

## **DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO COM O USO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITES**

**SILVA** Érika Lindbergh <sup>1</sup>; **ALVES** Rafael Moysés <sup>2</sup>; **ALBUQUERQUE** Paulo Sergio B. <sup>3</sup>; **SEBBENN** Alexandre Magno <sup>4</sup>

**RESUMO:** O plantio do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum na Região Amazônica exige que a base genética dos materiais de plantação seja a mais ampla possível, pois a região é tida como o centro de origem e diversidade da espécie. O material de pesquisa foi constituído por 24 clones de cupuaçuzeiro que estão em fase final de avaliação em quatro Unidades da Embrapa na Região Norte: CPAA – Amazonas, CPATU – Pará, CPAFAC – Acre e CPAFAP – Amapá, no qual foi realizado a extração do DNA e análises eletroforéticas. Dos 20 *primers* microssatélites utilizados, 15 foram eficientes na amplificação de bandas. Cinco, entretanto, foram monomórficos. Dentre os 15 pares de primers utilizados neste trabalho, os mais polimórficos foram mTcCIR135 e 162 que amplificaram 4 alelos cada, enquanto os primers mTcCIR7, 109, 194 e 198 foram monomórficos, amplificando apenas uma alelo. Existe variabilidade genética entre os clones em estudos. Porém, o nível de diversidade alélica foi baixa, provavelmente devido ao pequeno número de genótipos e locos polimórficos analisados.

**Palavras-chave:** *Theobroma*, microssatélites, BAG.

## **GENETIC DIVERSITY AMONG CLONE OF CUPUASSU WITH THE USE OF TYPE MOLECULAR MARKERS MICROSATELLITES**

**ABSTRACT:** The planting of cupuassu, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum in the Amazon region requires that the basic genetic material for planting is as broad as possible, because the region is taken as the center of origin and diversity of the species. The research material was formed by 24 clones of cupuassu that are in the final stage of evaluation in four units of Embrapa in the North: CPAA - Amazonia, CPATU - Para, CPAFAC - Acre and CPAFAP - Amapa, which was made in the extraction of DNA and electrophoretic analysis. Of the 20 primers used microsatellites, 15 were efficient in the amplification of bands. Five, however, were monomorphic. Among the 15 pairs of primers used in this study, the most polymorphic mTcCIR135 and 162 that were amplified 4 alleles each, while the primers mTcCIR7, 109, 194 and 198 were monomorphic, amplifying only one allele. There is genetic variability among clones in studies. However, the level of allelic diversity was low, probably due to the small number of genotypes and polymorphic loci tested.

**Keywords:** *Theobroma*, microsattelites, ABG.

## INTRODUÇÃO

O plantio do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum na Região Amazônica exige que a base genética dos materiais de plantação seja a mais ampla possível. Isto porque essa região é tida como o centro de origem e diversidade da espécie (Ducke, 1946; Cuatrecasas, 1964), implicando com isso que todos os patógenos coevoluíram com o cupuaçuzeiro ao longo dos tempos. Portanto, o desenvolvimento de cultivares resistentes aos patógenos limitantes ao cultivo dessa fruteira deverá levar em conta esse aspecto. Pois a estratégia mais segura para o programa de melhoramento do cupuaçuzeiro é desenvolver, continuamente, materiais que possuam diferentes fontes de resistência, diversificando os materiais de plantação a serem oferecidos aos produtores (Alves, 1999). Esta pesquisa objetiva estudar, com marcadores microssatélites, a organização da variabilidade genética de clones de cupuaçuzeiro, selecionados por diferentes entidades de pesquisa da Amazônia, com vistas a orientar as futuras recomendações desses materiais para plantio.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material de pesquisa (Tabela 1) foi constituído por 24 clones de cupuaçuzeiro que estão em fase final de avaliação em quatro Unidades da Embrapa na Região Norte: CPAA – Amazonas, CPATU – Pará, CPAFAC – Acre e CPAFAP – Amapá. Tecidos foliares dos clones selecionados foram enviados ao Laboratório de Genética Molecular da CEPLAC, em Benevides – Pará, onde foi realizada a extração do DNA e análises eletroforéticas. Para extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1990), modificado por Figueira et al. (1997) para espécies do gênero *Theobroma*. Foi utilizada a técnica de marcadores microssatélites na amplificação do DNA, sendo testados *primers* desenvolvidos por Lanaud et al. (1999) para emprego em *T. cacao*. Vinte *primers* que amplificam DNA de cupuaçuzeiro foram empregados, com base na seleção iniciada por Alves (2002). As reações foram preparadas com volume final de 13  $\mu$  l, contendo 15 ng de DNA genômico; 100  $\mu$  M de cada dNTPs; 0,2  $\mu$  M de cada primer (forward e reverse); tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), e 1 unidade de Taq DNA polymerase.

