



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**HELLEN OLIVEIRA DE OLIVEIRA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE CUPUAÇUZEIRO  
[*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum], COLETADOS NO PARÁ E  
AMAZONAS**

**BELÉM**

**2014**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**HELLEN OLIVEIRA DE OLIVEIRA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE CUPUAÇUZEIRO  
[*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum], COLETADOS NO PARÁ E  
AMAZONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Agronomia da  
Universidade Federal Rural da  
Amazônia como requisito para obtenção  
do grau de Bacharel em Agronomia.  
Área de concentração: Melhoramento  
Genético de Plantas  
Orientadora: Selma Toyoko Ohashi  
Co-orientador: Rafael Moysés Alves

**BELÉM  
2014**

---

Oliveira, Hellen Oliveira de

Diversidade genética entre acessos de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum], coletados no Pará e Amazonas. / Hellen Oliveira de Oliveira. – Belém, 2014.

40 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)  
– Universidade Federal Rural da Amazônia, 2014.

1. Cupuaçu – genética 2. Cupuaçu - variabilidade genética, 3. *Theobroma grandiflorum* – genética -melhoramento 4. Fruta nativa – Pará 5. Fruta nativa – Amazonas I. Título

CDD – 631.523

---

**HELLEN OLIVEIRA DE OLIVEIRA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE CUPUAÇUZEIRO  
[*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum], COLETADOS NO PARÁ E  
AMAZONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Agronomia. Área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas

Data da Aprovação: 24/11/2014

Banca Examinadora:

Co-orientador: \_\_\_\_\_  
Dr. Rafael Moysés Alves  
Embrapa Amazônia Oriental

Membro 1: \_\_\_\_\_  
Dra. Hérica Santos de Oliveira.  
Universidade Federal Rural da Amazônia

Membro 2: \_\_\_\_\_  
Dra. Ilmarina Campos de Menezes  
Embrapa Amazônia Oriental

À Wany, minha mãe, que tanto amo e que não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. E ao meu irmão, Heitor, pelo apoio e companheirismo. Todo esforço seria inútil se não fosse o amor de vocês que sempre estiveram presentes na minha vida.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me conceder a vida, e por ter me dado força e a sabedoria para que pudesse concluir este trabalho e realizar este sonho.

À Universidade Federal Rural da Amazônia pela oportunidade da realização deste curso.

À Embrapa Amazônia Oriental pelos recursos alocados para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Rafael Moysés Alves da Embrapa Amazônia Oriental, meu orientador, que me acolheu desde o início da graduação, o meu muito obrigada pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos técnicos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa, pela ajuda fornecida, em especial ao técnico Izaias Leite, pelo carinho e disposição em sempre me ajudar.

À CEPLAC pelas oportunidades e experiências adquiridas no desenvolvimento de trabalhos realizados no Laboratório de Genética Molecular, em especial ao técnico Adimil, pelo carinho, ensinamentos e sugestões valiosíssimas.

As amigas de laboratório Carolina Ramos, pela ajuda na execução das atividades laboratoriais, e a Msc. Andréia Fortes pela amizade, convivência e troca de experiências durante todo o período de iniciação científica.

Ao técnico José S. Oliveira da Embrapa Amazônia Oriental pela ajuda na coleta das amostras para a realização deste trabalho.

Ao doutorando Caio Silva pela disposição em ajudar com os programas estatísticos.

Ao meu melhor amigo, companheiro e namorado, Alan Nahon, pelo amor, carinho e por sempre me incentivar e compreender nos momentos difíceis.

A Aline Freitas, pelo convívio, confiança, amizade, carinho, e por tudo que passamos juntas, o meu muitíssimo obrigada.

Aos amigos de curso Odimar, Samara, Tahnity e Daniely pela amizade, companheirismo e apoio durante toda a minha trajetória acadêmica, e por sempre se mostrarem presentes nos momentos em que mais precisei, o meu eterno carinho.

As amigas Érika, Jéssica, Raissa, Marina, Claudia e Ana Paula, que caminharam juntas comigo para alcançar o objetivo de ingressar em uma Universidade e pela amizade que carrego com muito orgulho.

A vice - coordenadora do curso de Agronomia, Prof<sup>a</sup> Heliana Brasil, pelo imprescindível apoio durante a graduação.

A professora Dra. Selma Ohashi pela sua disposição e orientação para a realização deste trabalho.

À todos os demais amigos e colegas, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

O *Theobroma grandiflorum* é uma fruteira nativa da Amazônia brasileira e possui grande importância econômica para essa região devido a sua utilização comercial. Com a expansão do cultivo dessa espécie, programas de melhoramento genético vêm sendo desenvolvidos para ampliar a base genética do *T. grandiflorum*. Através do conhecimento genético entre os parentais é possível direcionar os cruzamentos controlados e evitar a perda de vigor devido à endogamia. Este trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética e o grau de parentesco de vinte e nove acessos de *T. grandiflorum*, com o intuito de selecionar genótipos promissores para incrementar o programa de melhoramento dessa espécie. Nesse sentido, foram utilizados vinte primers microssatélites desenvolvidos para cupuaçuzeiro, dos quais 19 mostraram-se polimórficos. Foram encontrados 55 alelos nos materiais estudados, sendo que o número efetivo de alelos por locos (1,887) foi menor do que o número médio de alelos por locos (3), indicando que muitos alelos têm baixa frequência. A heterozigosidade observada nos locos polimórficos variou de 0,200 a 0,600 com média de 0,400 e a heterozigosidade esperada nos locos polimórficos variou entre 0,265 a 0,725 com média de 0,470. O índice de fixação médio entre os locos (0,084) não foi significativamente diferente de zero, mas conferiu a ausência de endogamia dos materiais. A estimativa do grau de parentesco através da caracterização da distância genética dos acessos indicou que muitos têm uma ancestralidade comum e podem ser parentados. Os resultados indicaram que o conjunto de acessos analisados, apresentam um moderado nível de diversidade genética e ausência de endogamia, podendo, portanto, ser explorados no programa de melhoramento do cupuaçuzeiro, através de cruzamentos controlados.

**Palavras - chave:** fruteira nativa, variabilidade genética, microssatélites



## ABSTRACT

The *Theobroma grandiflorum* is a native species of the Brazilian Amazon and has great economic importance to the region due to its commercial use. With the expansion of the cultivation of this species, breeding programs have been developing to broaden the genetic base of *T. grandiflorum*. Through genetic knowledge among parents is possible to direct the controlled crossings and prevent loss of vigour due to endogamy. This study aimed to evaluate the genetic diversity and degree of kinship twenty-nine accessions of *T. grandiflorum*, in order to select promising genotypes to increase the breeding program of this species. Accordingly, were used twenty microsatellite primers developed for cupuassu tree, of which 19 proved to be polymorphic. Were found 55 alleles in the analyzed material, where the effective number of alleles per locus (1.887) was smaller than the average number of alleles per locus (3), indicating that have many low frequency alleles. The observed heterozygosity in polymorphic loci ranged from .200 to .600 with a mean of 0.400 and expected heterozygosity in polymorphic loci ranged from 0.265 to 0.725 with an average of 0.470. The average rate of attachment between loci (0.084) was not significantly different from zero, but given the absence of inbreeding material. The estimation of the degree of kinship through the characterization of the genetic distance of hits indicates that many have a common ancestry and may have be kin. The results indicate that all clones analyzed, have a moderate level of genetic diversity and absence of endogamy, can be, therefore, exploited in improving cupuassu tree through controlled crosses.

