



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Maria Suellem da Conceição Silva<sup>1</sup>, Rafael Moysés Alves<sup>2</sup>, Paulo Sergio Bevilaqua Albuquerque<sup>3</sup>,  
Carlos Rogério de Sousa Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). E-mail: suellem\_ufra@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: rafael@cpatu.embrapa.br

<sup>3</sup>Pesquisador, ERJOH, CEPLAC, BR 316 Km 17, CP 46, Marituba, PA, CEP 67105-970. E-mail: psbalbuq@oi.com.br

<sup>4</sup>Pesquisador(DCR),ERJOH,CEPLAC, BR316 Km 17, CP 46, Marituba,PA,CEP 67105-970.E-mail: [carlos-roger@hotmail.com](mailto:carlos-roger@hotmail.com)

**Resumo:** O cupuaçuzeiro é uma fruteira amazônica promissora, sendo o seu fruto muito utilizado industrialmente no fabrico de geléias, néctares, doces, ou no beneficiamento de sua polpa, o quê justifica a realização de pesquisas visando o seu melhoramento genético. Nesse sentido, foi avaliada a diversidade genética de 24 acessos de cupuaçuzeiro, utilizando 14 locos microssatélites, dos quais 12 mostraram-se polimórficos. Foram encontrados 48 alelos nos acessos em estudo. A média do número efetivo de alelos por locos ( $A_e$ ) foi 2,32 alelos. A heterozigosidade observada nos locos polimórficos variou de 0, 333 a 1, com média de 0, 540. A heterozigosidade esperada para os locos polimórficos variou entre 0, 488 (mTcCIR 58) a 0, 765 (mTcCIR 25) , com média de 0,541. O índice de fixação variou entre os locos polimórficos de negativo a positivo. Em doze locos polimórficos os valores foram positivos (variando entre 0, 1047 a 0, 4398). Os resultados indicam que o conjunto de clones apresenta variabilidade genética, podendo serem explorados no melhoramento do cupuaçuzeiro, através de cruzamentos controlados.

**Palavras-chave:** diversidade genética, microssatélites, *Theobroma grandiflorum*

### Introdução

O melhoramento genético do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum, na região Amazônica preconiza que a base genética utilizada seja a mais ampla possível. Considerando que a região é o centro putativo de origem e diversidade da espécie, provavelmente, os patógenos do cupuaçuzeiro coevoluíram com o mesmo ao longo dos tempos (CUATRECASAS, 1964). A estratégia mais segura para o programa de melhoramento do cupuaçuzeiro é desenvolver, continuamente, variedades que possuam diferentes genes de resistência, diversificando as cultivares a serem oferecidos aos produtores.



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética dos clones de cupuaçuzeiro, utilizando marcadores microssatélites, disponíveis nos diferentes BAG (Banco Ativo de Germoplasma) gerenciados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

### Material e Métodos

Avaliou-se, por meio de marcadores moleculares, a diversidade genética de 24 clones de cupuaçuzeiro dos BAG's da CPATU, CPAFRO, e CPAA. Tecidos foliares dos clones selecionados foram enviados ao Laboratório de Genética Molecular da (CEPLAC), localizada em Marituba, Pará, onde realizaram-se as extrações dos DNAs com base no protocolo de Doyle & Doyle, modificado por Figueira et al. (1997). Os marcadores genéticos utilizados foram locos de microssatélites desenvolvidos para cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) [Lanaud et al., 1999]. Empregou-se 14 *primers* heterólogos de cacauzeiros, baseado na seleção prévia realizada por Alves (2003). As reações de PCR foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700. As corridas de eletroforese foram realizadas em cubas verticais de sequenciamento. Após aplicação de 4 $\mu$ L das reações nos géis, eram iniciadas as pré-corridas a 40w, afim de alinhar corretamente as amostras. Após este procedimento a potência elétrica era elevada para 60w e permanecia por 3 horas. Os fragmentos foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6% e 7M de uréia. A revelação de gel foi realizada 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 (1972) que foram estimados com auxílio do programa GDA (Genetic Data Analysis), versão 1.1. A diversidade genética na amostra foi estimada para os seguintes parâmetros: número total de alelos (A), número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ), heterozigidade observada ( $H_o$ ) e esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ). O índice de fixação foi estimado por  $F = 1 - (H_o/H_e)$ .

