção de milho. v.1. Campinas, Fundação Cargill. pp. 198-202.

## MICROBIAL EVALUATION ASSOCIATED WITH THE COESO LAYER IN BRAZILIAN COASTAL TABLELAND SOIL

Quintino R. Araujo<sup>1,2\*</sup>, Nicholas B. Comerford<sup>3</sup>, José L. Bezerra<sup>1\*\*</sup>, Fábio G. Faleiro<sup>1,4\*\*\*</sup>, Andrew V. Ogram<sup>3</sup>, Abid Al-Agely<sup>3</sup>, Kátia M. T. Bezerra<sup>1</sup>, Patrícia V. Menezes<sup>1</sup>, Lindolfo P. Santos Filho<sup>1</sup>, Jorge G. Santos<sup>5</sup>, Alessandra S.G Faleiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas do Cacau / CEPLAC. <sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil,  
quintino@cepec.gov.br. <sup>3</sup>Soil and Water Science Department / University of Florida, Florida, USA. <sup>4</sup>Embrapa Cerrados,  
<sup>5</sup>Universidade Federal da Bahia.

\* Funded by CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

\*\* Funded by CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

This study looked at some fundamental aspects of the coeso layer of the Brazilian Coastal Tableland soils aiming to define procedures more adapted in the use and management of those soils. The Brazilian Coastal Tableland constitutes a very extensive ecosystem of great agricultural potential. Adequate knowledge of the coeso layer can bring valuable contributions to a sustainable agricultural production and environment protection. Microbial alternatives can be used associated to the current existing options (mechanical subsoiling) or plants with root system capable to grow through the coeso) to decrease the agricultural limitations of the coeso layers. The objective of this study was to evaluate the influence of different land uses on the qualitative and quantitative distribution of the microbial population of a Brazilian Coastal Tableland soil. The study was carried out at the Brazilian Wood Ecological Station and vicinity, in state of Bahia (between 16°10' to 16°30' S and 39°05' to 49°40' WG). Two soil horizons (A: 0-15 cm and B: 35-50 cm) were studied in four different land use areas (natural forest, rubber tree plantation, pasture and annual crops). The soil samples were analyzed at laboratories of the Cocoa Research Center (CEPEC / CEPLAC - Bahia, Brazil) and Soil and Water Science Department at the University of Florida (Florida, USA). Specific media were used to verify the fungal and bacterial colonies of fresh and air-dried soil. *Penicillium* sp was the dominant fungus species for all land uses on the fresh soil samples, including the B-horizon – that represents the coeso. The dominant fungi were characterized by DNA analysis. The genetic distance showed, by trend, a little difference between the *Penicillium* sp from A-horizons and that ones from B-horizons. The soil under pasture presented a higher regularity on the occurrence of fungal and bacterial colonies. The relevant occurrence of bacteria and fungi into the B-horizon, in most of the studied areas, can means an interesting indicator of possibilities to the biological improvement on the coeso layers. The soil under annual crop presented a greatest diversity of fungi. The obtained information points to a correlation between microbial population and organic matters, which could be used as a possible way to improve the agro-environmental properties of the coeso's soils.

**Key words:** Coeso soil, Brazilian Coastal Tableland, microorganisms.

**Avaliação de microorganismos associados com a camada coesa em solo de Tabuleiros Costeiros no Brasil.** Estudaram-se alguns aspectos fundamentais da camada coesa dos solos de Tabuleiros Costeiros brasileiro, como subsídios para definir procedimentos mais adaptados para o uso e manejo daquelas terras. Os Tabuleiros Costeiros no Brasil constituem-se em um ecossistema extenso e de grande potencial agrícola. Conhecimentos adequados sobre a camada coesa podem trazer valiosas contribuições para a produção agrícola sustentável e proteção de ambiente. Alternativas com microorganismos podem ser usadas associadas às opções existentes (subsolagem mecânica ou plantas com sistema de raiz capaz de penetrar no coeso) para diminuir as limitações agrícolas daquelas camadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes usos da terra na distribuição qualitativa e quantitativa da população microbiana de um solo dos Tabuleiros Costeiros brasileiro. O estudo foi realizado na Estação Ecológica do Pau-Brasil e áreas no entorno, no estado da Bahia (entre 16°10' e 16°30' S, e 39°05' e 49°40' WG). Dois horizontes do solo (A: 0-15 cm e B: 35-50 cm) foram estudados sob quatro diferentes usos da terra (floresta natural, seringueira, pasto e cultivos anuais). Amostras de solo foram analisadas em laboratórios do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC / CEPLAC - Bahia, Brasil) e Departamento de Ciência do Solo e da Água, na Universidade de Flórida (Flórida, E.U.A.). Foram usados meios de cultura específicos para verificar colônias de fungos e bactérias, em amostras de solo frescas e secas ao ar. *Penicillium* sp. foi a espécie de fungo dominante em todos os usos da terra nas amostras de terra frescas, inclusive no horizonte B - que representa o coeso. Os fungos predominantes foram caracterizados por análise de DNA. A distância genética mostrou, como tendência, uma pequena diferença entre os tipos de *Penicillium* sp. do horizonte A e aqueles do horizonte B. O solo sob pasto apresentou uma regularidade na ocorrência de colônias de fungos e bactérias. A relevante ocorrência de bactérias e fungos no horizonte B, na maior parte das áreas estudadas, representa um interessante indicador das possibilidades para melhoria biológica nas camadas coesas. O solo sob cultivos anuais apresentou uma maior diversidade de fungos. As informações obtidas podem indicar para uma relação entre população microbiana e matéria orgânica, o que poderia ser usado como um possível princípio para melhoria das propriedades agro-ambientais dos solos coesos.

**Palavras-chave:** Solo coeso, Tabuleiros Costeiros brasileiros, microorganismos.

*"There is nothing in the whole nature which is more important or deserves much attention as the soil. Truly it is the soil which nourishes and provides for the whole nature, the whole of creation depends on the soil, which is the ultimate foundation of our existence".* Friederich Albert Fallon

## Introduction

The concept of soil quality has been developed to characterize the usefulness and health of soils. Several soil and land indicators have been suggested (Doran et al., 1994). A better understanding of soil quality is fundamental for rehabilitation of degraded soils and environment (Mermut, Eswaran, 2001), thus, the interrelationship between physical properties, microbial populations and organic carbon dynamics are very important.

Conventional agricultural systems have caused significant alterations in the characteristics of natural ecosystems, mainly with respect to the conditions of soil, and particularly, on some of its physical attributes. It is of fundamental importance to promote further studies on the interrelation between biological and physical soil conditions.

The coeso layer present in some soils means a physical limitation that affects the dynamics of several edaphic attributes. The term 'coeso' is used to distinguish subsurface soil horizons that have hard, very hard or extremely hard consistency when dry but are friable when moist. This horizon also exhibits low fertility, low pH, increased aluminum saturation in the subsurface layer, low organic matter, low CEC and low water retention (Araujo, 2000; Souza, 1996; UFV, 1984). The coeso layer affects the air, water and nutrients dynamics and limits the root penetration. This study emphasizes the microbial conditions in the coeso soil, in order to advance in its characterization. The Brazilian Coastal Tableland region has a great agricultural and ecological diversity, but just a few studies about this subject have been done.

### Microorganisms and soil conditions

The advances in the systemic examination of microorganisms have not been used as an important tool to study the problems of compactness of Coastal Tableland soils. Soil microorganisms are responsible for factors related to soil health because they are integrants and participants of several physical, chemical and biological phenomena. Microorganisms that develop activities under adverse soil conditions can have a key role on the amelioration and conservation of those soils. The identification of the referred microorganisms opens the possibility for broader knowledge concerning different decomposition and incorporation levels of soil organic matter.

The conventional agricultural systems greatly alter

natural regulation. How will the dynamics of the microorganisms be altered, in different layers of the soil, starting from the changes in the land use and, consequently, in the characteristics of the radicular zone – within the body of the soil? They probably have a great influence on the health and sustainability condition of the soil.

Cultivation increases the accessibility of organic matter to microbial attack by disruption of soil structure (Voroney et al., 1981). Rupturing of soil aggregates promotes destabilization of the organic matter, making it susceptible to microbial decomposition (Sollins et al., 1996).

Over the last few decades subsoiling followed by liming, fertilization and irrigation, are main management technique used to solve temporarily the problems of the coeso layer in Tableland soils (Cassel, 1979; Nacif, 1994). More recently, Alvarenga et al. (1996) and Carvalho et al. (2001) have used successfully plants whose roots penetrate and surpass the coeso layer creating pores.

The association of the current management techniques used to overcome the coeso layer along with the establishment of a desired microbial populations may successfully increase the sustainability of agricultural systems, in the long run, and enable successful reclaim of polluted soils and also protect natural ecosystems.

Studies, such as the current one, that generate information on the microorganisms acting in the coeso Tableland layer can yield to improve management practices for these problem soils.

### Improving the organic matter content in the B-horizon.

How could be possible to manage the belowground biological functions to ameliorate the soil properties around the natural or anthropogenic compaction? In this way, the root system environment, its exudates and other organic substances, quickly decomposable by soil microbial, are fundamental.

What could be the best substrates to improve microbial populations and activities into the coeso layers? The decomposition of senesced plant litter represents an important intermediate step in the cycling of nutrients between above and belowground systems. The rate of decomposition of plant litter is sensitive to fluctuations in a number of parameters, including environmental conditions, and particularly to changes in the quality of the litter.

The composition and diversity of biotic communities are controlled by the availability of growth-limiting

resources. The amount and types of organic compounds entering the soil from plant litter and root control the availability of resource for soil microbial populations. Because plant communities differ in the amount and type of substrates entering the soil, could be reasoned that the composition and function of soil microbial communities should differ with the dominant vegetation (Myers et al., 2001).

The organic matter, also referred to as humus, represents one of the more stable transformation products formed in the course of residues decay. The soil organic matter is a valuable constituent because imparts many desirable biological, chemical and physical soil properties (Doran et al., 1996) that are very important to improve soil quality.

In agricultural ecosystems, considering their locations, the roots are very susceptible to decay but, during growth, roots supply exudates and sloughed-off cell materials that serve as carbon substrates for the microbial population as the same manner as post-harvest root residues (Wagner and Wolf, 1998). In natural ecosystems, considerable belowground residues are deposited continuously each year from root systems.

Carvalho et al., (2001) evaluated the relative power of root penetration of nine vegetal species (7 legumes and 2 grasses). They concluded that the legumes *Crotalaria juncea* L., *Calopogonium mucunoides* Desv. and the grass *Brachiaria humidicola* (Rend.) Schw were the species that explored a large soil volume in depth. It is possible that root systems of the mentioned plant species release a higher amount of exudates that will permit the existence of large microbial population. Upon death and decomposition of the roots, "bio-pores" that can increase the air and water circulation, are formed. Thus, studies about biological improvement of coeso soils must be expanded.

Examining conservative management methods used on Brazilian soils, Reeves (2001) concluded that intensive crop rotation reduces soil compaction, improves soil quality and reduces risks from short-term droughts, because of the high-residue cover crop production that largely influences soil structure, carbon and microbial populations, among others.

The majority of the carbon, when soil microorganisms decompose organic material, is evolved as  $\text{CO}_2$  or incorporated into biomass. However, a portion of the carbon is biochemically altered and remains in the soil as organic matter. The amount of soil organic matter accounts for up to 5% of the total soil volume, but it exerts a very large influence on soil properties – for example, improving the cation exchange capacity and promoting aggregation. Improved scientific knowledge on mentioned aspects represents the possibility of new

technological inputs to the coeso soils management that would attribute value and income to the agricultural use of lands and improvement of the environmental quality.

The objective of this study was to evaluate the influence of different land uses on the qualitative and quantitative distribution of the microbial population of a Brazilian Coastal Tableland soil.

## Material and Methods

### Study sites and sampling

Two soil horizons were studied under four different land uses. The sampling focused on the A and B-horizons of an Argissolo Amarelo Distrófico coeso (Ultisol) located in the vicinity of the Estação Ecológica de Pau-Brasil - ESPAB ( $16^{\circ}10'$  to  $16^{\circ}30'$  S and  $39^{\circ}05'$  to  $49^{\circ}40'$  WG). The A-horizon was a sandy loam texture 0 to 15 cm deep, while the B-horizon was a coeso of sandy clay loam texture at 35 to 50 cm depth. The deeper horizon was representative of the coeso. The climate is tropical without a dry season (Af by Koeppen) and with total rainfall of 1600 mm per yr. Drier months receive about 60 mm. The average annual temperature is  $23^{\circ}\text{C}$  and air humidity is 86% (Leão & Melo, 1990; Santana et al., 2001).

The first land use is natural forest - **NF**. NF is a 1,100 ha area of native Atlantic Forest, which was the characteristic vegetation cover type of the area and once stretched along the coast of Brazil. Today the native forest has survived in just 7% of its natural range. The second land use was an 11 ha rubber tree (*Hevea brasiliensis*) plantation - **RT**. The area had been under cultivation for 22 years. Trees were planted at 476 trees per hectare at a 7 by 3 m spacing, and the legume *Pueraria javanica*, covered the soil between trees. The third land use was 50 ha of 25-year-old pasture (*Brachiaria decumbens*) – **PA**. The area was originally ploughed to 15 cm depth. Six years previous to these measurements the area was limed ( $2 \text{ t ha}^{-1}$ , 25% Ca + 13% Mg) and fertilized (200 g per planting hole of ordinary super phosphate). The last land use was annual cropping – **AC** of 3.5 ha. This area was cultivated for 14 years preceding this study by small farmers. Main crops were corn (*Zea mays*), bean (*Phaseolus vulgaris*), pumpkin (*Cucurbita moschata*), sugar-cane (*Saccharum officinarum*) and cassava (*Manihot* spp). When this site was sampled, cassava had been growing for the past 12 months. It was fertilized with 40 g per plant of ordinary super phosphate. This area was burnt every 5 to 6 years and ploughed to a depth of 15 to 20 cm followed by harrowing. All study areas had never been subsoiled.

Four replicates of soil samples of each depth from

four different locations within a land use were taken. The different locations within a land use were at least 30-50 m far from each other. The four replicate samples at each location within a land use were combined for each depth.

### Fungal and bacterial analyses

To identify fungi, 2 grams of fresh soil were placed in Petri dishes in selective media composed of PDA + Rose of Bengal + antibiotic (PDA: 200 g potato, 12.5 g dextrose – C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, and 17.5 g agar; Rose of Bengal: 0.05 g for 1 L of PDA media; Suspension of streptomycin: 750 mL sterile water + 1 g antibiotic, using 50 mL suspension for 500 mL of PDA). For bacteria, the medium had: Tryptic-soy broth (3 g/L), agar (12 g/L), Cycloheximide (25 mg/L) and Antifoam Agent (25 mg/L). The plates were incubated and observed regularly for counting and isolation of colonies (Fernandez, 1993). Materials of the fresh soil were inoculated under 10<sup>-4</sup> dilution. Within the isolated fungi obtained from the different land uses, nine isolates were selected for DNA analysis. These isolates were previously characterized and classified on the basis of their morphological characteristics. Mycelia mass of each isolated were produced in Petri dishes containing PD liquid media.

The following procedure was applied on the air-dried soil samples, and the media were based on Johnson & Curl (1972). For fungi the medium used was composed of potato dextrose agar – PDA (39 g/L), Tergitol NP-10 (1ml/L) and was added, after autoclaving, Streptomycin (100 mg/L) - use water suspension, Chlortetracycline – HCl (50 mg/L) - use water suspension. Materials of the soil (5 g air dry) were inoculated under 10<sup>-2</sup> dilution. The medium used for bacteria was composed of Tryptic-soy broth (3 g/L), Agar (12 g/L), Cycloheximide (25 mg/L), Antifoam Agent (25 mg/L). Soils (5 g air dry sample) were inoculated under 10<sup>-6</sup> dilution. The number of organisms capable of growth on the specific medium was referred to as “colony forming units” – CFU, and calculated by: CFU/g soil = (No. colonies x final dilution) / g dry soil (Wollum II, 1982).

### Extraction of DNA

The DNA / RAPD markers procedure was applied on the dominant fungi obtained from fresh soil samples. Mycelia mass or cell suspensions of each isolate were used for extraction of genomic DNA. The extraction methodology was optimized from the approach described by Doyle and Doyle (1990). After extraction, the DNA concentration was estimated by spectroscopy at 260 nm (Sambrook et al., 1989). Bands of genomic DNA were separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel and

used as indicator of integrity and of purity of the DNA extracted. After measurement, the DNA samples were diluted to a concentration of 10ng mL<sup>-1</sup>.

### Obtaining RAPD markers

DNAs were amplified by a RAPD (Random Amplified Polymorph DNA) procedure. The amplification was accomplished in a 25 nl solution containing 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM each of desoxe-nucleotides (dATP, dTTP, dGTP and dCTP), 0.4 mM of a “primer” (Operon Technologies Inc., Avenue, CA, U.S.A.), Taq polymeraze and about 30 ng of DNA. Approximately 15 decamers primers were used to obtain RAPD markers. The amplifications were performed in thermo circulator, programmed for 40 cycles, each constituted by the following sequence: 15 seconds at 94 °C, 30 seconds at 35 °C and 90 seconds at 72 °C. After 40 cycles a final extension phase of 7 minutes at 72 °C and finally, the temperature was kept at 4 °C. After amplification, 3 ml of a mixture of blue of bhromophenol (0,25%), glycerol (60%) and water (39,75%) were added to each sample.

### Genetic matrix of distances

The RAPD markers were converted to a binary matrix and genetic distances between the peculiar isolates were calculated based in the complement of the coefficient of similarity (D) of Nei & Li (1979), utilizing the Program Genes (Cruz, 1997). The genetic matrix of distances was utilized for the graphic dispersion in two-dimensional space based in the minimum of the differences between the original genetic distances and the graphic distances (Cruz & Viana, 1994).

### Statistic

To evaluate the microbial data, a complete randomized statistical design was used in a factorial scheme (including the four land uses and the two depths) and the Duncan procedure, at 0,05 level, was applied for means comparison. Data had been transformed to logarithm in decimal base. To facilitate the visualization, the data had been presented graphically under original values.

## Results and Discussion

The way by which the samples were prepared seems to affect the Colony Forming Units (CFU) of fungi and bacteria. Figure 1 presents the average number of colonies of fungi and bacteria, by horizon, including the studied four land uses, for fresh soil. The CFU of fungi in the fresh soil was 4.6 (A-horizon) and 15.0 times (B-horizon)

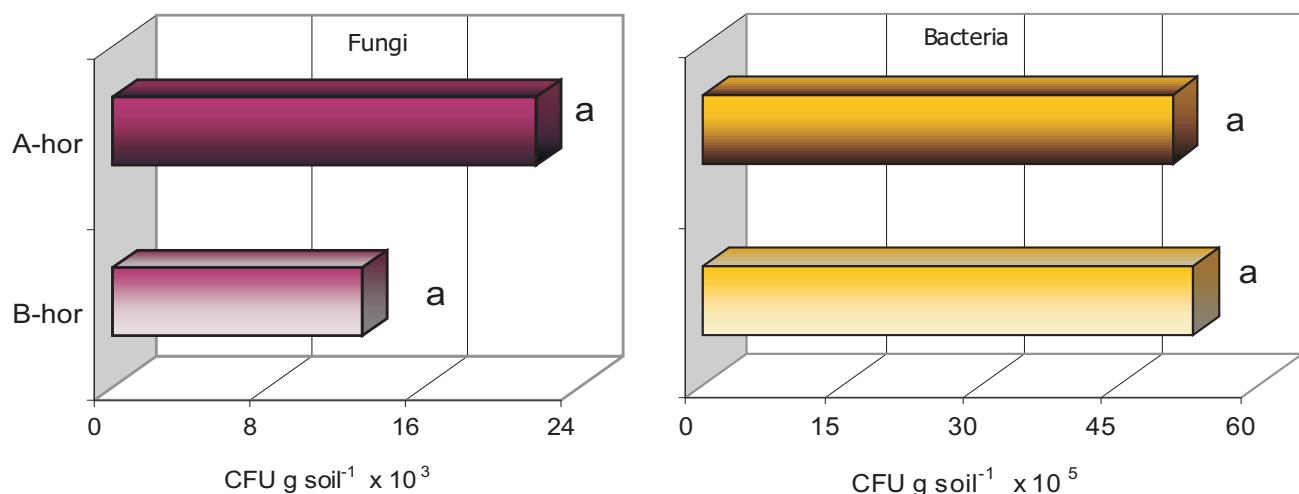


Figura 1 - Average number of CFU of fungi and bacteria (of fresh soil samples), for horizon, including four studied land uses, in a Coastal Tableland soil, Bahia, Brazil. Same letters denote no significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

higher than the air-dried soil data. For the bacteria these proportions, in the fresh samples, were 11.3 times (A-horizon) and 8.1 times (B-horizon) higher than the dried soil. Frequently, in opposition to the higher number of fungi in the A-horizon, the number of bacteria is higher in the B-horizon. Observing the B-horizon, the number of fungi colonies and the higher number of bacteria indicate an interesting data around the objective of the biological amelioration of the coeso layer.

The number of CFU by land use indicates, in spite of no statistical difference, that the soils under rubber tree and pastures favor fungi population, as indicated by Figures 2 and 3, respectively, in fresh and air-dried soil; while the soils under natural forest and annual crop favor of bacteria.

The number of colonies of fungi and bacteria are presented in Figure 4, for fresh soil, and in Figure 5, for dried soil. It was verified a best regularity on the fresh soil data, in spite of no statistical difference, with relative supremacy, in the A-horizon to the pasture and the rubber tree for fungi and to natural forest and annual crop for bacteria. In the B-horizon (coeso layer), fungi tend to be more numerous than bacteria in rubber tree soil, and bacteria tend to be more numerous than fungi in the natural forest and pasture.

Because the ideal fungi growth conditions are different from that of bacteria it was observed that in environments in which fungi are higher the bacteria CFU diminishes; and vice versa (Figure 5). In spite of no mathematics

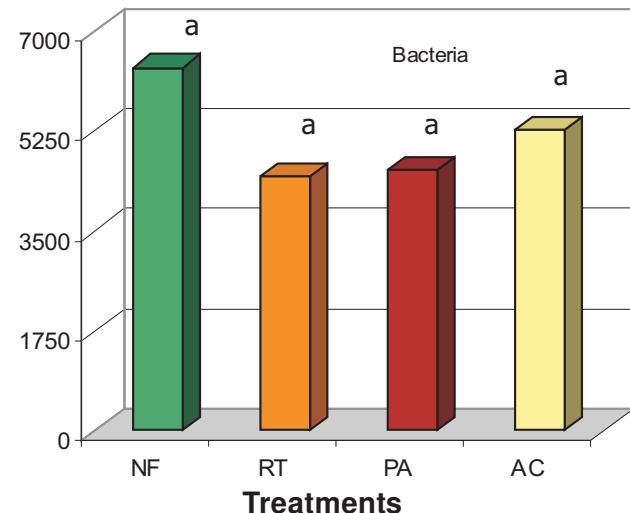
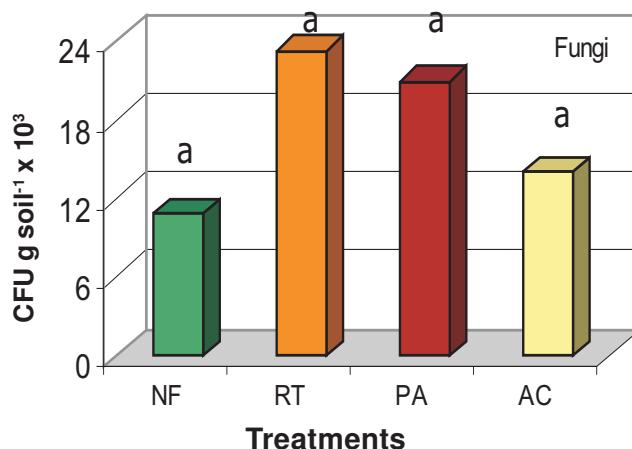


Figure 2 - Average number of CFU of fungi and bacteria (of fresh soil samples), under four land uses (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC - annual crop), in the two studied horizons, in a Coastal Tableland soil, Bahia, Brazil. Same letters denote no significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

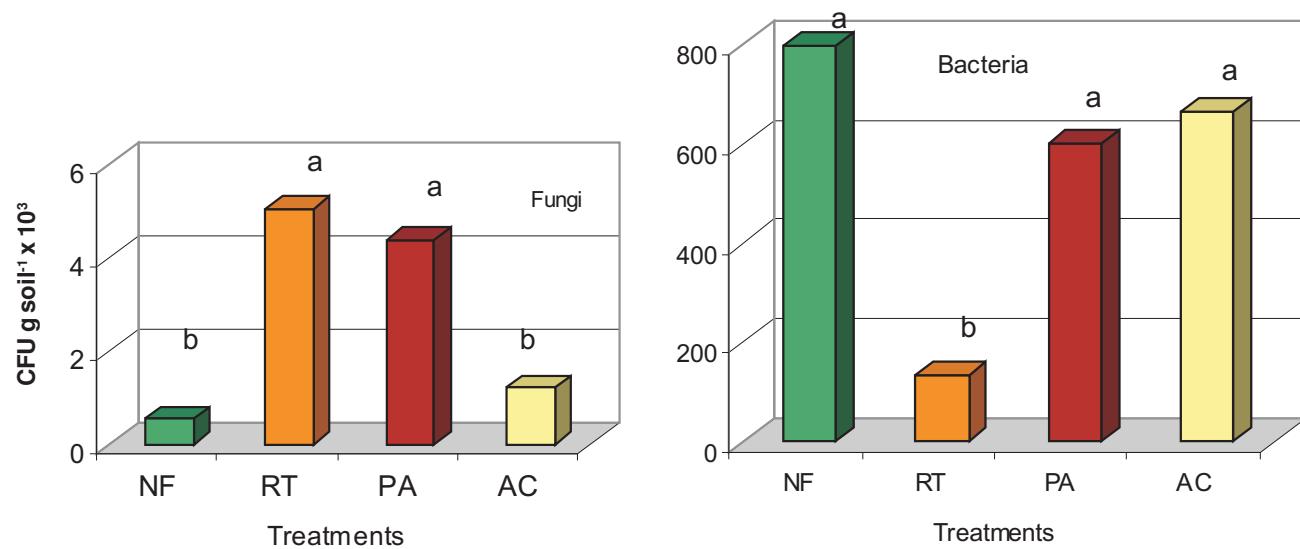


Figure 3 - Average number of CFU of fungi and bacteria (of air dried soil samples), under four land uses (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC -annual crop), including two studied horizons, in a Coastal Tableland soil, Bahia, Brazil. Different letters denote significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

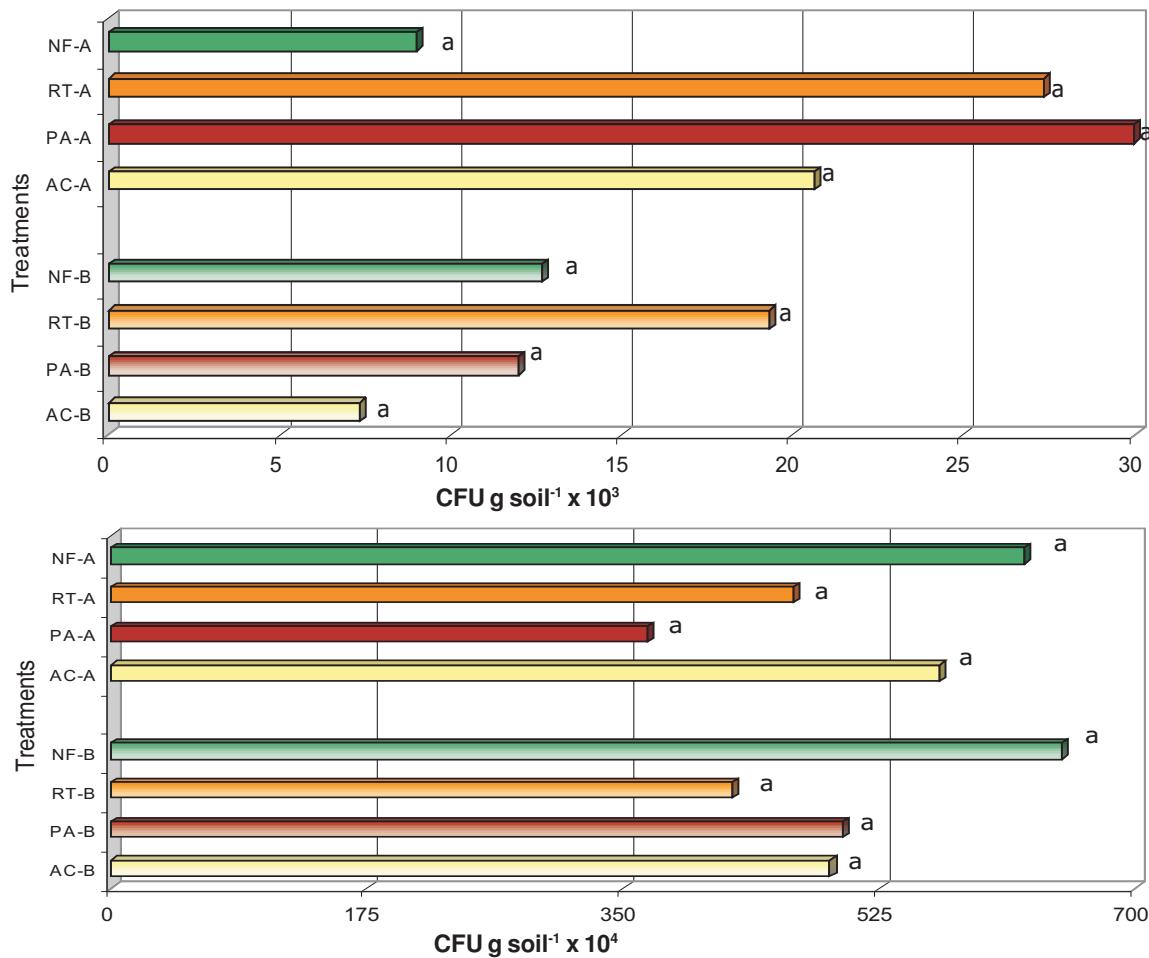


Figure 4 - Total number of CFU of fungi and bacteria (of fresh soil samples), over two depths (A-horizon and B-horizon), managed under different land uses (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC -annual crop), in a Coastal Tableland soil, Bahia, Brazil. In each depth, same letters denote no significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

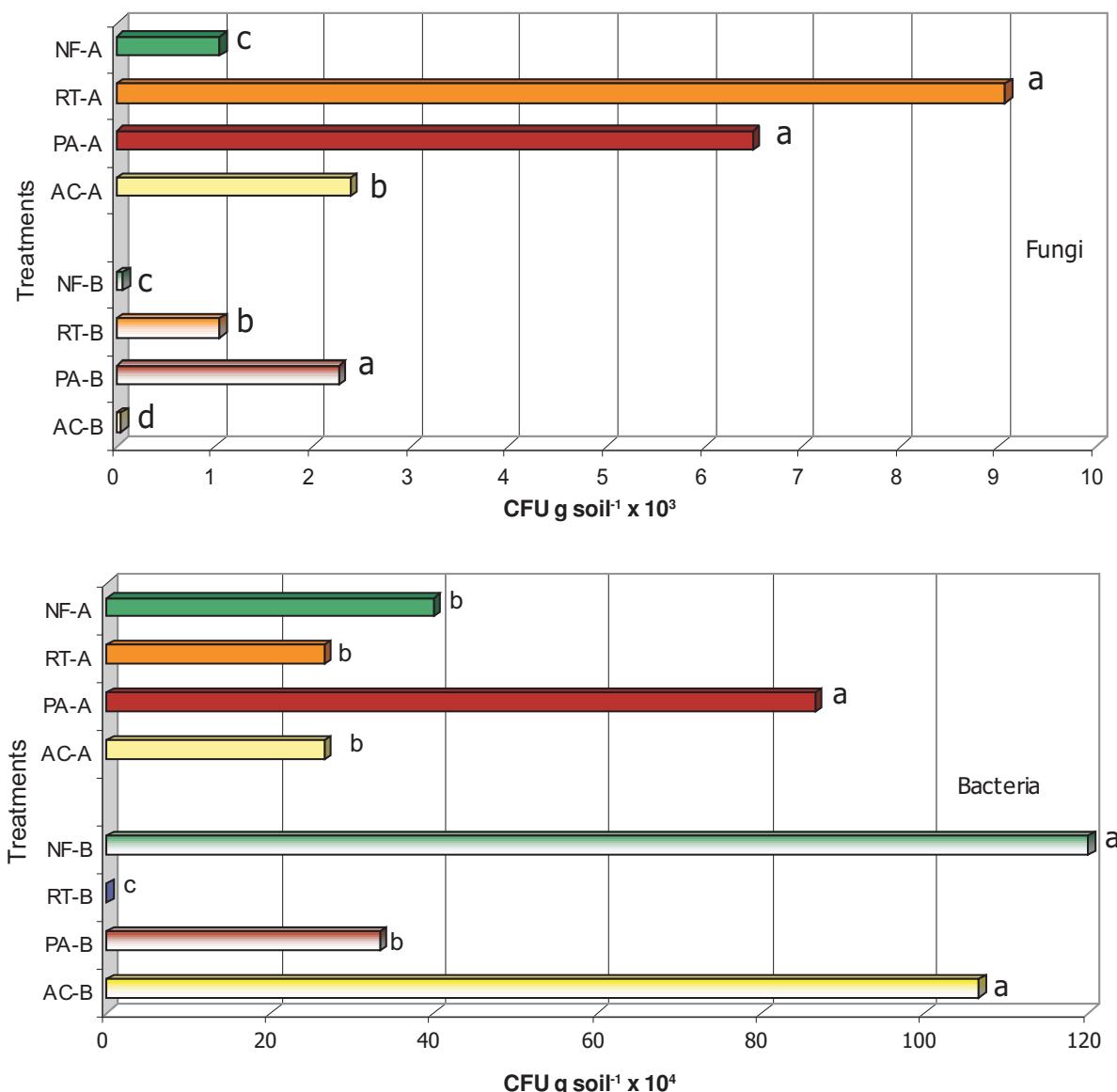


Figure 5 - Total number of CFU of fungi and bacteria (of air dried soil samples), over two depths (A-horizon and B-horizon), managed under different land uses (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC - annual crop), in a Coastal Tableland soil, Bahia, Brazil. In each depth, different letters denote significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

difference, fungi tend to predominate in pasture and rubber tree areas (A-horizon) and pasture (B-horizon). Bacteria, on the other hand, tend to be higher in pasture (A-horizon) and natural forest and annual crop (B-horizon).

The result of the Figure 5 indicates that the number of colonies of fungi in the B-horizon under natural forest and annual crop tend to zero. The occurrence of fungi and bacteria in the soil under pasture in the two analyzed horizons revealed that land cover alters the prevailing population of those organisms. Despite the soil under pasture presenting a higher diversity than the soil under rubber tree, the soil under rubber tree had higher fungi CFU. The occurrences of bacteria in the B-horizon, in

special under natural forest, annual crop and pasture, and of some colonies of fungi under pasture and rubber tree are an important indicative of the importance of additional studies to better understanding the microbiological processes that decrease the agro environmental limitations caused by the coeso layer.

In order to understand what soil characteristics would determine the presence of fungi, some soil basic physical and chemical characteristics (Table 1 based on Araujo et al. 2004) were related to bacteria and fungi CFU. The values of carbon tend to present a direct relationship with bacteria CFU, but not with fungi. Under natural conditions the Coastal Tableland soils, besides the limitations of the

coeso layer, have problems associated with aluminum and low fertility. Basic physical and chemical data presented in Table 1 show an irregular balance in the soil properties, among the land uses, in regard of their better or worse attributes.

The pasture area, besides the improved fertilization and lime conditions, had the possibility of high production of belowground organic substrata (C-3 plant) related to the temporary addition of cattle manure. Thus this area presented best values of pH, base saturation, phosphorus and large number of colonies, in the fresh soil, of fungi (A-horizon) and bacteria (B-horizon); and in the dried soil, fungi and bacteria (A-horizon). The area under rubber tree, in spite its greater CFU of fungi and bacteria (A-horizon, fresh soil) and fungi (A-horizon dried soil), did not show better soil properties. The natural forest area had more favorable carbon, pH, base saturation,

nitrogen, porosity and bulk density, and showed, especially to bacteria, a better potential to microbial colonization. The area under annual crop presented better conditions related to carbon, and higher clay content and aggregation; but, on the other hand, had higher C/N ratio and worse conditions around pH and aluminum (Table 1).

Grasses are considered efficient improvers of soil (Oades, 1984), because almost 50% of their photosynthesis production occurs belowground, in the zone of the root system. Effects of agricultural land use on organic matter content and related soil microbial and physical properties were compared in KwaZulu-Natal, South Africa, with soil under undisturbed native grassland, on Oxisols (Dominy & Haynes, 2002). Organic C, microbial biomass C, percentage organic C present as organic C, basal respiration and aggregate stability were

Table 1 - Chemical and physical analyses in an Argissolo Amarelo Distrofico coeso, Bahia, Brazil (Araujo et al., 2004).

Depth (cm)	Land Use	Chemical Properties						
		C	N	C/N	pH	AI	P	Base Saturation
		g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	-	-	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	%
0-15	Natural Forest	16.32 a	1,09 a	14.93 a	5.90 b	0,03 b	0,00 c	48.93 ab
	Rubber Tree	12.69 a	0,76 b	16.73 a	6.10 ab	0,27 a	1,73 b	25.68 c
	Pasture	12.84 a	0,76 b	17.16 a	6.55 a	0,00 b	3,75 a	59.96 a
	Annual Crop	14.88 a	0,81 b	18.14 a	5.83 b	0,08 b	1,00 bc	41.00 bc
35-50	Natural Forest	5.85 a	0,46 a	13.20 a	6.13 a	0,40 b	0,00 a	24.55 b
	Rubber Tree	4.89 b	0,39 a	12.85 a	6.13 a	0,60 ab	0,00 a	21.63 b
	Pasture	4.90 b	0,38 a	14.55 a	6.65 a	0,05 c	0,25 a	54.53 a
	Annual Crop	7.46 a	0,41 a	17.91 a	5.25 a	0,70 a	0,00 a	17.43 b
Physical Properties								
		Coarse Sand	Fine Sand	Clay Content	Total Porosity	Bulk Density	Stability of Aggregates	
		g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup>	g cm <sup>-3</sup>	% %	
		701.50 a	119,00 a	248.25 a	0,52 a	1,23 d	41,24 a	
0-15	Natural Forest	673.25 a	123,75 a	204.00 a	0,43 b	1,45 b	34,84 a	
	Rubber Tree	719.75 a	75,25 b	201.25 a	0,37 c	1,59 a	39,00 a	
	Pasture	648.75 a	121,00 a	270.75 a	0,46 b	1,35 c	43,18 a	
	Annual Crop	507.25 a	106,75 b	178.25 a	0,35 a	1,58 a	37,68 b	
35-50	Natural Forest	473.00 a	109,75 b	231.00 a	0,37 a	1,52 a	51,36 a	
	Rubber Tree	453.75 a	95,75 b	272.00 a	0,39 a	1,50 a	39,67 b	
	Pasture	343.75 a	136,00 a	295.25 a	0,38 a	1,49 a	52,76 a	
	Annual Crop							

In each column, for depth, different letters denote significant difference at 0.05 statistical level, by Duncan procedure.