**Keywords:** native fruit tree, Genetic variability, microsatellites.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Clones de acesso, local de coleta de 29 acessos de <i>Theobroma grandiflorum</i> analisados e a população a cada qual pertence.....	23
<b>Tabela 02</b> - Identificação dos vinte locos específicos de <i>Theobroma grandiflorum</i> .....	26
<b>Tabela 3</b> - Estimativa em parâmetros genéticos de 20 locos microssatélites de <i>Theobroma grandiflorum</i> , onde $A$ é o número total de alelos; $A_e$ : número médio efetivo de alelos por loco; $A_{e_{est}}$ é o peso molecular dos alelos $H_o$ : heterozigosidade observada; $H_e$ : heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; $F$ : índice de fixação; utilizando 29 acessos distribuídos em 17 populações.....	31

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Locais onde foram originalmente coletados os acessos de cupuaçuzeiro.....22
- Figura 2.** Procedimentos para a extração de DNA. I) Tecido foliar sadio; II) Maceração; III) Solução extratora; IV) Adição de CIA; V) Centrifugação.....25
- Figura 3.** Representação dos procedimentos para a amplificação de DNA: I) Preparo das reações (PCR); II) Amplificação em termociclador; III) Eletroforese em cuba vertical.....27
- Figura 4** - Géis de poliacrilamida mostrando variabilidade, por microssatélites nos locos mais polimórficos: *mTgM 09*, *mTgM 30*, *mTgM 43*, *mTgm 77* e *mTgM 87*.....29
- Figura 5** - Dendrograma baseado na distância genética de  $D_A$  (Nei, et al, 1983) entre 29 acessos de *Theobroma grandiflorum* estabelecidos em diferentes populações de cupuaçuzeiro da Amazônia brasileira, agrupados utilizando o método de médias das distâncias(UPGMA).....34

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 O cupuaçuzeiro.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Melhoramento genético de plantas.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Estudo da diversidade genética utilizando marcadores moleculares.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Marcadores microsatélites (SSR).....</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Caracterização dos materiais .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Extração de DNA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Amplificação de DNA com primers microsatélites .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Análise Estatística.....</b>	<b>28</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Caracterização dos locos microsatélites em <i>T. grandiflorum</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Caracterização dos acessos.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Distâncias genéticas .....</b>	<b>32</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada a maior floresta contínua tropical e detentora de um quarto da biodiversidade do planeta, com destaque para as suas frutas nativas que possuem sabores e aromas agradáveis indiscutíveis. Atualmente ocupa a segunda posição em termos de diversidade genética de espécies frutíferas tropicais no mundo, no entanto ainda não apresenta uma posição de destaque no comércio internacional (CLEMENT et al., 1982).

Existem aproximadamente 220 espécies frutíferas na Amazônia, as quais ainda não foram domesticadas (CLEMENT, et al., 1982). Dentre essas, o cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schumm., é a segunda espécie frutícola mais importante para a fruticultura da região, com cerca de 10% do mercado de todas as frutas amazônicas, sendo comercializada na Região Norte com cerca de 35.000 hectares plantados, com destaque para o Estado do Pará e Amazonas, que juntos apresentam 23.000ha plantados de cupuaçuzeiro (BORÉM et al., 2009).

Apesar da importância econômica que essa espécie apresenta para a fruticultura da região, ainda depende de ajustes no seu sistema produtivo, para ser considerada uma espécie domesticada. Assim como outras espécies amazônicas, teve seu processo de domesticação iniciada pelos nativos dessa região, pois bem antes da descoberta da América já era cultivado tanto plantas cosmopolitas quanto amazônicas. Os plantios se davam através de sementes oriundas de outras plantas, sem a utilização de materiais selecionados, o que proporcionou uma grande desuniformidade dentro das plantações (ALVES et al., 1997; SOUZA et al., 1998).

Tendo em vista que o cupuaçuzeiro é uma espécie semi-extrativista e que ainda carece de conhecimentos científicos sobre sua estrutura floral, fluxo gênico, polinizadores, bem como caracterização e quantificação da variabilidade genética entre e dentro das populações, é de suma importância reconhecer e quantificar a divergência genética entre as populações distribuídas nas regiões de ocorrência, com vistas à conservação da variabilidade genética das populações naturais e a seleção preliminar de materiais promissores para comporem o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) dessa espécie.

Essa fruteira tem apresentado grande diversidade genética para vários caracteres agronômicos de interesse, como produção de frutos, resistência a doenças e pragas, e rendimento agroindustrial. Isso tem permitido o desenvolvimento de programas de

melhoramento para a obtenção de genótipos cada vez mais eficientes, os quais atenderão as demandas futuras.

Para esta finalidade, o uso de marcadores moleculares vem se tornando instrumentos eficientes para quantificar a variabilidade genética existente dentro e entre populações de plantas. Dentre eles, o marcador microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) tem se destacado para a avaliação e caracterização de germoplasma, por se tratar de um poderoso marcador molecular para descrever a estrutura genética das populações, fluxo gênico e estimar parâmetros genéticos populacionais (MORGANTE & OLIVEIRA, 1993). Isso se deve as suas características intrínsecas de marcador somaticamente estável, codominante, neutro, multialélico, robusto, com elevada reprodutibilidade e confiabilidade, assim como, por sua simplicidade operacional e rapidez de análise, quando comparado com outras metodologias (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Desta forma esse trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética e o grau de parentesco em acessos de *T. grandiflorum* originados de diferentes propriedades rurais utilizando marcadores microssatélites a fim de utilizá-los em programas de melhoramento genético dessa espécie.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O cupuaçuzeiro

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum., é uma fruteira arbórea nativa da Amazônia brasileira, que apresenta grande destaque devido o seu potencial de mercado para exploração da polpa, com uma mucilagem que envolve as sementes, a qual corresponde a aproximadamente 40% do peso total do fruto (Calzavara et al., 1984). Atualmente é essa parte do fruto que sustenta todo o fluxo de produção, comercialização e industrialização (SOUZA et al., 1998).

Souza et al. (2002), descreve o cupuaçuzeiro como sendo uma das culturas mais rentáveis da região amazônica, sendo muito apropriada a sistemas agroflorestais, consorciando-se favoravelmente com várias culturas, justamente por ser uma espécie que se adapta muito bem ao sombreamento e permite resultados econômicos e ecológicos satisfatórios. A procura por cupuaçu vem aumentando sua importância econômica em todos os estados da federação, e começa a atrair a atenção mundial do mercado de frutas exóticas tropicais.

Essa fruteira destaca-se não só pelo sabor e aroma agradáveis, devido ao seu alto teor de ésteres e terpenos, mas também por seu excelente aproveitamento industrial. Vários produtos podem ser fabricados a partir da polpa, como sorvetes, sucos, doces, cremes, compotas, licores, iogurte, bolos, biscoitos, balas e etc. As sementes do cupuaçuzeiro são consideradas como sucedâneas do cacau, por possuírem excelente matéria-prima para fabricação de chocolate branco de alta qualidade, além de serem utilizadas para extração de óleo, que é utilizado na indústria de cosméticos. A casca também tem sua utilidade como adubo orgânico e fabricação de peças artesanais. (CARVALHO et al., 1980; GARCIA, 1991; VENTURIERI, 1993). As amêndoas possuem alto coeficiente de digestibilidade e composição típica das manteigas vegetais, semelhantes à manteiga de cacau (CLEMENT, 1982).

O cupuaçuzeiro pertence ao gênero *Theobroma*, membro da família *Malvaceae* (antes *Sterculiaceae*). A primeira revisão sistemática para o gênero foi realizada por Cuatrecasas (1964), baseada em coleções herborizadas. Sua análise surgiu do método clássico comparativo, usando principalmente as características dos frutos e os caracteres vegetativos, observando-se a presença de 22 espécies, sendo distribuídas em seis seções. *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Shum. está na seção *Glossopetalum*.

Dentre essas 22 espécies, nove são encontradas na Amazônia brasileira: *T. bicolor*, *T. cacao*, *T. canumanense*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. subincanum* e *T. sylvestre* (CUATRECASAS, 1964).

A espécie *T. grandiflorum* é diplóide e apresenta  $2n = 20$  cromossomos (CARLETTO, 1946). No entanto, segundo Moraes et al., (1994), tem-se relatos do cupuaçuzeiro triplóide, com 30 cromossomos, encontrado no município de Cametá-PA, que produz frutos sem sementes, possivelmente decorrente de uma mutação natural.

O significado do nome científico *Theobroma* é “manjar dos deuses” e *grandiflorum*, “flores grandes”. As flores do cupuaçuzeiro são hermafroditas e apresentam barreiras físicas que isolam o estigma da antera, além de serem incompatíveis sob controle gênico, tornando-a obrigatoriamente uma espécie alógama (VENTURIERI, 1994).

O nome cupuaçu é originário da língua Tupi (kupu= que parece com o cacau + uasu = grande). Também é conhecido em outras regiões por cupu (Estado do Pará ao Acre) , pupu, pupuaçu (Estado do Maranhã até a Bahia), cacau, cupuaçu (Bahia), cupuazur (Região de Iquito, no Peru), cacau blanco, pastate, (México, Costa Rica, Panamá), cupuassu (Inglaterra) entre outros (VENTURIERI, 1993).

O gênero *Theobroma*, tipicamente neotropical, encontra-se distribuído nas florestas tropicais úmidas do hemisfério ocidental, entre as latitudes 18° Norte e 15° Sul, estendendo-se do México até a bacia amazônica (CUATRECASAS, 1964).

O *Theobroma grandiflorum* ocorre naturalmente na parte Oriental da Hiléia Amazônica, região que compreende o Sul e Sudeste do Pará, nas áreas de terra firme e várzea alta, especialmente nas microrregiões de Marabá e Parauapebas (CAVALCANTE, 1996), e as áreas mais elevadas da região do médio rio Tapajós, rio Tocantins, rio Guamá, rio Xingu e rio Anapu, no Noroeste do Maranhão (CUATRECASAS, 1964; VENTURIERI 1993).

