

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**



18º Seminário de  
Iniciação Científica e  
2º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

**Embrapa**  
Belém, PA  
2014



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

## **DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO [*Theobroma grandiflorum* (WILLD. ex SPRENG.) SCHUM], COLETADOS EM PLANTIOS COMERCIAIS**

Hellen Oliveira de Oliveira <sup>1</sup>, Rafael Moysés Alves <sup>2</sup>, Carolina Ramos dos Santos <sup>3</sup>, Odimar Ferreira de Almeida <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de GENÉTICA, hellenoliveira17@gmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Pavilhão de Pesquisa, rafael-moyses.alves@embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, carolmiqueli@hotmail.com

<sup>4</sup> Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, Pavilhão de Pesquisa, odimar\_almeida14@hotmail.com

**Resumo:** Este trabalho teve por objetivo caracterizar e comparar a estrutura genética de 29 clones de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Shum., oriundos de 27 subgrupos, para auxiliar no processo de seleção. Para a caracterização genética foram utilizados oito *primers* microssatélites específicos para cupuaçuzeiro. Foi estimada a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), número total de alelos/loco, bem como o valor real de populações desses indivíduos e a relação entre si. Foi observado um número total de 23 alelos com média de 2,875 alelos/loco, sendo que, o máximo encontrado foi 6 alelos/loco. A heterozigosidade observada, em sua maioria, foi maior do que a esperada indicando ausência de endogamia. Os agrupamentos I, II, X e VXI foram os que permitiram as maiores integrações entre clones. No entanto, todas as populações apresentaram-se de forma não estruturada, indicando que o indivíduo de um grupo, tem a possibilidade de pertencer a outro grupo.

**Palavras-chave:** clones, diversidade genética, marcador molecular

### **Introdução**

A produtividade das plantações de cupuaçuzeiro tem decrescido vertiginosamente nos últimos anos na região amazônica, em virtude da susceptibilidade dos plantios ao basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, causador da doença denominada vassoura-de-bruxa. Nas lavouras de cacau do Sul da Bahia, desde a introdução da doença em 1989 (PEREIRA et al., 1989) foram observadas perdas de até 90% da produção, em decorrência do ataque dessa doença (ANDEBRHAN et al., 1998).

Para o programa de melhoramento do cupuaçuzeiro, o conhecimento do distanciamento genético entre os possíveis parentais permitirá direcionar os cruzamentos controlados, evitando-se aqueles que poderiam levar à consanguinidade e, conseqüentemente, a produção de progênies com perda de vigor devido à endogamia (ALVES et al., 2003).



Este estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade genética entre 29 clones de cupuaçuzeiro, a fim de auxiliar na seleção de genótipos promissores para o programa de melhoramento genético do cupuaçuzeiro, aumentando a base genética dos materiais de produção a serem recomendados aos produtores.

### **Material e Métodos**

Foram analisados 29 acessos de cupuaçuzeiro, coletados em propriedades rurais no Município de Tomé Açu – Pará. Para a caracterização genética, tecidos foliares dos genótipos foram levados ao laboratório de genética da Embrapa Amazônia Oriental, para extração de DNA, segundo o protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1990), modificado por Figueira et al. (1997). Para a amplificação do DNA foram testados oito primers heterólogos de microssatélites para essa espécie. A quantificação e a concentração do DNA foi determinada através do programa LabImage-1D L340. As amostras foram ajustadas para a concentração de 5ng DNA/ $\mu$ l e conservadas a 4°C.

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 polimerase. E foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), programado inicialmente com um ciclo de desnaturação à 94°C por 4 min; seguido de 10 ciclos de 94°C por 40s, touch down, decrescendo 1°C por ciclo, com temperatura de anelamento inicial de 59°C e final de 49°C por 40s, e extensão final à 72°C por 60s.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%, corrido em cuba vertical. A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata, conforme Creste et al. (2001).

As análises de variabilidade para determinar os parâmetros como Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho), Número de alelo/loco, foram obtidos através do programa GENALEX 6.501. E para a determinação do valor real de populações utilizou-se o programa STRUCTURE 2.3.4, sendo possível realizar 20 corridas independentes de 10.000 gerações de MCMC e 10.000 gerações de Burnin, variando o numero de K de 1 a 3.