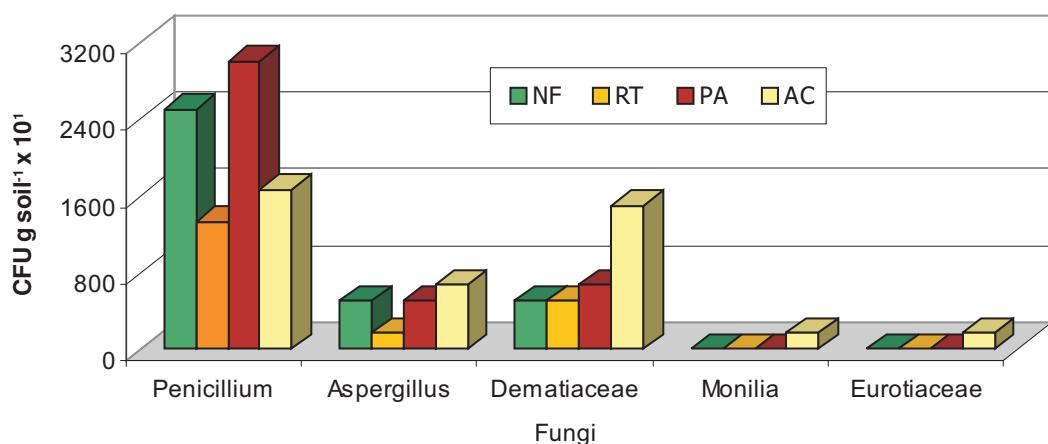
substantially greater in the surface 5 cm under maize zero-till than maize conventional-till but this trend tended to be reversed in the 10- to 30-cm layer. Also in the present study, major changes were observed in the studied surface layer (0-15 cm).

Under hardsetting clay B-horizons conditions of SE Australia, Pierret et al. (1999) studied the relation between root distributions and soil properties. They observed that the macro pore sheath soil contained more microbial biomass per unit mass than both the bulk soil and the rhizosphere. The bacterial population in the macro pore sheath was able to utilize a wider range of carbon substrates and to a greater extent than the bacterial population in the corresponding bulk soil.

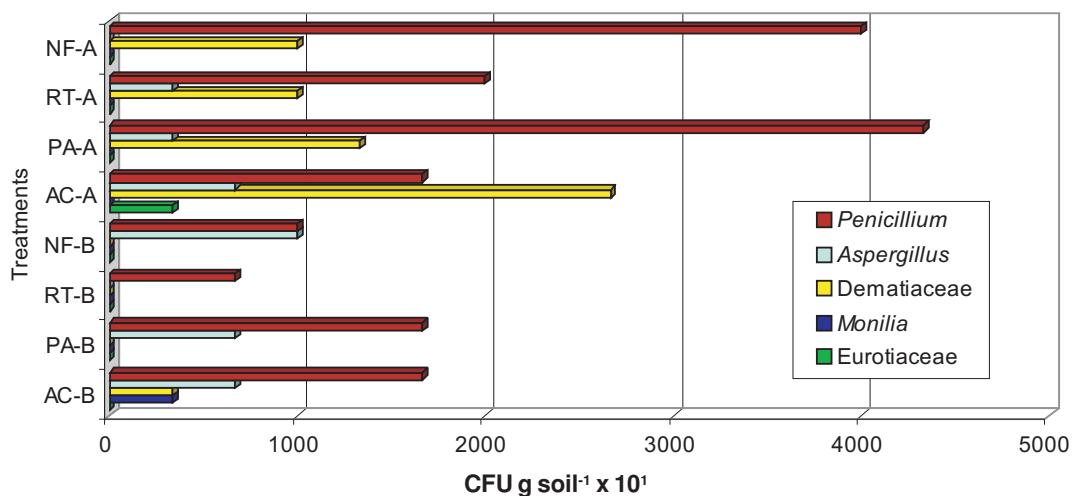
The identified fungi included representatives of genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monilia*, and the Families Dematiaceae and Eurotiaceae. Figure 6 illustrates the

number of colonies found for each land use. *Penicillium* was dominant followed by Dematiaceae and *Aspergillus*. The dominant organisms were differentiated through DNA markers.

The occurrence of fungi in each land use and each soil depth is presented in the Figure 7. *Penicillium* is present in all land uses. Dematiaceae is present in the A-horizon of all of the studied environments but the CFU reduces in the B-horizon in all land uses, except in the annual crops. *Aspergillus* occurs in the surface and subsoil of both pasture and annual crops, but is only present in surface soil of the rubber tree plantation and the subsoil of natural forest. Eurotiaceae and *Monilia* were the least present fungi, occurring only in the subsoil of the annual crops, respectively, in the A-horizon and in the B-horizon. The annual crops had the greatest diversity of fungi. Previous studies have examined the effects that



Figures 6 - Average number of CFU of fungi by land use (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC - annual crop), including two studied layers, in fresh samples of a Brazilian Tableland soil.



Figures 7 - Total number of CFU of fungi in fresh samples of a Brazilian Tableland soil, over two soil depths (A-horizon and B-horizon), managed under different land uses (NF - natural forest; RT - rubber tree; PA - pasture; AC - annual crop).

plant community composition and land-use history have on microbial communities in the soil (Buckley & Schmidt, 2001). Microbial community structure was observed to be remarkably similar among plots that shared a long-term history of agricultural management despite differences in plant community composition and land management that have been maintained on the plots in recent years. In contrast, microbial community structure differed significantly between fields that had never been cultivated and those having a long-term history of cultivation.

By contrast, some microbial cell components can be very resistant to decay and others are easily decomposed, such as that from *Aspergillus niger*, that has hyaline (no pigmented) fungal cell wall tissues, and consist predominantly of carbohydrate polymers (Wagner & Wolf, 1998).

Soil fungi such as *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, and bacteria, such as *Streptomyces*, *Pseudomonas* and *Bacillus*, are important in the initial extra cellular depolymerization of cellulose (Wagner & Wolf, 1998). Lugauskas et al. (1989) investigated the role of micromycetes in soil organic matter decomposition. Micromycetes first destroy simple soluble carbohydrates followed by cellulose, pectin, lignin and finally humus. Among the main soil micromycetes active in the destruction of organic matter are: *Penicillium* (*P. capsulatum*, *P. spinulosum*, *P. citreo-viride*, *P. phoeniceum*, *P. purpurogenum*, *P. urticae*), and other species and genera

The seven primers decamers utilized generated a total of 68 RAPD markers, with an average of 9,7 by primer. Figure 8 shows the standard of amplification of DNA samples of the 9 isolates obtained with the use of specific primer (OPL-8). It was verified a clear visual differentiation of the isolated representative of the *Penicillium* with relation to that of the Dematiaceae.

The genetic distances of *Penicillium* isolates were lower than those between this group and the Dematiaceae (Table 2). *Penicillium* had a tendency toward a greater similarity in the isolates originated from the B-horizon. However, the area under the rubber trees did not follow the same trend. In general, fungi found in the A horizon had a genetic distance between 0.012 and 0.073. The distance for those in the B-horizon ranged from 0.062 to 0.100. The shortest distance recorded between Dematiaceae and *Penicillium* was 0.794 for pasture in the A-horizon.

The grouping analysis illustrated the differences between isolates (Figure 9). There were clearly two groups that primarily represented the difference between *Penicillium* and Dematiaceae. It was possible to verify that the RAPD markers showed not only the differentiation

between the isolates of the peculiar groups, but also recorded the diversity of isolates into the same group.

Considering the possible action of PDA medium to fast growing fungi, like *Aspergillus* and *Penicillium*, other media could be also recommended to compare the fungal occurrence in the coeso soils. The present evaluation had used Rose of Bengal to counterbalance this.

The presence of fungi in the coeso horizon illustrates that biological activity that occurs in a presumably hostile soil environment. On the basis of these preliminary results, could be suggested that the presence, quantity and activity of associated fungi, bacteria and roots dynamics should be studied to better understand this soil subsurface horizon in this region of high biodiversity.

Based on hypothesis by Steenwerth et al. (2002), land use history and its associated management inputs and practices may produce a unique soil environment, for which microbes with specific environmental requirements may be selected and supported. They found that management factors showed distinct groupings for land use types and that differences in soil microbial community composition were highly associated with soil microbial biomass, suggesting that labile soil organic matter affects microbial composition.

The results indicate that the RAPD markers not only differentiate between the isolates of the peculiar groups, but also can record diversity of isolated within a group.

Polysaccharides produced by soil bacteria and humic substances produced by soil fungi improve aggregation – and this is desirable, because allows, for example, easier cultivation and penetration by plant roots because the soil offers less resistance; more rapid exchange with the atmosphere and thus better soil aeration; and higher infiltration rates (Wagner & Wolf, 1998). The soil

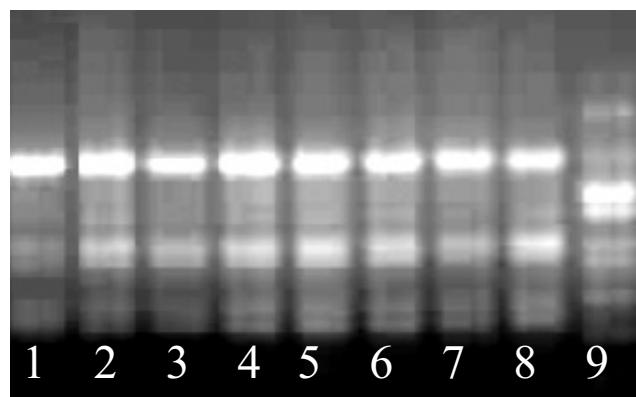


Figure 8 - Products of amplification of genomic DNA of 9 isolates of fungi (Penicillium 1-8 and Dematiaceae 9) of a Brazilian Tableland soil, generated with the utilization of the decamer primer L8.

Table 2 - Genetic matrix of distances between 9 isolated of fungi of a Brazilian Tableland soil, calculated on the basis of 68 RAPD markers.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0								
2	0,082	0							
3	0,070	0,060	0						
4	0,034	0,048	0,035	0					
5	0,034	0,070	0,057	0,023	0				
6	0,048	0,086	0,098	0,060	0,082	0			
7	0,047	0,036	0,048	0,012	0,034	0,073	0		
8	0,071	0,062	0,073	0,036	0,059	0,100	0,049	0	
9	0,806	0,826	0,800	0,803	0,808	0,794	0,800	0,853	0

1. *Penicillium* sp / Natural Forest / A-horizon  
 2. *Penicillium* sp / Natural Forest / B-horizon  
 3. *Penicillium* sp / Rubber Tree / A-horizon  
 4. *Penicillium* sp / Rubber Tree / B-horizon  
 5. *Penicillium* sp / Pasture / A-horizon  
 6. *Penicillium* sp / Pasture / B-horizon  
 7. *Penicillium* sp / Annual Crop / A-horizon  
 8. *Penicillium* sp / Annual Crop / B-horizon  
 9. Dematiaceae / Annual Crop / B-horizon

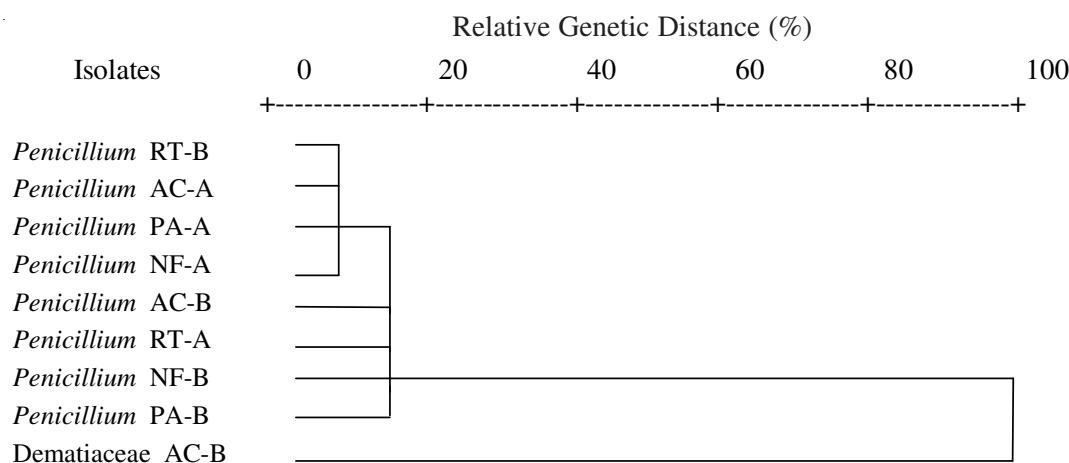


Figure 9 - Percent similarity of 9 isolated of fungi of a Brazilian Tableland soil, based on the genetic matrix of distances.

population diversity is considered bio-indicator of soil quality, because its several benefits.

The presence of microorganisms into the coeso layer of the Coastal Tableland soil may indicate the existence of possible processes of amelioration to that soil layer to the agricultural and environment planning.

## Conclusions

Based on the general conditions of the present study, was concluded that:

- The soil under pasture presented a higher regularity on the occurrence of fungal and bacterial colonies.
- The relevant occurrence of bacteria and fungi into the

B-horizon, in most of the studied areas, means an interesting indicator for the biological improvement of the coeso layers.

■ Fungi of the genus *Penicillium* were present in all the land uses, including into the B-horizon.

■ The soil under annual crop presented a greatest diversity of fungi.

■ The genetic distance showed, by trend, a little difference between the *Penicillium* fungi from A-horizons and that ones from B-horizons.

■ The obtained information can be very important to reach and to search more detailed knowledge about the relationship between microbial and some possible organic substrata, in order to make the best around and improve the agro-environmental properties of the coeso layers of soils.

## Literature Cited

- ALVARENGA, R.C. et al. 1996. Crescimento de raízes de leguminosas em camadas de solos compactados artificialmente. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 20(2):319-326.
- ARAUJO, Q. R. 2000. Solos de tabuleiros costeiros e qualidade de vida das populações. Ilhéus, UESC/ Editus. 97p.
- ARAUJO, Q.R. et al. 2004. Edaphologic attributes related to the coeso layer in Brazilian Coastal Tableland soils, under different land uses. *Agroforestry Systems* 63(2): 193-198.
- BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T.M. 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42 (1): 11-21.
- CARVALHO, S.R.L. et al. 2001. Caracterização e avaliação de leguminosas e gramíneas com alto poder relativo de penetração de raízes em solo coeso dos Tabuleiros Costeiros do Recôncavo Baiano (Etapa I). In: Cintra, L.F.D.; Anjos, J.L.; Ivo, W.M.P.M. eds. Workshop Coesão em Solos dos Tabuleiros Costeiros. Aracaju; Embrapa Tabuleiros Costeiros. pp. 261-291.
- CARVALHO, T.M. 1991. Variabilidade espacial de propriedades físico-hídricas de um Latossolo Vermelho-Amarelo através de Geoestatística. Tese de Mestrado. Lavras. ESAL. 79p.
- CASSEL, D.K. 1979. Subsoiling. *Crops and Soil Magazine* 32:7-10.
- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG, UFV. 442p.
- CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S. 1994. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. *Revista Brasileira de Genética* 17: 69-73.
- DOMINY, C.S.; HAYNES, R.J. 2002. Influence of agricultural land management on organic matter content, microbial activity and aggregate stability in the profiles of two Oxisols. *Biology and Fertility of Soils* 36(4):298-305.
- DORAN, J.W. et al. (eds.). 1994. Defining soil quality for sustainable environment. Madison Soil Science Society of America (Publication 35).
- DORAN, J.W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M.A. 1996. Soil health and sustainability. *Advances Agronomy* 56:1-54.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- FERNANDEZ, M. R. 1993. Manual para Laboratório de Fitopatologia. Passo Fundo, RS, EMBRAPA TRIGO.
- JOHNSON, L.F.; CURL, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publ. Company.
- LUGAUSKAS, A.YU; MIKULSKIENE A.I.; SLIAUZIENE, D. YU. 1989. Micromycetes-destructors of organic matter in soil: Destruction of organic matter in soil. Institute of Zoology and Parasitology, Lithuanian Academy of Sciences 89-93.
- MERMUT, A.R.; ESWARAN, H. 2001. Some major developments in soil science since the mid-1960. *Geoderma* 100:403-426.
- MYERS, R.T. et al. 2001. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. *Soil Science Society American Journal* 65 (2): 359-367.
- NACIF, P.G.S. 1994. Efeitos da subsolagem em propriedades físico-hídricas de um Latossolo Amarelo álico coeso, representativo do Recôncavo Baiano. Tese Mestrado. Viçosa, MG, UFV. 75p.
- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269-5273.
- OADES, J.M. 1984. Soil Organic Matter and Structural Stability: Mechanisms and implications for management. *Plant and Soil* 76: 319-337.
- PIERRET, A. et al. 1999. Differentiation of soil properties related to the spatial association of wheat roots and soil macropores. *Plant and Soil* 211: (1) 51-58.
- REEVES, D.W. 2001. Adapting soil management lessons from Brazil to the sub-tropical region of the USA. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 28, 2001. Londrina, PR, Resumos. Londrina, SBCS. pp.245.
- REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO, 13. Ilhéus, 2001. Guia de Excursão Técnica. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SENUP.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory. 653p.
- SOLLINS, P.; HOMMAN, P.; CALDWELL, B.A. 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74: 65-105.
- SOUZA, L.S. 1996. Uso e Manejo dos Solos Coesos dos Tabuleiros Costeiros. In: Nogueira, L.R.Q.; Nogueira, L.C. Reunião Técnica solos Solos Coesos dos Tabuleiros Costeiros. Aracaju, EMBRAPA-CPATC / EMBRAPA-CNPMF / EAVFBA / IGUFBA. pp. 36-75.
- STEENWERTH, K.L. et al. 2002. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology & Biochemistry* 34 (11): 1599-1611.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. 1984. Caracterização de solos e avaliação dos principais sistemas agrícolas dos tabuleiros costeiros do Baixo Rio Doce e da região norte do Estado do Espírito Santo e sua interpretação para uso agrícola. Viçosa, MG, UFV; CVRD. 153p.
- VORONEY, R. P.; van VEEN, J. A.; PAUL, E. A. 1981. Organic C dynamics in grassland soils. 1. Background information and computer simulation. *Canadian Journal Soil Science* 61:185-201.
- WAGNER, G.M.; WOLF, D.C. 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. In: Sylvia, D.M. et al. (eds.) *Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.,pp. 218-258
- WOLLUM II, A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller, R.H.; Keeney, D.R. (eds.). *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. Agron. Monograph 9. 2 ed. pp.781-802.

## IDENTIFICAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CACAUEROS AUTOCOMPATÍVEIS SELECCIONADOS PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA EM FAZENDAS PRODUTORAS

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

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC/SEGEN, Caixa Postal 07, 45600-970 Itabuna, Bahia, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, 73301-970, Planaltina, Distrito Federal. <sup>3</sup>UESC, 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 accessions 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 accessions were in three groups of similarity. The smaller group with PS 1319 and FSU 77 grouped with IMC 67. The other selfcompatible accessions 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 accessions 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 realizadas 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 cacaueiro, 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 inoculo, 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 SCA 6 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 freqüência 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 progêniess 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 progêniess de alguns clones como PA 150 (Yamada et al., 1988) UF 613 (Bartley e Yamada, 1982) e TSH (progêniess 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 cacaueiro (*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 Vitoria
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/ $\mu$ L.

#### 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 25 $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100 mM de cada um dos desoxirribonucleotídios (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  $\mu$ L 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 próximo 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. A 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.

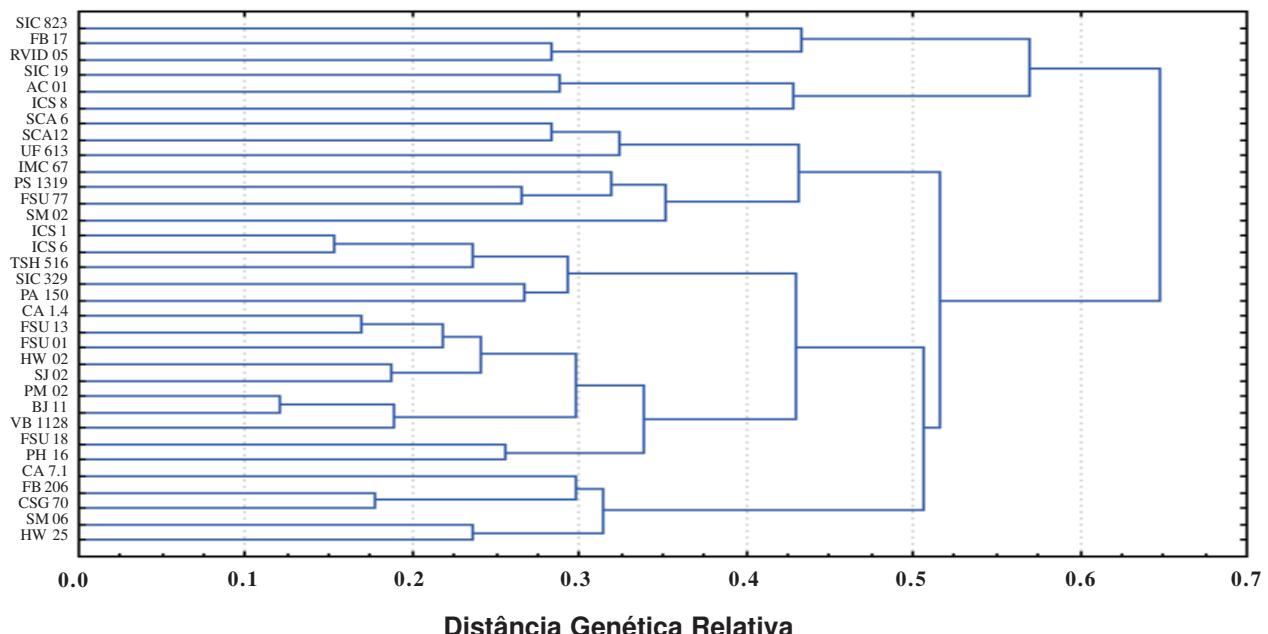


Figura 1. Análise de agrupamento de 33 acessos de cacaueiro, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 51 marcas. O método do UPGMA foi adotado como critério de agrupamento.

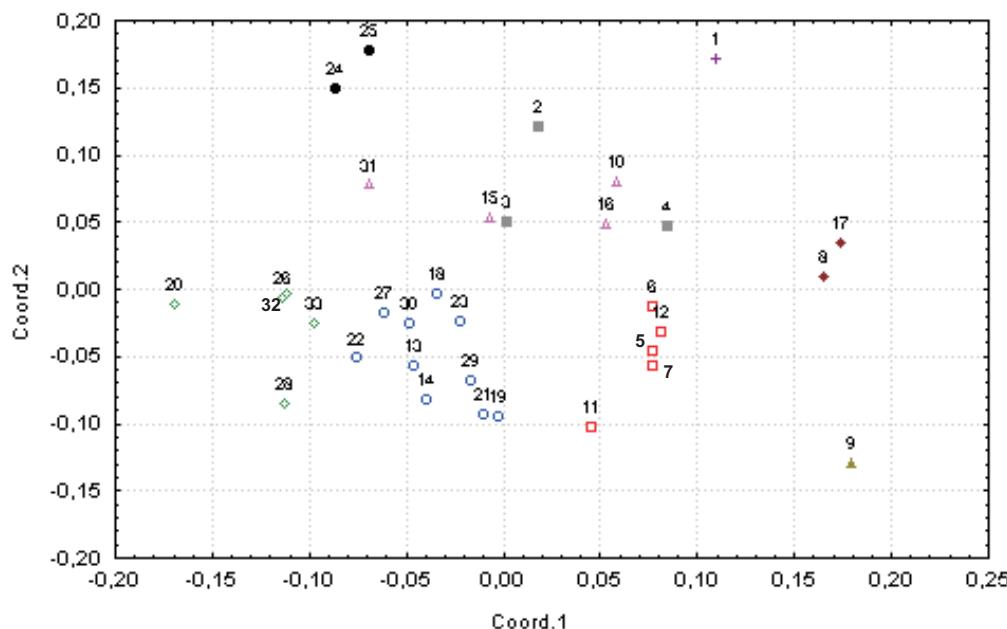


Figura 2. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 33 acessos de cacaueiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas usando 51 marcadores RAPD. O critério de agrupamento foi baseado no ponto de corte a 0,40 de distância genética relativa na Figure 1.

### 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 microsatélites. 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 14<sup>th</sup> 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. Agrotrópica (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.



## ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PALMA E PROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAR FOSFATO E FIXAR NITROGÊNIO

*<sup>1</sup>Francisco Eduardo C. Costa, <sup>2</sup>Itamar Soares de Melo*

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre - Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69; 13820-000, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. E-mail: Itamar@cnpma.embrapa.br

Bactérias associadas às cactáceas, adaptadas ao estresse hídrico e a altas temperaturas, podem ser usadas como inoculantes visando aumento de produtividade e recuperação de solos em processos de desertificação. Nesse sentido, visou-se selecionar bactérias endofíticas e rizobactérias de palma (*Opuntia ficus-indica*) quanto aos atributos de fixar N<sub>2</sub> e solubilizar fosfato. Sessenta e nove linhagens de bactérias, isoladas em meio livre de nitrogênio (meio NFB) foram avaliadas quanto à presença dos genes *nifH* e *nifD* e à capacidade de solubilizar fosfato. Ficou evidenciado a presença do gene *nifH* em dez bactérias, sendo os gêneros identificados como *Citrobacter*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum*, *Rodococcus*, *Stenotrophomonas* e *Enterobacter*. Vinte dos isolados bacterianos avaliados foram capazes de solubilizar *in vitro* fosfato de rocha, sobressaindo-se o gênero *Bacillus* como hiperprodutor. As espécies *B. megaterium* e *Enterobacter agglomerans* apresentaram os maiores níveis de solubilização de fosfato. Estas bactérias, aliadas a outras características benéficas, podem ser usadas para inoculação de plântulas de cacto visando assegurar maior índice de desenvolvimento em solos com déficit hídrico.

**Palavras-chave:** *Opuntia ficus-indica*, bactérias endofíticas, rizobactérias

**Isolation of bacteria associated to forrage palm and study of their potential to solubilize phosphates and fix nitrogen.** Bacteria associated to cacti, adapted to hydric stress and high temperatures, may be used as inoculants aiming to increase productivity and recovery of soil in desertification processes. Thus, this work had the objective to evaluate the potential of endophytic and rhizospheric bacteria of *Opuntia ficus-indica* in relation to solubilizing phosphate and nitrogen fixing attributes. Sixty-nine bacteria, isolated in nitrogen free media (NFB media) were evaluated in relation to the presence of the *nifH* and *nifD* genes and the capacity to solubilize phosphate. By the results obtained, it was verified the presence of the *nifH* gene in 10 bacterial isolates belonging to the genus *Citrobacter*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum*, *Rodococcus*, *Stenotrophomonas* and *Enterobacter*. Twenty of the bacterial isolates evaluated were able to solubilize *in vitro* rock phosphate with the genus *Bacillus* and *Enterobacter* presenting the greater halos of degradation. These bacteria, together with other beneficial characteristic, may be used to inoculate cacti plants aiming to assure the promotion of plant growth in soils with high hydric deficit.

**Key words:** *Opuntia ficus-indica*, endophytic bacteria, rhizospheric bacteria

## Introdução

A palma (*Opuntia ficus-indica* Mill.), originária do México, foi disseminada pelo mundo pelos colonizadores europeus para fins de produção comercial de frutos, ricos em vitamina C, a fim de combater o escorbuto. Atualmente é cultivada como forragem animal, e para consumo humano de seus artículos e recuperação de áreas impactadas por processos erosivos. O seu cultivo como forragem se dá com freqüência em áreas sujeitas a longos períodos de estiagem, onde normalmente é consorciada com outras culturas como o feijão-de-corda e milho.

Aproximadamente 50 milhões de quilômetros quadrados das terras emersas do globo são caracterizados como zonas áridas, onde vive 15% da humanidade. No Brasil isso corresponde a cerca de 12% de sua superfície.

Trabalhos experimentais demonstram a aplicabilidade de cactáceas associadas à bactérias promotoras de crescimento de plantas para a recuperação de áreas degradadas. Nas áreas desertificadas, a fixação biológica de nitrogênio é a principal via de entrada do elemento nitrogênio na cadeia trófica (Young, 1992). Todos os microrganismos fixadores de nitrogênio carregam o gene *nifH*, que codifica a ferro-proteína da nitrogenase. O resultado obtido nestes estudos foi de consolidação do solo (redeposição e formação de aglomerados estáveis em água), e melhoria da qualidade do solo (incremento na taxa de nitrogênio assimilável, matéria orgânica).

As bactérias promotoras de crescimento em plantas englobam as espécies de vida livre, as rizobactérias e as endofíticas. Os mecanismos de ação desses microrganismos são muito similares, atuando de formas diversas, desde a ciclagem rápida de nutrientes, a fim de evitar a lixiviação dos mesmos pelas chuvas, a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfato, etc. O fosfato, por sua vez, é escasso nos solos, fazendo com que o estoque deste mineral seja reposto continuamente nos sistemas agrícolas. O uso crescente do fosfato de rocha nos agroecossistemas vem sendo proposto como uma alternativa às fórmulas fosfatadas industrializadas; quando utilizado, observa-se um melhor aproveitamento do elemento P (fósforo) pelas culturas vegetais se for realizada a introdução no solo/rizosfera de microrganismos solubilizadores de fosfato (Zapata & Axmann, 1995).

Tabela 1. "Primers" utilizados para a detecção dos genes *nif*.

Gene	"Primer"	Seqüência	Referência
<i>NifH</i>	19F	5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3'	Ueda <i>et al.</i> , 1995
	407R	5'-AAICCRCCRAIACIACRTC-3'	
<i>NifD</i>	FdB261	5'-TGGGGICCIRTIAARGAYATG-3'	Stoltfus <i>et al.</i> , 1997
	FdB260	5'-TCRTTIGCIATRTGRTGNCC-3'	

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência e praticabilidade da associação entre plantas e bactérias solubilizadoras de fosfato de rocha em aumentar a disponibilidade do P, tornando-o solúvel à planta hospedeira (Barea & Jeffries, 1995).

Devido a importância do uso de inoculantes bacterianos e da associação destes com plantas xerófilicas visando à recuperação de solos em processo de desertificação é que este trabalho visou avaliar o potencial de bactérias isoladas de palma quanto a sua habilidade em fixar nitrogênio e solubilizar fosfato.

## Material e Métodos

### Deteção dos genes *nif* em bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*.

Sessenta e nove bactérias endofíticas e rizosféricas isoladas de palma em meio NFb (Dobereiner *et al.*, 1995) foram avaliadas quanto à presença dos genes *nifH* e *nifD*. A detecção foi feita utilizando-se "primers" específicos (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25µL., contendo 0,5 - 10ng de DNA molde; 1µM de cada "primer"; 0,2mM de cada dNTPs; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5µL do tampão da enzima (10X); 0,5 U/µL da Taq DNA polimerase (Life Technologies). Em todas as reações foram utilizados sete controles positivos, com o DNA molde de linhagens bacterianas pertencentes à Coleção de Bactérias Diazotróficas da EMBRAPA Agrobiologia, e um controle negativo sem o DNA molde. As espécies tipo que contém os genes *nif* usadas como controles positivos são: *Azoarcus indigenus*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum lipoferum*, *Burkholderia vietnamensis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador Peltier PTC200 programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min. a 59 °C, e mais 30 s a 72 °C e uma extensão final de 5 min. a 72 °C. Dez microlitros da reação de PCR foram observados em gel de agarose 1,2%, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Life Technologies) para visualização de um fragmento de aproximadamente 400pb.

### Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro*

A seleção de linhagens de bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill., isoladas em meio NFB, capazes de solubilizar fosfato *in vitro* foi realizada repicando-as em placas com os meios Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), meio National Botanical Research Institute phosphate growth medium devoid of Yeast extract (NBRIY) (Nautiyal, 1999) e meio National Botanical Research Institute Phosphate growth (NBRIP) (Nautiyal, 1999). Decorridos 14 dias, foi efetuada a medição do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de solubilização de fosfato. O tamanho do halo de solubilização é resultante da subtração do valor do diâmetro da colônia do diâmetro total do halo de solubilização (Nautiyal, 1999).

## Resultados e Discussão

### Detecção de genes *nifH* e *nifD* em bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*, isoladas em meio NFB

Dos 69 isolados bacterianos, 10 apresentaram amplificação do fragmento do gene *nifH* (Tabela 2). Nenhum dos isolados amplificou o segmento equivalente ao gene *nifD*. Todos os controles positivos amplificaram os segmentos dos genes *nifH* e *nifD*. Dos 10 microrganismos que apresentaram amplificação do segmento de 400 pb do gene *nifH*, 6 foram isolados da rizosfera, 1 endofítico de raiz e 2 endofíticos dos artículos. A identificação destas, feita pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular, coloca-as taxonomicamente dentro das seguintes espécies: *Citrobacter freundii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus erytropolis* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

O pequeno número de isolados que apresentaram amplificação do fragmento relativo ao gene *nifH* deve-se

ao fato de existir uma grande divergência nas suas seqüências, necessitando-se de um maior número de variações nas posições das seqüências degeneradas (Zehr & McReynolds, 1989). São muitos os trabalhos de detecção do gene *nifH* utilizando-se de PCR (Ohkuma *et al.*, 1999; Poly *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 1995; Widmer *et al.*, 1999; Laguerre *et al.*, 1996), no entanto, com raras exceções, estes partem de microrganismos em cultura. A base para estes trabalhos é a de efetuar a extração de DNA diretamente do solo e/ou da planta e procurar amplificar os genes de interesse para gerar filogenias baseadas nos mesmos, nem sempre nomeando os isolados em questão.

Rösch *et al.* (2002) descrevem a presença dos genes *nirK* e *nosZ*, que codificam, respectivamente, a redutase do nitrito contendo Cu e a redutase do óxido nitroso, em *Ochrobactrum anthropi* LMG3331, também nomeado *Achromobacter antropi*, não detectando por PCR a presença do gene *nifH*. Neste mesmo trabalho ocorre a amplificação do gene *nifH* em *A. ruhlandii* DSM653, portanto, devido à proximidade evolutiva e ao pequeno número de isolados testados é plenamente aceitável que ocorra o gene *nifH* em *A. antropii*.

No caso dos isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, trabalhos desenvolvidos recentemente (no prelo) relatam a ocorrência de gene *nifH* nesta espécie bacteriana, assim como a presença do mesmo nesta bactéria pode ser embasado na transferência horizontal do gene *nifH* (Hirsch *et al.*, 1995).

A fixação biológica de nitrogênio já foi descrita para o gênero *Enterobacter*, com o estudo do gene *nifH* em *E. agglomerans* (Siddavattam *et al.*, 1995; Kreutzer *et al.*, 1989) e *E. cloaceae* (Rösch *et al.*, 2002)

### Solubilização de fosfato por bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*, isoladas em meio NFB

Cerca de 29% dos isolados bacterianos, associados a

Tabela 2 - Linhagens bacterianas portadoras do gene *nifH* associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill., isoladas em NFB.

Isolado	Local de coleta	Microhabitat	Identificação *
NCOL27'B	Queimadas – PB	Raiz	<i>Citrobacter freundii</i>
NFCA1C	São José do Tapera – AL	Artículo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
NFCA1F	São José do Tapera – AL	Artículo	<i>Enterobacter agglomerans</i>
RINFA1A	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA1B	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA2A	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA2I	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Rhodococcus erytropolis</i>
RINFA2K	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
RINFA2N	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
NCOL113	Valinhos – SP	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

\* A identificação das bactérias se baseou na análise do perfil dos ácidos graxos da membrana celular obtido por um detector de ionização de chamas (FID) e identificado usando o software de Identificação Microbiana desenvolvido por MIDI Inc. (Newark, USA).

*Opuntia ficus-indica* Mill. isolados em meio NFb, apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , totalizando 20 bactérias: 5 rizosféricas, 11 endófitas de raiz e 4 endófitas de caule (Tabela 3).

Confirmado os resultados da literatura (Nautiyal, 1999), o meio NBRIP foi o que apresentou um maior

número de isolados solubilizando fosfato ( $n = 14$ ). No entanto, a sua aplicabilidade como único meio para a seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , é questionável visto que outros 6 isolados apresentaram esta capacidade nos outros meios utilizados e não no NBRIP.

Tabela 3 – Linhagens isoladas em meio NFb associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill, que solubilizaram fosfato,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , *in vitro*. São expressas as medidas do raio da colônia e do halo de solubilização.

Linhagem	Meio PVK		Meio NBRIY		Meio NBRIP	
	Colônia	Halo	Colônia	Halo	Colônia	Halo
Não identificada (NCol12')	0	-	0	-	3,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Não identificada (NCol2R17)	0	-	6,33 ± 0,57	2,0 ± 0,0	8,66 ± 1,15	1,33 ± 0,57
<i>Agrobacterium radiobacter</i> (NCol15)	0	-	0	-	2,33 ± 0,57	5,33 ± 0,57
<i>Bacillus coagulans</i> (NCOL12R17)	8,33 ± 0,57	2,0 ± 0,0	6,0 ± 1,0	2,0 ± 0,0	6,0 ± 1,0	2,33 ± 0,57
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFCT3D)	20,33 ± 0,57	0,5 ± 0,0	0	-	13,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3B)	12,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	8,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3C)	14,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	0	-	0	-
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3D)	0	-	0	-	9,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo I (NFCA2')	0	-	14,0 ± 1,0	2,0 ± 0,0	0	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo II (NFRT3A)	5,33 ± 0,57	0,5 ± 0,0	3,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	2,66 ± 0,55	1,66 ± 0,57
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo III (NFCA1F)	13,33 ± 0,57	8,0 ± 2,0	10,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	14,0 ± 1,0	5,0 ± 0,0
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo IV (NCol117)	0	-	0	-	3,33 ± 0,57	3,33 ± 0,57
<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo C (NFRT3E)	10,66 ± 1,52	7,0 ± 1,0	6,33 ± 1,15	5,33 ± 0,57	4,0 ± 0,0	5,0 ± 1,73
<i>Klebsiella trevisanii</i> (NFRT3C)	6,66 ± 1,15	1,0 ± 0,0	2,33 ± 0,57	4,33 ± 0,57	4,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
Não identificada (NFRP2C)	0	-	0	-	8,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (RINFA1B)	7,66 ± 0,57	9,66 ± 0,57	0	-	0	-
<i>Paenibacillus pabuli</i> (NCol210)	0	-	0	-	1,0 ± 0,0	4,0 ± 1,73
Não identificada (RINFA2L)	0	-	8,66 ± 1,15	1,66 ± 0,57	0	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (NFCA1C)	0	-	3,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0	0	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (RINFA2K)	15,66 ± 0,57	17,66 ± 0,57	0	-	0	-

## Literatura Citada

- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasilia, EMBRAPA - SPI, Itaguaí. RJ: EMBRAPA-CNPAB. 60p.
- HIRSCH, A. M. et al. 1995. Assessing horizontal transfer of *nif*HDK genes in eubacteria: nucleotide sequence of *nif*K from *Frankia* strain HFPCcI3. Molecular Biology Evolution 12 (1): 16-27.
- KREUTZER, R.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. 1989. Identification and characterization of the *nif*H and *nif*J promoter regions located on the *nif*-plasmid pEA3 of *Enterobacter agglomerans* 333. Gene 78(1):101-109.
- LAGUERRE, G. P. et al. 1995. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Applied Environmental. Microbiology 62: 2029-2036.
- NAUTIYAL, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270.
- OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Applied Environmental. Microbiology 65: 4926 - 4934.
- PIKOVSKAYA, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362-370.