Atualmente essa fruteira também está sendo cultivada em pequena escala ou em caráter experimental, na Colômbia, Costa Rica, Equador, Peru, Venezuela, México, Martinica, Trindad Tobago, Guiana (CUATRECASAS, 1964, GIACOMETTI, 1992), Bolívia, Guiana Francesa e Suriname. Assim como em outros estados brasileiros, como Bahia, São Paulo, Paraná, entre outros (VENTURIERI; AGUIAR, 1988).

Segundo Ducke (1946) o cupuaçuzeiro é uma cultura pré-colombiana e teve seu processo de domesticação iniciada antes mesmo da chegada de Cristovão Colombo ao



continente americano e já era conhecida e muito utilizada pelos índios que habitavam a Amazônia. Na concepção de Clement (1999), por ocasião dos contatos com os primeiros colonizadores, a coloca entre as espécies consideradas incipientemente domesticadas. Por essa razão, o cupuaçuzeiro é considerado uma espécie em domesticação na Amazônia, sendo gradativamente moldada mais pelo melhoramento genético que pela ação antrópica.

Alves et al., (1997) e Souza et al., (1998) citam que no processo inicial da domesticação dessa espécie, os plantios se davam através de sementes oriundas de plantas nativas, devido a inexistência de materiais selecionados. Portanto, essa tentativa ocorreu sem o devido apoio científico, acarretando na desuniformidade dentro dos pomares e baixa produtividade.

Por conseguinte, a transição da atividade extrativista para o cultivo do cupuaçuzeiro e o conseqüente aumento da área plantada, houve o aumento da incidência de doenças que atacam o cupuaçuzeiro, tanto em viveiro quanto em campo. Observações feitas no campo destacam a vassoura de bruxa, assim como no cacauzeiro, a doença fúngica que causa os maiores prejuízos aos ciclos vegetativos e reprodutivos dessa espécie (BENCHIMOL, 2000), chegando a perdas de 20 a 90% da produção, em casos mais severos (DIAS, 2001).

A vassoura-de-bruxa é causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), originária da bacia amazônica, atualmente se encontra disseminada, de forma endêmica, em toda a região tropical da América do Sul, onde parece ter evoluído com cacauzeiros silvestres (ALVES et al., 1998a; ALVES, 1999; ALVES, 2003).

Os sintomas dessa doença variam dependendo da cultivar, do tipo de tecido envolvido e do seu estágio de desenvolvimento. A infecção na almofada floral pode se dar por meio da flor, que necrosada, permanece aderida a almofada, ou pelo ovário fecundado (Evans, 1981). Em regiões meristemáticas, como gemas axilares e apicais, promove hipertrofia, com brotações vegetativas deformadas e entrenós curtos as quais, após um mês, secam, interferindo significativamente na área fotossintética da planta (VENTURIERI, 1993; BENCHIMOL, 2000).

No cacauzeiro foram observadas perdas de até 100% na produção em diversas propriedades rurais da Bahia, causando severos danos pela doença, aliados aos baixos preços do cacau no mercado internacional, à baixa produtividade das lavouras e aos

fatores climáticos adversos, desencadeando assim, o empobrecimento da região cacaueteira baiana (RUDGARD et al., 1993).

No Estado do Pará já se tem relatos feitos por Alves et al., 1998b, que grande parte dos plantios de cupuaçuzeiro se encontram seriamente comprometidos pelo ataque dessa doença, alguns devido o descaso com os pomares, e pela utilização de materiais genéticos susceptíveis a esse patógeno.

Para Wheeler e Suarez (1993), têm-se quatro estratégias adotadas para o manejo da vassoura de bruxa: prática fitossanitária, controle químico, uso de genótipos resistentes e de agentes de biocontrole, para reduzir a incidência da vassoura-de-bruxa, aumentar a produtividade e recuperar pomares atacados.

Dentre os métodos de controle dessa enfermidade, o emprego de materiais geneticamente resistentes vem ganhando espaço por ser o mais promissor e interessante, justamente por ser o mais econômico, estável e ambientalmente desejável (ALVES et al. 2009).

## **2.2. Melhoramento genético de plantas**

Com o início do processo de domesticação das espécies, através da seleção de características agrônômicas mais desejáveis ao homem, o melhoramento realizado aconteceu de forma subjetiva com as primeiras mudanças alélicas dirigidas (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Contudo, foram os clássicos experimentos de Mendel que contribuíram para uma melhor compreensão da hereditariedade, visando o melhoramento genético e o desenvolvimento de novas variedades (BORÉM & CAIXETA, 2006)

Existem três etapas para se iniciar o melhoramento genético: i) coleta, caracterização e avaliação do germoplasma; ii) seleção de materiais superiores a partir das coleções de germoplasma; e iii) utilização dos materiais selecionados para a criação de cultivares e melhoramento populacional (BORÉM et al. 2009).

O melhoramento genético convencional está associado com a genética mendeliana e a genética quantitativa, atrelado aos métodos estatísticos. No entanto por ser um processo moroso e os ganhos genéticos serem cada vez mais difíceis de serem obtidos, principalmente em plantas perenes, como é o caso do cupuaçuzeiro, que possuem um ciclo vegetativo longo, o sucesso depende da capacidade de se distinguir

fatores genéticos herdáveis daqueles puramente ambientais. Em virtude disto, a natureza poligênica das características de importância agrônômica dificulta e torna lentos os programas de melhoramento de plantas. Muitos desses entraves começaram a ser superados com o advento da genética molecular (MILLACH, 1998 apud LINS, 2008).

Na Embrapa Amazônia Oriental e na Embrapa Amazônia Ocidental vem sendo desenvolvidos trabalhos específicos para programa de melhoramento genético do *Theobroma grandiflorum*, com o objetivo de promover materiais genéticos resistentes e produtivos para essa espécie. A principal finalidade é a obtenção de plantas resistentes à vassoura de bruxa, plantas com muitos frutos, elevado rendimento da polpa e sementes (ALVES, 1999; SOUZA et al., 2002).

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 oferecidas aos produtores. A Embrapa Amazônia Oriental, em 2002, lançou os clones Coari, Codajás, Manacapuru e Belém, que se caracterizam por serem resistentes à vassoura de bruxa (CRUZ e ALVES, 2002). E recentemente, Alves e Ferreira (2012) lançaram a mais nova e promissora cultivar, BRS Carimbó, que possui maior produtividade e resistência a *M. perniciosa* quando comparada as cultivares anteriores.

### **2.3. Estudo da diversidade genética utilizando marcadores moleculares**

O estudo da diversidade dentro dos programas de melhoramento genético se faz essencial para conhecer as características intrínsecas de cada material de interesse e o grau de parentesco de cada indivíduo dentro da população, a fim de evitar a consanguinidade e conseqüentemente a perda da produção devido à endogamia. Dessa forma, a variabilidade existente dentro das coleções de cupuaçuzeiro, devem ser identificadas e esquematizadas, para um melhor direcionamento dentro do programa de melhoramento dessa fruteira, para uma ampliação nas possibilidades de junção de fatores de resistência a doenças, com outras características de interesse agrônômico (ALVES et al., 2003; PIRES et al, 2001).

A diversidade pode ser analisada em termos de genótipos individuais, linha pura, clones, acessos, e espécies silvestres, através de métodos específicos ou de uma combinação de métodos baseados em dados bioquímicos, citológicos e em técnicas

moleculares, que atualmente possibilitam uma diferenciação mais precisa entre os genótipos (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Foi a partir da década de 70, com o avanço das técnicas moleculares e utilização de marcadores isoenzimáticos que a caracterização genética ganhou impulso. No entanto, foi com o desenvolvimento de marcadores moleculares, a nível de sequenciamento genético, que estudos ganharam uma poderosa ferramenta para caracterizar e avaliar recursos genéticos, além de uma melhor forma de compreensão da estrutura e organização da diversidade genética das populações e o seu monitoramento ao longo dos anos. A utilização de marcadores moleculares pode ser usado desde o mapeamento genético a caracterização da diversidade genética (FIGUEIRA & CASCARDO, 2001 apud ALVES, 2003).

Marcadores moleculares já foram utilizados para estudo do cacaueteiro *Theobroma cacao*, uma das espécies mais estudadas do gênero e a qual possui mais informações na área de genética molecular. Os marcadores RAPD (polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente) e RLPF (polimorfismo de comprimento de fragmento digerido) já foram utilizados para estudo de diversidade genética e vêm sendo aplicados, essencialmente, para análise de coleções de germoplasma, demarcação de regiões geográficas de maior diversidade genética para coleta de germoplasma, classificação de variedades, além da caracterização da diversidade genética de pragas e patógenos que causam danos para essa cultura. Todos esses estudos são de extrema importância para propiciar estratégias para o melhoramento genético dessa espécie (FIGUEIRA E CASCARDO, 2001).