O protocolo de amplificação obedeceu ao seguinte esquema: um ciclo de desnaturação à 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 60 s e 72°C por 60 s. Os fragmentos (bandas) foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida à 7% e 7 M de uréia, corrido em cuba vertical. Inicialmente foi realizada uma pré-corrida durante 45 minutos à 65 W, e após a aplicação de 5  $\mu$  l de

reação no gel, foi realizada a corrida, durante 3 h, sendo à potência de 10 W por 10 minutos, e posteriormente, mantendo à potência constante de 60 W. Em seguida o gel era colorido com nitrato de prata, conforme Creste et al. (2001).

A genotipagem em cada loco foi obtida pela leitura direta das bandas no gel. Os materiais foram caracterizados a partir dos índices de diversidade genética, índice de fixação e da distância genética de Nei (1978). A diversidade genética na amostra foi estimada para os seguintes parâmetros: número total de alelos ( $k$ ), número médio de alelos por loco ( $A$ ), número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ). O índice de fixação foi estimado por  $F = 1 - (H_o / H_e)$ . Para verificar se os valores de  $F$  em nível de locos e média sobre os locos diferiam de zero foi utilizado 1000 permutações. Os índices de diversidade genética, o índice de fixação e as permutações foram estimadas com auxílio do programa FSTAT (Goudet, 2002). A distância genética entre os clones foi calculada pela a distância de Nei (1972). O método de agrupamento utilizado para a construção do dendrograma foi o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). As distâncias genéticas e o dendrograma foram obtidos a partir do programa TFPGA (Miller 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Diversidade genética*

Dos 20 *primers* microsatélites utilizados, 15 foram eficientes na amplificação de bandas. Cinco, entretanto, foram monomórficos (Tabela 2). Com estes *primers* construiu-se o *fingerprint* de cada genótipo mostrado na Tabela 2. Foram encontrados 34 alelos na população de estudo com média de 2,27 alelos por loco. Dentre os 15 pares de *primers* utilizados neste trabalho, os mais polimórficos foram mTcCIR135 e mTcCIR162 que amplificaram 4 alelos cada, enquanto os *primers* mTcCIR7, 109, 194 e 198 foram monomórficos, amplificando apenas uma alelo (Tabela 3).

Utilizando marcação radioativa nas amplificações, Lanaud et al. (1999) obtiveram média de 5,6 alelos por loco analisando 24 genótipos de cacaueteiro (*Teobroma cacao*), enquanto que Motamayor et al. (2001) utilizaram 16 pares de *primers* em 103 indivíduos de cacaueteiro de inúmeras procedências, encontraram 150 alelos, com média de 9,4 alelos por loco. Sereno et al. (2001) verificaram polimorfismo em nove locos e média de 4,4 alelos por loco analisando 94 genótipos de cacaueteiro, utilizando coloração de géis de poliacrilamida com brometo de etídeo. Alves (2003) trabalhando com populações de cupuaçuzeiro, observou que os *primers* mais polimórficos foram: mTcCIR61, mTcCIR26, mTcCIR17 e mTcCIR18, que amplificaram até 11, 10, 8 e 8 alelos, respectivamente, enquanto os *primers* mTcCIR09 e

mTcCIR54 amplificaram apenas dois alelos. O menor nível de diversidade alélica na presente amostra se deve possivelmente ao pequeno número de genótipos e locos polimórficos analisados.

O número efetivo de alelos por locos ( $A_e$ ) foi menor do que o número de alelos nos locos ( $A$ ), variando de 1 a 2,62 alelos, como média de 2,35 alelos por loco. Isto demonstra que muitos alelos têm baixa frequência ou são raros (Tabela 3). A heterozigosidade observada nos locos polimórficos variou de 0,190 a 0,957, como média de 0,42. A heterozigosidade esperada para os locos polimórficos variou entre 0,176 a 0,523, com média de 0,45. O índice de fixação variou entre os locos polimórficos de negativo a positivo (Tabela 3). Em quatro locos o índice de fixação foi negativo (variando de -0,830 a -0,081), sugerindo excesso de heterozigotos em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nos demais locos polimórficos os valores foram positivos, embora não significativamente diferentes de zero (variando entre 0,106 a 1). A média entre locos por sua vez foi positiva, mas baixa e não diferente de zero, o que demonstra que o conjunto dos clones encontra-se nas proporções esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Comparar diversidade genética entre diferentes espécies ou mesmo populações de mesma espécie é complicado devido a diferentes tamanhos amostrais em termos de indivíduos e locos analisados. Contudo, os resultados gerais, em termos de número de alelos, heterozigosidade e índice de fixação sugerem que esta pequena amostra contém um alto nível de diversidade genética e baixos níveis de homozigose e possivelmente ausência de endogamia, visto que os valores do índice  $F$  em nível de locos e média entre locos foram não significativamente diferentes de zero.

