

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PARENTAIS DA PRÓXIMA CULTIVAR DE CUPUAÇUZEIRO, COM USO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO MICROSSATÉLITES

Maria Suellem da Conceição Silva¹, Rafael Moysés Alves², Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque³

Resumo

A ampliação da base genética dos materiais de plantação é trabalho contínuo dos programas de melhoramento genético. Há necessidade, entretanto, que os parentais envolvidos estejam caracterizados fenotipicamente e genotipicamente para garantir os mecanismos de rastreabilidade e proteção das cultivares. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética dos clones de cupuaçuzeiro, utilizando marcadores microssatélites, que servirão como parentais da população melhorada de primeiro ciclo, a ser lançada pela Embrapa Amazônia Oriental. Foram estudados 16 clones de cupuaçuzeiro utilizando 14 locos heterólogos de microssatélites desenvolvidos para cacauzeiro. Os resultados demonstraram a distribuição dos materiais em três grandes grupos, havendo concordância entre os grupos e procedência das matrizes dos clones. Foi detectada divergência entre os clones, apesar do estreito relacionamento genético.

Introdução

Entre as fruteiras nativas da Amazônia o cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum, uma planta semi-umbrófila, destaca-se por se adaptar muito bem em consórcios com outras espécies perenes semi-perenes e provisórias (ALVES, 2003).

A produtividade dos plantios de cupuaçuzeiro tem decrescido vertiginosamente nos últimos anos na

região amazônica. Isto decorre, especialmente, pela susceptibilidade dos plantios ao fungo *Moliniophthora* (*Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer, causador da doença denominada vassoura-de-bruxa. Essa doença tem provocado sérios prejuízos ao cultivo de cupuaçuzeiro na região amazônica (ALVES et al., 1998, SOUZA et al., 1998).

Em 2002 a Embrapa Amazônia Oriental lançou as quatro primeiras cultivares de cupuaçuzeiro com resistência à vassoura-de-bruxa. Foram recomendados os clones Coari, Codajás, Manacapuru e Belém. O programa de melhoramento genético teve continuidade, ainda com foco na resistência e melhoria da produtividade, e prepara para os próximos anos o lançamento de uma nova cultivar, na forma de população melhorada de primeiro ciclo.

Esta pesquisa teve por objetivo caracterizar geneticamente os parentais dessa população, para garantir a identidade dos materiais envolvidos, e conhecer a variabilidade genética entre eles.

Material e Métodos

Tecidos foliares dos 16 clones de cupuaçuzeiro selecionados foram levados ao laboratório de biotecnologia da CEPLAC, em Marituba – Pará, para extração de DNA. Foram avaliados os seguintes materiais: 32 - híbrido de 174 (Coari -AM) x 186 (Codajás - AM); 42 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 434 (Muaná - PA); 44 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 434 (Muaná - PA); 46 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 215

(Manacapuru - AM); 47 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 1074 (Itacoatiara - AM); 48 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 1074 – (Itacoatiara - AM); 51 – híbrido de 215 (Manacapuru - AM) x 624 (Santarém - PA); 56 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 1074 (Itacoatiara - AM); 57 – híbrido de 186 (Codajás - AM) x 513 (Oiapoque - AP); 61 – híbrido de 228 (Manaus - AM) x 220 (Manacapuru - AM); 62 – híbrido de 185 (Codajás - AM) x 220 (Manacapuru - AM); 63 – híbrido de 174 (Coari - AM) x 248 (Itacoatiara - AM); 64 – híbrido de 185 (Codajás - AM) x 220 (Manacapuru - AM); 174 – clone primário (Coari - AM); 215 – clone primário (Manacapuru - AM); 1074 – clone primário (Itacoatiara - AM).

A extração foi realizada segundo o protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1990), modificado por Figueira et al. (1997) para espécies do gênero *Theobroma*. Para a amplificação do DNA foi utilizada a técnica de marcadores microssatélites, sendo testados primers desenvolvidos por Lanaud et al. (1999) para emprego em *T. cacao*. Quatorze primers de microssatélites que amplificam DNA de cupuaçuzeiro foram empregados, com base na seleção efetuada por Alves (2003) e em trabalho recentemente concluído. As reações foram preparadas com volume final de 13 µl, contendo 15 ng de DNA genômico; 100 µM de cada dNTPs; 0,2 µM 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 MgCl₂), e 1 unidade de Taq DNA polimerase.

As reações foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), programado inicialmente com um ciclo de desnaturação a 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 72°C por 60s; seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 46°C ou 51°C por 60s e 72°C por 60s.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida à 6% e 7 M de uréia, corrido em cuba vertical. Inicialmente era realizada uma pré-corrida durante 10 minutos à 40W, e após a aplicação de 4µl de cada reação no gel, era realizada a corrida, durante 3h à potência constante de 60W. A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata, conforme Creste et al. (2001).