#### **2.4. Marcadores microssatélites (SSR)**

Os marcadores microssatélites são ferramentas valiosas para análise de variabilidade genética presente em coleções de espécies vegetais. Esse marcador pode contribuir na conservação de plantas, já que permitem a obtenção de informações cruciais sobre a biologia das populações naturais, tais como fluxo gênico, migração, tamanho efetivo, sistema de cruzamento, entre outros (HOSBIANO et al., 2002).

Os Marcadores microssatélites permitem analisar a diversidade genética, heterozigosidade, e a formação de agrupamentos em populações estudadas. A diversidade genética tem sido referida como a riqueza de espécies dentro de um

ecossistema e o nível de variabilidade genica existente dentro de cada população (NEI, 1973), que pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções esperadas do equilíbrio independente de efeitos de migração, seleção, mutação, ou sistema reprodutivo. Weir (1996) concorda que a heterozigosidade é uma medida adequada para quantificar a variação, porém também considera a frequência de heterozigotos como um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes.

Os marcadores microssatélites vêm ganhando destaque em relação aos outros marcadores e estão sendo amplamente utilizados devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, a pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao seu grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo, constituindo um dos marcadores das classes mais polimórficas disponíveis atualmente. (BORÉM, 2006).

Microssatélites são sequências simples repetidas em séries de nucleotídeos repetidos em tandem, encontrados no genoma de plantas. Para amplificar uma ilha de microssatélites utiliza-se um par de primers, que são sequências únicas de oligonucleotídeos, homólogos as regiões flangeadoras dos microssatélites. Através da PCR é possível uma amplificação específica dos fragmentos contendo o DNA repetitivo em todo o genoma. Cada seguimento diferente de DNA representa um alelo daquele loco específico e está relacionado ao grau de polimorfismo entre as bandas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996 apud ALVES, 2003).

Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, co-dominante e suficientemente estável para serem utilizados em análises genéticas, como em estudos de ligação, identificação de genótipos, proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudos de diversidade, análise gênica e de locos quantitativos (QTL's), análise de pedigree, seleção assistida por marcadores e análise de bibliotecas para a clonagem de genes (BORÉM, 2006).

O conteúdo informático de um loco SSR é bastante alto justamente por se tratar de seqüências de alta taxa evolutiva. Quanto à acessibilidade apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de *primers* informativos, tendo a necessidade de isolamento para desenvolver primers específicos para cada espécie. Além disso, esse tipo de marcador demanda um processo demorado e trabalhoso. No entanto, uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-

obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (BUSO, 1998).

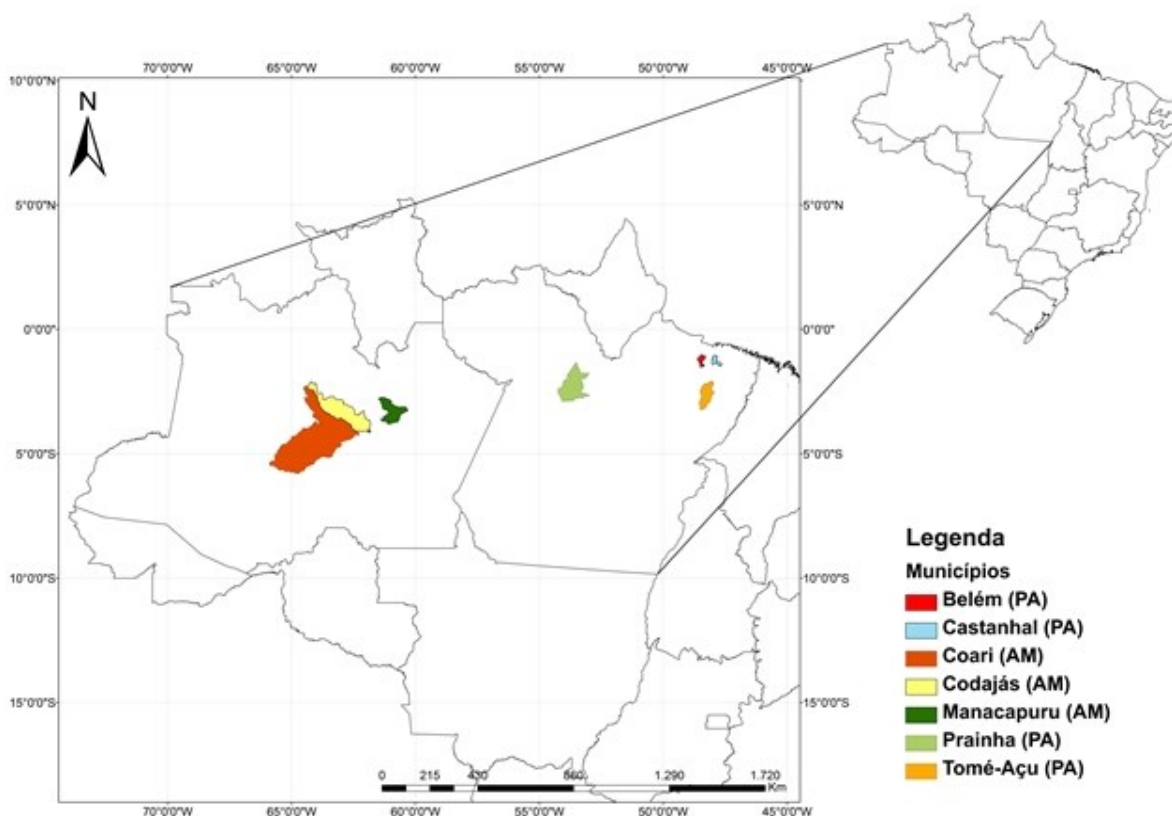
Ferreira & Grattapaglia (1996), explicam que já foi observado a conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, sendo possível, portanto, utilizar primers, denominados heterólogos, para uma espécie e emprega-los nas demais espécies do gênero.

Trabalhos recentes feitos por Alves et al., (2013), mostram a eficiência de primers heterólogos desenvolvidos para o *Theobroma cacao* sendo utilizados para caracterização da diversidade genética em coleções amazônicas de *Theobroma grandiflorum*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização dos materiais

Figura 1. Locais onde foram originalmente coletados os acessos de cupuaçuzeiro.



Para realização desse estudo foram analisados 29 acessos procedentes de dezessete populações de *Theobroma grandiflorum* (Tabela 1), sendo dez populações do município de Tomé-Açu (PA) coletadas em áreas de produtores rurais, duas populações de Belém (PA), uma população da Cidade de Prainha (PA), uma população de Itaquí localizada no município de Castanhal (PA) e três populações adivindas de cidades do Amazonas, Coari, Codajás e Manacapuru. (Figura 1).

Tabela 1. Acesso, local de coleta de 29 acessos de *Theobroma grandiflorum* analisados e a população a cada qual pertence.

Acessos	Local de Coleta da Matriz	População (P <sub>x</sub> )
1	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
3	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
4	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
5	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
6	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
7	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
8	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
9	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
10	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
11	INADA - Tomé Açu/PA	P <sub>1</sub>
12	KIMURA - Tomé Açu/PA	P <sub>2</sub>
13	LAURO KATO - Tomé Açu/PA	P <sub>3</sub>
14	MARCELO - Tomé Açu/PA	P <sub>4</sub>
15	HANTANI - Tomé Açu/PA	P <sub>5</sub>
16	HANTANI - Tomé Açu/PA	P <sub>5</sub>
17	MUROI - Tomé Açu/PA	P <sub>6</sub>
18	HOSHINA - Tomé Açu/PA	P <sub>7</sub>
19	WATANABE - Tomé Açu	P <sub>8</sub>
20	CEPLAC 1 - Belém/PA	P <sub>9</sub>
21	SEKO - Tomé Açu/PA	P <sub>10</sub>
22	174 - COARI (AM)	P <sub>11</sub>
23	186 - CODAJÁS (AM)	P <sub>12</sub>
24	215 - MANACAPURU (AM)	P <sub>13</sub>
25	622 - PRAINHA (PA)	P <sub>14</sub>
26	ITAQUI (Prog. 35/4) - Castanhal/PA	P <sub>15</sub>
27	ITAQUI (Prog. 35/5) - Castanhal/PA	P <sub>15</sub>
28	ITAQUI (Prog. 20/5) - Castanhal/PA	P <sub>15</sub>
30	286 BELÉM (PA)	P <sub>16</sub>
31	MATZUSAKI - Tomé Açu/PA	P <sub>17</sub>