POLY, F. et al. 2001. Comparison of *nif*H gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. Applied Environmental Microbiology 67 (5) : 2255-2262.

RÖSCH, R.; MERGEL, A.; BOTHE, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. Applied Environmental Microbiology 68: 3818-3829.

SIDDAVATTAM, D. 1995. Regulation of *nif* gene expression in *Enterobacter agglomerans*: nucleotide sequence of the *nif*LA operon and influence of temperature and ammonium on its transcription. Molecular General Genetics 20 (6): 629-636.

STOLTFSUS, J. R. et al. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant and Soil 194: 25-36.

UEDA, T. et al. 1995. Remarkable N2 -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nif*H gene sequences. Journal Bacteriology 177: 1414-1417.

WIDMER, F. et al. 1999. Analysis of *nif*H gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. Applied Environmental. Microbiology 65: 374-380.

YOUNG, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris; H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, N.Y. pp. 43-86.

ZAPATA, F.; AXMANN, H. 1995. 32P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. Fertilizer Research 41: 189-195.

ZEHR, J. P.; MCREYNOLDS, L. A. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nif*H gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Applied Environmental. Microbiology 55: 2522-2526.

## ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE DE VARIEDADES E LINHAGENS DE FEIJÓEIRO COMUM NO NORDESTE BRASILEIRO

*Hélio Wilson Lemos de Carvalho<sup>1</sup>, Dulce Regina Nunes Warwick<sup>1</sup>, Marcondes Maurício de Albuquerque<sup>1</sup>, Maria José Del Peloso<sup>2</sup>, Luis Cláudio de Faria<sup>2</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>2</sup>, João Gomes da Costa<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, 49025-040, Aracaju, Sergipe, Brasil.E-mail: helio@cpatc.embrapa.br.

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia Goiânia a Nova Veneza, km 12 Zona Rural, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil.

Diversas variedades e linhagens avançadas de feijoeiro comum, de diferentes grupos comerciais, foram avaliadas em seis redes experimentais, em diversos ambientes do Nordeste brasileiro, no biênio 2003-04, visando conhecer a adaptabilidade e a estabilidade de produção desses materiais, para fins de recomendação. Utilizou-se, em todas essas redes, o delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições. Os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade foram feitos conforme Eberhart & Russel (1966). O município de Simão Dias, no agreste sergipano, mostrou-se mais propício ao desenvolvimento do cultivo do feijoeiro, com rendimento médio de grãos superior a 3.000 kg/ha. Em todas as redes experimentais detectaram-se diferenças significativas, nas análises de variância conjuntas, entre os ambientes e os genótipos e comportamento produtivo diferenciado desses genótipos ante às oscilações ambientais. Os genótipos avaliados diferiram quanto a adaptabilidade e estabilidade de produção.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris* L., interação genótipo x variedades x ambiente, variedades,

**Adaptability and stability of bean breeding lines and cultivars in the Brazilian Northeast Region.** Different advanced bean-breeding lines and cultivars of diverse commercial groups were evaluated in six experimental networks, in different ecosystems of the Brazilian Northeast in the years 2003-2004. This work aimed to know the adaptability and production stability of the genetic materials in order to recommend to the farmers. In all cases it was used randomized block design with three repetitions. The parameters of adaptability and stability were done according to Eberhart & Russel (1966). The County of Simão Dias, in the semiarid State of Sergipe, was more suitable for the development of bean cultivation, with the average production superior to 3,000 kgs/ha. In all the experimental networks were found differences in the paired analysis of variance used, in the ecosystems and the genotypes, in the behavior productive in these genotypes in relation to the local area oscillation. The genotypes also had differences in relation to production stability and adaptability.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris* L., genotype x environment, interactions, varieties

## Introdução

No Nordeste brasileiro ocorrem inúmeros sistemas de produção de feijoeiro comum, predominando aqueles onde é quase ausente a aplicação de tecnologias de produção, praticados por pequenos e médios produtores rurais. Em razão de ser um produto de subsistência, tem expressiva importância sócio-econômica no cenário da agricultura nordestina, tanto no que se refere a extensa área dedicada ao cultivo desse produto, quanto na oferta de proteína vegetal de baixo custo na dieta alimentar do povo nordestino. Não obstante esta importância, sua baixa produtividade tem sido provocada pelo baixo nível tecnológico dispensado à cultura e aos fatores bióticos e abióticos restritivos à produção. Dentre os diversos fatores que podem contribuir para o aumento da produtividade de uma cultura, a recomendação de variedades melhoradas e de melhor adaptabilidade e estabilidade de produção não implica ônus adicional ao agricultor.

Distintas condições ambientais existem no Nordeste brasileiro (Silva et al., 1993), e o feijoeiro, com algumas restrições, é cultivado na maioria delas. Considerando este aspecto e aquele relacionado aos diferentes sistemas de produção prevalescentes na região, infere-se que é de interesse o desenvolvimento de um programa de avaliação de variedades de feijoeiro comum, visando subsidiar os agricultores na escolha de materiais genéticos de melhor adaptação e que sejam portadores de atributos agronômicos desejáveis.

Outro fator importante a ser considerado é a presença da interação genótipos x ambientes, a qual assume papel fundamental no processo de recomendação de cultivares. Para que se proceda uma recomendação mais eficiente, torna-se necessário minimizar o efeito dessa interação, por meio da seleção de cultivares com melhor estabilidade fenotípica (Ramalho et al., 1993). Diversos trabalhos ressaltam a importância e a influência da interação cultivares x ambientes, principalmente nas fases iniciais do programa que envolvem a avaliação final e a recomendação de cultivares (Santos, 1980; Duarte, 1988; Carbonell & Pompeu, 2000; Duarte & Zimmermann, 1994 e Carbonell et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi verificar a adaptabilidade e a estabilidade de variedades e linhagens avançadas de feijoeiro comum, no Nordeste brasileiro, para fins de recomendação.

## Material e Métodos

Foram avaliadas diferentes variedades e linhagens avançadas de feijoeiro comum, distribuídas em ensaios

de Valor de Cultivo e Uso, dos grupos comerciais carioca, mulatinho, preto e cores; além desses, foram realizados ensaios de teste de adaptação local, englobando 21 variedades e mais um tipo de ensaio denominado Valor de Cultivo e Uso/Sergipe, contemplando seis linhagens avançadas e seis variedades de diferentes grupos comerciais.

Os ensaios de teste de adaptação local foram realizados no ano agrícola de 2004; os demais ensaios foram realizados no decorrer dos anos agrícolas de 2003, nos municípios de Simão Dias e Nossa Senhora das Dores, e 2004, em Paripiranga, Simão Dias, Nossa Senhora das Dores e Arapiraca. Os municípios de Paripiranga, Simão Dias e Arapiraca localizam-se, respectivamente, na zona agreste dos estados da Bahia, Sergipe e Alagoas; o município de Nossa Senhora das Dores está situado nos tabuleiros costeiros do estado de Sergipe.

Os ensaios realizados no município de Simão Dias foram desenvolvidos nos sistemas em monocultivo e consorciado com o milho. Utilizou-se, em todos os ensaios, o delineamento em blocos ao acaso, com três repetições. No monocultivo, as parcelas constaram de quatro fileiras de 4,0m de comprimento, espaçadas de 0,50m; no consórcio, foram utilizadas três fileiras de feijoeiro e uma de milho, mantendo-se a mesma distância entre as fileiras. Foram mantidas 15 sementes/m, no feijoeiro, correspondendo a populações de 300.000 plantas/ha e 250.000 plantas/ha, respectivamente, nos sistemas em monocultivo e consorciado. As adubações de cada ensaio obedeceram aos resultados das análises de solo de cada área experimental.

Os dados de produtividade de grãos foram submetidos a uma análise de variância, por ambiente, obedecendo ao modelo em blocos ao acaso e a uma análise de variância conjunta, considerando aleatórios os efeitos de blocos e ambientes e, fixo, o efeito de cultivares (Vencovsky & Barriga, 1992).

Os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade foram estimados conforme metodologia proposta por Eberhart & Russel (1966), conforme segue abaixo:

$$Y_{ij} = u_i + B_i I_j + J_{ij} + e_{ij}$$

Onde:  $Y_{ij}$  = média da cultivar  $i$  no ambiente  $j$ ;  $u_i$  = média da cultivar  $i$  em todos os ambientes;  $B_i$  = coeficiente de regressão que mede a resposta da cultivar  $i$  quando variam os ambientes;  $I_j$  = índice ambiental;  $J_{ij}$  = desvio da regressão da cultivar  $i$  no ambiente  $j$ ;  $e_{ij}$  = erro residual associado à média.

Determinou-se também, o coeficiente de determinação  $R^2$ , segundo Steel & Torrie (1960), visando avaliar quanto de variação total de cada cultivar era explicado pelo modelo acima.

## Resultados e Discussão

A análise de variância conjunta para o peso de grãos mostrou efeitos significativos ( $p<0,01$ ) quanto aos genótipos, ambientes e interação genótipos x ambientes, nos seis conjuntos de experimentos. A interação genótipos x ambientes, significativa na análise de variância conjunta, indica uma grande influência dos ambientes no comportamento dos genótipos. Essas diferenças podem ser atribuídas, em grande parte, à ocorrência de estresses entre os ambientes considerados.

Constatada a presença da interação genótipos x ambientes, procurou-se verificar as respostas de cada genótipo nos ambientes estudados pelo método de Eberhart & Russel (1966). Além do preconizado pelo método proposto, considerou-se como genótipo melhor adaptado aquele com produtividade média de grãos acima da média geral (Vencovsky & Barriga, 1992).

A produtividade média de grãos (2.196 kg/ha) dos genótipos que compuseram os ensaios do grupo comercial carioca (Tabela 1), expressa o bom potencial para a produtividade desses materiais, destacando-se com melhor adaptação, aqueles materiais com rendimentos médios de grãos acima da média geral ( $b_0 >$  média geral). Nesse grupo de melhor adaptação, apenas a variedade Pérola mostrou-se exigente nas condições desfavoráveis ( $b > 1$ ), justificando sua recomendação para os ambientes favoráveis. Os demais genótipos desse grupo de melhor adaptação evidenciaram adaptabilidade ampla (estimativas de  $b_0 >$  média geral e de  $b$  semelhantes à unidade), consubstanciando-se em alternativas importantes para a agricultura regional.

Observando as produtividades médias ( $b_0$ ) dos materiais que formaram o grupo comercial mulatinho, verificou-se que algumas linhagens avançadas superaram a variedade testemunha BRS Marfim, com destaque para as CNFM 7958 e CNFM 10375 (Tabela 2). A média de produtividade do ensaio foi de 2.445 kg/ha, com variação de 2.177 kg/ha a 2.680 kg/ha, expressando a boa adaptação do conjunto avaliado. Verificando-se os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade desses materiais (Tabela 2), nota-se que no grupo de materiais de melhor adaptação ( $b_0 >$  média geral), apenas a linhagem CNFM 9381 mostrou ser exigente nas condições desfavoráveis ( $b > 1$ ), sugerindo sua recomendação para os ambientes favoráveis. Os demais materiais desse grupo de melhor adaptação, com estimativas de  $b$  semelhantes à unidade, evidenciaram adaptabilidade ampla, consolidando-se em alternativas importantes para a agricultura regional. No que se refere a estabilidade, o conjunto avaliado, à exceção das linhagens CNFM 10375, CNFM 8080, CNFM 9381

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 15 cultivares de feijoeiro comum do grupo comercial carioca em 8 ambientes nos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no biênio 2003-2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	B	R <sup>2</sup>
CNFC 9458	2372 a	1,04ns	90
Pérola	2349 a	1,27**	94
CNFC 8009	2255 a	0,89ns	89
Pitoco	2222 a	1,10ns	91
CNFC 9518	2221 a	1,08ns	93
Magnífico	2220 a	1,12ns	97
CNFC 9504	2219 a	1,01ns	94
CNFC 9461	2215 a	0,89ns	94
IAPAR 81	2183 a	0,96ns	90
CNFC 9484	2177 a	0,89ns	86
CNFC 9494	2172 a	1,01ns	98
CNFC 9500	2148 b	0,92ns	94
CNFC 9471	2073 b	0,88ns	93
CNFC 9435	2069 b	0,88ns	96
CNFC 9506	2042 b	0,97ns	81
Média	2196		
C.V.(%)	12		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott.

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 14 cultivares de feijoeiro comum do grupo comercial mulatinho em 7 ambientes nos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no biênio 2003-2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	b	R <sup>2</sup>
CNFM 7958	2680 a	0,98ns	90
CNFM 10375	2679 a	0,83ns	76
CNFM 8080	2545 b	0,94ns	64
CNFM 10387	2535 b	0,97ns	88
BRS Marfim	2532 b	1,06ns	85
CNFM 9381	2500 b	1,24*	79
CNFM 7957	2483 b	1,00ns	91
CNFM 10390	2370 c	1,17ns	66
CNFM 9412	2369 c	1,14ns	92
CNFM 10385	2369 c	0,96ns	87
CNFM 8057	2362 c	1,13ns	90
CNFM 10386	2353 c	0,92ns	94
IPA 6	2286 c	1,86ns	80
Bambuí	2177 c	0,74*	87
Média	2445		
C.V. (%)	11		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott

e CNFM 10390, mostrou boa previsibilidade nos ambientes considerados.

No conjunto de materiais do grupo comercial preto (Tabela 3), a média detectada foi de 2.174 kg/ha, com

Tabela 3. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 13 cultivares de feijoeiro comum do grupo comercial preto em 8 ambientes dos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no biênio 2003-2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	b	R <sup>2</sup>
BRS Valente	2423 a	1,05ns	87
TB 97-13	2327 a	1,11ns	89
CNFP 8000	2281 a	1,01ns	96
CNFP 10138	2219 b	0,92ns	86
FT Nobre	2207 b	0,91ns	92
Uirapuru	2157 b	1,05ns	93
Soberano	2126 b	0,93ns	91
CNFP 7966	2126 b	1,04ns	91
Diamante Negro	2112 b	1,10ns	92
CNFP 9328	2105 b	1,00ns	95
CNFP 7994	2071 b	0,99ns	93
CNFP 7972	2067 b	0,81*	76
TB 94-09	2038 b	1,04ns	92
Média	2174		
C.V. (%)	12		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott

variação de 2.038 kg/ha a 2.423 kg/ha, evidenciando a boa adaptação desses genótipos na região. A variedade Valente e a linhagem TB 97-13 apresentaram melhores rendimentos de grãos e mostraram, juntamente com os materiais que exibiram melhor adaptação ( $b_0 >$  média geral), estimativas de b semelhantes à unidade, evidenciando adaptabilidade ampla. Essa vantagem faz desses materiais excelentes opções de cultivo nos diferentes sistemas de produção regionais. Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos, à exceção do encontrado na linhagem CNFP 7972, estão acima de 80 %, o que mostra a alta estabilidade dos genótipos avaliados nos ambientes considerados e assegura a eficiência do método em explicar a variação nos dados observados em cada genótipo.

No grupo de materiais que formaram o grupo cores (Tabela 4), a linhagem CNFR 10241 superou as variedades Roxo 90, BRS Vereda e BRS Timbó, revelando melhor adaptação. Essa linhagem mostrou-se também exigente nas condições desfavoráveis ( $b>1$ ), justificando sua exploração comercial nos ambientes favoráveis. Os demais genótipos de melhor adaptação expressaram adaptabilidade ampla, além de mostrarem alta estabilidade nos ambientes estudados ( $R^2>80\%$ ).

Observando-se as produtividades médias dos materiais que compuseram os ensaios do Teste de Adaptação Local (Tabela 5), verifica-se que as variedades Rudá, BRS Supremo, BRS Pontal, BRS Valente, BRS Campeiro e BRS Marfim apresentaram melhor

adaptação. Nesse grupo de melhor adaptação, as variedades BRS Supremo, BRS Pontal, BRS Valente e Pérola mostraram-se exigentes nas condições

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 9 cultivares de feijoeiro-comum em 8 ambientes dos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no biênio 2003-2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	b	R <sup>2</sup>
CNFR 10241	2440 a	1,29**	88
Roxo 90	2153 b	1,02ns	92
BRS Vereda	2124 b	1,01ns	84
BRS Timbó	1993 c	0,96ns	94
Irai	1940 c	0,91ns	89
CNFR 8035	1919 c	0,92ns	95
CNFRJ 10299	1801 c	1,01ns	87
CNFRJ 10294	1771 d	0,91ns	83
BRS Radiante	1750 d	0,95ns	85
Média	1988		
C.V. (%)	10		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott.

Tabela 5. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 21 cultivares de feijoeiro comum em 5 ambientes dos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no ano agrícola de 2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	b	R <sup>2</sup>
Rudá	2402 a	1,09ns	95
BRS Supremo	2399 a	1,31**	95
BRS Pontal	2377 a	1,39**	92
BRS Valente	2285 a	1,25**	91
BRS Campeiro	2255 a	0,80*	94
BRS Marfim	2253 a	1,06ns	98
Bambuí	2175 b	0,88ns	96
Pérola	2168 b	1,24**	98
BRS Horizonte	2139 b	1,11ns	98
BRS Grafite	2127 b	0,94ns	96
BRS Vereda	2119 b	0,93ns	91
Corrente	2104 b	0,79**	91
BRS Requinte	2083 b	1,05ns	97
Diamante Negro	2050 c	0,94ns	91
BRSMG Talismã	2049 c	1,17ns	95
IPA 6	2035 c	0,82ns	94
Princesa	2008 c	1,04ns	93
Carioca	1939 c	1,00ns	94
BRS Timbó	1935 c	0,79*	98
Jalo Precoce	1700 d	0,71**	95
BRS Radiante	1677 d	0,58**	95
Média	2108		
C.V. (%)	12		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott

desfavoráveis ( $b > 1$ ), sugerindo suas recomendações para os ambientes favoráveis. Vale ressaltar que nesses grupo de materiais de melhor adaptação, as variedades Rudá, BRS Marfim, Bambuí, BRS Horizonte, BRS Grafite e BRS Vereda, de rendimentos médios de grãos superiores à média geral, de estimativas de  $b$  semelhantes à unidade e de alta estabilidade nos ambientes considerados ( $R^2 > 80\%$ ), caracterizaram-se como genótipos ideais preconizados pelo modelo proposto, sobressaindo as variedades BRS Marfim e Rudá, com melhor adaptação. No tocante à estabilidade, infere-se que todo o conjunto avaliado mostrou alta previsibilidade nos ambientes estudados ( $R^2 > 80\%$ ).

As variedades e linhagens avançadas que formaram os ensaios de Valor de Cultivo e Uso/Sergipe, apesar de mostrarem comportamento produtivo semelhantes, aquelas que apresentaram rendimentos médios de grãos superiores à média geral, revelaram melhor adaptação. À exceção da variedade Pérola, que mostrou exigência nas condições desfavoráveis, repetindo o comportamento apresentado em ensaios anteriores e justificando, mais uma vez, sua recomendação em ambientes favoráveis; os demais materiais exibiram adaptabilidade ampla e alta estabilidade nos ambientes considerados, consolidando-se em alternativas importantes para os diferentes sistemas de produção vigentes na região.

Tabela 6. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 12 cultivares de feijoeiro comum em 5 ambientes nos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas, no ano agrícola de 2004. Modelo Eberhart & Russel, 1966.

Genótipos	Médias	b	$R^2$
CNFC 8065	2361 a	1,17ns	99
CNFC 8075	2340 a	1,18ns	99
Corrente	2296 a	0,98ns	93
Pérola	2245 a	1,38**	88
BRS Marfim	2223 a	0,92ns	95
CNFM 8116	2206 a	0,81ns	86
BRS Horizonte	2201 a	0,99ns	95
CNFM 7815	2186 a	0,87ns	94
CNFC 8109	2171 a	0,84ns	79
Carioca ETE	2143 a	0,97ns	92
CNFM 7886	2112 a	0,80ns	91
CNFM 7119	1909 a	0,96ns	91
Média	2199		
C.V. (%)	11		

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott.

## Conclusões

1. A grande maioria das variedades e linhagens avançadas avaliadas mostram alta estabilidade de produção na região.

2. As variedades Rudá e BRS Marfim e as linhagens avançadas CNFM 7958, CNFM 10375, CNFM 8080, dentre outras, evidenciam adaptabilidade ampla, consolidando-se em alternativas importantes para a agricultura regional.

3. A variedade Pérola, largamente utilizada na região, mostra adaptação a ambientes favoráveis.

4. Direcionar a recomendação de melhores materiais genéticos, com a escolha de variedades e linhagens mais adaptadas e de melhor adaptabilidade e estabilidade de produção.

## Literatura Citada

CARBONELL, S.A.M. et al. 2001. Adaptabilidade e estabilidade de produção de cultivares e linhagens de feijoeiro no Estado de São Paulo. Bragantia (Brasil)60 (2): 69-77.

CARBONELL, S.A.M.; POMPEU, A.S. 2000. Estabilidade fenotípica de linhagens de feijoeiro em três épocas de plantio no Estado de São Paulo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35 (2): 321-329.

DUARTE, J.B. 1988. Estuda da adaptabilidade e estabilidade fenotípica de linhagens e cultivares de feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris L.*). Tese de Mestrado. Goiânia, EA/UFG, 155p.

DUARTE, J.B.; ZIMMERMANN, M.J. 1994. Adaptabilidade e estabilidade de rendimento de genótipos de feijoeiro comum. Pesquisa Agropecuária Brasileira 29 (1): 25-32.

EBERHART, S. A. ; RUSSEL, W. A. 1966. Stability parameters for comparing varieties. Crop Science 6: 36-40.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; RIGHETTO, G.U. 1993. Interação de cultivares de feijão por épocas de semeadura em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 28 (91); 1183-1189.

RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F. 2000. Adaptabilidade e estabilidade de

- cultivares de milho avaliadas em diferentes condições ambientais do Estado de Minas Gerais. *In: Reunion Latinoamericana del Maiz*, 28, 2000, Sete Lagoas, MG *Memórias Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo/CIMMYT* PP.251-260.
- SANTOS, J. B. dos.1980. Estabilidade fenotípica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) nas condições do Sul de Minas Gerais. Dissertação Mestrado. Lavras, UFL. 110p.
- SILVA, F.B.R. de. 1993. Zoneamento ecológico do Nordeste: diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico. Petrolina, EMBRAPA-CPATSA/EMBRAPA-CNPS, v1.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1960. Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw Hill Book Company, INC.481p.
- VENCOVSKY. R.; BARRIGA, P. 1992. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 496p.



## METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO PARA AVALIAR RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUERO (*Theobroma cacao*) EM CONDIÇÕES DE CAMPO

*Marival Lopes de Oliveira; Valdívnia Reis da Silva*

CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitopatologia, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil,  
e-mail: marival@cepec.gov.br

Alguns materiais genéticos recomendados no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero (VB) têm apresentado níveis de resistência mais pronunciados em lançamentos foliares do que em frutos. Considerando-se a necessidade de melhor estudar tais reações em diferentes genótipos de cacau, foram realizados ensaios visando avaliar ou desenvolver uma metodologia prática e eficiente para a inoculação de *Crinipellis perniciosa*, em condições de campo, como suporte nos processos de seleção e melhoramento genético visando resistência à VB. Em função da baixa disponibilidade de frutos em idade uniforme e da necessidade de se controlar infecções naturais, foram procedidas polinizações manuais entre os seguintes materiais genéticos: TSH 565 x UF 221; TSA 792 x EET 397 e TSH 774 x TSH 565. Após as polinizações as flores foram revestidas com sacos plásticos transparentes e os frutos inoculados aos 40 dias de idade, tendo o cuidado de mantê-los protegidos, com os sacos, até o final do ensaio. O método de inoculação que apresentou maior eficiência e praticidade foi o que utilizou como suporte para o inóculo, disco de papel de filtro de um centímetro de diâmetro, embebido em três gotas de uma suspensão de  $2 \times 10^5$  basidiósporos por mililitro de água, colocado em contato com a superfície do fruto. Nas inoculações com ferimentos, antes de se depositar os discos embebidos na suspensão de esporos em contato com os frutos, foram efetuadas puncturas, com uma agulha esterilizada, na sua superfície. Avaliações foram efetuadas, a intervalos mensais, e aos 90 dias após a inoculação, a avaliação final. Aparentemente, não foram detectadas diferenças entre os tratamentos com e sem ferimentos, e nem em relação aos percentuais de infecção de 66,67; 79,17 e 65,38% obtidos nas inoculações dos materiais genéticos relacionados acima.

**Palavras-chave:** *Crinipellis perniciosa*, frutos, resistência à doença.

**Methodology of inoculation to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) under field conditions.** The genetic materials recommended, so far, for the control of witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.) (WB) have been showing higher levels of resistance on vegetative tissues than on pods. The aim of this study was to evaluate or develop a practical and efficient methodology to inoculate *Crinipellis perniciosa*, under field conditions, as an aid on the processes of selection and genetic improvement of cacao varieties for resistance to WB. As a consequence of the low pod availability at uniform ages and the necessity of controlling natural pod infections, manual pollinizations were carried out using the following genetic material combinations: TSH565 x UF 221; TSA 792 x EET 397 and TSH 774 x TSH 565. After the pollinizations the flowers were enclosed in transparent plastic bags and the pods that came out, were inoculated 40 days later. The inoculated and non-inoculated pods were kept protected within the plastic bags until the end of the trials. The most efficient and practical method of inoculation was that using 1-cm-diameter filter paper disks embedded in 3 drops of a  $2 \times 10^5$  basidiospores suspension, per milliliter of sterilized distilled water, placed in contact with the pod surface. For the wounding inoculation treatments, before setting the filter paper disks in contact with the fruit tissues, punctures on the pod surface were made using a sterilized needle. Periodical evaluations were carried out, at monthly intervals 90 days after inoculations, until. Apparently, no differences were observed for treatments with or without wounding, neither in relation until percentages of infection (66.67; 79.17 and 65.38%) obtained for the genetic materials evaluated.

**Key-words:** *Crinipellis perniciosa*, pods, disease resistance.

## Introdução

A vassoura-de-bruxa (VB) causada por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, um fungo da classe dos basidiomicetos, família Tricholomataceae, constitui-se numa das mais importantes e destrutivas doenças do cacaueiro. Até o seu aparecimento na região cacaueira da Bahia em 1989 (Pereira *et al.*, 1989), esteve confinada à região Amazônica, aonde em determinadas situações chegava a provocar perdas superiores a 90% na produção (Evans, 1981; Evans & Bastos, 1981; Bastos, 1988). Como já se preconizava, ao encontrar condições ambientais favoráveis no sul da Bahia, a VB disseminou-se, rapidamente, alcançando em pouco tempo proporções epidêmicas, e acarretando drástica redução na produção, levando o país da condição de exportador a importador de cacau. A doença já foi constatada inclusive no vizinho estado do Espírito Santo.

O fungo infecta, principalmente, tecidos meristemáticos e em processo de crescimento, provocando sintomas característicos em lançamentos foliares, almofadas florais e frutos. Os frutos são mais suscetíveis até os três meses de idade, podendo ser observadas variações na sintomatologia em função da sua idade e do modo de penetração do patógeno. Quando a infecção ocorre ainda na floração, podem adquirir a forma de morango, não chegando a produzir amêndoas; e em idades jovens, com uma a duas semanas, desenvolvem-se frutos em forma de cenoura; lesões necróticas características, de coloração negra, com margens irregulares, normalmente deprimidas, podem se formar nos frutos infectados, circundadas ou não por halos cloróticos (Singer, 1942; Oliveira & Luz, 2005).

Com o aparecimento da doença na região cacaueira da Bahia, esforços redobrados foram colocados em prática no sentido de oferecer aos agricultores, no mais curto espaço de tempo, medidas de controle que pudessem minimizar os efeitos negativos provocados pela doença na economia regional. No início, com base nos conhecimentos disponíveis, foi recomendada a poda fitossanitária, que consistia na remoção dos tecidos infectados, realizada em intervalos trimestrais, geralmente, nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro, em associação com o controle químico utilizando-se o fungicida óxido cuproso a 3 ou 6 g por planta, em pulverizações mensais ou bimensais, respectivamente (Luz *et al.*, 1997).

A partir do ano de 1995, os primeiros materiais genéticos com resistência à VB começaram a ser recomendados através da distribuição inicial da variedade seminal Theobahia, e no ano de 1997, de algumas variedades clonais: os TSHs 516, 565 e 1188, além do

CEPEC 42 e EET 397, obtidas através da enxertia ou multiplicação por estacaia. No momento, cerca de 20 variedades fazem parte das recomendações da CEPLAC visando o manejo da doença.

Não se deve deixar de salientar que embora resistência seja a forma desejável e mais econômica de controle, alguns problemas têm sido observados com relação ao comportamento de materiais genéticos resistentes à doença em diferentes países ou localidades. Em decorrência de alguns fatores como: condições de clima, isolado do patógeno, densidade do inóculo e do método de inoculação, um determinado genótipo selecionado pode se comportar como resistente em uma localidade e suscetível em outra. Os Scavinas 6 e 12 são exemplos bastante conhecidos e freqüentemente mencionados na literatura. Selecionados, inicialmente, como resistentes em Trinidad (Baker & Holliday, 1957), não se comportaram da mesma forma no Equador (Bartley, 1977) e nem no Brasil (Evans & Bastos, 1980).

Mesmo em relação à experiência mais recente com as cinco variedades clonais recomendadas pela CEPLAC a partir do ano de 1997, diferenças consideráveis, em termos de manifestação de sintomas, têm sido observadas. Os clones TSH 1188 e 565 são exemplos bem ilustrativos. Embora ambos tenham apresentado bons níveis de resistência na copa, seu comportamento em relação à infecção de frutos tem sido consideravelmente diferente. O TSH 565 tem se mostrado, através de observações freqüentes em condições de campo, muito mais suscetível à infecção de frutos que o TSH 1188, não obstante ser uma variedade mais produtiva. Tal característica, extremamente desejável, por si só já justificaria a manutenção da variedade num programa de manejo integrado da doença, envolvendo adicionalmente outras estratégias como os controles químico, biológico e cultural, apesar de sua maior susceptibilidade.

Avaliações de fontes de resistência são, normalmente, realizadas em campo sob pressão natural de inóculo, como também através de inoculações, em condições mais ou menos controladas, em casas-de-vegetação. A avaliação e o desenvolvimento de métodos padronizados rápidos e eficientes de inoculação são bastante importantes, permitindo se fazer comparações entre genótipos tanto em condições artificiais quanto naturais, o que apressaria sobremaneira os processos de seleção e melhoramento genético visando resistência à doença.

Alguns métodos têm sido empregados na avaliação da resistência à VB, na maioria dos casos, utilizando-se mudas de cacau. Holliday (1955) utilizou um método que consistia em mergulhar sementes, com quatro dias de pré-germinadas, em uma suspensão de basidiósporos. Outro método que tem sido empregado na inoculação de

diferentes partes da planta é aquele em que se utiliza blocos de agar obtidos de impressões de basidiósporos sobre meio de agar-água (Evans, 1978; Cronshaw & Evans, 1978; Wheeler & Mepsted, 1988). Seu uso, entretanto, tem sofrido restrições pela falta de consistência e uniformidade dos resultados, uma vez que não permite a padronização da concentração do inóculo, além de apresentar limitações quando se necessita inocular um grande número de indivíduos, ao mesmo tempo (Purdy *et al.*, 1997). Tais limitações foram contornadas com o desenvolvimento de um sistema automatizado de inoculação de mudas, que além de outras vantagens, apresentava a possibilidade de se controlar, adicionalmente, as condições ambientais, proporcionando assim maior sucesso nas inoculações (Frias, 1987; Purdy *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de técnicas que permitiam o armazenamento de basidiósporos em nitrogênio líquido, por períodos prolongados, também contribuiu para o aprimoramento dos métodos de inoculação (Dickstein *et al.*, 1987; Frias *et al.*, 1991), proporcionando inóculo viável sempre que materiais a serem inoculados fossem disponibilizados (Purdy *et al.*, 1997, 1998; Frias & Purdy, 1995).

Em decorrência das limitações dos métodos existentes, principalmente, quando se necessita inocular grandes quantidades de materiais, utilizando-se concentrações padronizadas, notadamente, quando a avaliação em condições naturais é dificultada por baixa pressão ou uniformidade nos níveis de inóculo, por exemplo, se buscou desenvolver uma metodologia prática e facilmente reproduzível que proporcionasse avaliações adequadas e confiáveis, apressando-se assim os processos de seleção e melhoramento genético do cacau visando resistência à doença. Parte deste trabalho foi publicada previamente (Oliveira *et al.*, 2003).

## Material e Métodos

Ensaios foram realizados visando avaliar metodologias já descritas na literatura ou desenvolver métodos que fossem eficientes e práticos na inoculação de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, principalmente sobre frutos de cacau, em condições de campo, com vistas à agilização dos processos de seleção e melhoramento genético visando resistência à VB. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se materiais genéticos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), em Ilhéus, BA.

No primeiro ensaio, após avaliações preliminares dos métodos disponíveis, e levando em consideração as limitações em termos de número de frutos para

cada um dos trinta materiais genéticos selecionados como mais produtivos e que apresentavam algum nível de resistência à VB presentes no BAG, o material genético CA 6 foi aquele escolhido para dar início aos trabalhos. Em decorrência deste fato, adotou-se como primeiro critério na escolha do método a ter continuidade de avaliação, sua praticidade, já que como se salientou, este seria o objetivo principal na sua escolha, a fim de se facilitar o processo de inoculação de grandes quantidades de frutos ou de outros tecidos, sob condições de campo. Desta forma, o método desenvolvido neste trabalho em que se utilizou como suporte para o inóculo, discos de papel de filtro de 1,0 cm de diâmetro embebido em três gotas de uma suspensão de  $2 \times 10^5$  basidiósporos por mililitro de água destilada esterilizada, foi aquele escolhido para ter continuidade nas avaliações. As suspensões de basidiósporos usadas foram preparadas utilizando-se basidiocarpos produzidos sobre vassouras secas em condições adequadas para a esporulação, em vassoureiros (Rocha, 1983). Os basidiósporos foram coletados em soluções apropriadas, capazes de mantê-los sem germinar por períodos prolongados, de acordo com procedimentos descritos na literatura (Frias, 1987; Dickstein *et al.*, 1987; Purdy *et al.*, 1997). Inóculo produzido e armazenado conforme tais procedimentos pode ser tanto usado imediatamente, quanto armazenado para ser utilizado posteriormente.

Considerando-se a possibilidade do mecanismo de resistência envolvido estar relacionado à penetração do fungo, dois tratamentos foram avaliados: inoculação com e sem ferimentos. Para cada variante foram inoculados 20 frutos com 40 dias de idade, mantendo-se igual número, sem inocular, como testemunhas. Nas inoculações com ferimentos foram efetuadas, inicialmente, puncturas com uma agulha esterilizada, na superfície dos frutos, depositando-se a seguir discos de papel de filtro embebidos em três gotas da suspensão de esporos, com a face que recebeu o inóculo, voltada para baixo. Após as inoculações, os frutos foram revestidos com sacos plásticos contendo um chumaço de algodão embebido em água destilada esterilizada, por 48 horas, visando manter um ambiente propício à infecção (Figura 1). A despeito de o método ter se mostrado eficiente, persistiam dúvidas com relação ao fato de que poderiam ter ocorrido infecções naturais, uma vez que os frutos não permaneceram protegidos com os sacos durante todo o período de avaliação.

Em decorrência deste fato, um segundo ensaio foi realizado a fim de dirimir dúvidas e aprimorar a metodologia. Levando-se em consideração a baixa



Figura 1. Detalhes do método de inoculação mostrando frutos inoculados em condições de campo (fotos: a, b, c, d).

disponibilidade de frutos por planta, a necessidade de se ter uniformidade em termos de idade de frutos, e de se controlar infecções externas, foram efetuadas polinizações manuais nas seguintes combinações de materiais genéticos, escolhidos não só por apresentarem resistência à doença na copa e alguma susceptibilidade em frutos, como também pelo maior número de frutos produzidos: TSH 565 x UF221; TSA 792 x EET397 e TSH 774 x TSH 565. Em um total de dez plantas por material genético, foram efetuadas polinizações em um número de flores suficientes para se ter, ao menos, 30 frutos por tratamento, incluindo as testemunhas. Após a polinização, as flores foram protegidas com sacos plásticos transparentes, visando prevenir infecções externas. As inoculações foram efetuadas quando os frutos atingiram 40 dias de idade, utilizando-se procedimentos idênticos aos descritos, anteriormente, sendo os sacos repostos no mesmo local, após terem suas pontas cortadas, a fim de se evitar o acúmulo de água no seu interior, procurando manter os frutos sempre protegidos durante todo o período de avaliação. As avaliações foram realizadas a intervalos mensais, e aos 90 dias após a inoculação, a avaliação final.

## Resultados e discussão

A despeito de no primeiro ensaio a metodologia ter se mostrado bastante prática e eficiente na inoculação do fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, já que do total de 20 frutos inoculados, 18 e 17 foram infectados nos tratamentos com e sem ferimentos, respectivamente, ainda persistiram dúvidas em relação à possibilidade de terem ocorrido infecções naturais entre os casos computados como resultados positivos, em função dos frutos não terem permanecido protegidos com sacos plásticos, durante todo o período de avaliação, apesar de terem sido deixados iguais números de frutos como testemunhas (Figura 1). Da mesma forma, em decorrência de terem sido oriundos de polinizações abertas, não foi possível se utilizar frutos com idade uniforme nas inoculações, fato que poderia ter interferido nas manifestações dos sintomas da doença.

O segundo ensaio realizado mostrou, mais uma vez, a praticidade do método, especialmente, para aquelas situações onde houver a necessidade de se inocular grandes quantidades de frutos ou de outros tecidos, em condições de campo, principalmente, quando se está avaliando uma gama enorme de materiais genéticos, ao mesmo tempo. Embora os sintomas, em alguns casos, tenham se manifestado e foram visualizados um pouco mais cedo, na grande maioria,

entretanto, a observação dos sintomas nem sempre se constituiu numa tarefa fácil, em função da coloração avermelhada dos frutos nos materiais genéticos avaliados. Desta forma, limitou-se a considerar apenas a avaliação final aos 90 dias após a inoculação, oportunidade em que os sacos plásticos eram removidos, facilitando-se assim a visualização dos sintomas e a confirmação dos resultados.