### ***Distância genética entre os clones***

O dendrograma revelou que os materiais de 1 a 6, indicados pelo CPATU, apresentam uma forte proximidade genética, a exceção do clone 3 que é mais divergente. Possivelmente porque os três primeiros (clones 1, 2 e 3) são descendentes dos três últimos (clones 4, 5 e 6), que por sua vez foram coletados no Amazonas. Estes três clones com mais um outro, coletado em Belém, formaram a cultivar policlonal lançada pelo CPATU em 2002 (Alves & Cruz, 2002). Essa baixa divergência entre os três clones supracitados não tinha sido detectada pelos caracteres morfo-agronômicos que discriminaram os genótipos. No entanto, observado o genótipo destes seis clones (Tabela 2) é possível afirmar que estes não são idênticos, embora sejam parentes em algum grau. Por exemplo, o parentesco, em termo de coancestria (medida probabilística de parentesco) entre os clones 1, 2 e 3, com os clones 4, 5 e 6 é igual a 0,25, ou seja, existe a probabilidade de 25% dos genes serem idênticos por descendência. É, portanto, fundamental evitar envolver estes clones parentes em mesmos cruzamentos, para evitar gerar endogamia biparental na descendência, o que pode desencadear a depressão endogâmica.

Para os clones indicados pela Unidade do Amazonas (CPAA), o dendrograma revelou haver muita proximidade genética entre os clones 8 e 9, apesar de terem sido coletados na região Bragantina do Estado

do Pará e Manaus, respectivamente, bem como, entre os clones 10 e 11, ambos coletados na região Bragantina. Houve divergência desses dois grupos para o clone 12, também coletado naquela região, e mais acentuado ainda com o clone 7 coletado em Iranduba-AM.

O conjunto de clones indicados pelo CPAFAP se aglutinou em dois sub-grupos: o primeiro formado pelos clones 13, 15 e 16 e o outro pelos clones 14, 17 e 18. O clone 13 foi coletado no município de Mazagão – AP e o 17 em Porto Grande – AP, os demais materiais não dispõem de procedência. Entre os materiais oriundos do CPAFAC foram observadas as maiores divergências. Apenas os clones 20 (Cacoal–RO) e 22 (Machadinho-RO ) foram os mais próximos. Os outros três materiais também foram colhidos no Estado de Rondônia e somente o clone 23 foi coletado em Humaitá–AM. Em termos gerais, estes resultados indicam que este pequeno conjunto de clones apresenta variabilidade genética e podem ser explorados em programas de melhoramento, através de cruzamentos controlados. Contudo, é importante que estes tenham seu pedigree controlado daqui para frente a fim de evitar-se cruzar clones parentes e gerar endogamia biparental.

## CONCLUSÃO

Existe variabilidade genética entre os clones em estudos. Porém, o nível de diversidade alélica foi baixa, provavelmente devido ao pequeno número de genótipos e locos polimórficos analisados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.M. Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex. Spreng) Schum). In: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental. **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém, 1999b. cap.1, p.37-48 (Documentos, 16)
- ALVES, R.M. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex.Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. Piracicaba, 2002. 146p. Tese (Doutorado) ESALQ/USP
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.1315, 1990.
- FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S.V.; CARPENTER, D.; PIRES, J.L.; CASCARDO, J.C.M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* from Brazil and Malaysia. **Tropical Agriculture**, v.74, n.2, p.132-139. 1997.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): A computer program to calculate  $F$ -statistics. J Heredity 86, 485-486, 2002.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsattellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v.8, p.2141-2143, 1999.

MILLER, M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.