### 3.2. Extração de DNA

Para efetuar a caracterização genética, foram coletados, em Fevereiro de 2014, tecidos foliares dos genótipos e levados ao laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – Pará, para extração de DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1990) e modificado por Figueira et al. (1997) para espécie do gênero *Theobroma*. Cerca de 5ml de tecido foliar, na marca do tubo falcon, foram triturados em cadinho de porcelana, na presença de nitrogênio líquido e, acondicionado em tubo falcon de 15 ml, aos quais foram adicionados 5ml de tampão de extração (5M NaCl; 0,5M EDTA pH 8,0; 1M Tris-HCl pH 8,0; 1% Polivinilpirrolidona MW 10,000; 20% CTAB; 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol; 0.1 mg.ml<sup>-1</sup> proteinase K). Os tubos foram homogeneizados levemente em vortex por 10 s e colocados em banho maria à 60°C por 60 minutos, invertendo os tubos a cada 10 minutos. A seguir, foi adicionado aos tubos contendo o extrato, 5ml de solução contendo 24 partes de clorofórmio para uma parte de álcool isoamílico (CIA v/v), para formar uma emulsão e, sem seguida, foram homogeneizados e centrifugados por 10 min a 4°C e 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais foi adicionado 5ml de álcool 95% congelado e foram cuidadosamente homogeneizados e centrifugados novamente durante 10 min a 4°C e 12.000 rpm. O DNA foi centrifugado e lavado com 1ml de etanol 70% para remover sais, e colocado para secar a temperatura ambiente, por um período de 12h. O precipitado foi ressuspensionado com em 200 $\mu$ l a 300 $\mu$ l de tampão TE (1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0), contendo 10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> RNase, sendo o volume de acordo com a medusa observada, e levado a estufa à 37°C até dissolver durante uma hora, agitado de 10 em 10 min. A concentração de DNA foi determinada pelo Programa LabImag 1D, versão L340. a partir das quantificações realizadas em gel de agarose a 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA Bacteriófago íntegro lambda (50 ng/ul, 100ng/ul e 200 ng/ul). As amostras quantificadas foram diluídas para amostras de trabalho na concentração de 5 ng/ul de DNA e armazenadas a -20 °C. (Figura 2).





Figura 2. Procedimentos para a extração de DNA. I) Tecido foliar sadio; II) Maceração; III) Solução extratora adicionada ao extrato; IV) Adição de CIA; V) Centrifugação.

### 3.3. Amplificação de DNA com primers microssatélites

Para as amplificações de DNA as reações foram preparadas com um volume final de 13  $\mu$ l, contendo 15 ng de DNA genômico, 100  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 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>), 1 unidade de Taq DNA polimerase. Foram testados 20 pares de primers desenvolvidos para o cupuaçuzeiro, no entanto ainda não foram publicados (Tabela 2). As amplificações foram conduzidas no Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), programados, inicialmente, conforme Lanaud et al. (1999a): um ciclo de desnaturação à 94°C por quatro minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 49°C ou 55°C por 60s e 72°C por 60s. O marcador 10 Kb Plus DNA ladder foi utilizado como referência de peso molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação (Figura 3).

Tabela 2. Identificação dos vinte locos específicos de *Theobroma grandiflorum*.

Loco	Sequencia do primer (5'-3')	Temperatura de Anelamento
mTgM 09	<b>F:</b> GTGGGCAAAGAGTACCAAAA <b>R:</b> TTCACTTCAACTCTTGCACC	49° - 55°
mTgM 11	<b>F:</b> CTTTCTTGGTTGCCACTAAC <b>R:</b> TTTGTGGGGTAGAGAGAGGGTA	49° - 55°
mTgM 13	<b>F:</b> CACGTTTAATTGCAAAAGGACA <b>R:</b> ACGTTGGTCAGATCACGGTAG	49° - 55°
mTgM 17	<b>F:</b> GCTTTTCATTCCCTCCTCACAC <b>R:</b> GAGGGAGACTAGCGACAAAGAA	49° - 55°
mTgM 30	<b>F:</b> AACCACCTAATAAACCCCAACC <b>R:</b> AAGAGAGGGTGCAGCAGGTAG	49° - 55°
mTgM 31	<b>F:</b> CCTTCTTGTCTATCTCAATTTTCATC <b>R:</b> TGGGACAAGAGAAGGAGAGAA	49° - 55°
mTgM 39	<b>F:</b> CAAAGTCCCATCTCCACTTCTC <b>R:</b> GGGTGAGTGGGGTCTGTATG	49° - 55°
mTgM 43	<b>F:</b> CCCCTTCTCCTTCCATTATTTT <b>R:</b> AGAGAGAGAAAGCTCACCTGGA	49° - 55°
mTgM 47	<b>F:</b> CTCCCCCTTCCATTCTTCCTAC <b>R:</b> TTACCTGGAGGGAGGAGTGAG	49° - 55°
mTgM 48	<b>F:</b> TGCTATTTCTTGGTCAGACACC <b>R:</b> GAGAGAGCCGTAGAGAGAGAAAGA	49° - 55°
mTgM 50	<b>F:</b> TGCTCTACATGGGAGACTCAA <b>R:</b> CCTTCACAAAGAATCGAACAGA	49° - 55°
mTgM 62	<b>F:</b> GAGGAACACCCCTGTTTCAA <b>R:</b> TTGGTGAAGAGCCTGGTTTC	49° - 55°
mTgM 65	<b>F:</b> GCAGAACCCATAATTCAAAAGC <b>R:</b> GATAGAGCTTAAAGGGCGAGTG	49° - 55°
mTgM 76	<b>F:</b> AAGCAAGTGCCAAAACAAAGAT <b>R:</b> GCATTCACCAACTACCCTTCT	49° - 55°
mTgM 77	<b>F:</b> GTTAGATTTGGTGGTGCGAAAT <b>R:</b> GATCTTCGTTCCCTTTCCTTGC	49° - 55°
mTgM 87	<b>F:</b> TCCTTCCATTCTTCTTCGTTTC <b>R:</b> AAAGTGGTGAAAGAGCAACGTC	49° - 55°
mTgM 102	<b>F:</b> GTGGGTCGTGTCAAACAAC <b>R:</b> CGCCATTTTGTTCATTGTTTT	49° - 55°
mTgM 108	<b>F:</b> GAAAGGGAGGGTCATCGG <b>R:</b> CTTCTCCTTTCTTCCCTCCTC	49° - 55°
mTgM 113	<b>F:</b> TCACCGATCTCTAAAAGCAACA <b>R:</b> CGACCTCACTACATCCTTCTCC	49° - 55°
mTgM114	<b>F:</b> GGTCAAGGTGTTTAGGGTTTGA <b>R:</b> TAATCCGCCTCTCTCACTTC	49° - 55°

Tg : *Theobroma grandiflorum*; F: Forward; R: Reverse.

Os produtos amplificados eram separados em gel desnaturante de 7% poliacrilamida e 7M de uréia, corrido em cuba vertical Hoefer SQ3 da Amersham Biosciences. Para realização da eletroforese, o tratamento das placas de vidro obedeceu ao seguinte procedimento: na placa era aplicado 1ml a 2% de dimetildiclorosilano em actametil ciclo-octasilano (PlusOne Repel Silane ES, cat. # 17-1332-01, Amersham

Biosciences) e espera-se secar por dez minutos. Na placa maior, era aplicado 5 $\mu$ l de metacriloxipropil – trimetoxissilano (PlusOne Bind Silane, cat # 17-1330-01, Amersham Biosciences), diluído em 1ml de solução contendo ácido acético glacial 0,5% em etanol 95%, esperando secar por cinco minutos. As duas placas de vidro foram montadas com um espaçador de 0,5 mm de espessura, usando o aparato de sequenciamento SQ3 (Amersham Biosciences) (Figura 3).



Figura 3. Representação dos procedimentos para a amplificação de DNA: I) Preparo das reações (PCR); II) Amplificação em termociclador; III) Eletroforese em cuba vertical.

Para preparo do gel foram utilizados 8,75 ml de solução de acrilamida 40% (29 acrilamida: 1bisacrilamida), 5ml de 10 X TBE (54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico e 4,75g de EDTA 0,5 M pH 8,0); 16,8g de uréia; 120 $\mu$ l de 10% de persulfato de amônia (p/v); e 240 $\mu$ l de TEMED. A solução de acrilamida era aplicada no gel com auxílio de uma seringa plástica descartável.

Decorridos 60 minutos para polimerização, o conjunto de placas de vidro foram instaladas na cuba vertical de sequenciamento, colocando-se tampão TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) nos respectivos compartimentos. A eletroforese tinha de início uma pré-corrida, para aquecer o gel, na potência de 60W (em torno de 55mA e 1300V) durante 60 minutos.