Os resultados do segundo ensaio, mais uma vez, não mostraram diferenças aparentes entre os tratamentos com e sem ferimentos, como também não foram observadas diferenças substanciais entre os percentuais de infecção (66,67; 79,17 e 65,38%) obtidos para as respectivas combinações de materiais genéticos avaliadas: TSH 565 x UF221; TSA 792 x EET397 e TSH 774 x TSH 565.

Conquanto os resultados obtidos no presente trabalho não tenham apresentado diferenças substanciais entre os materiais genéticos avaliados, a constatação do comportamento diferenciado de alguns genótipos de cacau em diferentes países, situações e localidades, ou ainda, ao longo dos anos na mesma localidade, sugere o envolvimento de diferentes patótipos do fungo no processo (Purdy & Schmidt, 1996). Assim, o conhecimento das reações dos vários genótipos quando submetidos à ação de diferentes patótipos é de suma importância durante os processos de seleção e melhoramento genético visando resistência à VB. Neste sentido, e semelhantemente ao sistema automatizado desenvolvido para a inoculação de mudas sob condições de casa-de-vegetação (Frias, 1987; Frias & Purdy, 1995; Purdy *et al.*, 1997, 1998) a metodologia aqui desenvolvida mostrou-se de grande valia, uma vez que além da eficiência e praticidade, apresentou vantagens adicionais de permitir controlar, uniformizar ou ajustar a concentração do inóculo; proporcionar, através do armazenamento de esporos em nitrogênio líquido, inóculo viável sempre que materiais genéticos forem disponibilizados para inoculação; possibilitar a utilização de patótipos específicos ou até de misturas destes nas inoculações, proporcionando respostas adequadas, uniformes e mais confiáveis do genótipo avaliado, além de permitir efetuar comparações em relação à virulência de isolados do fungo em diferentes situações ambientais (Frias & Purdy, 1995; Purdy *et al.*, 1997).

Outro fator que não se pode deixar de considerar é a influência do genótipo do hospedeiro na manifestação dos sintomas e em alguns aspectos da epidemiologia da doença. Como ilustração cita-se, por exemplo, o período de incubação que pode variar em função do genótipo, tornando-se assim importante a investigação das

interações patógeno-hospedeiro em plantas geneticamente uniformes (Rudgard & Butler, 1987; Laker, 1990) a fim de não se estabelecer generalizações sobre a doença ou sobre o comportamento dos diferentes genótipos do hospedeiro, quanto à sua resistência, em avaliações nem sempre adequadas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Técnica Agrícola Virgínia Oliveira Damasceno pela valiosa colaboração durante a realização deste trabalho.

### Literatura Citada

- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. 1957. Witches' broom disease of cacao (*Marasmium perniciosus* Stahel). Kew. CMI. Phytopathological Paper n.º 2. 42 p.
- BARTLEY, B. G. D. 1977. The status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. In Conferencia Internacional de Investigación en cacao, 6, Caracas, Venezuela, 1977. Actas. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp.57.
- BASTOS, C. N. 1988. Efeitos inibitórios de extratos de cultivares de cacau e compostos fenólicos sobre a germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*. In International Cocoa Research Conference, 10, Santo Domingo, República Dominicana, 1987. Proceedings. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 371-374.
- CRONSHAW, D. K.; EVANS, H. C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. II. Methods of infection. Annals of Applied Biology 89:193-200.
- DICKSTEIN, E. R.; PURDY, L. H.; FRIAS, G. A. 1987. *Crinipellis perniciosa*, the cacao witches' broom fungus: inoculum production and storage. Phytopathology 77: 1747.
- EVANS, H. C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. Annals of Applied Biology 89: 185-192.
- EVANS, H. C. 1981. Witches' broom disease – a case study. Cocoa Growers' Bulletin 32: 5-19.
- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. 1980. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. Transactions of the British Mycological Society 74: 525-536.
- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. 1981. Preliminary results of research on witches' broom disease of cacao (*Crinipellis perniciosa*) in the Amazonian region of Brazil. In International Cocoa Research Conference, 7, 1979. Proceedings. Duala, Cameron. pp. 255-256.
- FRIAS, G. A. 1987. An inoculation method to evaluate resistance to witches' broom disease of cacao. Ph.D. Thesis. Gainesville, University of Florida, Plant Pathology Department. 111 p.
- FRIAS, G. A.; PURDY, L. H. 1995. An inoculation method for resistance on cacao to *Crinipellis perniciosa*. Plant Disease 79: 787-791.
- FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. 1991. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. Plant Disease 79:787-791.
- HOLLIDAY, P. 1955. A test for resistance to *Marasmium perniciosus* Stahel. In Port of Spain. Imperial College of Tropical Agriculture. A report on cacao Research, 1954. pp. 50-55.
- LAKER, H. A. 1990. Reactions of cocoa (*Theobroma cacao*) seedlings and clonal plants to isolates of *Crinipellis perniciosa* in Trinidad. Tropical Agriculture (Trinidad) 67 (1): 43-48.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 1997. Cacau – controle de doenças. In Vale, F. X. R.; Zambolim, L. eds. Controle de Doenças de Plantas – Grandes Culturas. Vol. II. Viçosa, MG, UFV. pp. 611-649.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. 132p.
- OLIVEIRA, M. L. et al. 2003. Metodologia prática para inoculação de *Crinipellis perniciosa* em frutos de cacau, em campo. Fitopatologia Brasileira 28 (Supl). pp. S220-S221.
- PEREIRA, J. L. M. et al. 1989. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotrópica (Brasil) 1:79-81.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. 1996. Status of cocoa witches' broom biology, epidemiology and management. Annual Review of Phytopathology 34: 573-594.
- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A., DICKSTEIN, E. R.; FRIAS, G. A. 1997. An automated system for screening *Theobroma cacao* for resistance to witches' broom. Agrotrópica (Brasil) 9 (3): 119-126.
- PURDY, L. H., DICKSTEIN, E. R. & SCHMIDT, R. A. 1998. Relative resistance of cacao clones to *Crinipellis perniciosa* determined by artificial inoculation using an automated basidiospore spray system. Agrotrópica 10(1): 9-12.
- ROCHA, H. M. 1983. The ecology of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). PhD. Thesis. England, University of London.
- RUDGARD, S. A.; BUTLER, D. R. 1987. Witches' broom disease on cocoa in Rondonia, Brazil: pod infection in relation to pod susceptibility, wetness, inoculum and phytosantation. Plant Pathology 36:515-522.
- SINGER, R. 1942. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. Lilloa 8:441-513.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. 1988. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology 37:473-488 ●

## PERFORMANCE FENOTÍPICA DE CULTIVARES DE MILHO NO MEIO-NORTE BRASILEIRO

**Milton José Cardoso<sup>1</sup>, Hélio Wilson Lemos de Carvalho<sup>2</sup>, Maria de Lourdes da Silva Leal<sup>2</sup>, Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães<sup>3</sup>, Evanildes Menezes de Souza<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Caixa Postal 01, 64.006-220, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: milton@cpamn.embrapa.br. <sup>2</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, Caixa Postal 44, 49001-970, Aracaju, Sergipe, Brasil. <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, km 65, Caixa Postal 151, 35701-970, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

No ano agrícola de 2003/2004, foram conduzidos dois tipos de experimentos, em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições, envolvendo a avaliação de 46 híbridos de milho em um dos experimentos e, 22 variedades e 24 híbridos em outro, em nove e oito ambientes, respectivamente, do Meio-Norte brasileiro. O objetivo foi conhecer a adaptabilidade e a estabilidade das cultivares para fins de recomendação. Os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade foram estimados conforme método proposto por Cruz et al. (1989). Detectaram-se, nas análises de variância conjunta, diferenças entre as cultivares e comportamento inconsistente em face das oscilações ambientais. Em ambos os experimentos, as variedades e híbridos avaliados diferiram quanto a adaptabilidade e estabilidade de produção. Os híbridos mostraram melhor adaptação que as variedades, consolidando-se em alternativas importante para exploração comercial na Região. Entre aqueles de melhor adaptação, os Pioneer 30 F 44, BRS 1001, AG 6690, DKB 350 destacaram-se para os ambientes favoráveis. Os híbridos que expressaram adaptabilidade ampla, a exemplo dos AG 7000, BRS 1010, DKB 390, Pioneer 30 F 90, dentre outros, consubstanciam-se em alternativas importantes para a agricultura regional. Também, as variedades que apresentaram adaptabilidade ampla, a exemplo das Sertanejo, São Francisco, Asa Branca, AL Alvorada, AL Ipiranga, dentre outras, tornam-se de importância para os diferentes sistemas de produção dos agricultores familiares.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, interação genótipo x ambiente, rendimento de grãos, híbridos, variedades

**Corn cultivars phenotype performance in the Brazilian Middle-Norte region.** In the agricultural year of 2003/2004, two types of experiments were evaluated, in experimental complete randomized design with three replications involving 46 corn hybrids in one of the experiments and, 22 varieties and 24 hybrids in other, in nine and eight environments, respectively, in the Brazilian Middle-North. The objective was to study the adaptability and the stability of those hybrids and varieties for recommendation purposes. The adaptability and stability parameters were measured as proposed by Cruz et al. (1989). The combined analysis of variance showed variations among the cultivars and inconsistent behaviour to of those cultivar in relation to environmental oscillations. In both experiments, the varieties and hybrids differed as to adaptability and production stability. The hybrids showed better adaptation than varieties, in important alternatives for commercial exploration in the Area. Among those of better adaptation, Pioneer 30 F 44, BRS 1001, AG 6690, DKB 350 stood out in favorable environments. The hybrids that expressed wide adaptability, as AG 7000, BRS 1010, DKB 390, Pioneer 30 F 90, use an important alternatives for the regional agriculture. Also, the varieties that presented wide adaptability, as the example the Sertanejo, São Francisco, Asa Branca, AL Alvorada, AL Ipiranga, are important alternatives for became small producers.

**Key word:** *Zea mays*, genotype x environment interaction, grain yield, hybrid, variety.

## Introdução

Em razão das distintas condições ambientais existentes na região Meio-Norte do Brasil (Silva et al., 1993), há necessidade de se conhecer o comportamento das variedades e híbridos de milho lançadas anualmente no mercado regional, tanto por empresas públicas quanto particulares. A avaliação é de extrema importância para o conhecimento da adaptação desses materiais aos diferentes ambientes dessa região. Estudos têm demonstrado a significância da interação cultivares x ambientes e, consequentemente, o comportamento diferencial desses materiais nos anos e ambientes estudados (Ramalho et al., 1993). Os ambientes de instalação dos experimentos são importantes no comportamento fenotípico dos genótipos, dada as distintas condições ambientais, que possibilitam a definição de pontos estratégicos para a execução dos ensaios com vistas a recomendação de cultivares (Duarte & Zimmermann, 1994). Fundamentado nesses conceitos de avaliação de cultivares em locais estratégicos e nos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade, foi possível, realizar a recomendação de cultivares de milho para diferentes ambientes dos estados do Paraná (Carneiro, 1998), de Minas Gerais (Ribeiro et al., 2000), do Nordeste brasileiro (Carvalho et al., 2002 e 2005; Souza et al., 2004) e do Meio-Norte do Brasil (Cardoso et al., 2003, 2004 e 2005).

Diversos trabalhos realizados com a cultura do milho, segundo Ribeiro et al. (2000), permitem inferir não haver uma relação fixa quanto à homogeneidade ou heterogeneidade do material e sua estabilidade, pois, é possível selecionar materiais mais estáveis em qualquer grupo (variedades, híbridos simples, híbridos triplos e híbridos duplos). Allard & Bradshaw (1964) ressaltam que os híbridos simples, por serem materiais mais homogêneos e por terem na heterozigosidade na maioria dos locos, possuem maior capacidade de processar as trocas ambientais de forma mais eficiente que a mistura de genótipos nos materiais heterogêneos. A ocorrência desses resultados sugere a importância do estudo da interação cultivares x ambientes, visando fornecer subsídios e maior compreensão do comportamento de diferentes cultivares de milho quando submetidas a diferentes condições ambientais (Arias, 1996).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a adaptabilidade e a estabilidade de produção de variedades e híbridos de milho quando submetidos a diferentes condições ambientais do Meio-Norte do Brasil.

## Material e Métodos

Os experimentos de avaliação de híbridos e os que envolveram a avaliação de variedades e híbridos foram conduzidos, respectivamente, em nove e oito ambientes do Meio-Norte brasileiro, no ano agrícola de 2003/2004, distribuídos nos estados do Maranhão e do Piauí, em diferentes tipos de solo, entre as latitudes 03° 11' S a 09° 04' S (Tabela 1). As precipitações pluviométricas registradas no decorrer do período experimental encontram-se na Tabela 2.

Os experimentos com híbridos envolveram 46 materiais e aqueles que avaliaram variedades e híbridos foram formados por 22 variedades e 24 híbridos. Em ambos, utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com três repetições. Cada parcela constou de quatro fileiras de 5,0 m de comprimento, espaçadas de 0,80 m e 0,25 m, entre covas, dentro das fileiras. Foi mantida uma planta por cova, após o desbaste. A área útil da parcela foi de 8,0 m<sup>2</sup> (duas fileiras centrais). As adubações foram realizadas de acordo com os resultados das análises de solo de cada área experimental.

Os pesos de grãos corrigidos para 13% de umidade foram transformados para produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e submetidos à análise de variância, pelo modelo em blocos ao acaso. A análise de variância conjunta obedeceu ao critério de homogeneidade dos quadrados médios residuais (Gomes, 1990), e foram realizadas conforme Vencovsky & Barriga (1992), considerando-se como aleatórios os efeitos de blocos e ambientes e, fixo, o efeito de cultivares. As referidas análises foram efetuadas, utilizando-se o Statistical Analysis System (SAS, Institute, 1996), para dados balanceados (PROC/ANOVA).

Os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade foram estimados pelo método de Cruz et al. (1989), o qual baseia-se na análise de regressão bissegmentada, tendo como parâmetros de adaptabilidade a média ( $b_0$ ), a resposta linear aos ambientes desfavoráveis ( $b_1$ ) e aos ambientes favoráveis ( $b_1 + b_2$ ). Foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = b_{0i} + b_{1i}I_j + b_{2i}T(I_j) + \sigma_{ij} + e_{ij} \text{ onde}$$

$Y_{ij}$ : média da cultivar  $i$  no ambiente  $j$ ;  $I_j$ : índice ambiental;  $T(I_j) = 0$  se  $I_j < 0$ ;  $T(I_j) = I_j - I_+$  se  $I_j > 0$ , sendo  $I_+$  a média dos índices  $I_j$  positivos;  $b_{0i}$ : média geral da cultivar  $i$ ;  $b_{1i}$ : coeficiente de regressão linear associado à variável  $I_j$ ;  $b_{2i}$ : coeficiente de regressão linear associado à variável  $T(I_j)$ ;  $\sigma_{ij}$ : desvio da regressão linear;  $e_{ij}$ : erro médio experimental.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos municípios onde foram executados os experimentos de milho ano agrícola 2003/2004. Região Meio-Norte do Brasil.

Município	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Tipo de solo (1)
Raimundo das Mangabeiras/MA	06° 49'	45° 24'	545	AVA
Paraibano/MA	06° 18'	43° 57'	196	CE
Barra do Corda/MA	05° 43'	45° 18'	84	LA
Anapurus/MA	03° 44'	43° 21'	10	LA
Teresina/PI	05° 02'	42° 47'	80	NF
Bom Princípio/PI	03° 11'	41° 37'	70	LA
Baixa Grande do Ribeiro/PI	08° 23'	45° 26	590	AVA
Bom Jesus/PI	09° 04'	44° 21'	277	AVA

(1) AVA: Argissolo Vermelho Amarelo, CE: Chernossolo Escuro, LA: Latossolo Amarelo e NF: Neossolo Flúvico.

Tabela 2. Índices pluviais (mm) ocorridos durante o período experimental. Região Meio-Norte do Brasil, ano agrícola 2003/2004.

Municípios	2003		2004			Total
	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	
S. Raimundo das Mangabeiras/MA	74*	480	333	179	-	906
Paraibano/MA	-	121*	292	301	231	945
Barra do Corda/MA	-	392*	275	164	164	995
Anapurus/MA	-	89*	120	341	380	930
Teresina/Pi	-	351*	172	316	222	1061
Bom Princípio/PI	-	89*	215	210	240	754
Baixa Grande do Ribeiro/PI	177*	636	425	211	-	1449
Bom Jesus/PI	315*	202	189	288-	994	994

\* Mês de plantio.

## Resultados e Discussão

Nos ensaios de híbridos detectaram-se diferenças significativas ( $p<0,01$ ) entre os materiais avaliados, em todos os ambientes (Tabela 3). Os coeficientes de variação obtidos variaram de 7% a 11%, conferindo boa precisão aos ensaios (Scapim et al., 1995). As produtividades médias de grãos oscilaram de  $6.025 \text{ kg ha}^{-1}$ , em Teresina, PI, em ambiente irrigado a  $7.124 \text{ kg ha}^{-1}$ , em Paraibano, MA, evidenciando a alta potencialidade dessas áreas para cultivo do milho em escala comercial. Ressalta-se que os rendimentos médios obtidos nesses ambientes são equivalentes àqueles registrados em áreas tradicionais de cultivo de milho nos estados do Paraná e Mato Grosso.

Nos ensaios formados por variedades e híbridos detectaram-se variações genéticas entre os materiais avaliados (Tabela 4). A oscilação observada no rendimento de grão foi de  $5.420 \text{ kg ha}^{-1}$ , em Anapurus, MA, a  $6.196 \text{ kg ha}^{-1}$ , em Barra do Corda, MA. Estes resultados são equivalentes aqueles registrados em áreas produtoras de milho nos estados do Paraná e Mato Grosso e, confirmam a potencialidade dessas áreas para o cultivo do milho. Os coeficientes de variação obtidos variaram de 6% a 12%, conferindo boa precisão aos ensaios.

A análise de variância conjunta, tanto dos ensaios constituídos por híbridos (Tabela 5), quanto dos formados por variedades e híbridos (Tabela 6), evidenciou efeito

significativo ( $p<0,01$ ), para ambientes, tratamentos e interação tratamentos x ambientes, revelando diferenças entre os ambientes e os tratamentos e comportamento diferenciado dos tratamentos em face das oscilações ambientais.

Constatada a presença da interação cultivar x ambiente, procurou-se verificar as respostas de cada cultivar nos ambientes considerados, pelo método de Cruz et al. (1989), que descreve como material ideal, aquela que expressa alta produtividade média de grãos ( $b_0 >$ média geral), adaptabilidade nos ambientes desfavoráveis ( $b_1$  o menor possível), responsividade à melhoria ambiental ( $b_1 + b_2$  o maior possível) e, finalmente, variância dos desvios da regressão igual a zero (alta estabilidade nos ambientes considerados). Além do preconizado pelo modelo proposto, considerou-se como cultivar melhor adaptada, aquela com produtividade média de grãos acima da média geral (Vencovsky & Barriga, 1992).

Nota-se, na Tabela 7, uma variação na produtividade média de grãos ( $b_0$ ) de  $5.960 \text{ kg ha}^{-1}$  a  $7.372 \text{ kg ha}^{-1}$ , destacando-se com melhor adaptação os híbridos com produtividade média de grãos superior à média geral ( $b_0 >$ média geral). Verificando os resultados de análise de adaptabilidade e estabilidade desses materiais, nota-se que o material ideal preconizado pelo modelo bissegmentado não existe entre os avaliados ( $b_0 >$ média geral,  $b_1 < 1$ ,  $b_1 + b_2 > 1$  e variância dos desvios da regressão próximas ou igual a zero). De forma semelhante, não foi encontrado

Tabela 3. Resumo das análises de variância de rendimento de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), por ambiente, dos experimentos com híbridos de milho. Região Meio-Norte do Brasil, ano agrícola 2003/2004.

Local	Quadrados médios		Médias	C. V. (%)
	Cultivares	Resíduo		
Anapurus/MA	1204988,6**	325883,1	6376	10
Barra do Corda/MA	944034,6**	309901,6	6585	8
S. R. das Mangabeiras/MA	573586,2**	237011,8	6484	8
Paraíbano/MA	1086449,6**	547041,7	7124	10
Teresina sequeiro/PI	1006086,4**	252592	6692	7
Teresina irrigado/PI	1220338,9**	467858,8	6025	11
Bom Jesus/PI	667184,0**	235650,4	6116	8
Baixa G. do Ribeiro/PI	2172294,6**	360722,5	6949	9
Bom Princípio/PI	1148382,2**	347873,1	6505	9

\*\* Significativo, a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4. Resumo das análises de variância da produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) dos experimentos de avaliação de cultivares de milho. Região Meio-Norte do Brasil, ano agrícola 2003/2004.

Local	Quadrados médios		Médias	C.V. (%)
	Cultivares	Resíduo		
Anapurus/MA	716063,1**	117605	5420	6
Barra do Corda/MA	2722310,1**	328013,7	6196	9
S. R. das Mangabeiras/MA	1051367,7**	356886,9	5960	10
Paraíbano/MA	2697417,0**	258458,6	6028	8
Teresina/PI	1789746,0**	241480,2	6016	8
Teresina irrigado /PI	2089097,5**	364064,1	5209	12
Bom Jesus/PI	2315927,0**	378381,1	5891	10
Baixa G. do Ribeiro/PI	3460926,5**	390563	6111	10

\*\* Significativo, a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 5. Análise de variância conjunta da produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de 46 híbridos de milho em oito ambientes da Região Meio-Norte do Brasil, no ano agrícola de 2003/2004.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios
Ambientes (A)	8	17400851,8**
Híbridos (H)	45	2477820,2**
Interação ( A x H)	360	943191,9**
Erro	810	342726,1
Média:		6540
C. V (%):		9

\*\* Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

Tabela 6. Análise de variância conjunta da produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de 46 cultivares de milho em sete ambientes da Região Meio-Norte do Brasil, no ano agrícola de 2003/2004.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios
Locais (L)	7	20198477,7**
Cultivares (C)	45	11892365,7**
Interação ( CxL)	315	712867,2**
Erro	720	302858,2
Média		5839
C. V (%):		9

\*\* Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

qualquer material que atendesse a todos os requisitos para adaptação nos ambientes desfavoráveis. Nesse caso, o híbrido teria que mostrar uma produção média alta ( $b_0 >$ média geral), os  $b_1 < 1$  e  $b_1 + b_2 < 1$ . Apesar disso, observa-se que o híbrido SHS 4060 se aproxima bastante dessa situação ( $b_0$  alto e  $b_1 < 1$  e estabilidade nos ambientes considerados (variância dos desvios da regressão igual a zero), podendo ser recomendado para essa classe de ambiente. Para as condições favoráveis, os híbridos devem apresentar média alta ( $b_0 >$ média geral), estimativas de  $b_1$  e de  $b_1 + b_2$  estatisticamente maiores que a unidade e variâncias dos desvios da regressão próximas ou igual a zero. Não foi encontrado qualquer híbrido que atendesse a todos esses requisitos. No entanto, os híbridos DAS 8420 e A 2345, de rendimentos médios superiores à média geral e em razão de serem exigentes nas condições desfavoráveis ( $b_1 > 1$ ), justificam suas recomendações para essas condições de ambiente. Da mesma forma, os híbridos Pioneer 30 F 44, Pioneer 30 F 98 e SHS 4060, de produtividades médias de grãos acima da média geral e responsivos à melhoria ambiental ( $b_1 + b_2 > 1$ ) devem também ser recomendados para essa classe de ambiente. Os demais híbridos que expressaram médias superiores à média geral e estimativas de  $b_1$  semelhantes à unidade, evidenciaram adaptabilidade ampla, consolidando-se em alternativas importantes para os diferentes sistemas de produção prevalecentes na região, destacando-se, entre eles, os Pioneer 30 F 44, Pioneer 30 F 90, DAS 8480, DAS 8460 e 2 C 577.

Entre os híbridos de melhor adaptação ( $b_0 >$ média geral), apenas os Pioneer 30 F 44, DAS 657, Pioneer 3021, Pioneer 30 F 98, 2 C 599 e DAS 766 mostraram os desvios da regressão semelhantes a zero, o que evidencia comportamento altamente previsível nos ambientes considerados.

Os parâmetros de adaptabilidade e estabilidade estimados nos experimentos envolvendo variedades e híbridos constam na Tabela 8. Verifica-se que a produtividade média de grãos oscilou de  $4.421 \text{ kg ha}^{-1}$  a  $7.246 \text{ kg ha}^{-1}$ , considerando-se que os materiais melhor adaptados ao Meio-Norte brasileiro expressaram produtividade médias de grãos acima da média geral ( $5.839 \text{ kg ha}^{-1}$ ), destacando-se os híbridos AG 7000 e BRS 1001. Entre os materiais de menor adaptação, podem ser citados as variedades CMS 47, Sintético Elite Flint, Sintético Flint e Caatingueiro. Observou-se que, dentre os de melhor adaptação, os híbridos BRS 1001, AG 6690, DKB 350, BRS 2223 e BRS 2114 foram exigentes nas condições desfavoráveis ( $b_1 > 1$ ), enquanto o híbrido PL 6880, mostrou-se menos exigente nessas condições ( $b_1 < 1$ ). Os híbridos AG 6690, DKB 350, AG 7575, AG 2060, e Colorado 32 foram os mais responsivos à melhoria ambiental ( $b_1 + b_2 > 1$ ).

Dentre os híbridos de melhor adaptação ( $b_0 >$ média geral), os que mostraram os desvios da regressão

estatisticamente semelhantes a zero, expressaram boa estabilidade nos ambientes considerados, a exemplo dos BRS 1001, BRS 1010, BRS 3123, AG 1051, DKB 466, AG 2060, PL 6880, DKB 950 e BRS 2114.

Relacionando-se a estabilidade das cultivares avaliadas, com suas respectivas bases genéticas (Tabela 8), nota-se que 18 dessas cultivares mostraram os desvios da regressão estatisticamente diferentes de zero, independentemente de suas bases genéticas (híbridos simples, híbridos triplos, híbridos duplos e variedades). As demais cultivares apresentaram alta estabilidade nos ambientes considerados, independentemente, também, de suas bases genéticas. Em trabalhos de competição de cultivares, onde se avaliam materiais de diferentes bases genéticas, surge o questionamento sobre a maior ou menor estabilidade das cultivares em relação ao grupo a que pertencem (Ribeiro et al., 2000). Resultados de inúmeros trabalhos com cultivares de milho permitem inferir não haver relação fixa entre a homogeneidade ou heterogeneidade de determinado genótipo e sua estabilidade, sendo possível selecionar cultivares mais estáveis em qualquer grupo, quer sejam variedades ou híbridos (Carneiro, 1998; Ribeiro et al., 2000; Carvalho et al., 2002 e 2005; Cardoso et al., 2001, 2004 e 2005), o que também foi constatado no presente trabalho.

O material ideal preconizado pelo modelo bisegmentado não foi encontrado no conjunto avaliado. Também não foi identificado qualquer material com adaptação específica a ambientes desfavoráveis. Entretanto, cultivares com médias altas nesses ambientes, tornam-se de importância para a agricultura regional, a exemplo dos híbridos AG 7000, BRS 1010, DKB 747, BRS 3123, BRS 3060, DKB 466 e, principalmente, o PL 6880, que se mostrou pouco exigente nas condições desfavoráveis. Com adaptação específica a ambientes favoráveis, destacaram-se os híbridos AG 6690 e DKB 350, os quais expressaram altas produtividades médias de grãos, exigência nas condições desfavoráveis e resposta favorável à melhoria ambiental ( $b_0 >$ média geral,  $b_1 > 1$  e  $b_1 + b_2 > 1$ ). Esses dois híbridos mostraram baixa estabilidade de produção nos ambientes considerados. Os híbridos BRS 1001, AG 6690, BRS 350, BRS 2223, BRS 2114, exigentes nas condições desfavoráveis e, os AG 7575, AG 2060 e Colorado 32, responsivos à melhoria ambiental, justificam também suas recomendações para as condições favoráveis. Os híbridos que mostraram adaptabilidade geral ( $b_0 >$ média geral e  $b_1 = 1$ ), consolidaram-se em alternativas importantes para a região.

Considerando a média das variedades ( $5.245 \text{ kg ha}^{-1}$ ), nota-se que apenas a AL Piratininga mostrou-se exigente nas condições desfavoráveis ( $b_1 > 1$ ), sugerindo sua utilização nessa classe de ambientes. As demais variedades

Tabela 7. Estimativas das médias e dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 46 híbridos de milho em nove ambientes do Meio-Norte brasileiro no ano agrícola de 2003/2004.

Híbridos	Produtividade média de grãos <sup>+</sup>							
	Geral	Desfavorável	Favorável	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>1</sub> +b <sub>2</sub>	s <sup>2</sup> d	R
Pioneer 30 F 44	7372a	6922	7932	1,29	2,35**	3,64**	687640	73
DAS 8420	7320a	6695	8100	2,40**	-0,34	2,05	3198038,9**	46
Pioneer 30 F 90	7084b	6955	7244	0,74	-0,57	0,17	1753292,2**	11
DAS 8480	7042b	6599	7647	1,06	-1,2	-0,13	1881653,4**	19
DAS 8460	6928b	6681	7259	0,94	0,66	1,61	1243468,4**	32
A 2345	6925b	6351	7640	2,13**	-0,81	1,32	1319382,6**	60
Strike	6904b	6778	7061	0,29	-0,13	0,15	2013618,6**	2
2 C 577	6876b	6617	7194	0,85	1,31	2,16	800630,8*	47
A 2560	6856b	6708	7040	1,11	-2,31**	-1,20**	1989523,0**	24
Pioneer 30 F 33	6824b	6529	7190	0,78	-0,35	1,14	560630,4	40
DAS 657	6773b	6555	7045	1,26	-0,29	0,97	1724031,0**	30
Fort	6769b	6534	7057	1,06	-0,47	0,59	2226710,6**	18
Pioneer 30 K 75	6652c	6510	6829	0,58	-0,81	1,4	146852,6	68
Pioneer 3021	6592c	6428	6785	0,45	-0,95	1,4	464123,6	36
Pioneer 30 F 98	6590c	6362	6866	0,92	2,02*	2,94**	201759,7	85
2 C 599	6553c	6380	6769	0,67	-2,85**	-2,17**	710665,2	47
DAS 766	6552c	6489	6655	0,01**	0,3	-0,29	725694,6*	1
SHS 4060	6543c	6346	6789	0,92	2,47**	3,39**	681089,1	67
Pioneer 30 F 80	6522 c	6057	7028	1,87*	-1,51	0,36	659384,9	68
Valent	6516c	6075	7068	1,91*	-1,09	0,82	248961,7	86
SHS 4080	6470c	6451	6482	0,14*	0,24	0,39	996961,1**	2
A 3663	6458c	6137	6848	1,05	-1,47	-0,41	463962	50
SHS 4040	6443c	6179	6771	1,18	-1,34	-0,15	409452,2	58
DAS 9560	6440c	6273	6648	1,03	-0,22	0,8	1163441,0**	30
Agromen 3050	6430c	6122	6815	1,23	0,41	1,65	578110,3	60
AS 32	6410c	6405	6417	0,62	-0,2	0,42	1956680,5**	8
AS 3466	6408c	6357	6396	0,82	0,05	0,87	1218029,5**	22
SHSA 5050	6402c	6054	6836	1,90*	-2,48**	-0,58*	860444,8*	63
Agromen 2012	6399c	6112	6757	1,12	-0,37	0,74	761346,4*	42
Agromen 35 A 42	6398c	6360	6427	0,33	0,46	0,79	272581,4	27
A 4450	6367c	6152	6635	0,82	-0,22	0,6	758293,4*	29
AS 3477	6357c	6165	6565	0,86	0,15	1,01	443606,3	47
Balu 178	6355c	5940	6873	1,67	-0,11	1,56	450058	55
A 4454	6353c	6022	6767	1,73*	-1,82*	-0,87	692522,1	63
A 4646	6352c	6380	6309	0,14*	1,41	1,59	1646720,2**	12
Agromen 30 A 00	6342c	6165	6556	0,86	-0,29	0,57	457602,9	42
Agromen 2011	6327c	5942	6805	1,22	2,02*	3,25**	473476,4	77
A 2555	6308c	5974	6686	1,1	1,96*	3,07**	1285027,6	51
Agromen 3180	6293c	6061	6559	1,02	-0,87	0,15	169720,9	71
AS 1533	6260c	5920	6678	1,83*	-0,67	1,21	482463,2	75
Agromen 3150	6257c	6112	6438	0,55	0,96	1,51	329483,2	50
A 4545	6249c	6268	6226	0,3	-0,65	-0,35	401230,3	11
SHS 5070	6208c	6136	6284	0,54	0,7	1,25	2676842,2**	9
SHS 4050	6199c	5815	6677	1,36	-0,88	0,48	1560200,2**	33
Agromen 25 A 23	6193c	5984	6437	0,29	2,39*	2,69*	675035,2	51
Agromen 3100	5960c	5811	6145	0,85	1,11	1,96	626756,6	51

\*e\*\* significativamente diferente da unidade, para b<sub>1</sub> e b<sub>1</sub>+b<sub>2</sub>, e de zero, para b<sub>2</sub>. Significativamente diferentes de zero, pelo teste F, para s<sup>2</sup>d.

+ Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 8. Estimativas dos parâmetros de adaptabilidade e estabilidade de 46 cultivares de milho em oito ambientes do Meio-Norte brasileiro no ano agrícola de 2003/2004.

Híbridos	Produtividade média de grãos <sup>+</sup>			$b_1$	$b_2$	$b_1+b_2$	$s_{2d}$	R
	Geral	Desfavorável	Favorável					
AG 7000 <sup>H</sup>	7246a	6444	7514	1,19	0,92	2,11	1072318,86**	47
BRS 1001 <sup>H</sup>	7026a	5998	7368	1,72*	0,24	1,96	659582,56	73
BRS 1010 <sup>H</sup>	7015a	6066	7332	1,53	0,1	1,64	345757,33	80
DKB 390 <sup>H</sup>	6849 <sup>a</sup>	5840	6885	1,08	-0,28	0,8	1559527,77**	30
AG 6690 <sup>H</sup>	6746b	5711	7090	1,68*	2,64	4,33*	1135493,66**	66
DKB 747 <sup>H</sup>	6660b	6010	6876	0,91	0,47	1,39	1024886,72**	34
BRS 3123 <sup>H</sup>	6634b	6201	6779	0,68	-0,34	0,33	407225,68	39
DKB 350 <sup>H</sup>	6577b	5362	6982	2,08**	2,23	4,31*	1075365,94**	73
BRS 3060 <sup>H</sup>	6557b	6095	6711	0,86	-0,6	0,25	1159959,62**	26
AG 1051 <sup>H</sup>	6470b	5977	6634	0,82	-1,02	-0,2	272740,36	58
DKB 466 <sup>H</sup>	6436b	6080	6559	0,54	1,68	2,22	149001,5	68
AG 4051 <sup>H</sup>	6417b	5749	6640	1,07	-0,79	0,28	973543,50**	40
AG 7575 <sup>H</sup>	6366b	5579	6629	1,22	3,41*	4,64**	1337300,13**	53
AG 405 <sup>H</sup>	6159c	5441	6398	1,1	2,01	3,12	1005745,70**	49
AG 2060 <sup>H</sup>	6154c	5257	6453	1,51	4,22**	5,73**	554485,08	80
PL 6880 <sup>H</sup>	6143c	5887	6288	0,31*	0,47	0,78	411532,24	15
AG 9010 <sup>H</sup>	6133c	5642	6296	0,75	-3,00*	-2,25*	796486,08*	37
BRS 2223 <sup>H</sup>	6064c	5107	6383	1,79*	-1,54	0,25	751297,60*	71
BRS 3150 <sup>H</sup>	6022c	5611	6159	0,83	3,29*	4,12*	2798193,17**	24
DKB 950 <sup>H</sup>	6020c	5575	6168	0,61	-2,17	-1,56*	474680,61	37
BRS 2114 <sup>H</sup>	5950d	4928	6291	1,79*	-1,02	0,76	480226,18	79
Colorado 32 <sup>H</sup>	5901d	4868	6245	1,53	2,38	3,91*	1549808,58**	54
BRS 2110 <sup>H</sup>	5862d	5661	5930	0,44	-0,35	0,09	439858,09	20
CPATC-4	5850d	5440	5987	0,7	0,03	0,74	240429,15	55
CPATC-5	5812d	5270	5992	0,94	-0,95	-0,01	238349,22	68
AL Piratininga	5789d	4559	6166	2,08**	3,57*	-1,48	915321,20**	73
DKB 900 <sup>H</sup>	5786d	5662	5828	0,22*	-0,31	-0,09	330924,91	8
Sertanejo	5658e	5319	5770	0,67	0,41	1,08	241857,69	55
São Francisco	5557e	5086	5714	0,84	0,28	1,12	73659,2	85
Asa Branca	5548e	5311	5620	0,39	0,41	0,8	202642,02	34
AL Alvorada	5493e	4766	5736	1,22	-0,57	0,64	1834715,58**	32
AL Ipiranga	5444e	4799	5659	1,14	0,9	2,05	414444,42	68
São Vicente	5395e	4868	5570	0,93	-0,16	-0,12	255952,02	66
Sintético Dentado	5361e	4898	5516	0,72	2,56	3,28	974699,93**	39
AL 25	5328e	4666	5649	1,33	0,22	1,55	239557,19	81
AL 30	5315e	4814	5482	1,04	-0,4	0,63	642092,89	49
AL 34	5284e	4846	5429	0,86	0,4	1,27	891416,45*	35
SHS 3031	5273e	5024	5355	0,59	1,61	2,2	473973,9	42
AL Bandeirante	5238e	4751	6401	0,92	-0,54	0,38	375211,4	57
Cruzeta	5005f	4316	5235	1,38	-2,08	-0,7	469101,65	70
BR 106	4917f	4645	5008	0,57	0,01	0,5	500198,89	28
BRS 4150	4818f	4232	5013	1,1	-2,49	-1,38	328019,84	69
Caatingueiro	4661g	3969	4891	1,39	-1,59	-0,19	566290,1	66
Sintético Flint	4628g	4538	4658	0,13**	-0,62	-0,48	272662,56	6
Sintético Elite Flint 4592g	4480	4630	0,41	-3,57**	-3,16*	771595,94*	34	
CMS 47	4421g	4323	4453	0,16**	-2,01	-1,85	310843,02	27

As cultivares cujos nomes são seguidos das letras H são híbridos e os demais são variedades. \*e\*\* significativamente diferente da unidade, para  $b_1$  e  $b_1+b_2$ , e de zero, para  $b_2$ . Significativamente diferentes de zero, pelo teste F, para  $s_{2d}^2$ . Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

como a Sertanejo, São Francisco, Asa Branca, AL Alvorada, AL Ipiranga, dentre outras que apresentaram produtividades médias de grãos superiores à média das variedades, expressaram adaptabilidade ampla ( $b_1$ =unidade), constituindo-se em opções importantes para os diferentes sistemas de produção em execução na região, especialmente, para aqueles sistemas de produção praticados por pequenos e médios produtores rurais.