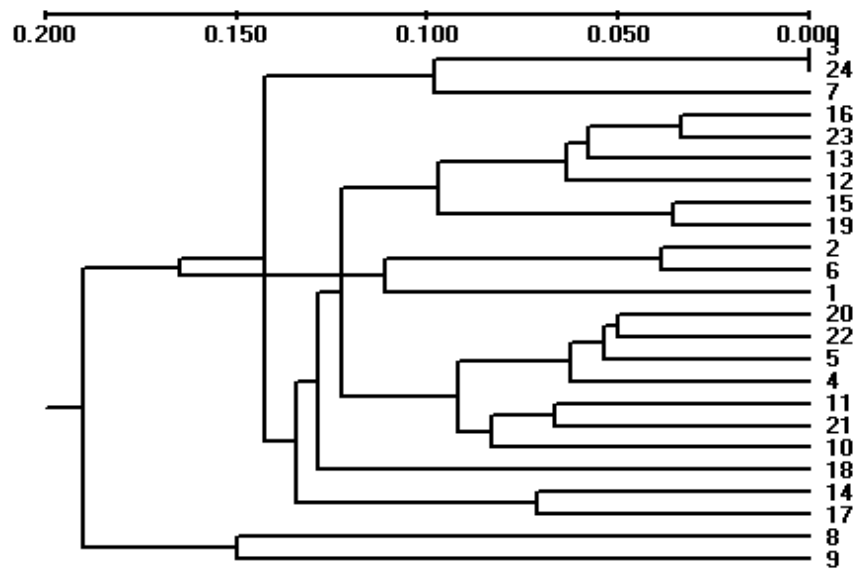


Figura 1 – Dendrograma mostrando a diversidade genética entre clones de cupuaçuzeiro.

Tabela 1 – Código usado no experimento, código original do acesso, local de introdução e local de coleta dos materiais analisados.

Código do experimento	Código do acesso	Introdução	Local de coleta da Matriz
1	42	Pará	Híbrido: Codajas (AM) x Muaná (PA)
2	46	Pará	Híbrido: Codajas (AM) x Manacapuru (PA)
3	47	Pará	Híbrido: Codajas (AM) x Parintins - AM
4	174	Pará	Coari - AM
5	186	Pará	Codajas - AM
6	215	Pará	Manacapuru - AM
7	Clone 59	Amazonas	Irاندuba -AM
8	Clone 15	Amazonas	Região Bragantina – PA
9	Clone 72	Amazonas	Manaus-AM
10	Clone 19	Amazonas	Região Bragantina – PA
11	Clone 09	Amazonas	Região Bragantina – PA
12	Clone 10	Amazonas	Região Bragantina – PA
13	01-5-1	Amapá	Mazagão - AP
14	05-4-1	Amapá	*
15	46-5-1	Amapá	*
16	51-4-1	Amapá	*
17	Clone 70	Amapá	Porto Grande - AP
18	74-5-2	Amapá	*
19	GM 4Kg	Rondônia	Guajará-Mirim - RO
20	CEL - M1	Rondônia	Cacoal - RO
21	Prog 04	Rondônia	Machadinho - RO
22	Prog 20	Rondônia	Machadinho - RO
23	Prog 34	Rondônia	Humaitá - AM
24	Prog 36	Rondônia	Porto Velho - RO

\* Sem informação

PRIMERS	mTcCl R 2	mTcCl R 4	mTcCl R 7	mTcCIR 19	mTcCIR 33	mTcCIR 57	mTcCIR 58	mTcCl R 109	mTcCl R 135	mTcCl R 162	mTcCl R 194	mTcCl R 198	mTcCIR 220	mTcCl R 230	mTcCIR 264
TRATAMENTOS															

Tabela 3 - Estimativas de parâmetros genéticos em 15 locos microssatélites de cupuaçuzeiro, onde A é o número total de alelos;  $A_e$ : número médio de alelos/loco;  $H_o$ : heterozigosidade observada;  $H_e$ : heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; F: índice de fixação, utilizando 24 acessos distribuídos em quatro populações.

	A	$A_e$	$H_o$	$H_e$	F
mTcCIR 2	2	2,04	0,455	0,509	0,106
mTcCIR 4	3	2,10	0,957	0,523	-0,830
mTcCIR 7	1	1,00	0	0	--
mTcCIR 19	3	2,62	0,542	0,618	0,123
mTcCIR 33	3	1,75	0,529	0,43	-0,231
mTcCIR 57	2	1,19	0	0,159	1,000
mTcCIR 58	3	1,79	0,319	0,442	0,279
mTcCIR 109	1	1,00	0	0	--
mTcCIR 135	4	1,86	0,565	0,462	-0,222
mTcCIR 162	4	1,96	0,261	0,489	0,467
mTcCIR 194	1	1,00	0	0	--
mTcCIR 198	1	1,00	0	0	--
mTcCIR 220	2	1,21	0,190	0,176	-0,081
mTcCIR 230	2	1,44	0,273	0,305	0,106
mTcCIR 264	2	1,61	0,130	0,377	0,654
Média	3,40	2,35	0,42	0,45	0,060
Desvio padrão	1,03	0,50	0,28	0,22	--
Total de alelos	34				