### Resultados e Discussão

Dos 14 *primers* microssatélites utilizados, 12 foram polimórficos. Com estes *primers* construiu-se o *fingerprint* de cada genótipo. Foram encontrados 48 alelos na população de estudo, o número de alelos por locos variou de um (mTcCIR54) a 7 alelos (mTcCIR25), o número médio de alelos por locos foi 3,43 alelos por loco. Dentre os 12 pares de primers utilizados neste trabalho, os mais polimórficos foram mTcCIR 25, 26, 75 e 135, onde amplificaram 7, 5, 4, 4 alelos respectivamente. Utilizando marcação radioativa nas ampliações, Lanaud et al. (1999) obtiveram média de 5,6 alelos



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

por loco analisando 24 genótipos de cacaueteiro (*Theobroma 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. O número efetivo de alelos por locos ( $A_e$ ) variou de um (mTcCIR 54) a 3,98 ( mTcCIR 25), como média de 2,32 alelos por loco. Isto demonstra que muitos alelos têm baixa frequência ou são raros. A heterozigosidade observada nos locos polimórficos variou de 0,333 a 1, com média de 0,540. A heterozigosidade esperada para os locos polimórficos variou entre 0,488 (mTcCIR 58) a 0,765 (mTcCIR 25), com média de 0,541. O índice de fixação variou entre os locos polimórficos de negativo a positivo. Os resultados gerais sugerem que os clones de cupuaçueteiro analisados contêm um bom nível de diversidade genética e baixos níveis de homozigose.

No dendrograma (Figura 1) gerado a partir da distância genética de Nei (1978) foi possível verificar que os clones de cupuaçueteiro formaram três grupos e apenas dois clones, o 66 PA e 65 AM, não se agruparam aos demais. O grupo representado pelos clones 69 PA, 95 AM, 84 AM, 215 AM, 77 RO, 78 RO, 79 RO, 82 RO, 42 AM PA, 93 AM, 85 PA, 88 PA e 174 AM, se agruparam, onde a maioria dos genótipos são oriundos do Estado do Amazonas, com exceção do 69 PA, 85 PA e 88PA, que pertence ao estado do Pará; e da maioria dos genótipos representantes do estado de Rondônia. O clone 174 AM está presente no mesmo clado do clone 95 AM, que agrupou-se ao seu parental 215 AM. No segundo grupo pode-se observar o agrupamento de dois clones do Pará (70 PA e 68 PA), Rondônia (80 RO), e por fim dois clones do Amazonas (81 AM e 67 AM). Este grupo o clone 80 RO não apresentando divergência com o 81 AM. O terceiro grupo, é representado pelo restante dos clones do Pará (CPATU) de procedência do Amazonas. A baixa variabilidade genética dos indivíduos deste grupo está associada ao grande parentesco, pelo fato de híbridos do 186 AM, apresentaram-se no mesmo grupo que ele. Os clones 66 PA e o 65 AM, não fizeram parte de nenhum dos grupos formados no dendrograma, mostrando-se genótipos mais divergentes, o que os tornam importante para o programa de melhoramento, na busca de uma maior heterose nos cruzamentos.



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

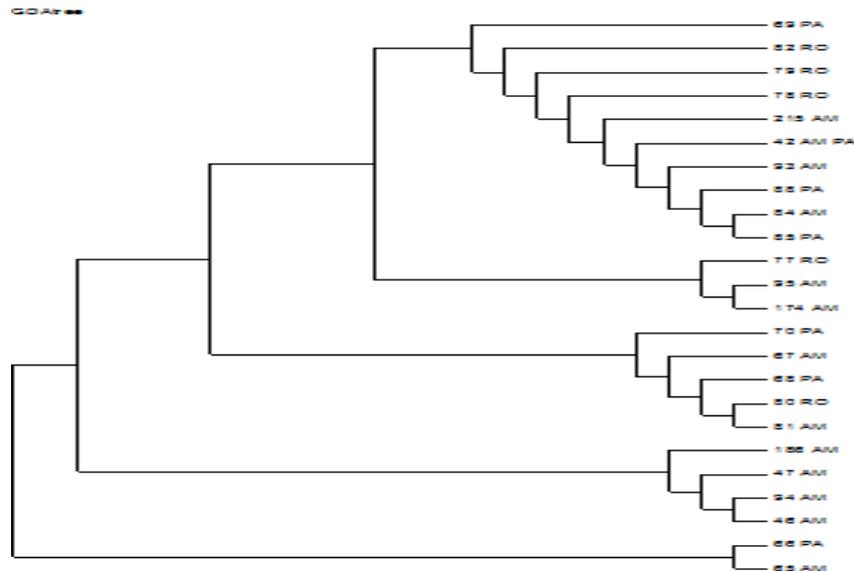


Figura 1. Dendrograma de clones de cupuaçuzeiro baseado na distância genética de Nei (1978), utilizando o método de médias das distâncias (GDA).

### Conclusões

Em termos gerais, estes resultados indicam que este equeno conjunto de clones apresenta variabilidade genética e podem ser explorados no melhoramento do cupuaçuzeiro, 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.

### Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, a Embrapa Amazônia Oriental, a CEPLAC, UFRA e aos Produtores.

### Referências Bibliográficas

- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex.Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** Piracicaba, 2003. 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.
- CUATRECASAS, J. Cacao and its allied. A taxonomic of the genus *Theobroma*. **Contributions U. S. of the Natural Herbarium**, v. 35, n. 6, p. 379-614, 1964.
- 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.
- LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v.8, p.2141-2143, 1999.
- MOTAMAYOR, J. C. 2001. Etude de la diversité génétique et de La domestication des cacaoyers du groupe Criollo (*Theobroma cacao* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires. Ph D Thesis. Université Paris XI. p. 179.