## Conclusões

1. Os híbridos mostram melhor adaptação que as variedades. Os que expressam adaptabilidade ampla, a exemplo dos Pioneer 30 F 44, Pioneer 30 F 90, DAS 8480, DAS 8460, AG 7000, BRS 1010, dentre outros, consubstanciam-se em alternativas importantes para a agricultura regional.

2. As variedades que mostram adaptabilidade ampla como a Sertanejo, São Francisco, Asa Branca, AL Alvorada, AL Ipiranga, dentre outras, têm importância fundamental para os sistemas de produção dos pequenos e médios produtores rurais.

## Literatura Citada

- ALLARD, R. W.; BRADSHAW, A. D. 1964. Implications of genotype environmental interactions in applied plant breeding. *Crop Science* 4 (5):503-508.
- ARIAS, E. R. A. 1996. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no Estado do Mato Grosso do Sul e avanço genético obtido no período de 1986/87 a 1993/94. Tese de Doutorado. Lavras, ESAL. 118p.
- CARDOSO, M. J. et al. 2001. Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de milho na Região Meio-Norte do Brasil no ano agrícola de 1999/2000. *Agrotrópica* (Brasil) 13 (2): 59-66.
- CARDOSO, M. J. et al. 2005. Comportamento fenotípico de cultivares de milho na Região Meio-Norte Brasileira. *Revista Ciência Agronômica* (Brasil) 36 (2): 181-188.
- CARDOSO, M. J. et al. 2003. Desempenho de híbridos de milho na Região Meio-Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* (Brasil) 2 (1): 43-52.
- CARDOSO, M. J. et al. 2004. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho em diferentes ambientes do Meio-Norte brasileiro. *Revista Ciência Agronômica* (Brasil) 35 (1): 68-75.
- CARNEIRO, P.C.S. 1998. Novas metodologias de análise de adaptabilidade e estabilidade de comportamento. Tese de Doutorado. Lavras, ESAL. 168p.
- CARVALHO, H.W.L. de. et al. 2002. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no nordeste brasileiro no triênio 1998 a 2000. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37 (11): 1581-1588.
- CARVALHO, H.W.L. de. et al. 2005. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40 (5): 471-477.
- CRUZ, C. D.; TORRES, R. A. de.; VENCOVSKY, R. 1989. An alternative approach to the stability analysis by Silva and Barreto. *Revista Brasileira de Genética* 12: 567- 580.
- DUARTE, J. P.; ZIMMERMANN, M. J. 1994. Adaptabilidade e estabilidade de rendimento de genótipos de feijoeiro comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29 (1): 25-32.
- GOMES, F. P. 1990. *Curso de estatística experimental*. 8 ed. São Paulo, Nobel. 450p.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos.; ZIMMERMANN, M. J. de O. 1993. Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicação no melhoramento do feijoeiro. Goiânia, Editora UFG.. pp.131-169. (Publicação, 120).
- RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F. 2000. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho avaliadas em diferentes condições ambientais do Estado de Minas Gerais. In: Reunion Latinoamericana del Maiz, 28, 2000, Sete Lagoas, MG. Memórias. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo; CIMMYT. pp.251-260.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos).1996. SAS/STAT user's Guide : version 6. 4. ed. Cary. v1.
- SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G. Pde.; CRUZ, C. D. 1995. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. . *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30 (5): 683-686.
- SILVA, F. B. R. de. et al. 1993. Zoneamento ecológico do Nordeste: diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA/EMBRAPA-CNPS, v.1.
- SOUZA, E. M. de. et al. 2004. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho nos Estados de Sergipe e Alagoas. *Revista Ciência Agronômica* (Brasil) 35 (1): 76-81.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. 1992. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 496p.

## ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS NA POPULAÇÃO DE MILHO CPATC-3 NO NORDESTE BRASILEIRO

*Hélio Wilson Lemos de Carvalho<sup>1</sup>, Manoel Xavier dos Santos<sup>2</sup>, Maria de Lourdes da Silva Leal<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, 49001-970, Aracaju, Sergipe, Brasil, e-mail: helio@cpatc.embrapa.br.  
<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, 49001-970, Aracaju, Sergipe, Brasil, e-mail:lurdinha@cpatc.embrapa.br.

<sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 152, 35701-970, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil

Três novos ciclos de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos foram praticados na população de milho CPATC-3, no Nordeste brasileiro, no período de 2002 a 2004, visando obter estimativas de parâmetros genéticos, para posterior verificação do comportamento da variabilidade genética em relação ao peso de espiga. Foram avaliadas 196 progênies de meios-irmãos em cada ciclo de seleção, em blocos ao acaso com duas repetições, realizando-se as recombinações das progênies selecionadas dentro do mesmo ano agrícola, de modo a obter um ciclo/ano. A variabilidade genética foi reduzida do ciclo II para o ciclo IV, mantendo-se constante no ciclo V. O ganho médio estimado por ciclo de seleção foi de 12,74% para o peso de espiga. A possibilidade de ganho em peso de espiga com a seleção, a alta variabilidade genética apresentada pela população e as elevadas médias de produtividade das progênies indicam o grande potencial dessa população na continuidade do programa de melhoramento de milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., progênies de meios-irmãos, variabilidade genética, melhoramento de plantas.

**Estimates of Genetic Parameters for ‘CPATC-3’ Maize Population in Northeast Region of Brazil.** Three new selection cycles of half-sib progenies of ‘CPATC-3’ maize were carried out from 2002 to 2004, in Northeast region of Brazil, aiming to determine estimates of genetic parameters as indicators of genetic variability for ear weight. It was evaluated 196 half-sib progenies in each selection cycle, using a randomized complete block design with two replications. The selected progenies were recombined in the same agricultural year in order to test one cycle per year. It was observed that the genetic variability was reduced from cycle II through cycle IV, but remained constant for cycle V. The estimated average gain per cycle was 12.74% of ear weight. The possibility of gain for ear weight with the selection, with the high genetic variability of the population, and with the high productivity averages of the progenies indicate the great genetic potential of this population for continuing the breeding program of maize.

**Key words:** *Zea mays* L., half-sib progenies, genetic variability, plant breeding.

## Introdução

O milho, no Nordeste brasileiro, é cultivado em cerca de três milhões de hectares, classificando-se entre os produtos agrícolas de importância para a região, em razão de sua participação na formação da renda agrícola, na ocupação de parcelas consideráveis da população rural, pela sua contribuição na alimentação humana e animal, onde entra como componente básico.

A produtividade de milho na região é baixa, em decorrência de sistemas de produção que utilizam pouca ou nenhuma tecnologia de produção, características dos pequenos e médios produtores rurais, das irregularidades climáticas, que provocam muitas vezes as frustrações de safras, da insuficiência de sementes selecionadas, de variedades melhoradas, dentre outras.

Existe, portanto, um grande mercado para variedades de milho no Nordeste brasileiro, as quais podem ser utilizadas nos diferentes sistemas de produção vigentes nas diferentes condições ambientais dessa ampla região, o que justifica a prioridade de se obter e difundir variedades de milho de melhor adaptação.

Sabe-se, no entanto, que uma das condições necessárias para alcançar sucesso com o melhoramento é a presença de variabilidade genética na população. Para detecção dessa variabilidade, tem sido utilizado com sucesso o método de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos (Paterniani, 1967). Esse método tem sido bastante usado no Brasil e no exterior e a sua grande vantagem é a possibilidade de obtenção da variância genética aditiva, tendo em vista os valiosos subsídios que fornece ao melhorista, uma vez que permite verificar quais as chances de êxito na seleção, e quais as alterações que podem ocorrer na variabilidade genética, no decorrer de sucessivos ciclos de seleção.

Trabalhos norte-americanos (Webel & Lonquist, 1967; Sentz, 1971; Compton & Bahadur, 1977) e brasileiros (Paterniani, 1968; Segóvia, 1976; Sawazaki, 1979; Pacheco, 1987; Carvalho et al., 2000a, 2000b, 2002 e 2003b) mostram a existência da variabilidade genética após sucessivos ciclos de seleção, e a presença de ganhos contínuos com o uso deste método.

O objetivo deste trabalho foi obter estimativas dos parâmetros genéticos da variedade de milho CPATC-3, submetidos a três ciclos de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos, no Nordeste brasileiro.

## Material e Métodos

Após realização dos ciclos original, I e II de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos na variedade

CPATC-3 (Carvalho et al., 2003a), foi obtido, de um campo de recombinação, 196 progênies de meios-irmãos, com base em boas características agronômicas de altura de planta e de espiga, resistência ao acamamento e quebranto do colmo, prolificidade, empalhamento, tipo e coloração de grãos e disposição das fileiras na espiga. A seguir, foram realizados mais três ciclos de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos, no decorrer dos anos agrícolas de 2002 (ciclo III, em Nossa Senhora das Dores), 2003 (ciclo IV em Nossa Senhora das Dores e Simão Dias) e 2004 (ciclo V, em Nossa Senhora das Dores).

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com duas repetições. Cada parcela constou de uma fileira de 5,0 m de comprimento, espaçadas de 0,80m e 0,40m entre covas dentro das fileiras. Foram colocadas três sementes por cova, deixando-se após o desbaste, duas plantas por cova. Após a realização dos ensaios, foi praticada uma intensidade de seleção de 10 % entre progênies. As progênies selecionadas foram recombinadas em lote isolado por despendoamento, onde foram selecionadas 196 novas progênies, correspondendo à intensidade de seleção de 10% dentro de progênies, no mesmo ano agrícola. Todos os ensaios e campos de recombinação receberam adubação de N e P, usando-se 80 kg/ha de N e 100 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, nas formas de uréia e superfosfato simples. Todo o fósforo e 1/3 do N foram aplicados por ocasião do plantio no fundo dos sulcos, e o restante do N, foi aplicado em cobertura, na quarta semana após o plantio. Na colheita foi tomado o peso de espigas de progénie, o qual foi ajustado para 15% de umidade. Não foi feita a correção para o estande em razão de as parcelas mostrarem número final de plantas bem próximo do ideal. Foi realizada, inicialmente, a análise de variância por local, obedecendo ao modelo em blocos ao acaso. Posteriormente, foi feita análise de variância conjunta, obedecendo ao critério de homogeneidade dos quadrados médios residuais. Os quadrados médios das análises de variância conjuntas foram ajustados para o nível de indivíduos, obtendo-se, assim, todas as estimativas nesse nível e expressas em (g/planta)<sup>2</sup>, conforme Vencovsky (1978). As estimativas da variância aditiva ( $\sigma^2_A$ ), da variância fenotípica nas próprias plantas ( $\sigma^2_P$ ) e entre médias de progênies ( $\sigma^2_F$ ), dos coeficientes de herdabilidade no sentido restrito nas médias de progênies ( $h^2_m$ ) e de plantas ( $h^2$ ) foram obtidas pelas seguintes expressões (Vencovsky & Barriga, 1992).

$$(\sigma^2_A) = 4 (\sigma^2_P)$$

$$(\sigma^2_F) = \sigma^2_P + \sigma^2_{pxl} + \sigma^2_e + \sigma^2_d,$$

$$(\sigma^2_F) = \sigma^2_P + \sigma^2_e/r + \sigma^2_d/n_r,$$

$$h^2_m = \sigma^2_P / (\sigma^2_F) \text{ e},$$

$$h^2 = \sigma^2_A / \sigma^2_F.$$

O índice de variação b foi determinado pela relação CVg/Cve, em que CVg= coeficiente de variação genotípica, e o CVe é o coeficiente ambiental.

O progresso esperado, quando se utiliza a seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos, dentro do mesmo ano agrícola , foi estimado pela fórmula:

$$Gs = K_1 \cdot \sigma_{p/}^2 / (\sigma_F^2) + K_2 \cdot (3/8) \sigma_A^2 / \sigma_d^2, \text{ em que,}$$

$K_1$ : diferencial de seleção estandardizado, que depende da intensidade de seleção entre progênies = 10 % (1,755);

$K_2$ : diferencial de seleção estandardizado, que depende da intensidade de seleção dentro de progênies = 10 % (1,755);

$\sigma_d$  : desvio-padrão fenotípico dentro de progênies de meios-irmãos .

Para cálculo dos ganhos considerou-se  $\sigma_d^2 = 10\sigma_e^2$  (Gardner, 1961).

## Resultados e Discussão

Os resultados das análises de variância apresentaram diferenças significativas ( $p<0,01$ ) entre as progênies, em todos os ciclos de seleção, o que evidencia a presença de variabilidade genética entre elas, quanto ao peso de espigas (Tabela 1). Esse fato, e o bom desempenho produtivo das progênies (Tabela 2), expressam a possibilidade de sucesso na seleção. Foi observado, também, no ciclo IV de seleção, efeito significativo da interação progênies x ambientes, o que mostra o comportamento diferenciado das progênies em face das oscilações ambientais. A importância dessa interação progênies x ambientes vem sendo verificada em trabalhos correlatos de melhoramento no Nordeste brasileiro, conforme destacam Carvalho et al.; (2000a, 2002 e 2003b). Os coeficientes de variação obtidos oscilaram de 12,54% a 15,86% e conferiram boa

Tabela 1 - Quadrados médios das análises de variância conjunta de pesos de espigas, em (g/planta)<sup>2</sup>, médias de produtividades (g/planta) e coeficientes de variação (%), nos ciclos III, IV e V da população de milho CPATC-3, no Nordeste brasileiro, de 2002 a 2004.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios		
		Ciclo III	Ciclo IV	Ciclo V
Progênies	195	1039,14**	649,56**	518,31**
Progênies x locais	195	-	568,41**	-
Erro médio	390	-	315,82	-
Erro	195	399,24	-	415,32
Média		159,30	112,04	142,28
C.V. (%)		12,54	15,86	14,32

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2 - Produtividade média da testemunha BR 106 e das progênies de milho avaliadas e selecionadas da população CPATC-3 nos ciclos de seleção III, IV e V, porcentagens médias das progênies avaliadas e selecionadas em relação à testemunha. Nordeste brasileiro, 2002 a 2004.

Ciclo	Material	Produtividade média (kg/ha)	Percentagem em relação à testemunha
III	BR 106	8120	100
	Progênies avaliadas	9120	112
	Progênies selecionadas	11168	137
	Amplitude de variação	4795 a 12677	
IV	BR 106	5857	100
	Progênies avaliadas	6448	110
	Progênies selecionadas	7657	131
	Amplitude de variação	4432 a 8179	
V	BR 106	6579	100
	Progênies avaliadas	7452	113
	Progênies selecionadas	8801	134
	Amplitude de variação	5075 a 9375	

precisão aos ensaios, conforme critérios adotados por Scapim et al., (1995), o que é bastante desejável, porque torna possível a obtenção de melhor resposta à seleção.

As progênies avaliadas apresentaram produtividade média de 7.382 kg/ha de espigas, o que evidencia boa adaptação da variedade CPATC-3 na região (Tabela 2). Essas progênies produziram +12%, +10% e +13%, em relação à variedade testemunha BR106, nos ciclos III, IV e V, respectivamente. Nesses respectivos ciclos, as progênies selecionadas superaram a testemunha BR 106 em 37%, 31% e 34%.

As estimativas dos parâmetros genéticos das populações-base nos ciclos III e V foram obtidas em um só ambiente, estando, portanto, influenciadas pela interação progênies x ambientes. Hallauer & Miranda Filho (1988) ressaltam que a avaliação de progênies em mais de um ambiente melhora a eficiência do processo seletivo e permite a obtenção de estimativas mais consistentes dos componentes da variância. As magnitudes dessas estimativas (Tabela 3) mostraram queda da variabilidade genética do ciclo III para o ciclo IV, sendo essa redução significativa, em razão das avaliações das progênies do ciclo IV terem sido realizadas em dois ambientes, ficando menos influenciadas pela interação progênies x ambientes. Decréscimos da variabilidade no decorrer de ciclos de seleção têm sido destacados por diversos autores em trabalhos envolvendo progênies de meios-irmãos (Santos & Naspolini Filho, 1986; Carvalho et al., 2002 e 2003b). Do ciclo IV para o ciclo V foi observado pequeno acréscimo da variabilidade. Incrementos na variabilidade genética no decorrer de ciclos de seleção têm sido descritos por Segóvia (1976) e Sawazaki (1979). Para o primeiro autor, o acréscimo da variabilidade observado a

partir do ciclo IV de seleção com a variedade Centralmex pode ter ocorrido principalmente em razão do maior número de progênies selecionadas em cada ciclo, e à modalidade de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos, que foi de um ciclo a cada dois anos. Para Sawazaki (1979), os incrementos registrados nos ciclos XI, XII e XIII, com progênies da variedade IAC-Maia, deveu-se à introdução de algumas linhagens. No entanto, supõe-se que o acréscimo verificado no ciclo VII com a IAC-Maia foi causado pela liberação de razoável quantidade de variabilidade potencial. No presente trabalho, supõe-se que o acréscimo ocorrido do ciclo IV para o ciclo V com a variedade CPATC-3 tenha ocorrido em consequência da liberação de parte da variabilidade genética potencial, a exemplo do constatado por Carvalho et al., (2000), com a população CMS 453, do ciclo I para o ciclo II e com a população CMS 35 (Carvalho et al., 2002), do ciclo II para o ciclo III.

As estimativas da variância genética entre progênies foram coerentes com as registradas por Carvalho et al., (1998, 2000a e 2003b) e estão dentro do limite do levantamento realizado por Ramalho (1977), envolvendo diversas populações de milho brasileiras e, expressam a variabilidade genética presente na variedade CPATC-3. Verificou-se, também, que a variação detectada na variância genética aditiva acompanhou a variação mostrada para a variância genética entre progênies. As reduções nas estimativas dessa variância nos ciclos IV e V já eram esperadas em razão da exploração da variabilidade livre no ciclo inicial, conforme ressaltam Weibel & Lonquist (1967) e Paterniani (1967 e 1968). Segundo Paterniani (1968) é de interesse que a variância genética aditiva permaneça tão alta quanto possível, para

Tabela 3 - Estimativas dos parâmetros genéticos do caráter peso de espigas (g/planta)<sup>2</sup> da população CPATC-3. Nordeste brasileiro, 2002 a 2004.

Parâmetros genéticos	Ciclo III	Ciclo IV	Ciclo V
$\sigma_p^2$ (g/planta) <sup>2</sup>	319,95	40,57	51,49
$\sigma_A^2$ (g/planta) <sup>2</sup>	1279,00	162,28	205,96
$\sigma_{pxl}^2$ (g/planta) <sup>2</sup>	-	126,29	-
$h_m^2$	61,58	24,98	19,86
$h^2$	37,98	6,26	6,66
C. V <sub>g</sub> (%)	11,22	5,68	5,04
B	0,90	0,35	0,35
Gs entre (g/planta)	24,64	5,58	5,60
Gs entre (%)	15,46	4,98	3,93
Gs dentro (g/planta)	16,02	2,28	2,55
Gs dentro (%)	10,04	2,03	1,79
Gs total (%)	25,50	7,01	5,72

$\sigma_p^2$  : variância genética entre progênies;  $\sigma_A^2$  : variância genética aditiva;

$\sigma_{pxl}^2$  : variância da interação progênies x locais;  $h_m^2$  : coeficiente de herdabilidade no sentido restrito considerando as médias de progênies;  $h^2$  : coeficiente de herdabilidade no sentido restrito considerando o indivíduo; C.V.g: coeficiente de variação genética; b: índice de variação; Gs: ganhos entre e dentro de progênies de meios-irmãos; Gs: ganho total por ciclo /ano.

permitir a obtenção de ganhos substanciais por seleção. De acordo com o referido autor, esse método de seleção reduz muito essa variância, sobretudo, no primeiro ciclo de seleção, apesar de mesmo ocorrendo redução, terem sido observados ganhos satisfatórios, a exemplo dos relatados por Pacheco, (1987), Santos & Naspolini Filho (1986) e Carvalho et al., (2000b e 2003b).

Os valores dos coeficientes de herdabilidade no sentido restrito com média de progênies de meios-irmãos ( $h_m^2$ ) superaram as obtidas nas próprias plantas ( $h^2$ ), em todos os ciclos de seleção (Tabela 3). Esse fato indica que a variação genética existente entre indivíduos meios-irmãos é grande em relação à variância fenotípica, o que está de acordo com os relatos de Santos et al, (1998) e Carvalho et al., (2002 e 2003a), sendo os valores mais altos encontrados quando a seleção foi realizada em um só ambiente. Os valores dos coeficientes de variação genéticos mostraram que as progênies dos ciclos III, IV e V apresentaram variabilidade. Os coeficientes b retrataram condição mais favorável para a seleção no âmbito local. A finalidade principal do índice b, segundo Vencovsky (1987), é indicar se determinado material, numa dada fase de avaliação, se presta à seleção. De acordo com o autor, uma situação mais favorável para a seleção de progênies de milho é quando a estimativa de b apresenta valor próximo ou superior à unidade.

Os ganhos estimados com a seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos foram de 15,46% e 10,04%, totalizando 25,50%, no ciclo III; 4,98% e 2,03%, totalizando 7,01, no ciclo IV e 3,93% e 1,79%, totalizando 5,72%, no ciclo V, com média de 12,74%, por ciclo/ano e da mesma magnitude que os ganhos registrados por Carvalho et al., (2002, 2003a e 2003b). Tais resultados confirmam o potencial genético da variedade CPATC-3 em responder à seleção para aumento da produtividade de espigas.

## Conclusão

As médias de produtividades de espigas e as magnitudes dos parâmetros genéticos das progênies evidenciam que a população CPATC-3 detém alta variabilidade genética.

## Literatura Citada

- CARVALHO, H.W.L. de; LEAL, M. de L. da S.; SANTOS, M.X. dos. 2002. Estimativas de parâmetros genéticos na população de milho CMS 35 no Estado de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37 (10): 1399-1405.
- CARVALHO, H. W. L de.; PACHECO, C. A.P.; SANTOS, M. X. dos.; GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R. 1998. Três ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos na população de milho BR 5011 no Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35 ( 5):713-720.
- CARVALHO, H.W.L. de; SANTOS, M. X. dos, LEAL, M. de L. da S.; SOUZA, E. M. de. 2003b. Estimativas dos parâmetros genéticos de variedades de milho BR 5028-São Francisco no Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38 (8): 929-935.
- CARVALHO, H.W.L. de; LEAL, M. de L. da S.; SANTOS, M. X. dos SOUZA, E. M. de. 2003a. Estimativas dos parâmetros genéticos na população de milho CPATC-3 em dois locais de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38 (1): 73-78.
- CARVALHO, H.W.L. de; SANTOS, M.X. dos; LEAL, M. de L. da S.; CARVALHO, P.C.L. de. 2000b. Melhoramento genético da cultivar de milho BR 5033-Asa Branca no Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(7):1417-1425.
- CARVALHO, H.W.L. de; LEAL, M. de L. da S.; SANTOS, M.X. dos; PACHECO, C.A.P. 2000a. Potencial genético da cultivar de milho BR 5011-Sertanejo nos tabuleiros costeiros do nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35 (6):1169-1176.
- COMPTON, W. A.; BAHADUR, K. 1977. Ten cycles of progress from modified ear-to-row selection in corn. *Crop Science* 17: 378-380.
- GARDNER, C.O. 1961. An evolution of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. *Crop Science* 1:241-245.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J. B. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. 2. Ed. Ames: Iowa, State University Press. 468p.
- PACHECO, C.A. P. 1987. Avaliação de progênies de meios -irmãos na população de milho CMS 39 em diferentes condições de ambiente- 2º de seleção. Dissertação de Mestrado. Lavras, ESAL. 109p.
- PATERNIANI, E. 1968. Avaliação de métodos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos no melhoramento de milho (*Zea mays L*). Dissertação de Mestrado. Piracicaba, ESALQ. 92p.
- PATERNIANI,E. 1967. Selection among and within half-sib families in a Brazilian population of maize (*Zea mays L*). *Crop Science* 7 (3): 212-216.

- RAMALHO, M. A. P. 1977. Eficiência relativa de alguns processos de seleção intrapopulacional no milho baseados em famílias não endógamas. Dissertação Mestrado. Piracicaba, ESALQ. 122p.
- SANTOS, M. X. dos. et al. 1998. Melhoramento intrapopulacional no sintético elite NT para solo pobre em nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira 33 (1): 55-61.
- SANTOS, M. X dos.; NASPOLINI FILHO. W.. 1986. Estimativas de parâmetros genéticos em três ciclos de seleção entre e dentro de progêniens de meios-irmãos no milho (*Zea mays L*) Dentado Composto Nordeste. Revista Brasileira de Genética 9 (2): 307-3019.
- SAWAZAKI, E. 1979. Treze ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos para a produção de grãos no milho IAC Maia. Dissertação Mestrado. Piracicaba, ESALQ. 99p.
- SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G. P de.; CRUZ, C. D. 1995. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira 30 (5): 683-686.
- SEGOVIA, R.T. 1976. Seis ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos no milho (*Zea mays L*) Centralmex. Tese de Doutorado. Piracicaba, ESALQ. 98p.
- SENTZ, J.C. 1971. Genetics variances in a synthetic variety of maize estimated by two matting design. Crop Science 11: 234-238.
- VENCOVSKY. R. 1987. Herança quantitativa. In: Paterniani, E; Viegas, G. P. Melhoramento e produção do milho. 2 ed. Campinas, Fundação Cargill. pp. 137-214.
- VENCOVSKY, R. 1978. Herança quantitativa . In: Paterniani, E. ed. Melhoramento e produção do milho no Brasil. Piracicaba: ESALQ. pp. 122-201.
- VENCOVSKY. R.; BARRIGA, P. 1992. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 496p.
- WEBEL, O.D.; LONQUIST, J.H. 1967. An evalution of modified ear - to-row selection in a population of corn (*Zea mays L*). Crop Science 7: 651-655.



## COMPATIBILIDADE SOMÁTICA ENTRE ISOLADOS DE *Crinipellis perniciosa* ORIGINÁRIOS DA REGIÃO CACAUERA DA BAHIA

*Marival Lopes de Oliveira, Karina Peres Gramacho, Valdívnia Reis da Silva*

CEPLAC, Centro de Pesquisas do Cacau, Seção de Fitopatologia, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.  
E-mail: marival@cepec.gov.br.

*Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacaueiro, permaneceu confinado à região amazônica até 1989, quando foi assinalado pela primeira vez no sul da Bahia. Em função das condições ambientais favoráveis disseminou-se, rapidamente, já estando presente em todos os municípios. Visando conhecer a diversidade genética do fungo na região cacauera da Bahia, foram efetuadas amostragens, coletas e isolamentos de materiais infectados nos diferentes agrossistemas produtores de cacau, ficando estabelecida uma coleção de 629 isolados. O presente trabalho apresenta resultados de estudos de compatibilidade somática entre 135 deles. Na realização dos testes, discos de micélio foram pareados em placas de petri contendo meio de batata-dextrose-agar (BDA), a uma distância de dois centímetros um do outro, obedecendo a um arranjo 4 x 4, o que permitiu a avaliação simultânea de 16 combinações de isolados numa mesma placa. As análises revelaram a existência de, pelo menos, três grupos de compatibilidade, denominados aleatoriamente de A, B, e C. Do conjunto de isolados testados, 67 pertenciam ao grupo A, 66 ao grupo B, e 2 ao grupo C. Ao se analisar os dados por agrossistema foi observada a seguinte distribuição: Agrossistema Almada: 64,52% grupo A e 34,48% grupo B; Agrossistema Camacã: 90% grupo A e 10% grupo B; Agrossistema Canavieiras: 75% grupo A e 25% grupo B; Agrossistema Caravelas: 50% grupo A e 50% grupo B; Agrossistema Ibicuí: 62,5% grupo A e 37,50% grupo B; Agrossistema Ipiaú: 23,53% grupo A, 70,59% grupo B e 5,88% grupo C; Agrossistema Itamarajú: 100% grupo A; Agrossistema Jiquiriçá: 30% grupo A e 70% grupo B; Agrossistema Medeiros Neto: 100% grupo A; Agrossistema Porto Seguro: 100% grupo A; Agrossistema Recôncavo: 57,14% grupo A e 42,86 grupo B; Agrossistema Valença: 22,22% grupo A, 75% grupo B e 2,78% grupo C. Quando se efetuou a análise, por município, observou-se a predominância do grupo A em localidades situadas mais ao sul da região cacauera, tomando como referência os municípios de Ilhéus e Itabuna, enquanto o grupo B esteve mais presente naquelas situadas ao norte. O grupo C, por sua vez, só foi encontrado em dois municípios ao norte: Valença e Jequié, cada um com um isolado.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, vassoura-de-bruxa, agrossistemas, variabilidade.

**Somatic compatibility among isolates of *Crinipellis perniciosa* from the cacao-growing region of Bahia, Brazil.** *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, remained confined to the Amazonian basin until 1989, when it was registered, for the first time, in the main cocoa growing region of Brazil, the southern of Bahia. As a consequence of the favorable environmental conditions, the fungus disseminated quickly, being already present basically in all the counties of the region. In order to study the genetic diversity of the fungus in the region, sampling and isolations were performed using infected materials obtained from the different cacao growing agro-systems of the southern Bahia, resulting in an initial collection of 629 isolates. The work reported here presents results on the somatic compatibility on a set of 135 isolates. In the assay's accomplishment, 5-mm-diameter disks were taken from the margins of 8- to 10-day-old colonies grown on potato-dextrose-agar (PDA) and placed 2,0 cm apart in a 4 x 4 grid pattern, in 100-mm-diameter petri dishes containing PDA, so that, 16 combinations of isolates could be examined, simultaneously, in the same plate. The results of the assays have shown the existence of, at least, three groups of somatic compatibility: A, B, and C. Out of the 135 isolates evaluated, 67 belonged to the group A, 66 to the group B, and 2 to the group C. When an analysis by agro-system was performed, the following distribution of the isolates for each group was observed: Almada agro-system: 64.52% belonged to group A and 34.48% to the group B; Camacã agro-system: 90% belonged to the group A and 10% to the group B; Canavieiras agro-system: 75% belonged to the group A and 25% to the group B; Caravelas agro-system: 50% belonged to the group A and 50% to the group B; Ibicuí agro-system: 62.5% belonged to the group A and 37.50% to the group B; Ipiaú agro-system: 23.53% belonged to the group A, 70.59% to the group B and 5.88% to the group C; Itamaraju agro-system: 100% belonged to the group A; Jiquiriçá agro-system: 30% belonged to the group A and 70% to the group B; Medeiros Neto agro-system: 100% belonged to the group A; Porto Seguro agro-system: 100% belonged to the group A; Reconcavo agro-system: 57.14% belonged to the group A and 42.86 to the group B; Valença agro-system: 22.22% belonged to the group A, 75% to the group B and 2.78% to the group C. Similarly, the analysis by municipality has shown the predominance of the group A in localities at the southern of the region, taking as reference the counties of Ilheus and Itabuna, while the group B was predominant in those locations at the northern part. The group C, on the other hand, was only found in two localities in the northern region: the municipalities of Valença and Jequié, each one having one isolate.

**Key words:** *Theobroma cacao*, witches' broom disease, agro-systems, variability.

## Introdução

A vassoura-de-bruxa (VB) é uma das mais importantes doenças do cacau (Theobroma cacao L.) causando perdas expressivas na produção em algumas situações (Evans, 1981; Evans & Bastos, 1981; Bastos, 1988). No Brasil, a doença esteve confinada à bacia Amazônica até 1989, quando foi assinalada, pela primeira vez, na região sul da Bahia (Pereira *et al.*, 1989). Ao encontrar condições favoráveis disseminou-se, rapidamente, atingindo em pouco tempo todos os municípios, estando presente, inclusive, no estado do Espírito Santo.

*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, seu agente causal, é um fungo da classe dos Basidiomicetos, família Tricholomataceae, que apresenta ciclo de vida dividido em duas fases: a parasítica ou biotrófica que é constituída pelo micélio monocariótico, sem gramos de conexão, com crescimento intercelular e diâmetro mais espesso (4 - 20 mm) que o da fase saprofítica (1,5 - 3,0 mm), que ao contrário, possui gramos de conexão podendo crescer tanto inter- quanto intracelularmente (Evans, 1980, 1981; McGahey & Wheeler, 1988).

Diversidade genética entre populações do fungo tem sido detectada através de critérios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, testes de compatibilidade somática, ou ainda com base nos sintomas apresentados por cultivares de cacau e outras espécies de *Theobroma* (Wheeler & Mepsted, 1982; Andebrhan & Almeida, 1984; Andebrhan, 1985, 1988; Andebrhan & Bastos, 1985; Hedger *et al.*, 1987; Wheeler & Mepsted, 1988; Bastos *et al.*, 1988; McGahey & Wheeler, 1988; Oliveira & Luz, 2005). Mesmo em relação a patogenicidade tem sido observada variação entre populações do fungo, até quando isolados originários do próprio cacau são comparados (Bartley, 1977; Evans, 1978; Evans & Bastos, 1980; Andebrhan & Fonseca, 1982; Wheeler & Mepsted, 1982, 1988; Rocha, 1983; Bastos & Evans, 1985; Bastos, 1986).

Métodos moleculares, como as análises de RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Andebrhan & Furtek, 1994; Andebrhan *et al.*, 1999), RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Gebhardt & Salamini, 1992), PCR de DNA repetitivo (Jarret *et al.*, 1993; Khashnobish & Shearer, 1996), além de isoenzimas (Yamada & Oliveira, 2000; Oliveira *et al.*, 2003b) tem sido utilizados, com freqüência, na identificação de variantes genéticos na espécie. Eletroforese em gel de amido de isoenzimas é uma técnica amplamente empregada na determinação de variabilidade entre locos de enzimas, principalmente, na detecção de polimorfismo genético em plantas e em uma gama de microorganismos, embora, pouco utilizada com o fungo *C. perniciosa* (Andebrhan & Furtek, 1994), apesar de Oliveira *et al.*

(2003b) terem mostrado, recentemente, sua utilidade na detecção de variação entre populações do fungo presentes no sul da Bahia.

Variabilidade genética já foi detectada, inclusive, com base no círculo de hospedeiros, tendo sido reconhecido quatro biótipos do fungo: biótipo-C, ocorrendo em espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*; biótipo-S, em solanáceas; biótipo-L, em liana (*Entada gigas* (L.) Falc. & Rendle e *Arrabidaea verrucosa* (Família Bignoniacae) podendo ainda colonizar, de forma saprofítica, uma variedade de substratos; e biótipo-B, infectando *Bixa orellana* (Baker & Holliday, 1957; Thorold, 1975; Evans, 1978; Bastos & Evans, 1985; Bastos & Andebrhan, 1986; Hedger *et al.*, 1987; Bastos *et al.*, 1988; Griffith, 1989).

Com o objetivo de estudar a variabilidade do fungo *C. perniciosa* na região sul da Bahia, foram efetuadas amostragens representativas dos diferentes agrossistemas produtores de cacau, ficando estabelecida uma coleção inicial de 629 isolados. O presente trabalho apresenta resultados dos estudos de compatibilidade somática entre 135 deles, mostrando a utilidade da técnica como uma ferramenta adicional na detecção de diferenças intraespécificas entre populações do fungo, a fim de fornecer subsídio aos programas de melhoramento genético do cacau visando resistência à vassoura-de-bruxa. Parte deste trabalho foi publicada previamente (Oliveira *et al.*, 2003a).

## Material e Métodos

Visando o estabelecimento de uma coleção de isolados do fungo *C. perniciosa* que fosse representativa dos diferentes agrossistemas produtores de cacau do sul da Bahia, foram realizadas amostragens, coletas e isolamentos em meio de batata-dextrose-agar (BDA), utilizando-se frutos infectados e vassoura vegetativas, provenientes dos principais municípios produtores, com a finalidade de estudar a diversidade genética do fungo na região.

Durante as coletas procurou-se adotar padrões de amostragens que levassem em consideração a importância do município como produtor de cacau na definição do número de amostras e fazendas a serem amostradas. Assim, as coletas foram distribuídas por propriedades situadas em pontos, os mais equidistantes e estratégicos possíveis, considerando-se a maior ou menor importância da micro-região como produtora de cacau no município.

Em função do grande número de isolados obtidos, 639, houve necessidade de se estabelecer uma sub-

coleção de trabalho, constituída de 135 indivíduos, que mantivesse a representatividade dos diversos municípios e agrossistemas.

Na realização dos ensaios, discos de micélio de três milímetros de diâmetro, obtidos das margens de colônias com oito a dez dias de crescimento em meio de BDA, foram pareados em placas de petri contendo o mesmo meio de cultura, a uma distância de dois centímetros um do outro e obedecendo a um arranjo 4 x 4, o que permitiu a avaliação simultânea de 16 combinações de isolados por placa.

Após a inoculação as placas foram seladas com Parafilm®, a fim de se evitar dessecamento, e incubadas a 25 °C, no escuro, até que as colônias entrassem em contato e que fosse possível a visualização de reações de antagonismo entre elas. Cada ensaio foi repetido pelo menos uma vez.

Na caracterização das reações entre as diferentes combinações de isolados e visando a geração de matrizes de dados para a análise, foram considerados os seguintes critérios de avaliação: para as reações de compatibilidade envolvendo o crescimento micelial sem qualquer tipo de antagonismo entre eles, adotou-se o valor 1 (um), enquanto naquelas de incompatibilidade com a formação de linhas de precipitação e de outras formas de antagonismo, como paralisação no crescimento sem o contato entre isolados, o valor 0 (zero). Os resultados foram analisados e os isolados ordenados em grupos utilizando-se o programa estatístico SAS.

## Resultados e Discussão

Matrizes de dados correspondentes aos três ensaios envolvendo todas as combinações possíveis entre os 135 isolados avaliados foram geradas e utilizadas nas análises. A indicação de antagonismo mútuo entre eles foi caracterizada pelo surgimento de linhas de precipitação entre as colônias, muitas vezes associada ao aparecimento de pigmentação escura. Outras vezes, no entanto, só a paralisação no crescimento era observada, sem que se notasse qualquer outra reação de antagonismo. A despeito de em algumas situações terem sido constatadas inconsistências, três grupos de compatibilidade puderam ser caracterizados analisando-se todo o conjunto de isolados. Tais grupos foram denominados, aleatoriamente, de grupos A, B e C. Indivíduos pertencentes a cada grupo eram caracterizados por apresentar reações de compatibilidade entre si, mas de incompatibilidade com os dos outros dois grupos. Do total de indivíduos avaliados, 67 pertenciam ao grupo A, 66 ao grupo B e 2 ao grupo C (Tabela 1). A existência de diferentes genótipos

em populações de espécies de fungos basidiomicetos, que podem ser detectados através de testes de compatibilidade somática, é bem conhecida (Todd & Rayner, 1980; Lane, 1981, McGarry & Wheeler, 1988). Wheeler e Mepsted (1982) utilizando essa técnica demonstraram a existência de genótipos diferentes em populações de *C. perniciosa* originárias de países da América do Sul e Caribe que podiam ser separadas também geograficamente.