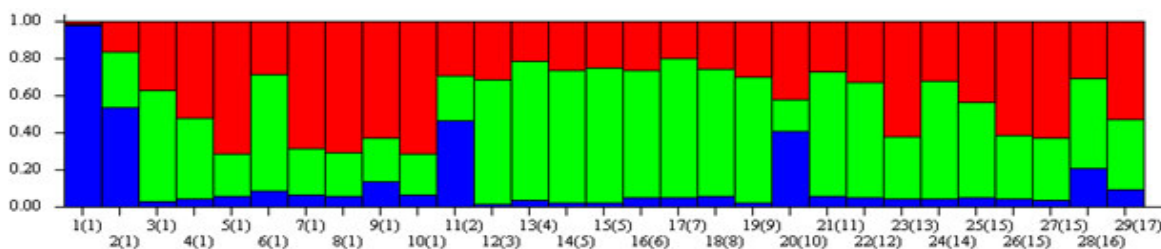
### Resultados e Discussão

Os 29 clones de cupuaçuzeiro eram procedentes de 17 populações diferentes. Foi obtido um total de 23 alelos, com média de 2,875 alelos/loco, sendo que, o máximo encontrado foi de 6 alelos/loco. A heterozigosidade observada, em sua maioria, foi maior do que a esperada, exceto a população do grupo I (INADA). Esse maior nível de homozigosidade corre, provavelmente, da origem de um parental comum (Tabela 1, Figura 1).

Tabela1. Procedência dos 29 acessos de cupuaçuzeiro, e seus agrupamentos determinados pelo software STRUCTURE 2.3.4 , e a Heterozigosidade Observada (Ho) e Heterozigosidade Esperada (He) das 17 populações através do programa GENALEX 6.501.

PROCEDÊNCIAS	GRUPOS	ACESSOS	Ho	He
INADA	I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0,475	0,545
KIMURA	II	12	0,500	0,250
LAURO KATO	III	13	0,000	0,000
MARCELO	IV	14	0,250	0,125
HANTANI	V	15 e 16	0,375	0,188
MUROI	VI	17	0,125	0,063
HOSHINA	VII	18	0,375	0,188
WATANABE	VII	19	0,500	0,250
CEPLAC	IX	20	0,125	0,063
SEKO	X	21	0,375	0,188
174 (COARI)	XI	22	0,250	0,125
186 (CODAJÁS)	XII	23	0,375	0,188
215 (MANACAPURU)	XIII	24	0,500	0,250
622 (BAG)	XIV	25	0,375	0,188
ITAQUI	XV	26, 27 e 28	0,458	0,299
286 (BELÉM)	XVI	30	0,250	0,125
MATZUSAKI	XVII	31	0,375	0,188

Figura 1. Representação gráfica, através de códigos de barra, do comportamento dos 29 isolados . Cada cor corresponde a um cluster genotípico. Os valores da coordenada Y correspondem a coeficientes de associação (Q) que revelam como cada amostra (isolado) se encaixa em um específico cluster.





Dos oito *primers* avaliados, todos apresentaram boa amplificação e polimorfismo. Entre eles, somente o loco mTgM\_09 não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e deverá ser descartado.

Os resultados gerados pelo Structure mostram que os clones dos grupos I, II, X e XVI são mais integrados que os demais grupos. No entanto, todas as populações apresentaram-se de forma não estruturada, provando assim, a possibilidade de integração entre eles. Ou seja, cada clone tem a possibilidade de pertencer a outro grupo.

### Conclusões

- 1) A variabilidade genética é alta entre os grupos dos acessos estudados, permitindo que a seleção seja eficiente entre eles;
- 2) Dentro dos grupos, devido à alta homoziguidade, a seleção deverá ser mais criteriosa.

### Referências Bibliográficas

ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 373-379, 2003.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia brasileira. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 10, p. 49-60, 1998.

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.

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.

PEREIRA, S. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência da vassoura de bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 1, p. 79-81, 1989.