

## ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) K. Schum, ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Alves, R.M.<sup>1</sup>; Figueira, A.V.O.<sup>2</sup>; Cruz, E.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, ESALQ, Depto. de Genética, ralves@esalq.usp.br;

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, CENA, Lab. de Melhoramento de plantas, C.P. 96, 13400-970, Piracicaba – SP.

<sup>3</sup>Embrapa Amazônia Oriental, C.P. 48, 66017-970, Belém-Pará.

A Amazônia Brasileira constitui a única reserva de variabilidade genética do cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, (Willd ex Spreng) K. Schum, uma fruteira silvestre dessa região, com excelente potencial de mercado para exploração da polpa e semente.

A espécie *T. grandiflorum* é diplóide e apresenta  $2n=20$  cromossomos (Carletto, 1946). É uma espécie alógama, possivelmente auto-incompatível, com flores hermafroditas, que, na Região Amazônica, floresce no período de julho a dezembro, período mais seco do ano, e frutifica de agosto a abril (Prance & Silva, 1975).

Apesar da grande ênfase que tem sido dada, nos últimos anos, à proteção das espécies amazônicas (Clement, 1988), faltam informações científicas para respaldar essas iniciativas. Estudos sobre biologia floral, lista mínima de descritores, grau de variabilidade genética dentro e entre populações, são raros ou inexistentes.

Este trabalho teve por objetivo estudar a estrutura e diversidade genética de três populações de cupuaçuzeiro pertencentes à Embrapa Amazônia Oriental, coletadas na Amazônia Brasileira, caracterizando os acessos por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

Foram utilizados 46 acessos do BAG cupuaçuzeiro, coletados nos Estados do Amazonas, Pará e Amapá, coletados em pomares caseiros, pequenas propriedades rurais e áreas silvestres (Lima et al., 1986).

Para extração de DNA, foi utilizado o protocolo de Doyle & Doyle (1990). As amplificações foram conduzidas no termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System, modelo 9700, programado, preliminarmente, com as temperaturas propostas por Lanaud *et al.* (1999) isto é: um ciclo de denaturação à temperatura de 94°C por 4 minutos e, em seguida, submetidas a 30 ciclos da seguinte forma: 94°C por 30 s, 46°C ou 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Foram testados 44 pares de primers desenhados para cacau, mas que amplificaram sítios de microssatélites em outras espécies do gênero *Theobroma* (primers heterólogos), inclusive o cupuaçuzeiro (Lanaud *et al.*, 1999). Os produtos de reação foram separados em gel de poliacrilamida 6%, desnaturante com 7 M de uréia, corrido eletroforéticamente em cuba vertical da Amersham Pharmacia Biotech, modelo Hoefer SQ3 sequencer, e colorido com nitrato de prata.

Foi otimizado o protocolo desenvolvido para análise de microssatélites em cacauzeiro, (*T. cacao* L.), levando-se em consideração, também, os resultados obtidos com essa espécie, por Sereno (2001), adaptando-o para utilização em cupuaçuzeiro. Houve necessidade de aumentar a temperatura de anelamento dos primers, pois nas temperaturas preconizadas originalmente, ocorria o aparecimento de múltiplas bandas, inviabilizando a leitura dos géis.

Dos 44 pares de primers testados, 19 (43,2%) demonstraram perfis polimórficos, os quais foram responsáveis por 97 alelos, sendo obtidos, em média, 5,1 alelos por loco. Por outro lado, 8 (18,2%) primers apesar de amplificarem, não foram informativos (monomórficos) e 17 (38,6%) não amplificaram fragmentos.

Resultados comparativos de trabalhos, empregando alguns dos primers aqui testados, encontram-se resumidos na Tabela 1. Lanaud *et al.* (1999), empregando uma coleção de cacau, obtiveram bandas informativas para todos os onze locos, com uma média de 5,63 alelos/loco. Por outro lado, Sereno (2001) trabalhando também com cacau, obteve polimorfismo em nove locos e média de 4,46 alelos/loco. Comparando com os resultados das análises de cupuaçu aqui realizadas, verifica-se claramente o efeito de um primer heterólogo, caracterizado pelo aumento de monomorfismo e, em alguns casos, inviabilização da análise, seja pelo aparecimento de multibandas ou falta de definição das mesmas. Dos onze primers comparados nesta análise, apenas sete apresentaram bandas polimórficas, com média de 3,82 alelos/loco (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre o número de alelos obtidos com a utilização de onze primers comuns de microsatelites, em cacau (Lanaud *et al.*, 1999; Sereno, 2001) e cupuaçu do presente trabalho, originados dos acessos do BAG de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental.

Loco	Lanaud <i>et al.</i> (1999)	Sereno (2001)	Presente trabalho
GEN 526	4	1	1
GEN 458	3	1	*
ACMC 66	8	3	8
ACMC 19	4	4	*
ACMC 05	8	7	6
ACMC 21	9	7	4
ACMC 45	4	4	7
ACMC 65	3	5	8
TCCT	3	6	1
ACMC 12	6	3	4
ACMC 24	10	8	3
TOTAL	62	49	42
MÉDIA	5,63	4,46	3,82

\* Não amplificou.