As amostras para eletroforese foram desnaturadas com a adição de 5 $\mu$ l, de tampão de carregamento (constituído por 95% formamida; 0,05% xilenocianol; 0,05 de azul de bromofenol; 12,5% sacarose; 10mM NaOH), e colocadas à 94°C por 5 minutos, e mantidas em gelo até o carregamento no gel. Eram aplicados 5 $\mu$ l de reação em cada poço.

Após a aplicação das amostras, foi realizada a corrida propriamente dita, com potência constante de 60W durante duas horas e meia. A coloração com nitrato de prata foi realizada conforme descrito por Creste et al. (2001). O gel, fixado na placa de vidro

maior, era tratado com um litro de solução fixadora constituída de 10% etanol, acrescida de 1% de ácido acético, durante 10 minutos e, posteriormente, lavado uma vez em água destilada por um minuto. Após a lavagem, o gel era tratado com um litro de 1,6% ácido nítrico por cinco minutos, seguido de duas lavagens em água destilada durante um minuto. Na sequência, o gel era tratado com um litro de uma solução de  $2 \text{ g.l}^{-1}$  de nitrato de prata durante 20 minutos, e lavado com água por duas vezes durante um minuto. As bandas eram reveladas com uma solução de  $30 \text{ g.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$  acrescida de  $540 \text{ }\mu\text{l.l}^{-1}$  de formaldeído até as bandas adquirirem a intensidade desejada. Eram colocados 500 ml da solução até saturar e, uma vez descartados, eram colocados os 500 ml restantes. Após o aparecimento das bandas essa solução era substituída por 1000 ml de solução bloqueadora de 5% ácido acético, por cinco minutos. O gel era lavado em água destilada e ficava secando ao ar livre até ser fotografado.

Após a eletroforese, as imagens dos géis foram escaneadas e armazenadas digitalmente. Foi realizada a interpretação visual dos géis, onde cada loco com diferente padrão de migração nos géis foi considerado um alelo. A partir destes perfis alélicos, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado pela sequência alfabética, de A até a letra máxima de alelos por loco (X).

### 3.4. Análise Estatística

A diversidade genética foi caracterizada pelo número total de alelos (A), número efetivo de alelos por loco (Ae), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A endogamia dos genótipos foi inferida da estimativa do índice de fixação (F). Todos esses parâmetros foram obtidos com o auxílio do programa GENALEX 6.501 (PEAKALL and SMOUSE, 2006).

Os dados genotípicos gerados pelo programa NTSYS 2.02, foram codificados em matrizes numéricas. A partir dessas matrizes foram feitas as análises de distância genética e de agrupamentos entre os acessos de *T. grandiflorum*, utilizando a distância genética  $D_A$  (NEI et al., 1983).

A análise de agrupamento foi realizada utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização dos locos microssatélites em *T. grandiflorum*

Construiu-se o perfil genotípico dos 29 acessos de cupuaçuzeiro para servir como “*fingerprint*” de caracterização genética e que serão uteis na disponibilização das informações relativas ao acervo genético dos diferentes acessos de *T. grandiflorum*.

Para a genotipagem foram selecionados 20 marcadores moleculares microssatélites, onde foram encontrados 55 alelos nas populações, sendo que o número de alelos por locos variou de um (*mTgM 31*) a quatro (*mTgM 30*, *mTgM 77* e *mTgM 87*), com média de 3 alelos por loco (Tabela 3). Dos primers testados, 19 apresentaram polimorfismo (95%), os mais polimórficos foram *mTgM 09*, *mTgM 30*, *mTgM 43*, *mTgM 77* e *mTgM 87*, que amplificaram até 4 alelos (Figura 2).

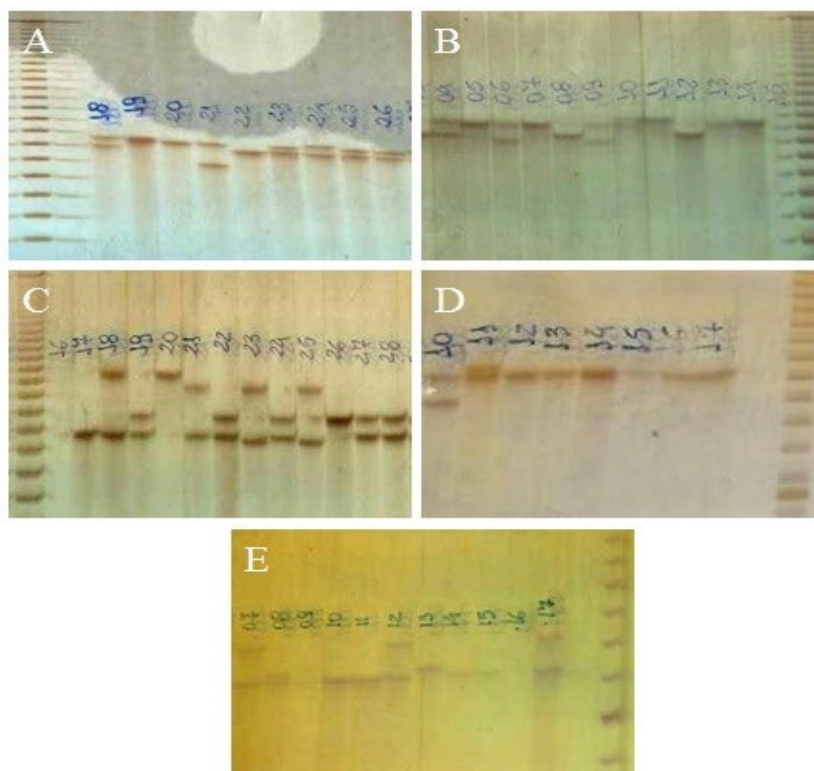


Figura 2. Géis de poliacrilamida mostrando variabilidade, por microssatélites nos locos mais polimórficos: A) *mTgM 09*, B) *mTgM 30*, C) *mTgM 43*, D) *mTgM 77* e E) *mTgM 87*.

Alguns trabalhos relatam média de alelos/loco semelhantes às obtidas nesse estudo. ALVES et al. (2013), ao analisarem a diversidade genética em populações amazônicas de cupuaçuzeiro, utilizando *primers* heterólogos de microssatélites desenvolvidos para *T. cacao*, obtiveram 45 alelos na população estudada, com uma média de 3,29 alelos por loco. SILVA et al. (2013) também obtiveram 48 alelos na população de estudo, com uma média de 3,43 alelos por loco.

Entretanto, o número médio de alelo/loco encontra-se abaixo do observado para espécies do gênero *Theobroma*. Lanaud et al. (1999), ao analisarem 24 genótipos de cacauzeiro, obtiveram média de 5,6 alelos por loco e Motamayor et al. (2001) analisaram a diversidade genética em cacauzeiros e encontraram 150 alelos, com média de 9,4 alelos por locos. Estes resultados decorreram da grande variabilidade entre os acessos lá empregados.

No presente trabalho o grau de polimorfismo revelado pelo número de alelos por loco, foi relativamente inferior aos trabalhos realizados com *T.cacao*, mesmo sendo utilizados primers específicos para o *T. grandiflorum*. Isso se deve, possivelmente, pela quantidade de amostras analisadas ou pelas características intrínsecas de cada população estudada.

#### **4.2. Caracterização dos acessos**

O número de alelos amplificados é uma forma de quantificar a diversidade genética, visto que apresenta a riqueza de variações alélicas, sendo que quanto maior o número de alelos amplificados, maior a informação da diversidade gerada pelo marcador. Neste caso, o número efetivo de alelos por locos ( $A_e$ ) foi inferior ao número de alelos nos locos ( $A$ ), variando de 1,00 (mTgM 31) a 3,636 (mTgM 30), com média de 1,887 alelos por locos. Isto demonstra que muitos alelos têm baixa frequência ou são raros (Tabela 3).

A heterozigosidade observada nos locos polimórficos variou de 0,200 (mTgM 113) a 0,600 (mTgM 87 e mTgM 108), com média de 0,400. A heterozigosidade esperada nos locos polimórficos variou entre 0,265 (mTgM65) a 0,725 (mTgM 30), com média de 0,470. O índice de fixação ( $F$ ) variou entre os locos polimórficos de negativo a positivo (Tabela 3). Em oito locos, o índice de fixação foi negativo (variando de  $-0,333$  a  $-0,010$ ), sugerindo excesso de heterozigotos em relação ao esperado em

equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os demais locos polimórficos apresentaram valores positivos (variando entre 0,583 a 0,084). A média entre locos foi positiva (0,084), porém baixa e não significativamente diferente de zero, sugerindo, assim, ausência de endogamia.