Ao se efetuar a análise dos dados por agrossistema foi observada a seguinte distribuição em termos de prevalência para os três grupos de compatibilidade (Tabela 2): Agrossistema Almada: 64,52% pertenciam ao grupo A e 34,48% grupo B; Agrossistema Camacã: 90% grupo A e 10% grupo B; Agrossistema Canavieiras: 75% grupo A e 25% grupo B; Agrossistema Caravelas: 50% grupo A e 50% grupo B; Agrossistema Ibicuí: 62,50% grupo A e 37,50% grupo B; Agrossistema Ipiaú: 23,53% grupo A, 70,59% grupo B e 5,88% grupo C; Agrossistema Itamarajú: 100% grupo A; Agrossistema Jiquiriçá: 30% grupo A e 70% grupo B; Agrossistema Medeiros Neto: 100% grupo A; Agrossistema Porto Seguro: 100% grupo A; Agrossistema Recôncavo: 57,14% grupo A e 42,86 grupo B; Agrossistema Valença: 22,22% grupo A, 75% grupo B e 2,78% grupo C.

Na Tabela 3 são apresentados resultados de uma análise similar levando-se em consideração a distribuição dos grupos de compatibilidade por município. De um modo geral, apesar do número de isolados por município ter sido baixo, os três grupos apresentaram a seguinte distribuição: grupo A, compreendendo indivíduos oriundos, com poucas exceções, de municípios localizados ao sul da região cacauíra da Bahia, tomando como referencial os municípios de Ilhéus e Itabuna; o grupo B constituído, predominantemente, por isolados provenientes da região mais ao norte; e o grupo C, representado por apenas dois isolados, ficou restrito aos municípios de Valença e Jequié, situados também mais ao norte da região (Figura 1).

Os resultados obtidos neste trabalho embora de difícil correlação com aqueles relatados na literatura utilizando-se outros critérios, guardam alguma semelhança com os descritos por Andebrhan *et al.* (1999) empregando a análise de RAPD. Estudando um total de 46 isolados, provenientes da região cacauíra da Bahia, os autores distinguiram dois grupos principais: o grupo G1, constituído por indivíduos procedentes de áreas mais ao sul, e o grupo G2, por isolados oriundos de áreas ao norte da região. À semelhança das conclusões tiradas por McGarry e Wheeler (1988), os resultados aqui obtidos vêm demonstrar, mais uma vez, a utilidade dos testes de compatibilidade na caracterização da diversidade

Tabela 1. Resultados dos testes entre isolados de *Crinipellis perniciosa* ordenados por grupos de compatibilidade

Isolado	Agossistema	Município	Grupo de compatibilidade	Tipo de tecido <sup>a</sup>
600	Almada	São José da Vitória	A	V
606	Almada	Itabuna	A	V
607	Almada	Buerarema	A	F
612	Almada	Ilhéus	A	F
613	Almada	Itabuna	A	V
614	Almada	Lomanto Júnior	A	F
619	Almada	Itabuna	A	V
620	Almada	Itabuna	A	F
623	Almada	Coarací	A	F
626	Almada	Coarací	A	F
631	Almada	Ibicaraí	A	F
634	Almada	Ibicaraí	A	F
655	Almada	Uruçuca	A	F
664	Camacã	Arataca	A	V
675	Almada	Floresta Azul	A	V
679	Almada	Floresta Azul	A	V
680	Almada	Floresta Azul	A	F
696	Camacã	Camacã	A	F
699	Camacã	Camacã	A	V
700	Camacã	Camacã	A	F
703	Medeiros Neto	Itahem	A	V
719	Camacã	Pau Brasil	A	V
723	Camacã	Pau Brasil	A	V
730	Almada	Ilhéus	A	F
734	Almada	Ilhéus	A	F
750	Almada	Ilhéus	A	F
781	Ibucuí	Itororó	A	V
788	Ibucuí	Caatiba	A	F
796	Ibucuí	Ibucuí	A	F
805	Camacã	Santa Luzia	A	V
823	Camacã	Mascote	A	V
824	Camacã	Mascote	A	F
834	Ipiaú	Barra do Rocha	A	F
847	Ipiaú	Itagi	A	V
871	Ipiaú	Ibirataia	A	V
892	Ipiaú	Ipiaú	A	F
938	Canavieiras	Belmonte	A	F
973	Jiquiriçá	Wenceslau Guimarães	A	V
1010	Valença	Taperoá	A	F
1020	Valença	Ituberá	A	F
1040	Valença	Camamú	A	F
1060	Valença	Camamú	A	F
1065	Porto Seguro	Porto Seguro	A	V
1067	Porto Seguro	Eunápolis	A	V
1068	Porto Seguro	Eunápolis	A	F
1073	Canavieiras	Canavieiras	A	V
1084	Canavieiras	Canavieiras	A	F
1085	Valença	Una	A	V
1086	Valença	Una	A	F
1111	Ibucuí	Santa Cruz da Vitória	A	V
1115	Ibucuí	Potiraguá	A	V
1139	Valença	Maraú	A	V
1150	Valença	Itacaré	A	F
1159	Jiquiriçá	Ubaíra	A	V
1163	Jiquiriçá	Cravolância	A	V
1171	Recôncavo	Santo Antônio de Jesus	A	V
1181	Recôncavo	Santo Amaro	A	V
1182	Recôncavo	Santo Amaro	A	F
1187	Caravelas	Nova Viçosa	A	V
1192	Almada	Itabuna	A	F
1209	Itamarajú	Itamarajú	A	V
1210	Itamarajú	Itamarajú	A	F
1215	Itamarajú	Jucuruçú	A	V
1216	Itamarajú	Jucuruçú	A	F
1217	Itamarajú	Guaratinga	A	V
1222	Porto Seguro	Cabrália	A	F
1304	Recôncavo	Nazaré das Farinhas	A	F

<sup>a</sup> V = Vassouras; F= Frutos.

(Continuação) Tabela 1

Isolado	Agrossistema	Município	Grupo de compatibilidade	Tipo de tecido <sup>a</sup>
625	Almada	Almadina	B	V
635	Almada	Itajuipe	B	V
641	Almada	Itajuipe	B	V
652	Almada	Uruçuca	B	V
653	Almada	Uruçuca	B	F
658	Almada	Uruçuca	B	V
659	Almada	Uruçuca	B	V
681	Almada	Almadina	B	V
733	Almada	Ilhéus	B	V
763	Ibicuí	Itapitanga	B	V
764	Ibicuí	Itaptanga	B	F
772	Almada	Ilhéus	B	F
800	Camacá	Santa Luzia	B	F
826	Ipiaú	Gongogi	B	F
840	Ipiaú	Ibiraptanga	B	F
851	Ipiaú	Jitauna	B	V
866	Ipiaú	Ibirataia	B	F
881	Ipiaú	Nova Ibiá	B	V
882	Ipiaú	Nova Ibiá	B	F
893	Canavieiras	Belmonte	B	V
895	Jiquiriçá	Jiquiriçá	B	V
896	Jiquiriçá	Jaguaqua	B	F
910	Ipiaú	Aiquara	B	F
911	Ipiaú	Aiquara	B	V
932	Ibicuí	Dário Meira	B	F
941	Jiquiriçá	Teolândia	B	V
942	Jiquiriçá	Teolândia	B	F
945	Jiquiriçá	Ubaíra	B	V
954	Jiquiriçá	Teolândia	B	F
955	Valença	Taperoá	B	V
956	Valença	Taperoá	B	F
957	Valença	Valença	B	V
958	Valença	Valença	B	F
961	Valença	Tancredo Neves	B	V
962	Valença	Tancredo Neves	B	F
982	Valença	Piraí do Norte	B	F
992	Valença	Valença	B	F
995	Valença	Valença	B	V
1002	Valença	Nilo Peçanha	B	F
1007	Valença	Nilo Peçanha	B	V
1008	Valença	Nilo Peçanha	B	F
1015	Valença	Taperoá	B	V
1016	Valença	Taperoá	B	F
1018	Valença	Valença	B	F
1025	Valença	Ituberá	B	V
1027	Valença	Camamú	B	V
1033	Valença	Camamú	B	V
1047	Valença	Camamú	B	V
1121	Valença	Itacaré	B	V
1122	Valença	Itacaré	B	F
1123	Ipiaú	Aurelino Leal	B	V
1124	Ipiaú	Aurelino Leal	B	F
1129	Valença	Maraú	B	V
1130	Valença	Maraú	B	F
1140	Valença	Maraú	B	F
1143	Ipiaú	Ubaitaba	B	V
1144	Ipiaú	Ubaitaba	B	F
1149	Valença	Itacaré	B	V
1155	Valença	Itacaré	B	V
1164	Jiquiriçá	Cravolândia	B	F
1173	Recôncavo	São Miguel da Mata	B	V
1179	Recôncavo	Conde	B	V
1188	Caravela	Nova Viçosa	B	F
1193	Almada	Itabuna	B	V
1302	Valença	Aratuípe	B	F
1305	Recôncavo	Muniz Ferreira	B	V
915	Ipiaú	Jequié	C	V
1017	Valença	Valença	C	V

<sup>a</sup> V = Vassouras; F= Frutos.

Tabela 2. Distribuição dos grupos de compatibilidade, entre isolados de *Crinipellis perniciosa*, por agrossistemas produtor de cacau do sul da Bahia

Agrossistema	Números e percentuais de isolados por grupo						Total de isolados	
	A		B		C			
	Número	%	Número	%	Número	%		
Almada	20	64,52	11	35,48	0	0	31	
Camacã	9	90	1	10	0	0	10	
Canavieiras	3	75	1	25	0	0	4	
Caravelas	1	50	1	50	0	0	2	
Ibicuí	5	62,5	3	37,5	0	0	8	
Ipiaú	4	23,53	12	70,59	1	5,88	17	
Itamaráu	5	100	0	0	0	0	5	
Jiquiriçá	3	30	7	70	0	0	10	
Medeiros Neto	1	100	0	0	0	0	1	
Porto Seguro	4	100	0	0	0	0	4	
Recôncavo	4	57,14	3	42,86	0	0	7	
Valença	8	22,22	27	75	1	2,78	36	

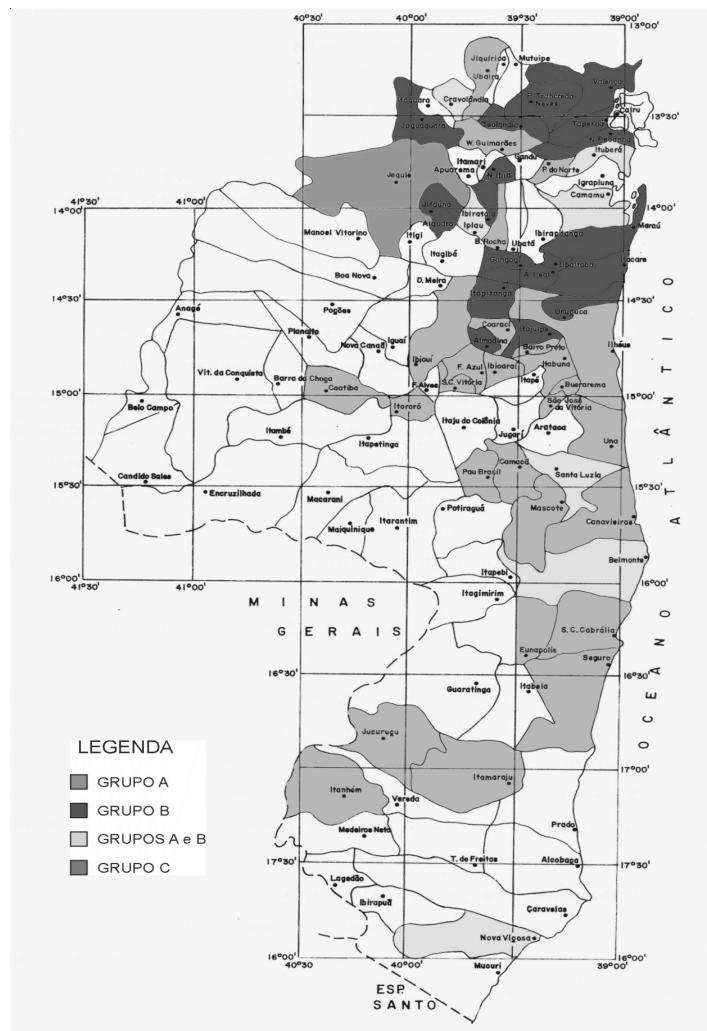


Figura 1. Distribuição dos grupos de compatibilidade somática, entre isolados de *Crinipellis perniciosa*, por município do sul da Bahia.

genética entre isolados de *C. perniciosa* originários da região sul da Bahia, pelo menos no que se refere ao estabelecimento de agrupamentos mais amplos envolvendo indivíduos de diferentes hospedeiros ou origens. Compatibilidade somática quando associada a outras técnicas já utilizadas (Andebrhan, 1988), poderia melhorar as possibilidades de serem estabelecidas diferenças mais consistentes entre variantes do fungo, até mesmo entre indivíduos procedentes de uma única localidade (McGeary & Wheeler, 1988).

Mesmo com a demonstração da utilidade da técnica na caracterização da variabilidade do patógeno, ainda poderiam existir dúvidas se as diferenças estabelecidas neste trabalho guardariam ou não alguma correlação com possíveis diferenças em termos de patogenicidade entre os isolados, fato que seria da grande importância durante avaliações de genótipos de cacau com resistência a *C. perniciosa*, como enfatizaram Wheeler e Mepsted (1988). Dentro de tal enfoque, McGeary e Wheeler (1988) constataram que os resultados dos testes de compatibilidade somática e de taxa de crescimento do fungo em meios de cultura não eram conflitantes com aqueles obtidos em ensaios de patogenicidade, sugerindo que tais testes poderiam constituir-se em ferramentas mais sensíveis na determinação de variantes genéticos entre populações do fungo, podendo ainda ser útil na definição, por exemplo, do número de isolados que deveriam ser utilizados em trabalhos de seleção visando resistência à doença.

Tabela 3. Distribuição dos grupos de compatibilidade, entre isolados de *Crinipellis perniciosa*, por município produtor de cacau do sul da Bahia.

Município	Número de Isolados	Percentuais de isolados por grupos de compatibilidade		
		A	B	C
Aurelino Leal	2	0	100	0
Aiquara	2	0	100	0
Almadina	2	0	100	0
Arataca	1	100	0	0
Aratuípe	1	0	100	0
Barra do Rocha	1	100	0	0
Belmante	2	50	50	0
Buerarema	1	100	0	0
Caatiba	1	100	0	0
Camacã	3	100	0	0
Camamú	5	40	60	0
Canavieiras	2	100	0	0
Coaraci	2	100	0	0
Conde	1	0	100	0
Cravolândia	2	50	50	0
Dário Meira	1	0	100	0
Eunápolis	2	100	0	0
Floresta Azul	3	100	0	0
Gongogi	1	0	100	0
Guaratinga	1	100	0	0
Ibicaraí	2	100	0	0
Ibicuí	1	100	0	0
Ibiraptanga	1	0	100	0
Ibirataia	2	50	50	0
Ilhéus	6	66,67	33,33	0
Ipiau	1	100	0	0
Itabuna	6	83,33	16,67	0
Itacaré	5	20	80	0
Itagi	1	100	0	0
Itahem	1	100	0	0
Itajuipe	2	0	100	0
Itamarajú	2	100	0	0
Itaptinga	2	0	100	0
Itororó	1	100	0	0
Ituberá	2	50	50	0
Jaguaquara	2	0	100	0
Jequié	1	0	0	100
Jitauna	1	0	100	0
Jucuruçú	2	100	0	0
Lomanto Júnior	1	100	0	0
Muniz Ferreira	1	0	100	0
Maraú	4	25	75	0
Mascote	2	100	0	0
Nazaré das Farinhas	1	100	0	0
Nova Ibiá	2	0	100	0
Nilo Peçanha	3	0	100	0
Nova Viçosa	2	50	50	0
Pau Brasil	2	100	0	0
Piraí do Norte	1	0	100	0
Porto Seguro	1	100	0	0
Potiraguá	1	100	0	0
Santo Amaro	2	100	0	0
Santa Luzia	2	50	50	0
Santo Antônio de Jesus	1	100	0,00	0,00
Santa Cruz Cabrália	1	100	0	0
Santa Cruz da Vitória	1	100	0	0
São Miguel da Mata	1	0	100	0,00
Tancredo Neves	2	0	100	0
Taperoá	5	20	80	0
Teolândia	3	0	100	0
Ubaitaba	2	0	100	0
Ubaíra	2	50	50	0
Una	2	100	0	0
Uruçuca	5	20	80	0
Valença	7	0	85,72	14,29
Wenceslau Guimarães	1	100	0	0

## Agradecimentos

Ao Common Fund of Commodities (CFC) através da supervisão da International Cocoa Organization, pelo auxílio financeiro.

## Literatura Citada

- ANDEBRHAN, T. 1985. Variabilidade de isolados de *Crinipellis perniciosa*. In: Belém, CEPLAC/DEPEA. Informe de Pesquisas 1985. pp. 30-32.
- ANDEBRHAN, T. 1987. Cultural characteristics and biochemical reactions of isolates of *Crinipellis perniciosa*, causative agent of witches' broom disease of cocoa. In: International Cocoa Research Conference, 10, Santo Domingo, República Dominicana, 1987. Proceedings. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp.363-366.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. C. 1984. Crescimento micelial de *Crinipellis perniciosa* originado de vários locais da Amazônia Brasileira. In: Belém, CEPLAC/DEPEA. Informe Técnico 1984, pp.
- ANDEBRHAN, T.; BASTOS, C.N. 1985. Variabilidade de isolados de *Crinipellis perniciosa*. In: Belém, CEPLAC/DEPEA. Informe Técnico 1985. pp. 51-56.
- ANDEBRHAN, T.; FONSECA, S.A. 1982. Resistência do cacaueiro a *C. perniciosa*. In: Belém, CEPLAC/DEPEA. Informe Técnico 1982. pp. 70-75.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. 1994. Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* isolates from different hosts. Plant Pathology 43: 1020-1027.
- ANDEBRHAN, T. et al. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. European Journal of Plant Pathology 105: 167-175.
- BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. 1957. Witches' broom disease of cacao (*Marsamium perniciosus* Stahel). Kew. CMI. Phytopathological Paper n.02. 42 p.
- BARTLEY, B. G. D. 1977. The status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. In: Conferencia Internacional de Investigación en Cacao, 6, Caracas, Venezuela, 1977. Actas. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance pp. 57.
- BASTOS, C. N. 1986. Comparação morfológica de isolados de *C. perniciosa* (Stahel) Singer. In: Belém, CEPLAC/DEPEA. Informe Técnico 1986. pp. 45-49.
- BASTOS, C. N. 1988. Efeitos inibitórios de extratos de cultivares de cacau e compostos fenólicos sobre a geminação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*. In: International Cocoa Research Conference, 10, 1987. Santo Domingo, República Dominicana. Proceedings. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 371-374.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. 1986. Urucu *Bixa orellana* a new host of Witches' broom disease *Crinipellis perniciosa* of cocoa. Fitopatologia Brasileira. 11:963-965.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. 1985. New pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. Plant Pathology 34: 306-312.
- BASTOS, C. N., ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. 1988. Comparação morfológica de isolados de *Crinipellis perniciosa*. Fitopatologia Brasileira 13:202-206.
- EVANS, H. C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. Annals of Applied Biology 89: 185-192.
- EVANS, H. C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society 74: 515-523.
- EVANS, H. C. 1981. Witches' broom disease – a case study. Cocoa Growers' Bulletin 32: 5-19.
- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. 1980. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. Transactions of the British Mycological Society 74: 525-536.
- EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. 1979. Preliminary results of research on witches' broom disease of cacao (*Crinipellis perniciosa*) in the Amazonian Region of Brazil. In: Conference Internationale pur la Recherche Cacaoyére, 7, Douala, Camerun. Actes. London, J. de Lafforest' and Transla. Inter, 1981. pp. 255-256.
- GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. 1992. Restriction fragment length polymorphisms analysis of plant genomes and its application to plant breeding. International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology 135: 201-237.
- GRIFITH, G. W. 1989. Population structure of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. PhD Thesis. LOCAL, University of Wales. pp.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. 1987. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). Transactions of the British Mycological Society 88: 533-546.
- JARRET, R. L. et al. 1993. Detecting genetic diversity in diploid bananas using PCR and primers from a highly repetitive DNA sequences. Euphytica 68: 69-76.
- KHASHNOBISH, A.; SHEARER, C. A. 1996. Phylogenetic relationships in some *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria* species. Mycological Research 100: 1355-1363.
- LANE, E. B. 1981. Somatic incompatibility in fungi and myxomycetes. In: Gull, K.; Oliver, S. G. eds. The fungal nucleus. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 239-258.
- McGEARY, F. M.; WHEELER, E. J. 1988. Growth rates of, and micelial interactions between isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. Plant Pathology 37: 489-498.
- OLIVEIRA, M. L. et al. 2003a. Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis perniciosa* da região cacaueira da Bahia. Fitopatologia Brasileira 28 (suplemento): p. 220.
- OLIVEIRA, M. L.; et al. 2003b. Variabilidade isoenzimática entre isolados de *Crinipellis perniciosa* de cacau e outros hospedeiros. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia 34 Uberlândia, MG. Resumo Expandido, REx. 206, CD ROM, Brasília – DF, Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Vol. 01.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. 132 p.
- PEREIRA, J. L. M. et al. 1989. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotrópica (Brasil) 1: 79-81.
- ROCHA, H. M. 1983. The ecology of *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). PhD. Thesis. England. University of London. pp.
- THOROLD, C. A. 1975. Diseases of cocoa. Oxford. Clarendon Press.
- TODD, N. K. & RAYNER, A. D. M. 1980. Fungal individualism. Science Progress. 66: 3331-3354.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. 1982. Pathogenic races of *Crinipellis perniciosa*? Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia, 1981. pp.365-370.
- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. 1988. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology 37:473-488.
- YAMADA, M. M.; OLIVEIRA, M. L. 2000. Métodos e protocolos para eletroforese em gel de amido de isoenzimas de *Crinipellis perniciosa*. Agrotrópica (Brasil)12: 7-14.

## DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR THE GENETIC ANALYSIS OF *Crinipellis perniciosa*

**Karina Peres Gramacho<sup>1</sup>, A. M. Risterucci<sup>2</sup>, C. Lanau<sup>2</sup>, Cássia Bahia<sup>1</sup>, Uilson V. Lopes<sup>1</sup>, Abelmon da Silva Gesteira<sup>3</sup>, Marcos Renato Araújo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil; <sup>2</sup>Cocoa Research Center, CIRAD - France; <sup>3</sup>UESC;  
<sup>4</sup>UNICAMP/Laboratório de Genômica e Expressão

Witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.), caused by *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, is the most important disease of cacao in the cacao growing areas of South America and Caribbean Islands. Very little is known about the genetic biology of the pathogen population, and this information is very important to the host improvement programs and deployment of resistant planting material. A collaborative America Countries international program was initiated to identify and describe the genetic diversity of *Crinipellis perniciosa* in South America. Microsatellites (SSR) constitute highly informative genetic markers for population genetic studies due to their co-dominant and multiallelic nature and distribution in the genome. SSR primers were searched in the *C. perniciosa* genome data base and designed as potential candidates to define an efficient, standardized, molecular fingerprinting protocol for this pathogen. These primers have been evaluated for reliability, widespread distribution across the *C. perniciosa* genome and their ability to discriminate isolates of this fungus. The final objective here is to study the diversity structure of the *C. perniciosa* population from the main cacao growing area in South America countries. Preliminary results are reported.

**Key words:** Witches' broom, *Theobroma cacao*, genetic diversity.

**Desenvolvimento de marcadores microsatélite para análise genética de *Crinipellis perniciosa*.** A doença vassoura-de-bruxa do cacau (Theobroma cacao L.), causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, é a principal enfermidade desta cultura na América do Sul e Ilhas do Caribe. Pouco se sabe sobre a biologia e o comportamento genético deste fitopatógeno, informação importante para o desenvolvimento de variedades resistentes à vassoura-de-bruxa. Um consórcio internacional foi iniciado para descrever a diversidade genética do *Crinipellis perniciosa* na América do Sul. Microsatélites (SSR) constituem marcadores genéticos altamente informativos para estudos genéticos de população, devido a sua natureza co-dominante e distribuição no genoma. SSR foram procurados na base de dados do *C. perniciosa* e selecionados como candidatos potenciais para o estabelecimento de um protocolo de *fingerprinting* para este fitopatógeno. Estas regiões de SSR foram avaliadas quanto a sua distribuição no genoma do *C. perniciosa* e poder discriminativo entre os isolados da espécie. O objetivo final deste trabalho foi estudar a estrutura genética em populações de *C. perniciosa* provenientes de regiões produtoras de cacau de países da América do Sul. Os resultados preliminares deste trabalho são descritos.

**Palavras-chave:** Vassoura-de-bruxa, *Theobroma cacao*, diversidade genética.

## Introduction

In 1989, witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) was introduced in Bahia (Pereira et al., 1989), causing a tremendous drop in yield. The severity of the disease was higher than in other regions due to a combination of several factors favorable to the disease, such as a continuous large area (600 thousand hectares) cultivated as a monoculture, with highly susceptible varieties and with a climate favorable to the development of the epidemics.

*Crinipellis perniciosa* is a very unique basidiomycete, as it belongs to a restricted group of basidiomycetes, that is hemibiotrophic and has a homomictic reproductive strategy (Griffith and Hedger, 1994), features found in only 1% of all basidiomycetes. While much research has been conducted on population structure of fungal pathogens (Mc Donald 1997), knowledge on the population structure of *C. perniciosa* is sparse and most work has been focused primarily on understanding the origin of the fungus in Bahia (Anderbrhan et al. 1999; Gomes et al. 2000; Arruda et al. 2003).

Simple sequence repeat (SSR) markers are potentially valuable tools for studying genetic variation within genotypes. Microsatellites are highly polymorphic due to their variable number of repeat and highly reproducible and easy to score. The primers also provide specificity for a particular species; therefore, the markers can be applied to samples therefore avoiding the potential problems associated with nonspecific markers on contaminated samples. They are ideal molecular markers for studying genetic variation within populations (Järne and Lagoda 1996).

At present, library development and screening is the common way to isolate relatively large quantities of SSRs, but the investments in time and money can make this process expensive. Database screening provides the most readily available source of SSRs to anyone with access to a sequencing data base. As part of our research in population dynamics *Crinipellis perniciosa*, we initiated this study to develop locus-specific microsatellite markers, and applied these to a collection of 600 isolates of *C. perniciosa*. The genome database was searched for the presence of SSR. The objective of this search was to assess the frequency of different motifs and to check the general applicability of these primers in amplifying DNA from other biotypes, and other closely related species (*Moniliophthora roreri*).

## Materials and Methods

### Fungal Isolates and DNA extraction

One-hundred isolates of *C. perniciosa* were used in this study. The isolates are listed in Table 1.

Table 1. Isolates of *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri* screened for SSR amplification

C- biotype	Bahia (91)* Amazonas (2) Peru (1) Ecuador (1)
S- biotype	<i>Solanum lycocarpum</i> (1) <i>Solanum rugoso</i> (1) <i>Ormosea arborea</i> (1)
<i>Moniliophthora roreri</i>	Peru(1) Ecuador(1)
<b>Total: 100 isolates</b>	

\* Numbers of isolates within parentheses.

Infected tissues, taken from vegetative brooms and diseased pods, were harvested, surface-sterilized and incubated on *Crinipellis* nutrient selective medium for 3–8 days. The morphology of the derived cultures was carefully observed in order to confirm their identity. All fungal cultures were grown in Malt 50% for 12 days. Mycelia were filtered through Whatman No. 1 filter paper, washed twice with TE buffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0), lyophilised and total DNA was extracted as described by Zolan and Pukila (1986). The amount of DNA was quantified by electrophoresis and spectrophotometry. The DNA samples were diluted in 100 µl sterilized water adjusted to 1 ng µl<sup>-1</sup> and stored at -21°C for further use. Samples that showed degradation of DNA in electrophoresis gels were discarded and DNA extraction was repeated. RNA was eliminated by adding 3 µl of RNase.

### Isolation of microsatellites

*Crinipellis perniciosa* database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>) was screened for the presence of SSR. Primer pairs complementary to the flanking regions of the microsatellite sequences were designed using either the computer program PRIMER3 ([www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) or oligo 4.0. Primers were designed in a way of yielding PCR products of three different sizes. Sixty six microsatellites with di-tri and tetra motifs were screened in *Crinipellis* sequences (Table 2). Sixty-three primers were designed and tested in 3% agarose gel.

### PCR Analysis and Amplification

PCR reactions were carried out in a volume of 20 µL containing 5 ng of DNA template, 0.4 µM of each primer,

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 1X reaction buffer and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech or PeqLeb). PCR products were first checked using 3% agarose gel stained with ethidium bromide. Primers pairs with good amplification were screened for polymorphism in 5% polyacrylamide gels.

Ten primers were radiolabelled and checked on acrylamide gel. This step was done at CIRAD. Radioactive PCR were as follow: 5 µL forward primer (100 µM) was end-labelled using 10 µL [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] -ATP, 2 µL of T<sub>4</sub> kinase buffer, and 3 µL of T<sub>4</sub> DNA kinase were brought to a final volume of 30 µL with sterile ddH<sub>2</sub>O. The contents were mixed and incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by incubation at 70°C by 10 min. For the radioactive PCR reaction, 3 µL of radioactive primer and 5 µL of nonradioactive primer (together, 4 µM) were used following the PCR protocol. Electrophoresis of radioactive products was carried out in 5% denaturing TBE acrylamide gel. The gels were dried at 80°C for 1.5 h.

All the amplifications were performed with a Touch

Down PCR, encompassing 10 cycles of denaturation at 94°C for 4 min, primer annealing at 60–48°C using 1.0°C decrements, and extension at 72°C for 1 min, followed by 20 cycles at 94°C for 4 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final 4-min extension at 72°C.

## Results and Discussion

Sixty-three primer pairs, each flanking a distinct microsatellite locus, were first tested on a set of 16 isolates including isolates of the two biotypes. Most of the primer pairs produced locus-specific amplicons in PCR. Of the primer pairs designed, 28 were tested on polyacrylamide gel. Six loci were polymorphic and another 13 remain to be screened for polymorphism (Figure 1). Almost all alleles found differed in size by three base pairs or multiples of two base pairs. There is one case where three successive alleles differed by only one base pair (Table 2).

Table 2. Characterization of microsatellite products in isolates of *Crinipellis perniciosa*.

Nb. alleles	PRIMER 15	PRIMER 16	PRIMER 23	PRIMER 19	PRIMER 14	PRIMER 22
	7	3	3	3	2	2
1 <sup>0</sup>	176	209	202	197	235	198
2 <sup>0</sup>	177	212	206	200	239	201
3 <sup>0</sup>	180	221	214	206		
4 <sup>0</sup>	186					
5 <sup>0</sup>	194					
6 <sup>0</sup>	197					
7 <sup>0</sup>	200					

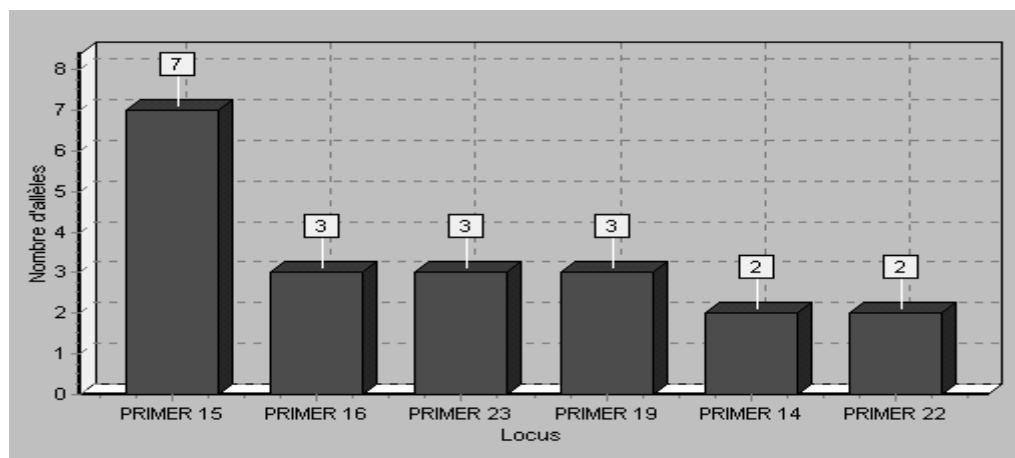


Figure 1. Histogram depicting the number of alleles that occurred at each locus.

Overall tetranucleotide repeat microsatellites showed higher levels of polymorphism than three dinucleotide repeat regions. Average heterozygosities ranged from 0.02-0.5. Preliminary results indicated that Bahia population do indeed have reduced genetic diversity when compared with the others populations. Primer sets were also tested to check the general applicability of these primers in amplifying DNA from closely related biotypes and species. Cross species amplification was successful in all loci. We have identified three loci very useful to distinguish isolates from different biotypes, and a fourth one (primer 23) that identified the most pathogenic isolate. Four primers differentiated isolates from other countries.

The isolate from *Moniliophthora* gave repeatable and scored patterns in all loci. Our results may therefore indicate a recent common ancestor for the *Moniliophthora roreri* studied. These preliminary results suggest the usefulness of the primers in population studies may go beyond the present study of the *C. perniciosa* and have applications in population genetics of *M. roreri*.

Microsatellites clearly exist in large numbers in the genome of *C. perniciosa*, but their variability is lower than reported for other fungi. This low level of variability is manifested in two ways. First, the number of polymorphic loci was low. Among the 28 loci screened, only seven were found to be polymorphic. Second, the number of alleles at the polymorphic loci was low. The number of alleles in each locus ranged from 2 to 7 among isolates of *C. perniciosa* from a wide geographic area. In contrast, in *Venturia inaequalis*, seven polymorphic loci were found in 23 sequenced clones and the number of alleles in each locus ranged from 2 to 48 (Tenzer et al 1999). Also in *Aspergillus fumigatus*, 10-23 different alleles were detected in four microsatellite loci among 102 isolates (Bart-Delabesse et al. 1998).

Although, We will test the effectiveness of the silver staining process to detect polymorphisms in the remaining loci, automated detection of microsatellite alleles with fluorescent dye-labeled primers would be most efficient for studying populations. However, it is prudent to determine the feasibility of the designed primers and polymorphisms of the defined loci before attaching fluorescent dyes to the primers.

Given their level of polymorphism, the primers presented here should prove to be useful for investigating the population genetic structure of *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. This work is under way.

## Acknowledgements

Special thanks to the technicians José dos Santos Reis and Joselito de Moraes, for helping us on collecting the isolates and to SEAGRI-BA and CFC/ICCO/BIOMOL for supporting this project and the Project Genoma Consortium and CIRAD.

## Literature Cited

- ANDERBRHAN, T. et al. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 105: 167-175.
- ARRUDA, M. C. C. et al. 2003. Nuclear and mitochondrial DNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. *Mycological Research* 107:25-37.
- BART-DELABESSE, E. et al. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2413-2418.
- GOMES, L.M. et al. 2000. Genetic diversity of *Crinipellis* from the south region of Bahia-Brazil using RAPD molecular markers. *Fitopatologia Brasileira* 25:377.
- GRIFFITH,G.W.; HEDGER, J. N. 1994. The breeding biology of biotypes of witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). *Transactions of the Bristish Mycological Society* 88.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L.1996. Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- MCDONALD, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453.
- PEREIRA, J. L.; et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica* (Brasil) 1: 79-81.
- TENZER, I.; et al. 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89: 748-753.
- ZOLAN.,M.; PUKILA, A. P. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.

## PHYLOGEOGRAPHY OF THE WITCHES' BROOM PATHOGEN IN BAHIA

<sup>1</sup>Karina Peres Gramacho, <sup>2</sup>Uilson Vanderlei Lopes, <sup>2</sup>José Luis Pires, <sup>3</sup>José Ronaldo Monteiro Lopes,  
<sup>4</sup>Cássia Bahia, Luana Mahé<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC/Sação de Fitopatologia; <sup>2</sup>CEPLAC/CEPEC/Sação de Genética; <sup>3</sup>CEPLAC/Centro de Extensão; <sup>4</sup>CEPLAC/  
CEPEC/Lab. de Biotecnologia

Witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.), caused by *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, is the most important disease of cacao in the growing areas of South America and Caribbean Islands. Knowledge of the amount and distribution of the genetic variation within and among populations is important to understand the biology of this pathogenic fungus. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to determine the genetic structure of Bahian populations of *C. perniciosa*. Fungal isolates were collected by hierarchical sampling, from nine naturally infected cacao plantations, in three different agroecological zones, during a single growing season. Samples were collected from diseased pods and vegetative brooms in three trees per site. A total of 52 isolates were sampled. Trees were at least 10 m apart within an agroecological zone, and plantations at least 5 km apart each other. Spatial scales included comparisons within and among trees, within and among fields and within and among agroecological zones. Fungal populations from different zones differed significantly among themselves ( $p=0.1\%$ ). These result is in agreement with the previously reported degree of somatic compatibility groups in the *C. perniciosa* population from different ecological areas, which suggests that the fungal population infecting cacao plantations has different population structures in the the agroecological zones studied. Therefore, this result should be considered when devising strategies for controlling witches' broom, including genetics, chemical and biological control.

**Key words:** *Crinipellis perniciosa*, *Theobroma cacao*, RAPD, DNA, disease.

**Philogeografia do patógeno vassoura-de-bruxa na Bahia.** A vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), causada por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, é a doença mais importante do cacaueiro nas plantações da América do Sul e Caribe. O conhecimento da quantidade e distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações é um componente importante para o entendimento da biologia deste fungo patogênico. Marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram usados para determinar a estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* na Bahia. Isolados do fungo foram coletados por amostragem hierárquica em nove plantações de cacau naturalmente infectadas, em três diferentes zonas agroecológicas, numa mesma época. Amostras foram coletadas a partir de frutos doentes e vassouras vegetativas em três árvores por local. Cinquenta e dois tecidos doentes (infectados) foram amostrados. As árvores situavam-se pelo menos 10 m uma das outras, e os locais dentro de uma zona agroecológica situavam-se pelo menos 5 km uns dos outros. Análises espaciais incluíram comparações dentro e entre árvores, dentro e entre fazendas, e dentro e entre zonas agroecológicas. Populações do fitopatógeno das diferentes zonas diferiram entre si. Estes dados estão de acordo com estudos previamente reportados de compatibilidade somática em populações de *Crinipellis perniciosa*. Observou-se neste estudo que a população de *C. perniciosa* infectando plantios de cacau tem uma estrutura populacional diferente em diferentes zonas agroecológicas, e isto deve ser considerado nos testes de germoplasmas para resistência à vassoura-de-bruxa.