As análises de distância/identidade genética foram realizadas utilizando o programa POPEGNE, versão 1.32 (YEH; BOYLE, 1997).

Resultados e Discussão

Foi obtido o perfil eletroforético de cada material utilizado, para servir como “fingerprint” de caracterização genética que garantirá a identidade e rastreabilidade dos materiais formadores da nova cultivar.

Foram encontrados 41 alelos com a utilização dos 14 locos microssatélites com média de 2,9 alelos/loco (Tabela 1). Os mais polimórficos foram os locos: mTcCIR 7, mTcCIR 25, mTcCIR 99 e mTcCIR 135.

No dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1978) foi possível verificar a existência de três grandes grupos (Fig. 1).

O grupo mais externo apresenta o clone primário 1074 (Itacoatiara - AM), seu híbrido o clone 56 [186 (Codajás - AM) x 1074 (Itacoatiara - AM)] e o clone 63 [174 (Coari - AM) x 248 (Itacoatiara - AM)]. Um dos parentais do 63 (clone 248) é também oriundo de Itacoatiara - AM. Neste grupo observa-se, ainda, a presença do clone 51, identificado como híbrido de 215 (Manacapuru - AM) x 624

(Santarém - PA). Entretanto ao analisarmos a matriz de dados dos alelos amplificados, verificamos que o clone 51 é incompatível com o parental 215 (Manacapuru - AM).

No segundo grupo, foi verificado que todos os clones agrupados são híbridos do clone 186 (Codajás - AM). Como o relacionamento genético entre esses clones é de irmãos completos e meios irmãos, ficou comprovada a pouca distância genética entre eles.

No terceiro grupo podemos observar a prevalência dos materiais provenientes da região de Manacapuru - AM. Além do clone primário 215 (Manacapuru - AM), agruparam os clones 61, híbrido de 228 (Manaus - AM) x 220 (Manacapuru - AM); 62 [híbrido de 185 (Codajás - AM) x 220 (Manacapuru-AM)] e 64, híbrido de 185 (Codajás - AM) x 220 (Manacapuru-AM). Destes, os clones 62 e 64 foram os mais próximos geneticamente, o que era esperado pois se trata de irmãos completos. Neste grupo observamos, ainda, o agrupamento do clone primário 174 (Coari - AM), com seu híbrido, o clone 32, (híbrido de 174 Coari - AM x 186 Codajás - AM).

Os resultados deste trabalho servirão para orientar a distribuição das plantas na formação do pomar de sementes para a produção da população melhorada de primeiro ciclo. Plantas de um mesmo clone, ou plantas de clones que apresentem pouca distância genética, deverão ficar intercaladas por plantas de clones mais divergentes. Com essa estratégia serão induzidos cruzamentos entre materiais divergentes, minimizando a possibilidade de cruzamentos consanguíneos.

Conclusões

Apesar do estreito relacionamento genético, houve boa divergência entre os clones que comporão a parentagem da próxima cultivar de cupaçuzeiro a ser lançada pela Embrapa Amazônia Oriental. O arranjo criterioso das plantas no campo, com base nas informações de distâncias genéticas, servirá para minimizar os riscos de produção de sementes endogâmicas.

Referências

ALVES, R.M.; STEIN, R.L.B.; ARAÚJO, D.G. de; PIMENTEL, L. Avaliação de clones de cupaçuzeiro quanto à resistência a vassoura-de-bruxa. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.20, n.3, p.297-306, 1998.

ALVES, R.M. Caracterização genética de populações de cupaçuzeiro *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.

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.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*, v.89, p.583-590, 1978.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.A.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J. A. K.; LANAUD, C. A new linkage map based on codominant markers: development and integration

of 201 new microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Heideberg, v.108, n.5, p.1151-1161, Mar. 2004.