No fenograma obtido a partir de uma análise preliminar, envolvendo todos os acessos de forma independente de hierarquia, foi observado dois grupamentos extremos, os dois constituídos por clones oriundos do Estado do Amazonas. O primeiro formado pelos acessos 215, 1056, 220, 1074 e 216, e o segundo grupo pelos acessos 230, 218, 181, 228, 219 e 174. A análise de bootstrap, com 1.000 repetições, entretanto, não discriminou grupos estatisticamente distintos. Os acessos procedentes do Pará e Amapá ocuparam, juntamente com os demais acessos do Amazonas, uma porção intermediária do fenograma. Há uma tendência dos acessos do Pará e Amapá formarem grupos próximos, denotando similaridade genética entre essas procedências, apesar de haver algumas exceções. Acessos de procedência muito próxima, como por exemplo o 11 e 12 de Tabatinga-AM, 514 e 515 do Oiapoque-AP e, 621 e 622 de Prainha-PA, também tenderam a manter-se agrupados, possivelmente decorrente de estreita similaridade genética. Acessos que apresentaram incompatibilidade nos cruzamentos controlados como 174 e 215; 286 e 434, apresentaram alta divergência genética, ocupando grupos bastante polarizados no fenograma. Ao passo que acessos totalmente compatíveis como 513 e 484; 186 e 620; 286 e 554, ocuparam posições próximas.

Os acessos que apresentam resistência à vassoura-de-bruxa: 174, 186, 215, 220 e 286, foram plotados em diferentes grupos, caracterizando-os como geneticamente divergentes, levantando à hipótese de que os genes de resistência tenham origens de fontes distintas. A única exceção ficou com os acessos 215 e 220 que compartilham grupos muito próximos.

O acesso 217 formou um grupo inteiramente distinto dos demais. Este clone tem como característica peculiar a produção de um número reduzido de sementes, apesar de apresentar produção regular de frutos, suspeitando-se que se trate de um aneuplóide, fato que será investigado através de estudos citogenéticos.

A análise dos acessos agrupados em três populações revelou que a população oriunda do Amazonas apresentou 96% de todos os alelos encontrados, com média de 4,9 alelos/loco sendo, portanto, a população mais bem representada no BAG. Foi também responsável por 100% dos loci polimórficos. Vale ressaltar que 63% dos acessos do BAG são originários dessa população, isto explica, em parte, esta alta variabilidade.

Por outro lado, a população do Pará, Estado apontado como o centro de origem do cupuaçuzeiro, encontra-se mal representada no BAG, pois conta com apenas 22% dos acessos, apesar de deter 62% dos alelos, com média de 3,2 alelos/loco, sendo 89% dos loci polimórficos. Urge, portanto, que sejam realizadas, em caráter de urgência, coletas especialmente nas regiões sul e sudeste do estado, onde encontram-se os maiores maciços de cupuaçuzeiros nativos. Coincidentemente estas regiões encontram-se sob forte pressão antrópica, acreditando-se que grande parte desse reservatório gênico, já tenha sido perdido pela ação de madeireiras, expansão da fronteira agrícola e assentamentos de colonos. Populações oriundas do Amapá estão, também, fracamente representadas no BAG de cupuaçuzeiro. Apenas 15% dos acessos são originárias daquele estado.

A presente pesquisa confirma a viabilidade de utilização de primers de microssatélites delineados para o cacauzeiro, serem utilizados com sucesso em estudos de genética do cupuaçuzeiro. Como não foi possível observar uma correlação direta entre distância geográfica e distância genética, fica respaldada a hipótese de uma origem comum para os acessos das três populações. Por se tratar de uma espécie de longo ciclo reprodutivo, o tempo decorrido, após a migração, provavelmente não foi suficiente para promover mudanças genéticas mais expressivas.

#### REFERÊNCIAS

- Carletto, G.M. *O número de cromossomos em cacauzeiros*. Ilhéus: Instituto de cacau da Bahia, 1946. (Boletim Técnico, 6).
- Clement, C.R. Origin, domestication and genetic conservation of Amazonian fruit tree species. In: SYMPOSIUM, NATIVE PEOPLES AND THE ORIGIN AND CONSERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES, 1, International Congress of Ethnobiology. 1988.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* v.12, p.13-15, 1990.
- Lima, R.R.; Alencar, S.A.; Frade Júnior, J.M.; Brandão, G.R. Coleta e avaliação de plantas amazônicas de cultura ou de exploração pré-colombiana: recursos genéticos da região do Solimões. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém, *Anais...*, Belém: Embrapa-CPATU, 1986. v.4, p.39-49. (Embrapa-CPATU. Documentos, 36)
- 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.
- Prance, G.T.; Silva, M. F. *Árvores de Manaus*. Manaus: INPA, 1975. p.249-25,