Tabela 3. Estimativa em parâmetros genéticos em 20 locos microssatélites de *Theobroma grandiflorum*, onde  $A$  é o número total de alelos;  $A_e$ : número médio efetivo de alelos por loco;  $A_{\text{alelos}} \text{ Estimados}$  é o peso molecular dos alelos;  $H_o$ : heterozigosidade observada;  $H_e$ : heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $F$ : índice de fixação; utilizando 29 acessos distribuídos em 17 populações.

<i>Locos</i>	$A$	$A_e$	<i>Alelos estimados</i>	$H_o$	$H_e$	$F$
mTgM 09	4	2,128	181, 175, 173 e 170	0,400	0,530	0,245
mTgM 11	3	2,020	140, 130 e 120	0,400	0,505	0,208
mTgM 13	2	1,980	140 e 120	0,500	0,495	-0,010
mTgM 17	2	1,600	210 e 200	0,500	0,375	-0,333
mTgM 30	4	3,636	200, 195, 185 e 180	0,500	0,725	0,310
mTgM 31	1	1,000	160	0,000	0,000	#N/D
mTgM 39	3	1,802	175, 171 e 168	0,400	0,445	0,101
mTgM 43	4	2,105	185, 173, 165 e 148	0,300	0,525	0,429
mTgM 47	2	1,471	305 e 300	0,400	0,320	-0,250
mTgM 48	2	1,600	290 e 285	0,500	0,375	-0,333
mTgM 50	3	2,198	108, 106 e 98	0,400	0,545	0,266
mTgM 62	2	1,835	210 e 190	0,300	0,455	0,341
mTgM 65	3	1,361	240, 233 e 220	0,300	0,265	-0,132
mTgM 76	2	1,471	218 e 208	0,400	0,320	-0,250
mTgM 77	4	1,869	155, 150, 145 e 138	0,400	0,465	0,140
mTgM 87	4	1,905	122, 120, 113 e 110	0,600	0,475	-0,263
mTgM 102	2	1,835	122 e 120	0,500	0,455	-0,099
mTgM 108	3	2,899	175, 170 e 160	0,600	0,655	0,084
mTgM 113	2	1,923	126 e 122	0,200	0,480	0,583
mTgM114	3	2,667	148, 140 e 137	0,600	0,625	0,040
Média	3	1,887	-	0,400	0,470	0,084
Desvio Padrão	0,9104					
Total de Alelos	55					

Em termos gerais, os parâmetros de diversidade analisados, como número de alelos, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e índice de fixação, indicam que os acessos de *T. grandiflorum* apresentam um nível de diversidade genética moderado e baixos índices de homozigose.

#### 4.3. Distâncias genéticas

Através do dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1983) foi possível verificar que as populações de cupuaçuzeiro formaram cinco grupos (Figura 3).

O Grupo I, formado pelos acessos 01, 23, 25, 12 e 26, agrupa quatro acessos do Pará e um do Amazonas. Os acessos 23 (186 de Codajás - AM) e 25 (622 de Prainha - PA) apresentaram boa afinidade genética. Entretanto os locais de coleta desses materiais ficam relativamente distantes (aproximadamente 1000 km em linha reta). Alves et al (2013) explicaram que nesses casos, a hipótese mais provável é que o material 186 de Codajás-AM tenha sido introduzido no Estado do Amazonas através de mudas ou sementes oriundas do Estado do Pará, por este estado ser o centro de origem dessa fruteira (CUATRECASAS, 1964). A relação entre esses materiais é mais forte que entre o acesso 01 da população Inada (PA) e o acesso 26 (Itaqui – Pará).

O Grupo II, constituído pelos acesso 07, 17, 14, 18, 15, 22, 16, 24, 28, 27 e 19, é o mais numeroso do estudo. Desses os acessos 07 e 17, oriundos das fazendas Inada e Muroi, formaram um sub-grupo, por apresentarem boa proximidade genética, sendo os mais distantes dos demais acessos do grupo. Dentro do segundo sub-grupo é relevante a proximidade genética entre os acessos 24 (Manacapuru – AM) e 28 (Itaqui –PA). O mesmo acontece entre os acessos 15 Hantani (PA) e 174 de Coari (AM), que apesar da proximidade genética, também foram coletados em locais distantes uns dos outros. Nesse caso, cruzamentos entre esses materiais com similaridade genética, não devem ser realizados, a fim de evitar a endogamia.

O Grupo III foi composto por apenas quatro acessos, todos procedentes do Pará (04, 13, 20 e 08). Ficou ressaltada, nesse grupo, a proximidade genética do acesso 13 (Lauro Kato T. Açu - PA) e 20, oriundo de Belém (Ceplac). Tal situação deverá inviabilizar a hibridação entre os dois genótipos.

Sete acessos formaram o Grupo IV, todos do Pará. Dentre esses, cinco foram procedentes de uma única propriedade, Fazenda Inada. Isto indica uma origem comum para esses acessos, havendo necessidade de levar esse resultado em consideração, no procedimento de seleção.

O Grupo V formado por apenas dois acessos, 03 e 29, reuniu duas procedências distintas (Inada) e (Belém) do Estado do Pará.



Em uma análise geral, estes resultados indicam que esses materiais que exibem características agronômicas desejáveis, apresentam diversidade genética entre eles e podem ser explorados em programas de melhoramento de *T. grandiflorum*, através de cruzamentos controlados.

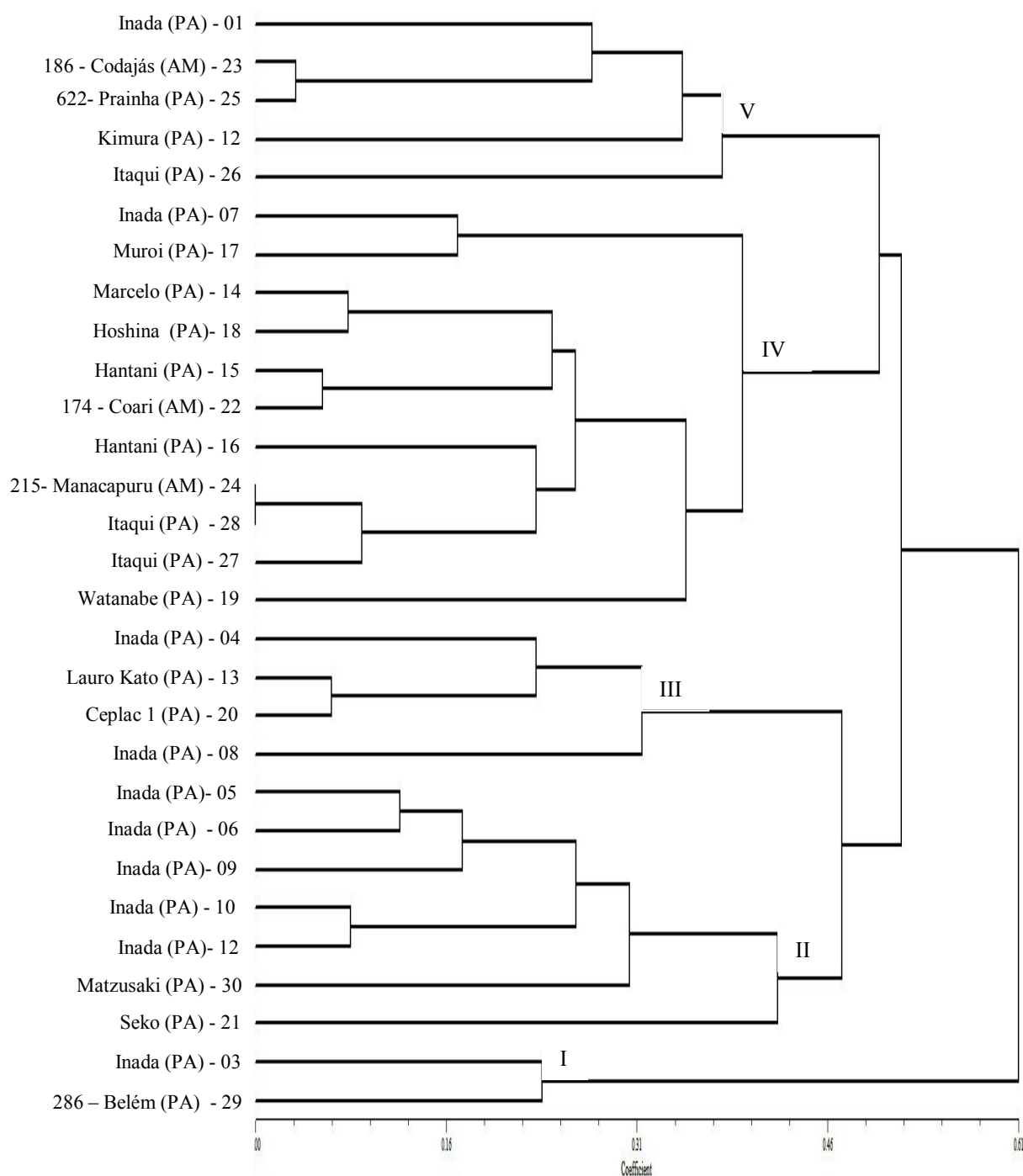


Figura 3. Dendrograma baseado na distância genética de  $D_A$  (Nei, et al, 1983) entre 29 acessos de *Theobroma grandiflorum* estabelecidos em diferentes populações de cupuaçuzeiro da Amazônia brasileira, agrupados utilizando o método de médias das distâncias (UPGMA).