**Palavras-chave:** *Crinipellis perniciosa*, *Theobroma cacao*, RAPD, DNA, doença.

## Introduction

Witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) represents the major challenge for the re-establishment of the cacao crop in South America. Sanitation (pruning), fungicides and biological control agents (*Trichoderma stromaticum*) have been used as control methods. However, resistance has been the method of choice, because of its low cost to farmers and efficiency. Information about the population biology and genetics of this pathogen is important to cacao improvement programs and the deployment of resistant varieties to farmers. However, little is known about the population genetic of this pathogen and, only recently, research using molecular techniques has indicated genetic diversity among isolates (Anderbrhan and Furtek 1994; Griffith and Hedger 1994; Purdy and Schmidt 1996), and possibly two distinct introductions of *C. perniciosa* were responsible for the outbreak of witches' broom in Bahia (Anderbrhan *et al.* 1999; Gomes *et al.* 2000; Arruda *et al.*, 2003).

The geographical distribution of *C. perniciosa* in Bahia includes all the 100 counties in southeast Bahia, where cacao is planted (Sá *et al.* 1982). Because these plantations have both overlapping and non-overlapping distributions, their study offers an opportunity for examining the phylogeography of the pathogen in a biogeographical context, using molecular markers. This approach, allows an exploration of the relationship between gene genealogies or phylogeny and geography (Avise 2000). Phylogeographic studies of medically and agriculturally important fungi have revealed substantial phylogenetic structure in populations of fungi which were previously considered homogeneous across their sampled range (Geiser *et al* 1998; Kasuga *et al.* 1999; Koufopanou *et al* 1997; O'donnell *et al* 2000).

We undertook the present study to obtain an initial, broad profile of genetic structure variation of *C. perniciosa* in three agroecological areas from Southeast of Bahia, which vary in ecological, biophysical, climate conditions, land use and cacao planted area. Epidemiological factors could play a major role in substructuring populations. The main goal of this study was to use a hierarchical sampling scheme (tree, plantation, county) to determine whether the population was substructured by the agroecology area from which it was collected.

## Materials and Methods

### Sampling Strategies and Isolates Growth

Six-hundred isolates of *C. perniciosa* were collected

from twelve agroecological areas representing the natural distribution of *C. perniciosa* from cacao plantations in Bahia. However, here only the data of 52 isolates of three of these areas will be presented, namely from: Uruçuca, Camacan and Una (Figure 1). These areas are at least 55 km apart each other and are differentiated by climate conditions, land use and soil type (Table 1). The first two represents the first foci of the disease, and are considered adequate for cacao production. The last one, Una, is considered marginal for cacao planting.

In each County, isolates were sampled in three plantations, at least 5 km apart. For the purposes of this study, all isolates of *C. perniciosa* collected from an individual cacao plantation were considered a subpopulation of the pathogen and all isolates combined were considered to represent the overall population. Three trees, at least 10 m apart, were sampled in each plantation or subpopulation, during a single growing season. On each tree, isolates were taken from vegetative brooms and diseased pods, totaling eighteen isolates per county (3 plantations x 3 trees x 2 isolates). Diseased tissues were decontaminated by a 10-min immersion in 50 g of sodium hypochlorite per liter, rinsed, and placed on a *Crinipellis* nutrient selective medium for 3-8 days. The morphology of the derived cultures was carefully observed in order to confirm their identity. The isolated strains were then locally stored as dried mycelium, agar cultures immersed under sterilized dry mineral oil at 4 or 18 °C, or under sterilized water. Procedures for obtaining higher quality DNA from young mycelium of *C. perniciosa* were also developed.

### DNA Extraction and Amplification

All fungal cultures were grown in Malt 50% for 12 days. Mycelia were filtered through a Whatman No. 1 filter paper, washed twice with TE buffer (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0), and then lyophilized. Total DNA was extracted as described by Zolan and Pukila (1986). The amount of DNA was quantified by electrophoresis and spectrophotometry. The DNA samples were adjusted to 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  and stored at -21°C for further use. Samples that showed DNA degradation in electrophoresis gels were discarded and DNA extraction was repeated.

Amplification reactions were performed in 25  $\mu\text{L}$  volumes containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25 mM  $\text{L}^{-1}$  each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.4  $\mu\text{M}$  of primer, 0.5  $\mu\text{L}$  of Taq DNA polymerase and

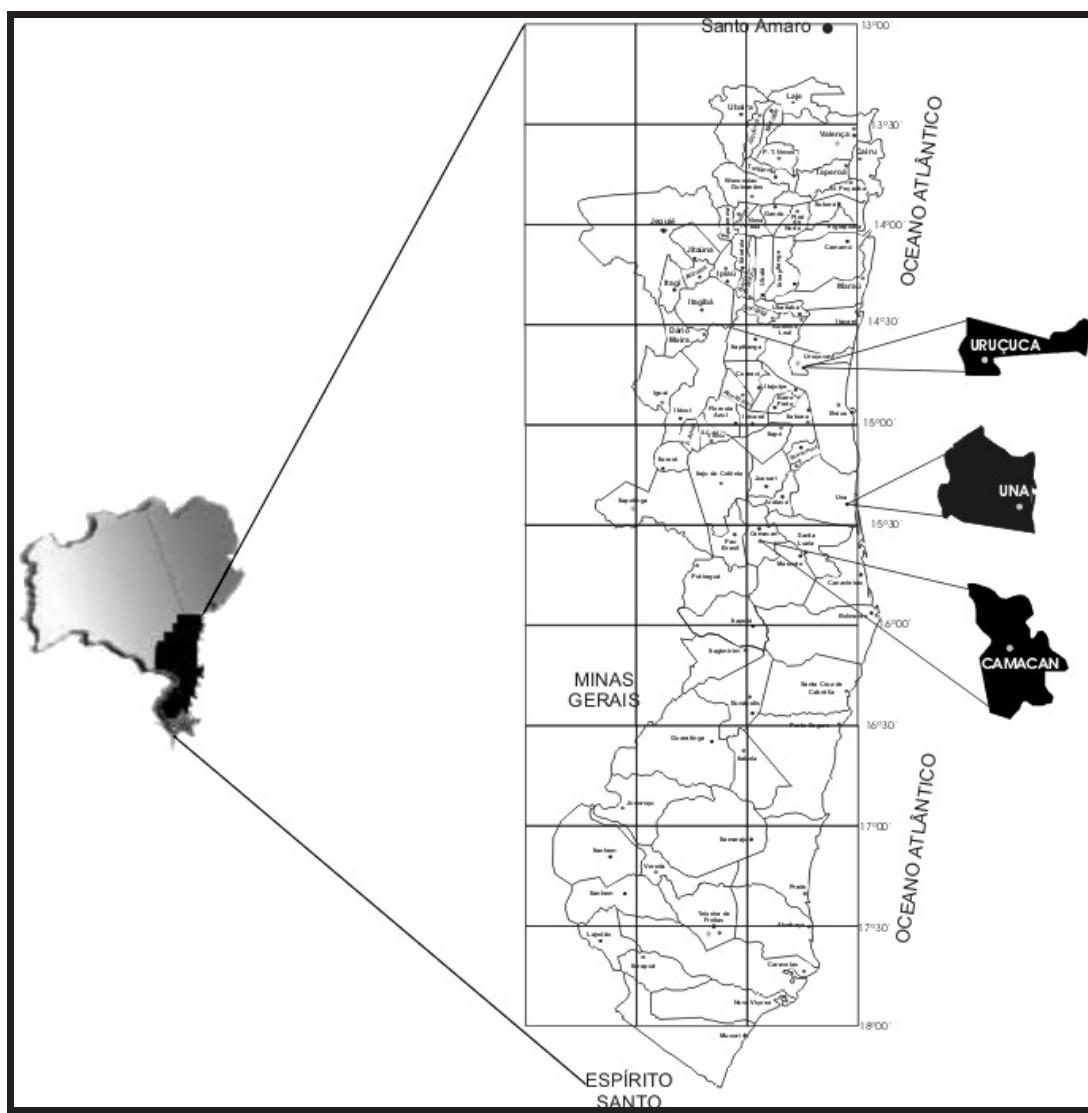


Figure 1. Cacao areas in Southeast of Bahia where *C. perniciosa* isolates were sampled for the phylogeography studies.

Table 1. Description of the agroecological zones used in the *C. perniciosa* phylogeography studies.

Zones	Area (ha)		Latitude	Longitude	Altitude (m)	Rainfall (mm/year)	Temperature (°C)	Soil Type	Land Use
	Total	Cacao							
Uruçuca	524,100	188,986	14°35' S	39°17' W	102	1800	21.0-26.4	Alfissols Ultissols	Cacao Pasture
Camacan	351,000	101,000	15°24' S	39°30' W	200-400	1300	17.0-33.0	Alfissols Ultissols Oxisols	Cacao Pasture
Una	638,900	58,984	13°22' S	39°04' W	5	2297	21.0-26.3	Ultissols Oxisols Podzols	Cacao Coconut Oil palm Hevea

approximately 30 ng of genomic DNA. Amplifications were conducted in a Perking-Elmer, GeneAmp PCR System 9600. Thirty cycles of PCR amplifications were performed under the following parameters: denaturation for 1 min at 92°C, primer annealing for 1 min at 35°C; and primer extension for 2 min at 72°C.

Amplification products were separated by electrophoresis at 110 V for 2 h on ethidium bromide-stained ( $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-1}$ ), 1.2% agarose gels run in 1x Tris-borate EDTA buffer and visualized under UV light.

### Data Analysis

Ten primers (Operon Technologies Inc.), among forty, were selected based on a screening with four DNAs of *C. perniciosa* from different agroecological zones. The selected primers yielded one or more repeatable polymorphisms. Discarded primers were those monomorphic, yielding unrepeatable results, or not yielding DNA amplification products. RAPD assays of each isolate were performed at least two times, with only reproducible, amplified fragments being scored. For each sample, the presence and absence of RAPD fragments were recorded as 1 or 0, respectively, and treated as discrete characters. Faint RAPD bands were not included in this analysis.

*Multidimensional Scaling Analysis:* The 0/1 data were used to calculate genetic distances as Jaccard's similarity coefficient (Jaccard, 1908). Based on genetic distances, a multi-dimensional scale (MDS) method, using SAS® PROC MDS and SAS-graph were carried out and the resulting first three dimensions were plotted for each isolate (SAS, 1986).

*Cluster analysis:* Cluster analysis based on genetic distance was performed using Ward's minimum variance method (Ward, 1963). The number of modal clusters were pre-established according to the hierarchical scheme: numbers of populations (isolates collected from the same agroecological area were considered a population) and subpopulations (isolates collected from plantations within an agroecological area).

*Analysis of molecular variance:* We used AMOVA, analysis of molecular variance, (Excoffier et al., 1992), to deduce the significance of geographical divisions both between populations and between regions. The statistics of molecular variants  $\phi_{CT}$  (among regions),  $\phi_{ST}$  (among populations), and  $\phi_{SC}$  (among populations within regions) were estimated. The significance of these F-statistic analogues was evaluated based on 1,000 random permutations. AMOVA was performed using the software Arlequin version 1.8 (Schneider et al., 2000).

### Results

Among the 129 RAPD markers, 113 (87.5%) were polymorphic and 16 (12.4%) monomorphic. Individual RAPD primers generated from 7 to 13 amplified fragments for the 52 strains analyzed (Table 2). The polymorphic markers revealed by the ten primers were present in every population sampled, and there was no case of private alleles, i.e., alleles unique to one or a few populations.

To determine whether the populations were substructured, we subdivided them on the basis of agroecological zones (Counties), plantations, and tree. The visual representation of the relationship of the isolates suggested the presence of three groups clusterized according to their county of origin (Figure 2).

To assess the distinctiveness of the groups, we used Ward's minimum variance method (Ward, 1963). The three clusters identified by that method corresponded to the clusters visually identified in the three dimensional graph, revealing a clear consensus of three groups according to their region of origin (groups I, II, and III) (Table 3). With respect to the geographic origin of the isolates, group I included 11 of the 17 isolates from Una; group II, 9 of the 17 isolates from Uruçuca; and group III 16 of the 18 isolates from Camacan and the

Table 2. Attributes of the oligonucleotide primers used for generating RAPD markers from 52 individuals of *Crinipellis perniciosa* sampled from three populations in Southeast of Bahia.

Primer	Number of Amplified Fragments	
	Polymorphic	Monomorphic
OPA19	9	1
OPA16	10	2
OPB10	6	1
OPB11	7	2
OPC4	8	1
OPD01	9	1
OPE14	12	1
OPH12	7	1
OPH20	9	1
OPI05	10	2
OPI13	9	1
OPI18	9	1
OPG15	8	1
Total	113	16

remaining isolates from Uruçuca. Generally, isolates collected from an individual plantation were very similar and tended to fall into the same group.

Hierarchical analysis of RAPD fingerprinting with AMOVA indicated the presence of variance attributable to genetic differences within an agroecological area

( $\hat{\sigma}_{ST}=0,21$  p<0,001), among regions ( $\hat{\sigma}_{CT}=0,18$ ; p<0,059) and among population within an agroecological area ( $\hat{\sigma}_{CT}=0,03$  p<0,103) (Table 4). Also, out of the total genetic diversity, 78.7% was attributable to differences within populations and only 18.6% to differences between populations.

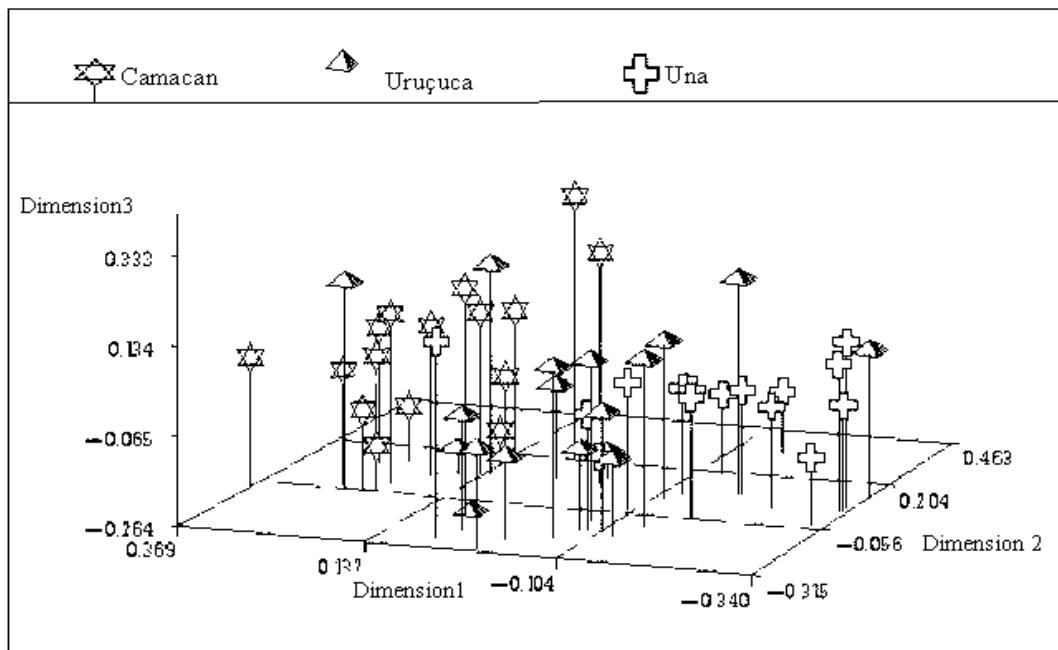


Figure 2. Multidimensional scaling (MDS) plot for genetic distance among the three agroecological areas of Southeast of Bahia.

Table 3. Clustering statistics from Ward's minimum variance cluster analysis of 52 isolates of *Crinipellis perniciosa* based on RAPD fragment occurrence.

County	Plantation	Group 1	Group 2	Group 3	Total
Una	1	2	1	2	5
	2	5	0	0	5
	3	4	3	0	7
Total Isolates* (Percent)		11 (78.5%)	4 (23.0%)	2 (11.0%)	17
Camacan	1	1	1	4	6
	2	0	0	5	5
	3	0	0	7	7
Total Isolates (Percent)		1 (55.0)%	1 (55.0)%	16 (88.8%)	18
Uruçuca	1	0	6	0	6
	2	0	3	0	3
	3	3	0	6	9
Total Isolates (Percent)		3 (17.6)%	9 (52.9%)	6 (35.3%)	18

\*Percentages are over isolates within a county

Table 4. Analysis of molecular variance of random amplified polymorphic DNA for six populations of *Crinipellis perniciosa* from three agroecological regions in Southeast Bahia (Una, Uruçuca and Camacan).

Source	df	Variance components	$\hat{\sigma}^2$ Statistics	% Total
Among regions	2	2.12	0.18 **	18.6
Among sub-populations within regions	3	0.31	0.03 <sup>ns</sup>	2.7
Within populations	46	8.97	0.21***	78.7

\*\* Significant at  $P < 0.05$ , based on 1000 permutations

\*\*\* Significant at  $P < 0.01$ , based on 1000 permutations

<sup>ns</sup> Non significant

## Discussion

One of our primary goal was to investigate the population structure of *C. perniciosa*. A large number of reports and papers have been published on the progression of the witches' broom disease since its first appearance in the 1989 in Bahia, Brazil, but only a small number of these were population studies. The results presented here showed high levels of intrapopulation genetic diversity, with three distinct RAPD groups or clusters occurring in each population. Genetically closely related populations were often from the same county and plantation. This result is in agreement with a previous somatic compatibility study in *C. perniciosa* isolates, in which it was observed a tendency of cluterization according to the agroecological zone (Oliveira 1993, not published). Isolates from Uruçuca were all in a single somatic compatibility group, and those from Camacan in other group.

We propose several mechanisms that can contribute to the local high diversity and the phylogeography groups found in our study. One mechanism is local selection. Probably exerted by the variety of environmental and host in the region. The region is characterized in agroecological areas, with special characteristics of soil, climate, and dynamic of land use. The climate gradient across these areas vary from wet to dry zones, and average year rainfall between 803 to 1303 mm, and mean temperature from 20 to 25°C. These regions also vary in cacao planted area, with the majority being planted in Camacan and Uruçuca. Plantations in Una are more diversified; only 9.5% of the area is planted with cacao. Therefore, it is likely that the local environment operates favouring adapted ecotypes to persist.

A second contributing factor is the formation of heterokaryons between two genetically different primary hyphae (Griffith and Hedger 1994). This has been suggested as a possible explanation of the genetic diversity between isolates within the same area (Anderbrhan and

Furtek 1994; Gomes *et al.* 2000; Niella *et al.* 2000). Reproduction of *C. perniciosa* is homothallic for the C-, S- and B-biotypes, and heterothallic for the L-biotype (Griffith and Hedger 1994). Genetic variability among these different biotypes has been shown to be more related to proximity than to the nature of the host itself (Anderbrhan and Furtek 1994; Griffith and Hedger 1994; Purdy and Dickstein 1990). In homothallic biotypes, the existence of a high degree of genetic diversity suggests that the fungus does not just reproduce clonally. Additionally, the underlying recombining genetic structure may be due to parasexual cycle. Different RAPD markers were found in basidiospores from the same basidiocarp implying the existence of a certain degree of polymorphism (Anderbrhan and Furtek 1994). The process of dikaryotisation for homothallic biotypes occurs by anastomosis between two adjacent uninucleate hyphae. Therefore, an explanation could be that heterokaryosis may happen between two genetically distinct primary mycelium when homomictic mycelia is undergoing autodikaryosis. This could happen in an infected meristem between two genetically different germinating basidiospores. The stable heterokaryons could stabilize and enter into the saprophytic stage (Griffith and Hedger 1994) which may allow multiple genotype to persist.

Although our analysis was restricted to only three of the twelve agroecological areas, a quite limited data set, and so may be viewed as somewhat preliminary; the important result of this study was the genetic differentiation among agroecological areas. To our knowledge this is the first evidence of ecotypes in the *Crinipellis - Theobroma cacao* pathosystem. The interpretation of these results is not a clear-cut, and the current study, however, cannot establish which factors are important in shaping the population structure of *C. perniciosa*. A comparison of the genetic composition of isolates from the different agroecological areas would answer some of these questions. In order to answer these

questions, a study involving 600 isolates from all the 12 agroecological areas in Southeast Bahia is under way.

We report that *C. perniciosa* population infecting cacao plantations has a similar population structure within an agroecological zone and this should be considered when devising control strategies including test of varieties, fungicides and biological control agents.

### Acknowledgements

Special thanks to the technicians José dos Santos Reis and Joselito de Moraes, for helping us on collecting the isolates and to SEAGRI-BA and CFC/ICCO/BIOMOL for supporting this project.

### Literature Cited

- ANDEBRHAN, T. et al. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. European Journal of Plant Pathology 105: 167-175.
- ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosa* isolates from different hosts. Plant Pathology 43:1020-1027.
- ARRUDA, M. C. C. et al. 2003. Nuclear and mitochondrial DNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. Mycological Research 107:25-37.
- AVISE, J. C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA. Harvard University Press. 447pp.
- EXCOFFIER, L. S.; MOUSE, P.E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491
- GEISER, D. M. et al. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Proceedings of the National Academy Science 95:388-393.
- GOMES, L.M.C. et al. 2000. Genetic diversity of *Crinipellis* from the south region of Bahia-Brazil using RAPD molecular markers. Fitopatologia Brasileira 25:377.
- GRIFFITH,G.W.; HEDGER, J. N. 1994. The breeding biology of biotypes of witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). Transactions of the British Mycological Society 88.
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution orale. Bulletin de la Societe Vaudoise Science Natural 44: 223-270.
- KASUGA, T., TAYLOR, J. W.; WHITE, T. J. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. Journal of Clinical Microbiology 37:653-663.
- KOUFOPANOU, V., BURT, A.; TAYLOR, J. W. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Proceedings of the National Academy Science 94:5478-5482.
- NIELLA,G. R. et al. 2000. Produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa*, isolado de *Theobroma cacao* em meio farelo-vermiculita. Fitopatologia Brasileira 263-263.
- O'DONNELL, K. et al. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. PNAS (USA) 97:7905-7910.
- PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. de. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotrópica(Brasil) 1: 79-81.
- PURDY, L.H.;SCHMIDT, R.A. 1996. Status of cacao witches' broom: Biology, Epidemiology, and Management. Annual Review of Phytopathology 34:573-594
- SÁ, D. F.; ALMEIDA, H.; SILVA, L.; LEÃO, A. C. 1982. Fatores edafo-climáticas seletivos ao zoneamento da cacaicultura no Sudeste da Bahia. Revista Theobroma (Brasil) 12: 169-187
- SAS INSTITUTTE. 1985. SAS users guide: statistics. SAS Institute, Cary N.C.

- SILVA, L. F.; LEITE, J. O. 1988. Caracterização preliminar dos agrossistemas das regiões cacaueiras da Bahia e Espírito Santo. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico 156. 15p.
- SCHNEIDER, S.; RIESSLI, D.; EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analyses. Software manual. 111p.
- WARD, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58: 236-244.
- ZOLAN, M.; PUKILA, A. P. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprus cmereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.



## ASSALARIAMENTO, AGRICULTURA FAMILIAR E SOCIABILIDADE NA FRUTICULTURA IRRIGADA NORDESTINA

*<sup>1</sup>Josefa Salete Barbosa Calvacanti, <sup>2</sup>Dalva Maria da Mota*

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, 49001-970, Aracaju, Sergipe, Brasil.  
<sup>2</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil; dalva@cpatu.embrapa.br

O objetivo do artigo é analisar as configurações do trabalho na fruticultura irrigada Nordestina, a partir da comparação das experiências do Vale do São Francisco e do Platô de Neópolis. Pretende com isso, reativar a discussão sobre as formas de trabalho na agricultura, sobre o lugar de homens e mulheres nos modernos processos de produção e nas práticas de sociabilidade que se instituem. As particularidades locais do trabalho são analisadas, chamando a atenção para semelhanças e diferenças que evidenciam a constituição de atores em situações heterogêneas de trabalho.

**Palavras-chave:** trabalho, gênero, Platô de Neópolis, fruticultura irrigada.

**Workers, family farming and sociability in the Brazilian Northeast irrigated fruit production.** The objective of the article is to analyze the configurations of the work in the Northeastern irrigated horticulture, starting from the comparison of the experiences of the valley of San Francisco and of the Plateau of Neópolis. We intended with that, to reactivate the discussion on the works forms on the agriculture, on the men and women's place in the modern production process and in the sociability practices that are instituted. It is also intended, to detach the local particularities of the work, getting the attention for likeness and differences that evidence the actor's constitution in heterogeneous situations of work.

**Key words:** work, gender, Plateau of Neópolis, irrigated fruit production.

## Introdução

O objetivo central deste artigo é analisar as novas configurações do trabalho na fruticultura irrigada Nordestina reativando a discussão sobre as formas de trabalho na agricultura, particularmente, sobre o lugar de homens e mulheres, que se assalariam temporária ou permanentemente em empresas dedicadas à produção de frutas frescas para os mercados nacional e internacional nos projetos de irrigação localizados no Vale do São Francisco e no Platô de Neópolis/SE. Pretende também, destacar as particularidades locais do trabalho, chamando a atenção para semelhanças e diferenças que evidenciam a constituição de atores em situações heterogêneas de trabalho que mesclam práticas “tradicionalas” e “modernas” visando a eficiência e controle da produção e dos trabalhadores, com efeito sobre a organização do trabalho e gestão dos empreendimentos.

No Vale do São Francisco a organização do trabalho tem privilegiado a incorporação das mulheres, em oposição à quase exclusão das mesmas no Platô de Neópolis. A predominância do trabalho registrado, em ambos os casos, contraria a tendência de intensificação do trabalho temporário e precário em outras regiões agrícolas latino-americanas (Bendini, 1999; Lara, 1998). A valorização das práticas e sociabilidade camponesas no Platô e a imposição de uma racionalidade baseada em padrões externos de qualidade para os trabalhadores do Vale também são diferenciais que têm influenciado na organização do trabalho e no controle dos trabalhadores, particularidades que constituem o cerne deste artigo.

O sucesso da atividade, no entanto, deve ser relativizado, pois várias empresas enfrentam dificuldades e uma parcela significativa dos agricultores foram substituídos por pequenos fruticultores mais capitalizados (Cavalcanti, 1998). Como consequências imediatas, se pode observar a redução do nível de empregos, a exigência de mão-de-obra mais qualificada e um processo crescente de terceirização e flexibilização que, escamoteia, em muitos casos, relações precárias (Silva, 2001, p. 115).

Apesar dessas dificuldades, o Vale do São Francisco é apontado como uma experiência de êxito na qual o empresariado é tido como ator central (Aliás, este mesmo "status" do empresariado tem sido destacado no estudos atuais de uma vertente da sociologia do trabalho, que volta a colocar o tema da modernização no centro do debate, destacando até que ponto os novos modelos (pós-fordismo, modelo japonês, etc.) estão sendo adotados em diferentes partes do mundo (Abramo & Montero, 2000, p. 86). O empresariado emerge como o ator vitorioso frente ao Estado, o sindicato. "Pero, sin embargo, se podría pensar que incluso ese (único) actor tiene un margen de libertad reducido, ya que supone que su única posibilidad de éxito sería la adecuación necesaria (y mientras más rápida mejor) a los nuevos patrones de competitividad dominantes a escala internacional" (Abramo & Montero, 2000, p. 86-87)) no

soerguimento do pólo frutícola, servindo, inclusive, de inspiração para a implantação do Platô de Neópolis, projeto exclusivamente para empresários, segundo um modelo que apresenta a inovação da parceria entre estes e o Estado. Coube ao Estado o planejamento e a instalação da infra-estrutura de irrigação fora dos lotes, e aos empresários, os investimentos nas parcelas, a implementação da produção e da comercialização.

Na experiência do Platô, entretanto, o empresariado intensificou e ampliou suas atividades como convidado, ator central e participou de um processo de seleção em que a sua capacidade de investimentos foi avaliada, o que evidencia uma reorientação do Governo no sentido de catalisar mudanças, criando um ambiente propício aos investimentos privados em consonância com o modelo neoliberal (Neves et al., 1997).

Em que pese a desproporcionalidade das áreas irrigadas nas duas experiências (pouco mais de 4 mil hectares no Platô e 31.000 no Vale) importa reter que o objetivo é refletir sobre os impactos desses sistemas de produção na organização do trabalho, incorporando as particularidades de cada experiência, com preocupação predominantemente, qualitativa.

## A pesquisa

A área de pesquisa é o Platô de Neópolis e o Vale do São Francisco. O primeiro, abrange os municípios de Neópolis, Santana do São Francisco, Pacatuba e Japoatã em Sergipe. O segundo, alcança os municípios de Juazeiro e Petrolina na Bahia e em Pernambuco, respectivamente. Em ambos, a fruticultura irrigada é a atividade central com diferentes níveis de inserção nos mercados nacional e internacional.

O estudo foi realizado através de pesquisa documental-censitária e empírica, no ano de 2002. A pesquisa de campo foi conduzida com atores-chaves homens e mulheres (10 trabalhadores, 03 empresários e 02 técnicos de cada área) através de entrevistas abertas sobre a organização do trabalho e da vida social, além de observação da rotina de trabalho em 04 empresas de cada projeto. Foram ainda visitados os galpões onde se realiza o trabalho de pós-colheita. As principais variáveis pesquisadas foram: sistemas de produção em uso, número de trabalhadores permanentes e temporários, tipos de ocupação associadas a gênero, idade, escolaridade e salários.

Os resultados e discussões estão organizados em 05 (cinco) partes, quais sejam: i)Antecedentes históricos, ii)Inclusões/Exclusões das Mulheres nas Atividades da Fruticultura Irrigada, iii)Sociabilidade no Lugar de Trabalho, iv)Agricultura familiar e Assalariamento e v)Conclusões.

## Antecedentes históricos

O Vale do São Francisco e o Platô de Neópolis/SE são espaços de produção de frutas frescas, construídos sob o forte apoio das políticas públicas, segundo novos modelos de apropriação do território, do meio ambiente e do trabalho, orientados por estratégias locais para atendimento a padrões de qualidade e eficiência exigidos externamente.

Nas duas áreas objeto de reflexão foram implantadas políticas públicas para a produção de energia e seus desdobramentos culminaram com o estabelecimento de pólos de desenvolvimento para minimizar os efeitos dessas políticas sobre as populações locais e promover o desenvolvimento regional. Os projetos do Vale do São Francisco foram efetivamente implantados em meados dos anos 70 e envolveram técnicos, empresários e agricultores familiares. A finalidade inicial era a produção de frutas e de matéria-prima para as agroindústrias, no contexto da denominada “modernização conservadora” (Quando a agricultura brasileira passou por mudanças que beneficiaram regiões específicas, produtos e grupos de produtores e repercutiram na configuração de novos espaços produtivos, na modernização da base técnica de produção e na transformação das relações sociais daí decorrentes, mas também na exclusão de parcela significativa dos trabalhadores e pequenos produtores). Após os primeiros cultivos, a integração à agroindústria se mostrou insustentável (Cavalcanti, 1999; Silva, 2001), e novas estratégias foram colocadas em prática, culminando com a expansão da fruticultura para exportação pela iniciativa privada no final dos anos 80. O forte apoio estatal através de fartos incentivos fiscais e financeiros e do suporte das instituições públicas como Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e Codevasf (Companhia de Desenvolvimento do Vale São Francisco) foram fundamentais a consolidação de uma base produtora de frutas frescas nos anos 80 (Cavalcanti, 1998; Silva, 2001), com vinculação aos mercados nacional e internacional. “A partir de então, a atividade conhece uma rápida expansão, constituindo na região um complexo frutícola vinculado aos mercados externos e interno (Silva, 2001, p. 115).

Em 1999, a área de fruticultura no Vale do São Francisco ocupava 31 mil hectares e as principais culturas eram manga, coco, banana, uva, goiaba, dentre outras (Silva, 2001, p. 104).

A implantação do Platô de Neópolis estava prevista como ação da Codevasf para atender às populações atingidas pela barragem de Itaparica mas, diante de diferentes e contraditórios estudos de viabilidade, a obra foi sendo adiada até que o Governo de Sergipe assumiu o gerenciamento da mesma, com o assentamento exclusivo de médios e grandes empresários. Segundo Padrão (1996), os critérios para seleção dos grupos empresariais

foram: capacidade empresarial, cadastro bancário e disponibilidade de recursos para desenvolver o projeto. Os grupos são originários dos Estados de Sergipe, São Paulo, Alagoas, Pernambuco, Bahia e Ceará. É formado por 35 lotes cujos tamanhos variam de 20 a 600 hectares. Até dezembro/2001, 60% do projeto estava efetivamente implantado, o que corresponde a um total de aproximadamente 4500ha. As principais culturas são coco, laranja, tangerina, limão e banana, direcionadas ao mercado nacional. A administração do Projeto é realizada por um condomínio denominado ASCONDIR (Associação dos Concessionários do Projeto Platô de Neópolis), que tem como atribuições o gerenciamento do projeto, a realização de ações que estimulem o desenvolvimento regional, o incremento da produção e o treinamento de pessoal.

## Inclusões/Exclusões das Mulheres nas Atividades da Fruticultura Irrigada

Em pesquisa realizada no Platô, Mota (2000) observou que as mulheres constituem apenas 4% do total dos trabalhadores, assim mesmo, mais da metade trabalha de forma temporária e clandestina. Já no Vale do São Francisco, Cavalcanti (1997, 1998, 1999) constatou que as novas oportunidades de emprego contribuíram, para a ampliação do mercado de trabalho para as mulheres, tendência observada por Lara (1998) no México e por Antunes (1999) para os diferentes setores da economia mundial.

Apesar da ampliação do número de mulheres empregadas na viticultura no Vale, observam-se tentativas de reduzir sua participação no trabalho assalariado, justificado por um viés de gênero.

Nos dois casos, no entanto, há a constatação de que o número de vagas vem sofrendo uma gradativa redução pela substituição do trabalho humano pela tecnologia, a exemplo da fertirrigação e da automatização da irrigação. As mulheres são as mais prejudicadas, seja pelo maior peso dos encargos trabalhistas, seja pelo fato de acumularem dupla jornada e serem responsáveis diretas pelos filhos, consequentemente, mais susceptíveis aos acontecimentos externos ao trabalho; ou ainda, pela noção usualmente compartilhada por homens e mulheres, trabalhadores da agricultura, de que a mulher só é capaz de executar tarefas leves e delicadas, o que escamoteia a qualificação obtida no dia-a-dia do trabalho.

Todas estas assertivas são válidas para o contexto do Platô, mas existem ainda outras razões que têm impedido uma incorporação mais constante das mulheres ao trabalho. Na região, as atividades das mulheres, ainda estão muito associadas à ajuda e, como tal, não têm registro em sistemas de produção cuja lógica é empresarial. Em

períodos anteriores à implantação do Platô as atividades como o artesanato e a pesca de camarão, eram desenvolvidas predominantemente pelas mulheres num contexto em que o acesso a terra para agricultura estava muito limitado, assim mesmo, na condição de morada ou arrendamento. A fragilidade das unidades agrícolas de produção desta região teve como consequência a pluralidade de atividades, entre as quais o assalariamento das mulheres na cana-de-açúcar, assim mesmo, no curto tempo de funcionamento da Usina Grande Vale que empregava um número reduzido de mulheres dada a concepção de que aquele era um tipo de ambiente pouco propício as mulheres casadas. Esse ambiente tornou-se suspeito, pelas insinuações de relações amorosas entre recrutadores da força-de-trabalho e trabalhadoras. Aliás, este é um fato observado e analisado em outras regiões do Brasil (Stolke, 1982). Assim, segundo informações orais, esta atividade era particularmente desenvolvida pelas mulheres solteiras e limitada à adubação.

As experiências que as mulheres residentes na área do Platô acumulam como trabalhadoras na agricultura familiar, na pesca ou como assalariadas não têm distintivos positivos quando comparadas com as dos homens, com exceção da adubação manual. Aliás, esta atividade, intensa na fase de formação de pomares, tende a diminuir pela substituição pela fertirrigação. Por outro lado, em nenhuma das principais culturas implantadas no Platô (coco, laranja, tangerina), as mulheres têm um papel exclusivo. Ao contrário, na agricultura familiar ou empresarial local, a cultura do coco está intimamente associada aos homens, também na perspectiva de gênero, pelo reconhecimento de que a colheita dos frutos depende de habilidades atribuídas aos homens para escalar os coqueiros.

Apesar da possibilidade de ocupação das mulheres diminuir na adubação, tende a se expandir na polinização do maracujá, mas concentrada em apenas 03 (três) empresas e ocupando menos de 1% da área irrigada do Platô. O argumento utilizado pelos empregadores e gerentes para explicitar a preferência pelas mulheres para este tipo de atividade é a aptidão natural, semelhante ao constatado por Cavalcanti (1999) no Vale do São Francisco onde as mulheres ocupam cerca de 70% dos empregos na cultura da uva. Nos dois casos, no entanto, a experiência das mulheres na esfera doméstica contribui enormemente para o domínio de atividades que dependem da coordenação motora fina, do manuseio dos pequenos músculos, imprescindível na preparação de alimentos, na costura e no trato com as crianças. Todas estas são atividades tradicionalmente circunscritas ao domínio doméstico, espaço associado às mulheres.

No Vale, a divisão sexual do trabalho é clara, há trabalho

de mulheres e de homens conforme detalhado por Cavalcanti (1999, p.270). No Platô, esta classificação encontra-se em construção e só genericamente pode-se afirmar que adubação e polinização do maracujá são tarefas de mulheres. Em decorrência do pouco tempo de funcionamento do projeto e da inserção temporária e precária das mulheres, as mesmas ainda não estão associadas positivamente a um tipo de trabalho ou de ocupação.

O funcionamento ainda parcial do Platô não foi suficiente para atrair migrantes. Trabalhadores locais, residentes em povoados ou sedes municipais próximas, recrutados por redes de interconhecimento que funcionam na seleção de novos trabalhadores, formam a força-de-trabalho do Platô. Essas redes têm também um papel de controle social, exercido pelos vínculos de parentesco e amizade, além de reforçar o recrutamento de homens, seja para a preservação de um padrão cultural seja pela estratégia de diminuição da pressão sobre as vagas e também como parte de uma estratégia de reprodução em que compete aos homens a responsabilidade pela manutenção do grupo doméstico.

### **Sociabilidade no Lugar de Trabalho**

Uma diferença central marca as experiências aqui analisadas: o tempo de funcionamento e a dimensão dos empreendimentos. A experiência de mais de 30 (trinta) anos, do Vale do São Francisco com impacto na economia local e ponto de atração de trabalhadores e empresários de diferentes qualificações e origens, para trabalhar temporária ou permanentemente, contribuíram para o crescimento das cidades circunvizinhas, fato inquestionavelmente relacionado à criação desse pólo de produção de frutas frescas. O Platô de Néópolis é uma experiência recente de 08 (oito) anos, com cerca de 15% da área irrigada do Vale e que funciona quase que exclusivamente, com trabalhadores de origem local e que residem em povoados e sedes municipais circunvizinhas ao projeto. Estas características influenciam nas relações tecidas no dia-a-dia do trabalho, seja entre os trabalhadores de uma mesma empresa, seja entre as diferentes etnias.