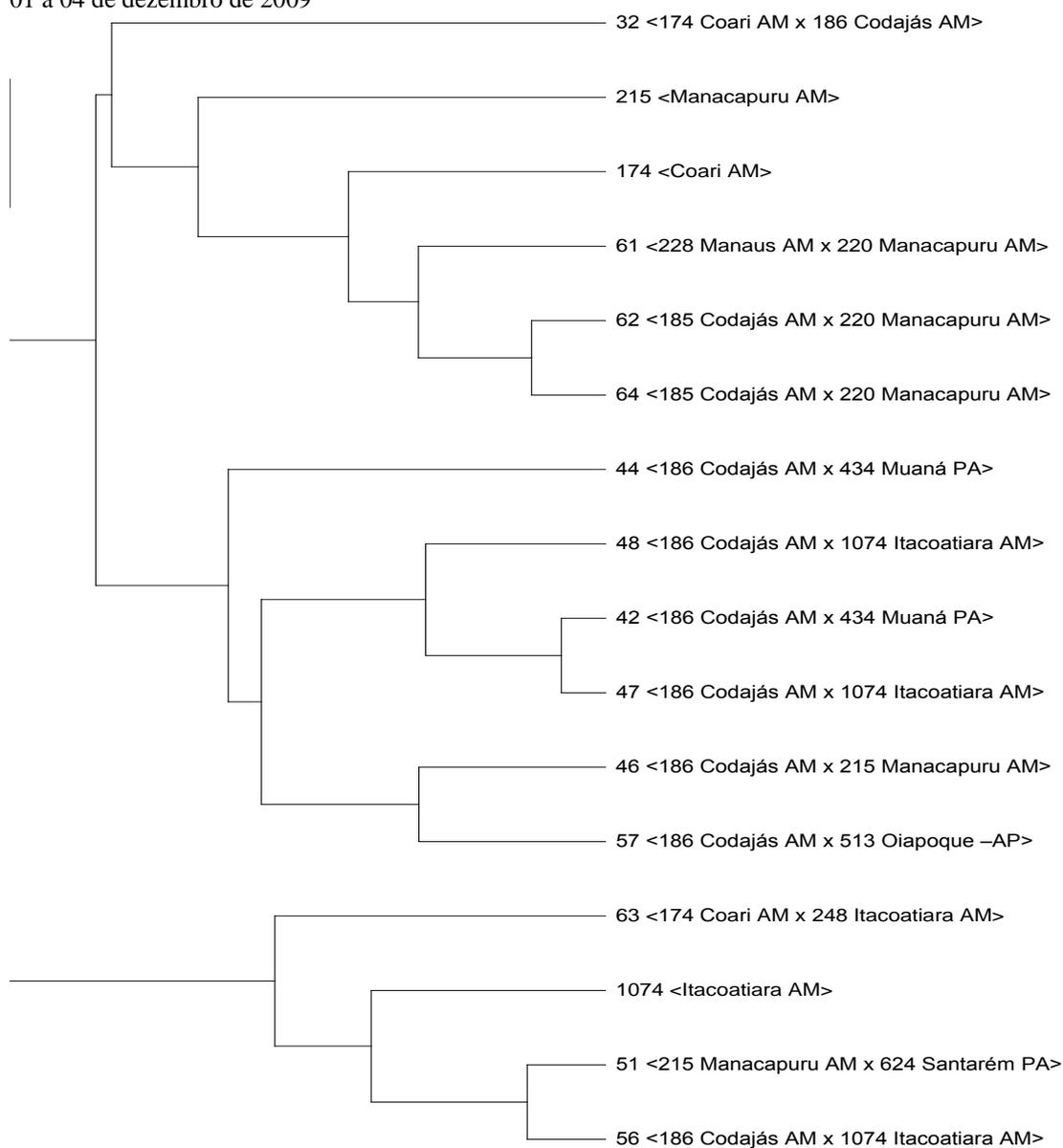
SOUZA, A. das G.C.; SILVA, S.E.L.; SOUZA, N.R. Avaliação de progênies de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng, Schum) em Manaus. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.20, n.3, p.307-312, 1998.

YEH, F.C.; BOYLE, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, v.129, p.157.

ANEXOS

Tabela 1. Tamanho estimado dos alelos identificados (pb) na análise de 16 clones de cupuaçuzeiro, utilizando 14 locos microssatélites, em comparação à localização nos grupos de ligação do mapa consensual do cacauzeiro (PUGH et al., 2004) e alelos clonados (LANAUD et al., 1999).

Loco	Grupo de ligação	Alelo Clonado(pb)	Alelos Estimados (pb)	Nº Alelos
mTcCIR 7	VII	160	147, 149, 150 e 152	4
mTcCIR 9	VI	274	295 e 310	2
mTcCIR 17	IV	271	280 e 292	2
mTcCIR 25	VI	153	134, 135, 147 e 170	4
mTcCIR 26	VIII	298	250, 265 e 270	3
mTcCIR 54	I	165	149, 150 e 151	3
mTcCIR 57	IV	253	260, 268 e 270	3
mTcCIR 99	VIII	249	270, 280, 288 e 300	4
mTcCIR 124	IX	131	155 e 162	2
mTcCIR 135	III	246	254, 260, 270 e 280	4
mTcCIR 162	III	162	190, 200 e 204	3
mTcCIR 220	X	201	225 e 230	2
mTcCIR 270	I	224	220 e 222	2
mTcCIR 286	I	119	290, 300 e 304	3



1

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