## 5. CONCLUSÕES

Os acessos de *T. grandiflorum* analisados apresentaram variabilidade genética com moderado nível de riqueza alélica.

Alguns acessos apresentaram estreito grau de parentesco entre si, portanto, hibridações entre eles deverão ser evitadas, pois poderão gerar depressão por endogamia, o que origina plantas com baixos desenvolvimento e produção de frutos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.M.; CORRÊA, J.R.V.; RODRIGO, M. Melhoramento genético do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) no Estado do Pará. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTADO- REINO E CUPUAÇU, 1., 1996, Belém. Anais... Belém: EMBRAPA, CPATU/JICA, 1997. p.127-146. (Documentos, 88).

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

ALVES, R.M.; CORRÊA, J.R.V.; GOMES, M.R.O. Avaliação preliminar de matrizes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em áreas de produtores de Tomé-Açu, Pará. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 13., 1998, Feira de Santana. **Resumos...** Feira de Santana: Sociedade Brasileira de Genética, Seção Nordeste, 1998b. p.359.

ALVES, R.M. Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex. Spreng) Schum). In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém, 1999. cap.1, p.37- 48. (Documentos, 16)

ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex.Spreng.) Schum., por marcadores microsatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2003. 146 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2003.

ALVES, R.M.; FARIAS NETO, J. T.; CRUZ, E.D.; OLIVEIRA, M.S.P. Estratégias do melhoramento genético desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental, para obtenção das primeiras cultivares de cupuaçuzeiro e açaizeiro. In: **Seminário Técnico Brasil-Japão Projeto “Desenvolvimento Tecnológico para a Agricultura Sustentável na Amazônia Oriental**. Belém:EMBRAPA\_CPATU, 2003. (Embrapa-CPATU. Documentos)

ALVES, R. M. 2007. Recomendações técnicas para o plantio de clones de cupuaçuzeiro. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 151: 4p.

ALVES, R.M.; RESENDE, M.D.V.; BANDEIRA, B. dos S.; PINHEIRO, T.M.; FARIAS, D.C.R.; Evolução da vassoura-de-bruxa e avaliação da resistência em progênies de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1022-1032, Dezembro 2009.

ALVES, R.M.; FERREIRA, F.N. **BRS Carimbó - a nova cultivar de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental**. Belém, PA. Embrapa Amazônia Oriental. (Comunicado Técnico 232), 2012. 8p.

ALVES, R.M.; SILVA, C.R. de S.; SILVA, M.S. da C.; SILVA, D.C. de S.; SEBBENN, A.M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 35, n. 3, p. 818-828, Setembro 2013

BENCHIMOL, R.L. Doenças do cupuaçuzeiro causadas por fungos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 50p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Minas Gerais: Folha de Viçosa, 2006. 374 p.

BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R. **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa, MG, 2009. 486p.

BUSO, G. S. C. **Análise genética de espécies silvestres de arroz (*Oryza spp*) nativas do Brasil**: estrutura de populações, diversidade genética e relações filogenéticas utilizando marcadores moleculares. 1998. 324f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro – cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém: EMBRAPA, CPATU, 1984. 10p. (Documento, 32).

CARLETTO, G.M. 1946. O número de cromossômios em cacauzeiros. Ilhéus: Instituto de Cacao da Bahia. Boletim Técnico, 6:35-39.

CARVALHO, J.R.; ROCHA FILHO, G.N.; SERRUYA, H. Análise dos óleos de três frutos comestíveis da região amazônica – cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Shum). Sterculiaceae), mari (*Paraqueiba paraenses*, Icacinaceae) e uxi (*Endopleura uxi*, Humisiaceae). In: I Encontro de profissionais de química da Amazônia, Anais Belém: UFPA, 1980. p.187-196.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CNPq/ Museu Paraense Emílio Goeld, 5 ed. 1996, 279p. (Coleção Adolpho Ducke).

CLEMET, C.R.; MÜLLER, C.H.; FLORES, W.B.C. Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas Nativas da Amazônia Brasileira. *Acta Amazônica*. V.12, n. 4, p. 677-695, 1982.

CLEMENT, C.R. 1999. 1942 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany* 53(2):188-202.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Planta Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, E.D.; ALVES, R.M. 2002. Cultivares de cupuaçuzeiro tolerantes à vassoura de bruxa. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 4p. (Recomendações Técnicas).

CUATRECASAS, J. 1994 - Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *United States Natural Herbarium*, Washington 35(6):375-614.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. 578p. : il.

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p. 13-15.1990.
- DUCKE, A. 1946. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira: notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. Belém: IAN. Boletim Técnico, 8:24.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease - a case study. **Cocoa Growers' Bulletin**, Bournville, v.32, p. 5-19, 1981.
- 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.
- FIGUEIRA, A. V. O.; CASCARDO, J. C. M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: Dias, L. A. S. (Editor). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. 578p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.
- GARCIA, C.L. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes e no vigor de plântulas de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng.) Shum). 1991. 62p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/FUA., Manaus.
- GIACOMETTI, D.C. Cupuassu, *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shum. In: HERNANDEZ, J.E.; LEÓN, J. Cultivos marginados: outra perspectiva de 1492. Roma: FAO, 1992. p. 203-207. (FAO. Producción y Protección Vegetal, 26).
- HOSBIANO, A. A, PALMERI, D.A., BRAVO, J.P., PEREIRA, T.E.B., LOPES, C.R., GIMENES, M.A., Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, v. 12, n. 1, p. 10-15, 2002.
- 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**, Lawrence, v.8, p.2141-2143, 1999.
- LINS, B.A.; Distâncias genéticas estimadas com marcadores moleculares e associação com performance de híbridos de *Theobroma cacao* L. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.
- MORAES, V.H. de F.; MULLER, C.H.; SOUZA, A. das G.; ANTÔNIO, I.C. 1994. Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon. **Angewandte Botanik** 68:47-52.
- MORGANTE, M.; OLIVEIRA, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993

MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, A. P.; LANAUD, C. Domestication du cacaoyer cultivés par les Mayas. I. Preuve d'une origine sud américaine des cacaieyers cultivés par les mayas. In: THEORETICAL AND APPLIED GENETICS RESEARCH CONFERENCE, 13., Lagos, 2001. Proceedings. Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 2001. 54-68.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v07, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, New York, , v.19, p. 153-170, 1983.

PIRES, J.L.; FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.S.; FALEIRO, A.S.G.; MONTEIRO, W.R. Variabilidade genética de fontes de resistências de *Theobroma cacao* L. à *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. *Fitopatologia Brasileira*, 26 (Suplemento): 347, 2001.

PEAKALL, R. and SMOUSE, P.E. (2006) GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, **6**, 288-295.

RUDGARD, S.A., MADDISON, A.C. & ANDEBRHAN, T. Disease Management in Cocoa: Comparative Epidemiology of Witches' Broom. London. Chapman & Hall. 1993.

SILVA, M. S. da C., ALVES, R. M., ALBUQUERQUE, P. S. B., SILVA, C. R. de S. S., Diversidade genética de acessos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) utilizando marcadores microssatélites. 14º Seminário de Iniciação Científica. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

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

SOUZA, A. G. C.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, S. E. L.; SOUZA, N. R. . The cupuaçuzeiro genetic improvement program at Embrapa Amazônia Ocidental. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, Londrina, v.2, n.3, p.471-478, 2002.

VENTURIERI, G.A.; AGRUIAR, J.P.L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Will. Ex Spreng.) Schum). *Acta Amazônica*, v.18, n.1/2, p.3-8, 1988.

VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: a espécie sua cultura, usos, e processamento. Belém: Club do cupu, 1993. 108p.

VENTURIERI, G.A. 1994. Floral biology of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Shumann). Tese Ph.D. University of Reading. 206p

WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discretetion genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 377p.

WHEELER BEJ, SUÁREZ C, 1993. The pathosystem. In: Rudgard SA, Maddison AC, Andebrhan T, eds. *Disease Management in Cocoa: Comparative Epidemiology of Witches' Broom*. London, UK: Chapman & Hall, 9–19.