Analizando os atores sociais no Vale do São Francisco, Cavalcanti (1999, p. 133) constatou que diferentes etnias compõem a população vinculada a agricultura irrigada. Esta diversidade étnica, com as suas especificidades culturais, influencia na organização do trabalho, nas relações entre os trabalhadores e na constituição de identidades a partir do lugar que ocupam na produção e na sociedade local e na forma como concebem a nova situação. As diferenças étnicas são reconhecidas e valorizadas em algumas situações.

*“É assim, que ao falar da objetividade dos paulistas e italianos, ou do trabalho duro dos japoneses e seus descendentes, ou da criatividade dos nordestinos, os nossos informantes estão refletindo sobre o modo como essas diferenças convivem no cotidiano da produção”* (Cavalcanti, 1999, p. 134).

No Platô de Neópolis, apesar da grande maioria dos envolvidos ter origem local, alguns gerentes que são originários do Sudeste do Brasil são taxativos na explicitação das diferenças culturais, afirmando que os nordestinos são preguiçosos, têm muita festa e não gostam de vínculos duradouros com o trabalho. Em oposição, os gerentes que têm origem local, reconhecem nos trabalhadores atributos positivos, muito embora concordem quanto à dificuldade de manter o mesmo contingente de trabalhadores por meses seguidos.

Em uma ou outra situação, a constatação é de que os empregadores, preocupados em atender prazos e padrões de qualidade buscam manter um núcleo central da força-de-trabalho, a partir de diferentes estratégias, dentre as quais a regularização da relação trabalhista. No Vale, os trabalhadores nessa condição, encontram-se sob o estrito controle de fiscais, inclusive externos, que observam o ritmo de trabalho, as relações entre os trabalhadores e os critérios de qualidade. O condicionamento para uma racionalidade produtivista com qualidade é imposto aos trabalhadores, muito embora formas de resistência se evidenciem.

No Platô, pelas diferentes razões já discutidas, predominou a contratação de gerentes e trabalhadores de origem local, concorrendo para o fortalecimento de sociabilidades com base em relações pré-existentes. Ou seja, 40% dos trabalhadores são parentes, além das redes de recrutamento terem funcionado predominantemente com base no parentesco e na camaradagem. Neste emaranhado de relações que mesclam trabalho com relações pessoais despontam situações de reprodução de condições domésticas no trabalho, a exemplo de refeições partilhadas pelos membros de uma mesma família e a realização conjunta de percursos de idas e vindas. Mas também se reproduzem situações de forte controle social, tanto pelas hierarquias familiares em que diferentes membros da família controlam os seus membros nas condições de trabalho, como na esfera doméstica. Por outro lado, os trabalhadores recrutadores não querem se comprometer indicando pessoas que não correspondem aos interesses das empresas. Os indicados evitam decepcionar um amigo ou parente, temendo repercussões negativas nas relações na vida social local. Assim, estas redes têm se revelado como eficiente controle da força de trabalho, pelos compromissos de reciprocidade

assumidos entre quem indica e quem é indicado. Não se observam situações de controle de conversa ou de brincadeiras entre os trabalhadores no Platô. Aliás, este é um dado que tem sido destacado pelos trabalhadores como muito positivo. Apesar desta condição o agrupamento dos trabalhadores do Platô é segmentado por sexo, seja porque as mulheres trabalham em épocas e atividades específicas, seja porque existe uma noção de que homens e mulheres trabalhando juntos comprometem um padrão moral considerado adequado.

### Agricultura familiar e Assalariamento

Comparando os dois casos aqui em análise, concorda-se com Silva (2001) que na atualidade as áreas de fruticultura irrigada são pólos de serviço, não obstante os diferentes estágios de desenvolvimento em que se encontram, o que influencia na organização do trabalho e nas relações entre os proprietários e os trabalhadores.

No Vale do São Francisco a presença de “colonos” - agricultores familiares - na relação dos beneficiários dos projetos de irrigação tem sido objeto de diferentes interpretações. Os primeiros anos da agricultura irrigada foram marcados por uma estreita relação entre irrigantes e agroindústria para o processamento dos produtos, dentre os quais, o tomate. Estes irrigantes trabalhavam junto com suas famílias para produzir sob contrato. O fracasso desta tentativa levou ao enfraquecimento dos mesmos, que por este motivo foram, em grande parte, excluídos do acesso aos seus lotes. No lugar deles fortaleceram-se pequenos empresários e agricultores familiares que se beneficiaram das condições oferecidas para a produção e passaram a se preocupar com as demandas dos mercados e modernas técnicas de gestão. Os poucos colonos que permaneceram têm enfrentado momentos críticos de perda do controle dos meios de produção e pouca competitividade, dadas as exigências do mercado. Sendo assim, os novos espaços ocupados pelos agricultores familiares e o seu sucesso dependem da sua associação, de uma produção de qualidade, diversificação e ocupação de novas janelas de mercado.

O trabalho nessas unidades está também restrito ao quesito “qualificação”. Trabalhadores qualificados e também múltiplos, que possam realizar as diferentes atividades e que sejam “flexíveis”. Flexibilidade, entendida como estar apto para realizar o trabalho em tempos pouco definidos, não requerer contrato permanente, pelo contrário, a idéia dominante é de que eles possam ser “parceiros” no empreendimento, compartilhando com os proprietários as obrigações de produzir segundo critérios pré-estabelecidos e também os lucros eventuais, calculados com base numa conta em que são incluídos

também os possíveis e reais prejuízos. Essa dependência mútua é parte da agenda de controle dos trabalhadores, registrando-se a sua vulnerabilidade. Assim, ainda que em alguns casos as redes de parentesco e amizade funcionem, o trabalhador, em geral, está só. Resultado disso é que o campo no Vale não é um espaço de morada mas essencialmente de trabalho.

Diferentemente do Vale, as atividades do Platô são desenvolvidas exclusivamente por trabalhadores assalariados e têm se concentrado muito mais na produção agrícola do que em outras etapas. Esta condição tem influenciado na preferência por trabalhadores que sejam originários da agricultura familiar.

De maneira geral, existe uma compreensão entre trabalhadores e responsáveis pelos processos de produção, de que a pessoa que é originária de famílias que lidam com a agricultura está mais capacitado para realizar o trabalho porque sabe manejar diferentes instrumentos, observar os fenômenos naturais, discernir espécies vegetais e animais e, também, porque é capaz de oferecer sugestões ao manejo de diferentes culturas e à solução de problemas do dia-a-dia. Em outras palavras, é um sujeito que acumula um conhecimento adquirido no dia-a-dia, mas que é demandado a cada minuto, mesmo que em sistemas de produção alheios às suas experiências. Por outro lado, dominar este conhecimento vai exigir menos em termos de capacitação, que nas palavras de um agrônomo um trabalhador que não tenha origem agrícola “É diferente, porque ele não tem aquela noção de fazer aquele trabalho, você tem que quebrar muito a cabeça ensinando a eles”.

As interpretações dos diferentes atores quanto às características particulares dos trabalhadores originários da agricultura se concentram também na questão da adaptação dos corpos ao trabalho a céu aberto. O trabalho é realizado “quer chova quer faça sol”. Roupas e corpos molhados, suor escorrendo pelos rostos e corpos, são manifestações físicas do contato do homem com a natureza diariamente neste tipo de serviço. Movimentos de levantar, abaixar, mover braços e pernas, ter contato com o solo, com ervas daninhas, com pequenos animais que pousam insistentemente nos corpos (mosquitos, moscas) também são diários.

Apesar da predominância dos informantes que acreditam na diferente capacitação dos trabalhadores originários da agricultura, uma minoria afirma que trabalhadores de diferentes origens se comportam igualmente frente ao trabalho, porque na agricultura irrigada os procedimentos são muito diferentes dos da agricultura de sequeiro. No entanto, reconhecem que os trabalhadores que já foram agricultores se adaptam muito mais rápido aos novos requerimentos. Acredito que a

propalada igualdade de capacidades para o trabalho agrícola venha da própria ampliação que este termo sofre na agricultura irrigada. Atividades de encanador, eletricista, almoxarife etc., foram todas incorporadas à ossatura do trabalho agrícola. Visto assim, é plausível que determinadas atividades apareçam mais identificadas com uns e outros trabalhadores.

Experiências já são acumuladas pela contratação de trabalhadores de origem urbana para trabalhos tradicionalmente agrícolas (plantio, colheita, por exemplo), sem bons resultados pela falta de uma habilidade, mesmo que os trabalhadores sujeitos a esta associação sejam provenientes de diferentes experiências, como por exemplo o assalariamento na cana-de-açúcar. Analiso que o julgamento, do saber-fazer ou não, uma atividade é feito com a rapidez dos que dispõem de uma força-de-trabalho abundante e diversificada e que por isso mesmo não têm tempo para ensinar. Assim, é mais racional, economicamente falando, dispor de um trabalhador que tanto tem mais conhecimento e habilidade para fazer o trabalho, pela capacitação do saber-fazer nas suas unidades de origem, como está mais habituado a enfrentar as intempéries. O costume imprime suas marcas nos corpos.

Na escala ocupacional que elaboram mentalmente e na prática, os trabalhadores de origem urbana têm apresentado maior capacidade para os serviços burocráticos, daí, a predominância dos mesmos neste tipo de serviço. Além disso, estão mais atualizados com outros assuntos, que não aqueles específicos do trabalho agrícola.

Contrapõem-se a estas interpretações e classificações, no entanto, os interesses pessoais, que questionam todas estas idéias acerca das diferentes capacidades. Assim, ser da zona urbana pode ser apenas um distintivo, mas que não impede de apreender e fazer um bom trabalho, particularmente num contexto em que a velocidade da mudança tecnológica exige continuamente novas habilidades e conhecimentos. Mesmo assim, para adquirir novas habilidades é necessário tempo e entre um trabalhador que já acumula saberes no campo agrícola e um que não sabe o primeiro é preferido num contexto em que a maioria das atividades dos trabalhadores ainda exige habilidade manual. Para uma atividade completamente automatizada como a fertirrigação, em que a capacidade requerida é saber calcular a dosagem de fertilizantes e regular os equipamentos em uma determinada unidade de tempo, a origem do trabalhador é indiferente frente a uma capacidade que pode ser rapidamente adquirida.

Para uma ou outra atividade, os entrevistados afirmam que os trabalhadores originários da agricultura estão mais acostumados ao trabalho quando comparados com os

de origem urbana ou com os pescadores, não apenas pelos saber-fazer e pelo saber-ser.

“O pessoal de pesca é um pessoal um pouco mais relaxado, eles não estão habituados a carteira assinada, a horário de trabalho e quando falta ou por algum motivo eles saem da fazenda, eles tem esse meio de convivência que é a pesca. Então eles são menos dependentes. Por isto, a opção para oferecer um trabalho vai ser sempre para alguém que é proveniente da agricultura”.

## Conclusões

No Vale do São Francisco, em descompasso com o sucesso dos empreendimentos, pequenos agricultores foram excluídos, o nível de emprego reduziu-se e formas de parceria foram recriadas, marginais ao sistema de proteção social e trabalhista (Silva, 2001, p. 116). As relações sociais se reconfiguraram nos planos individuais e coletivos, como consequência das divisões sociais entre os que têm ou não trabalho, entre os grupos étnicos, entre homens e mulheres e entre os produtores que tiveram acesso diferenciado às políticas públicas engendradas. No Platô, os agricultores familiares foram excluídos desde o início e o volume de empregos previsto não parece se concretizar. A região ainda não se constituiu como um polo de atração de trabalhadores, a exemplo do que ocorreu no Vale. Assim sendo, os trabalhadores locais que se inseriram no Platô estão imersos em redes sociais locais e tendem a reproduzir estas relações nos espaços de trabalho.

A valorização de trabalhadores originários da agricultura familiar no Platô e de trabalhadores mais especializados no Vale é decorrente das estratégias dos empresários e gerentes, mas também do estágio em que se encontram os empreendimentos. Para o primeiro, as atividades de plantio e de constituição dos pomares são predominantes e exigem maiores conhecimentos da agricultura. No segundo, as atividades de colheita e pós-colheita têm outros requisitos. Sem contar que os trinta anos de funcionamento do projeto já são suficientes para ter uma mão-de-obra qualificada localmente.

A diferente incorporação das mulheres está relacionada aos saberes constituídos na atividade agrícola. Na região do Platô, as mulheres trabalhavam como assalariadas na cana-de-açúcar, mesmo assim, não era a atividade predominante em uma região que tem o artesanato e a pesca como atividades muito importantes e um limitado acesso a terra. Neste sentido, instituiu-se um padrão cultural em que as mulheres têm menores vínculos com a terra.

A predominância do trabalho registrado no Vale e no Platô de Neópolis têm contribuído para que sejam questionadas tendências assim como as particularidades e chamar a atenção para as influências e determinações recíprocas entre esferas da vida cotidiana<sup>5</sup> e do trabalho. Evidências empíricas e análise crítica da literatura têm colocado em questão uma concepção de que os agricultores originários da agricultura familiar são inadequados ao assalariamento.

As rupturas e continuidades entre um passado “camponês” e um presente de assalariamento, questionam análises isoladas dos processos produtivos e da polarização das classes, revalorizando as teses quanto à coexistência de diferentes formas produtivas na agricultura e chamando a atenção para as novas associações entre trabalho, parentesco e trajetórias sociais, num contexto da reestruturação produtiva na agricultura, cujas consequências mais visíveis são a diminuição de postos de trabalho, baixos salários, inserções descontínuas e formas diárias de resistência.

## Literatura Citada

- ABRAMO, L. MONTERO, C.. 2000. “Origen y evolución de la sociología del trabajo en América Latina”, In: E. de la Garça (org.), Tratado Latinoamericano de Sociología del Trabajo. México, Fondo de Cultura Económica.
- ANTUNES, R. 1999. Adeus ao trabalho? Ensaio sobre as metamorfoses e a centralidade no mundo do trabalho. 6<sup>a</sup> edição, Campinas/São Paulo, Editora da UNICAMP/Cortez Editora.
- BENDINI, M. 1999. “Entre maçãs e pêras: globalização, competitividade e trabalho”, In: J. S. B. Cavalcanti (org.), Globalização, trabalho, meio ambiente: mudanças socioeconômicas em regiões frutícolas para exportação, Recife, Editora da UFPE, pp. 97-121.
- CAVALCANTI, J. S. B. 1997. “Frutas para o mercado global”. Estudos Avançados USP, n°29, pp. 79-93.
- CAVALCANTI, J. S. B. ; RAMOS, J. V. R.; SILVA, A. C. B. da. 1998. “O trabalho feminino na agricultura de exportação. As trabalhadoras na viticultura”, In L. Abramo e A. R. de P. Abreu (orgs), Gênero e trabalho na sociologia latino-americana, São Paulo/Rio de Janeiro, ALAST.
- CAVALCANTI, J. S. B. 1999. “Globalização e processos sociais na fruticultura de exportação do Vale do São Francisco”. In J. S .B. Cavalcanti (org.), Globalização, trabalho, meio ambiente: mudanças

- socioeconômicas em regiões frutícolas para exportação. Recife, Editora Universitária/UFPE.
- MOTA, D. M. da. 2000. "O trabalho temporário no projeto de irrigação Platô de Neópolis, SE". *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 18:113-134.
- NEVES, M. F., LAZZARINI, S. G.; MACHADO FILHO, C. A. P. 1997b. "Cenários e perspectivas para o agribusiness brasileiro". In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 35, Natal/RN, SOBER, pp. 846-861.
- SILVA, P. C. G. da. 2001. Articulação dos interesses públicos e privados no Pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA: em busca de espaço no mercado globalizado de frutas frescas. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. (mimeografado).
- STOLCKE, V. 1982. "A família que não é sagrada", In: Estudos sobre a família no Brasil. São Paulo, Ed. Brasiliense, pp.39-9

●

## NOTA CIENTÍFICA

### IDENTIFICAÇÃO DO GENE DELETÉRIO “LUTEUS-PA” EM ACESSOS DE *Theobroma cacao L.* DA SÉRIE PARINARI (PA)

*Milton Macoto Yamada, Ronaldo Carvalho Santos, José Luis Pires*

CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 7, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

O fator “Luteus-Pa” é designado para um caráter que foi pela primeira vez identificado em alguns acessos da série Parinari (Pa) para um fator fisiológico que causa a morte de plântulas ao redor de 30 dias de idade. O objetivo deste trabalho foi identificar outros clones desta série que apresentam o fator letal “Luteus-Pa”, e para isto, os clones foram cruzados com PA 30 e PA 169 utilizados como testadores por serem portadores deste caráter, e as sementes foram plantadas para observar as segregações. O caráter é controlado por um gene na forma recessiva, tendo sido identificado o clone PA 44 como portador deste caráter.

**Palavras-chave:** cacau, marcador genético, fator letal.

**Identification of lethalgene “Luteus-Pa” in accessions of *Theobroma cacao L.* in the Paranari series.** The lethal factor “Luteus-Pa” is designated as a trait which was the first time identified in Parinari (Pa) population for a one physiologic character which cause death of plants around 30 to 40 days old. The objective of this work was to identify other clones which present lethal factor “Luteus-Pa”, and for this proposal PA 30 and PA 169 were crossed as testers, because they are carriers of this character and the seeds were planted to observe segregations. It was observed PA 44 carrying these character.

**Key words:** cacao, genetic markers, lethal factor.

Durante estudos de compatibilidade em clones da série Parinari (PA) no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) (Yamada et al. 1982) foi descoberto um gene simples letal recessivo denominado "Luteus-Pa" (Bartley et al. 1983). Como consequência da ação deste gene, as plantas nascem e crescem normalmente, e após um período de aproximadamente 30 dias, as folhas das plantas portadoras deste caráter em homozigose começam a amarelecer e morrem depois de alguns dias. Foram identificados como portador desses genes os clones PA 30, PA 121 e PA 169. Estes clones possuem esses genes em heterozigose, que quando são intercruzados ou autofecundados usando-se a técnica da mistura de pólen com pólen da espécie Herrania, segregam na proporção de 3:1 (Bartley et al. 1983) indicando ser um caráter monogênico. Em estudos fisiológicos foi verificado que esse gene atua na reação do PS2 (Almeida et al. 1996).

Outros clones da série Parinari foram incorporados para o teste de compatibilidade (Yamada et al., 1996) porque foram introduzidos posteriormente no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC). Entretanto, na época as sementes resultantes dos frutos destas polinizações não foram plantadas, e com isso impossível de saber se esses outros acessos dessa série são portadores desse gene deletério.

O presente trabalho teve o objetivo de identificar novos clones Parinari que portam o caráter "Luteus-Pa" e demonstrar a maneira como este marcador genético pode ser útil no programa de melhoramento genético do cacaueiro.

As polinizações foram realizadas nos clones PA 13, PA 44, PA 120, PA 300, PA 303 e PA 310 com o pólen de PA 169 e os clones PA 4, PA 70 e PA 107 com PA 30 (Tabela 1). Todos os clones utilizados foram os da segunda fase dos estudos de compatibilidade (Yamada et al. 1996).

As polinizações foram em número de 30 seguindo o método de Yamada et al. (1982) e as sementes dos frutos colhidos plantadas com a finalidade de observar as segregações nas progêniens. O plantio foi feito em pó de serra para verificar o aparecimento das plantas portadoras

Tabela 1. Resultados das segregações das progêniens de cruzamentos dos clones da série Parinari com PA 169 e PA 30.

Série	PA 169			Série	PA 30		
	N (nº)	L (nº)	Total		N( nº)	L (nº)	Total
PA 13	104	-	104	PA 04	43	-	43
PA 44	54	19	73	PA 70	39	-	39
PA 120	72	-	72	PA 107	57	-	57
PA 300	48	-	48				
PA 303	82	-	82				
PA 310	50	-	50				

N – Plantas normais L- Plantas com o caráter "Luteus-Pa" n = número de plantas

do caráter, considerando que não havia o interesse de conservar esse material por longo período em casa de vegetação. Os resultados dos clones que segregaram foram testados para a relação de 3:1 pelo método de Qui-Quadrado.

Dentre os nove clones testados no presente estudo, somente o PA 44 apresentou o caráter e segregou na proporção de 54 plantas normais para 19 plantas com caráter "Luteus-PA" estando de acordo com a segregação 3:1 no teste de Qui-quadrado ( $\chi^2 = 0.04$ , valor inferior a 3,841 a 5% com 1 grau de liberdade), confirmando a condição monogênica do caráter. Outros acessos Parinari apresentaram todas as plantas normais (Tabela 1). A identificação dos clones portadores desse caráter "Luteus-Pa" dentro da série Parinari é de grande importância porque este pode ser utilizado como um marcador genético. Um exemplo do uso, pode ser, como ferramenta em teste de paternidade, como no caso de seleções das fazendas. Outra utilidade seria no caso de verificar erros de identificação no Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Os resultados encontrados até o momento foram em PA 30, 169 e 121 e neste trabalho PA 44, não indicando com isso que somente esses acessos são portadores desse caráter. O universo das seleções na família Parinari feitas por Pound é muito extenso, e as identificações foram feitas apenas, em parte dessas seleções. Ainda não foi identificado este caráter em outras populações cacauzeiras.

## Agradecimentos

Os autores agradecem Geroncio Nascimento da Trindade pelos trabalhos de polinizações e o plantio das sementes.

## Literatura Citada

- ALMEIDA, A A F. de; VALLE, R.R.; SERRANO, MINAR, P. 1999. Fluorescence of chlorophyll, gás exchange and chemical composition in a *Theobroma cacao* cross with the lethal factor Luteus-PA. Conferencia Internacional de Pesquisas de Cacau, 12, Salvador, 1996. Lagos Nigéria, Cocoa Producers' Alliance. pp. 601-612.
- BARTLEY, B.G.D. et al. 1983. Genética de *Theobroma cacao*: Ocorrência do fator letal 'Luteus-Pa' na família Parinari. Revista Theobroma (Brasil) 13 (3): 275-278.
- YAMADA, M.M. et al. 1982. Herança do fator compatibilidade em *Theobroma cacao* L.I. Relações fenotípicas na família PA (Parinari). Revista Theobroma (Brasil) 12 (3): 163-167.
- YAMADA, M.M. et al. 1996. Herança do fator compatibilidade em *Theobroma cacao* L. II. Relações fenotípicas em genótipos adicionais do grupo Parinari (PA). Agrotrópica (Brasil) 8 (2): 51-52.

## NOTA CIENTÍFICA

### DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA MURCHA-DE-CERATOCYSTIS DO CACAUERO NA BAHIA, BRASIL

*<sup>1</sup>Luz Carlos Cordeiro de Almeida, <sup>1</sup>Antônio Zózimo de Matos Costa,  
<sup>2</sup>José Ronaldo Monteiro Lopes, <sup>1</sup>José Luiz Bezerra*

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC/Sação de Fitopatologia, cordeirolc@yahoo.com.br

<sup>2</sup>CEPLAC/CENEX/Setor de Transferência de Tecnologia

A murcha-de-Ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* (ex-*fimbriata*), tem assumido importância econômica na região Sul da Bahia, Brasil, por causar morte de cacaueiros. Para se conhecer a distribuição geográfica e a incidência nos cacauais, foi realizado levantamento nas fazendas com suspeita de ocorrência da doença em março de 2000, e também foram compilados os registros da Clínica Fitopatológica do CEPEC, no período de 2000 a 2005. Com base nos resultados obtidos verificou-se que a doença encontrava-se distribuída nos cacauais baianos, sendo observada em 42 fazendas de 22 municípios situados em nove agrossistemas. No município de Uruçuca foi encontrada a maior incidência (30 %), enquanto a média geral foi inferior a 1 %. No Espírito Santo, a doença ocorreu em três fazendas do município de Linhares. Em todas as plantas doentes foram observadas lesões oriundas de cortes na base do caule. No levantamento realizado nas fazendas a doença foi diagnosticada apenas na variedade Theobahia e nos registros da clínica fitopatológica, além desta variedade, foi diagnosticada nos clones TSH 516, TSH 1188 e VB 618 e outros não identificados e também em híbridos com idade superior a 20 anos.

**Palavras-chave:** *Ceratocystis cacaofunesta*, *C. fimbriata*, mal-do-facão, *Theobroma cacao*.

#### **Geographical distribution of cacao Ceratocystis wilt disease in Bahia State, Brazil.**

The Ceratocystis wilt, caused by *Ceratocystis cacaofunesta* (ex-*fimbriata*), has assumed economic importance in the South Bahia Region of Brazil, because it causes death of cacao plants. To know the geographical distribution and disease incidence, a survey was done in cacao plantations of Bahia State on March, 2000. The records of the phytopathological clinic of CEPEC, during the period 2000 to 2005 were also checked. The results showed spreading of the disease in cocoa plantations of Bahia State, which was observed on 42 farms of 22 municipalities situated in nine agrosystems. The biggest incidence (30 %) was found in Uruçuca municipality, although the overall media was less than 1 %. In Espírito Santo State, the disease occurred on three farms of the Linhares municipality. All diseased cocoa plants showed lesions originating from wounds on the stem base. During the survey only the variety Theobahia was affected by the disease, but from records of the phytopathological clinic it also occurs in cacao clones TSH 516, TSH 1188, VB 618, several non-identified cacao clones and hybrids over 20 years old.

**Key words:** *Ceratocystis cacaofunesta*, *C. fimbriata*, *Theobroma cacao*.

## Introdução

A ocorrência da murcha-de-Ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrech & Harrington (Engelbrech e Harrington, 2005), anteriormente identificado como *C. fimbriata* Ellis & Halsted, foi relatada por Bezerra et al. em 1998 (Oliveira e Luz, 2005) causando morte de cacauzeiros, *Theobroma cacao* L., no Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec) em Ilhéus na Bahia. Esta doença letal é de importância econômica porque reduz drasticamente a população de cacauzeiros nas plantações. Segundo Lass (1985), na Colômbia, em 1955, houve mais de 50 % de morte de cacauzeiros, resultando no declínio da produção; no Equador, em 1970, somente em um local morreram 40.000 cacauzeiros; e, em Trinidad, na década de 1950, essa doença foi mais importante que as outras observadas nos cacauzeiros.

Após a doença vassoura-de-bruxa do cacauzeiro [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] ser detectada em 1989 no estado da Bahia, Brasil (Pereira et al., 1990), a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), visando ampliar o leque de recomendações para o manejo integrado, através de uma medida de controle mais duradoura, distribuiu aos agricultores, a partir de 1997, sementes da variedade Theobahia (SCA 6 X ICS 1), considerada resistente à doença. Um ano depois do plantio, a Clínica Fitopatológica do Cepec passou a receber constantemente amostras de cacauzeiros da variedade Theobahia com sintomas da murcha-de-Ceratocystis. O material botânico trazido à Clínica Fitopatológica justificou a realização de um levantamento para conhecer a distribuição geográfica e a incidência dessa doença nos agrossistemas da região cacaueira baiana.

## Material e Métodos

No período de 13 a 27 de março do ano 2000, foram visitadas 65 fazendas perfazendo um total de 335.928 cacauzeiros da variedade Theobahia, que era o único material genético com registro da infecção até a época do levantamento e com histórico de morte de cacauzeiros causada por *C. cacaofunesta*. As fazendas estavam localizadas nos seguintes agrossistemas e municípios: **Almada** (Ilhéus, Juçari e Uruçuca); **Camacan** (Arataca, Camacan e Santa Luzia); **Canavieiras** (Belmonte); **Ipiraú** (Ibirapitanga, Piraí do Norte e Ubatã); e **Valença** (Itacaré, Ituberá e Una), conforme Silva e Leite (1988). Também foram visitados plantios sem histórico da doença, desde que houvesse mais de 500 cacauzeiros da variedade Theobahia, tanto os seminais como os enxertados. Das plantas com sintomas de murcha e que causaram dúvidas na identificação do agente causal, foram retiradas amostras e enviadas à Clínica Fitopatológica para diagnóstico.

No período de abril de 2000 a outubro de 2005, informações contidas nos laudos da Clínica Fitopatológica foram acompanhadas para observar a disseminação do patógeno e a evolução da doença nos agrossistemas e o tipo de população de material genético infectado.

## Resultados e Discussão

Em 15 fazendas de nove municípios, totalizando 128.900 plantas da variedade Theobahia, foram registradas 877 plantas com sintomas da doença, resultando em incidência média inferior a 1 %. Nos agrossistemas Almada e Camacan ocorreram as maiores incidências, embora no município de Camacan o valor foi inferior à média. Valores também baixos foram encontrados nos demais agrossistemas (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência da murcha-de-Ceratocystis em cacauzeiros da variedade Theobahia em agrossistemas do Sul da Bahia. Ano 2000.

Agrossistema/ Município	Nº de fazendas	Nº total de plantas inspecionadas	Nº de plantas doentes	Incidência (%)
<b>Almada</b>				
Ilhéus	1	3.000	100	3,34
Uruçuca	2	1.800	241	13,39
<b>Camacan</b>				
Arataca	1	2.500	44	1,76
Camacan	2	85.500	150	0,18
Santa Luzia	2	5.500	321	5,84
<b>Canavieiras</b>				
Belmonte	3	22.500	16	0,08
<b>Ipiraú</b>				
Piraí do Norte	1	3.000	2	0,07
Ubatã	1	100	1	1,00
<b>Valença</b>				
Ituberá	2	5.000	2	0,04
<b>Média</b>				0,68

Entretanto, no agrossistema Camacan foi encontrado o maior número de fazendas (cinco) com plantas doentes.

Os maiores índices de incidência foram observados na fazenda Novo Oriente, em Uruçuca, onde 240 cacaueiros dos 800 inspecionados apresentaram-se infectados, resultando em incidência de 30 %, e na fazenda Nova Esperança, em Santa Luzia, onde 320 dos 3.000 cacaueiros inspecionados estavam doentes, resultando numa incidência de 10,7 %. Estes índices de incidência evidenciaram a suscetibilidade da variedade Theobahia à murcha-de-Ceratocystis, embora não tenha sido observado morte de plantas enxertadas com esta variedade durante o período de inspeção.

Em todas as plantas que expressaram os sintomas da doença foram constadas lesões desenvolvidas a partir de cortes no tronco, posicionadas à altura do coleto, que corresponderam a ferimentos realizados durante a roçagem, a qual é feita com uso de facão. De acordo com Oliveira e Luz (2005) o patógeno penetra principalmente através de ferimentos deixados na planta durante as práticas de poda, limpeza do solo, desbrota e colheita de frutos.

O levantamento nos laudos emitidos pela Clínica Fitopatológica evidenciou a presença da doença em 30 fazendas, localizadas nos agrossistemas (Figura 1) **Almada** (Ibicaraí, Ilhéus, Itajuípe, Lomanto Junior e Uruçuca), **Camacan** (Camacan), **Canavieiras**

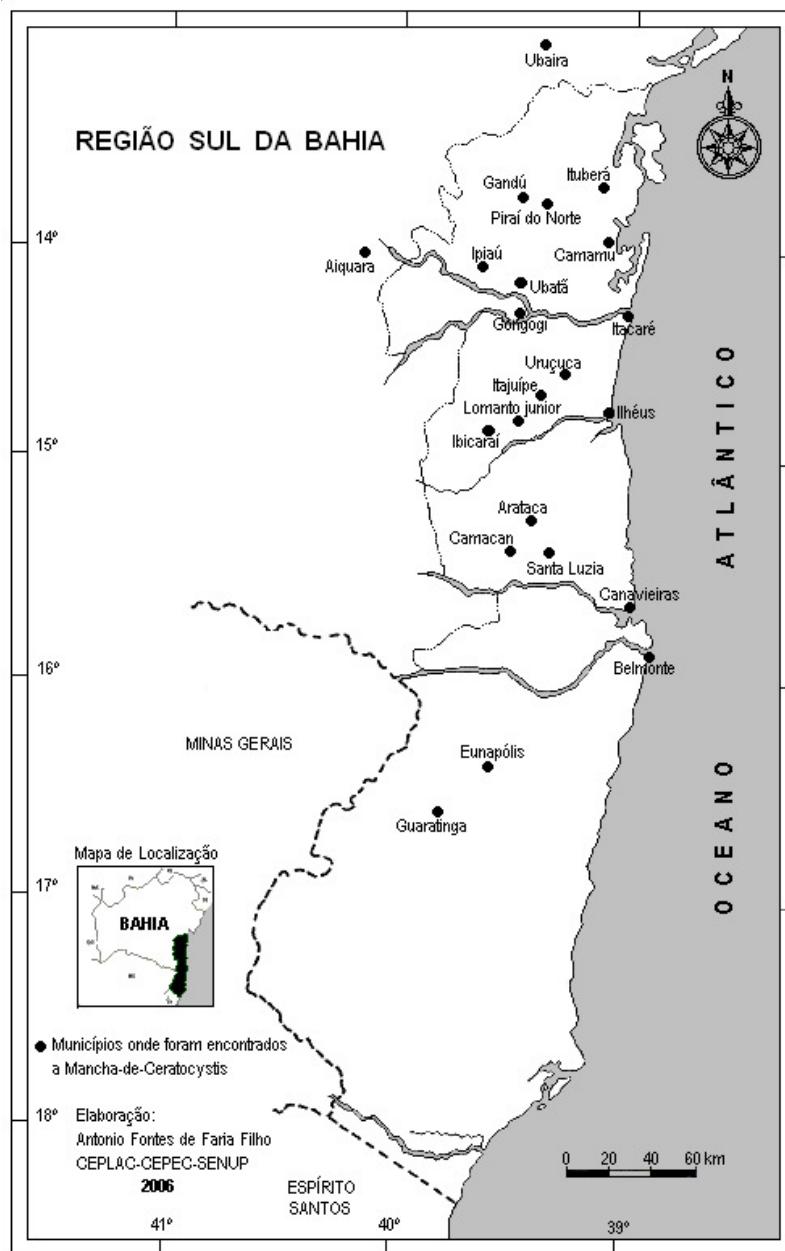


Figura 1 - Distribuição geográfica da murcha-de-Ceratocystis do cacaueiro na Bahia.

(Canavieiras), **Itamarajú** (Guaratinga), **Ipiáu** (Aiquara, Gandu, Gongogi, Ipiáu e Ubatã), **Jiquiriçá** (Ubaira), **Porto Seguro** (Eunápolis), **Rio Doce** (Linhares) e **Valença** (Camamu, Itacaré e Ituberá). O patógeno foi observado nos clones TSH 516, TSH 1188, VB 618 e outros não especificados; na variedade Theobahia; e em híbridos com idade superior a 20 anos. A diversidade do material genético atacado pelo patógeno é uma evidência de que a variedade Theobahia não é o único material genético suscetível em condições de campo, embora o TSH 516 tenha o mesmo genótipo dessa variedade. Estudos *in vivo*, realizados em laboratório por Silva et al. (2004), mostraram que vários clones de cacaueiros foram suscetíveis a um isolado do patógeno obtido de cacauero da Bahia. Constatou-se que o isolado era muito agressivo ao se observar a suscetibilidade do clone IMC 67, quando a sua reação conhecida era de resistência (Delgado e Echandi, 1965; Espinosa, 1968; Soria e Salazar, 1965; Delgado e Suárez, 2003). Estas informações permitem prever que outros materiais genéticos de cacaueiros, tanto os distribuídos pela CEPLAC aos agricultores como aqueles selecionados pelos próprios agricultores, podem ser infectados pelo patógeno.

Nos resultados obtidos observou-se que a doença foi encontrada em 42 fazendas de 22 municípios situados em oito agrossistemas da região cacauera do Sul da Bahia (Figura 1) e em três fazendas de um município do agrossistema Rio Doce no Espírito Santo. Portanto, a doença encontra-se distribuída nos cacauais baianos, além de ter sido encontrada também no Espírito Santo em 2001.

### Literatura Citada

DELGADO C., J.; ECHANDI, E. 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal Del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba (Costa Rica) 15 (4):286-289.

- DELGADO, R.; SUÁREZ, C. 2003. Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao. In: Seminario Nacional de Sanidad Vegetal, 12. 2003. Anais. Latacunga, Ecuador. pp8.
- ENGELBRECHT, C.J.B.; HARRINGTON, T.C. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia 97 (1):57-69.
- ESPINOZA M., A.S. 1968. Nuevas contribuciones al estudio de la resistencia del cacao al "Mal del Machete" causado por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted. (Tesis Ingeniero Agronomo). Guayaquil, Universidad de Guayaquil.
- LASS, R. A. 1985. Diseases. In Wood, G.A.R.; Lass, R.A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. pp. 265-365.
- OLIVEIRA, M. L. de; LUZ, E.D.M.N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.
- PEREIRA, J.L., RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M. de; ALMEIDA, L.C.C. de. 1989. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. Tropical Agriculture (Turrialba) 67(2):188-189.
- SILVA, L.F. da; LEITE, J. de O. 1988. Caracterização preliminar dos agrossistemas das regiões cacaueras da Bahia e Espírito Santo. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 156. 15p.
- SILVA, S.D.V.M.; PAIM, M.C.; CASTRO, W.M. 2004. Cacau "jaca" resistente a *Ceratocystis fimbriata* na região Cacauera da Bahia, Brasil. Fitopatología Brasileira 29(5): 538-540.
- SORIA V., J.; SALAZAR, G. 1965. Pruebas preliminares de resistencia a *Ceratocystis fimbriata* en clones e híbridos de cacao. Turrialba (Costa Rica) 15 (4):290-295.

## **AGRADECIMENTOS AOS CONSULTORES CIENTÍFICOS**

Em 2005, a Comissão de Editoração do CEPEC contou com a colaboração de especialistas, pertencentes ou não ao quadro da CEPLAC, que, como consultores científicos, revisaram os trabalhos recebidos para publicação, contribuindo, dessa maneira, para melhorar o seu conteúdo e apresentação.

A todos eles, essa Comissão expressa os seus mais sinceros agradecimentos, esperando continuar recebendo deles a sua valiosa colaboração.

- Antônio Enedi Boaretto (1) CENA/USP
- Antônio Figueira (1) CENA/USP
- Caio Marcio V. C. de Almeida (1) CEPLAC/SUPOC
- Cleber Novaes Bastos (1) CEPLAC/SUPOR
- Eneida de Moraes C. Marcilio (1) Univ. Estadual de Feira de Santana / BA
- Eurípedes Malavolta (1) CENA/USP
- Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (1) UNICAMP/SP
- José Luiz Bezerra (2) CEPLAC/CEPEC
- Luiz Carlos Cordeiro de Almeida (1) CEPLAC/CEPEC
- Maria Menezes (1) UFRPE/Recife - PE
- Mario Lúcio V. Resende (2) UFLA/Lavras - MG
- Messias Gonzaga Pereira (5) UENF/ CCTA/ RJ
- Milton Macoto Yamada (3) CEPLAC/CEPEC
- Quintino Reis de Araújo (1) CEPLAC/CEPEC
- Raul René Valle (1) CEPLAC/CEPEC
- Rita Bordignon (1) IAC/Campinas - SP
- Ronan Xavier Correa (2) UESC - BA
- Stela Dalva V. M. Silva (1) CEPLAC/CEPEC

\*Os números entre parênteses, após os consultores, indicam o número de trabalhos revisados.



**COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUDEIRA**  
**Orgão Vinculado ao Ministério da Agricultura**