

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (3)

March 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1332020833>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&p=view&path%5B%5D=833&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Diversidade genética entre cupuízeiros nativos do Portal da Amazônia, Mato Grosso, Brasil

Genetic diversity between native cupuízeiros of Amazonia Portal, Mato Grosso, Brazil

A. G. M. Cordeiro, L. H. R. Silva, E. S. Cardoso, G. F. Pena, K. É. M. Zortéa, A. A. B. Rossi

Universidade do Estado de Mato Grosso - Campus de Alta Floresta

*Author for correspondence: a1g2m3c4@gmail.com

Resumo. *Theobroma subincanum* Mart., conhecido popularmente como cupuí, pertence à família Malvaceae. É uma espécie frutífera silvestre nativa da Amazônia encontrada em florestas de terra firme, sendo caracterizada pela sua grande importância alimentícia e ecológica. O cupuí apresenta genes que podem ser utilizados para o melhoramento genético de espécies comerciais do gênero, de modo que muitos estudos têm sido realizados para caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares, dentre os quais os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) têm sido amplamente utilizados. Neste contexto o objetivo do estudo foi analisar a diversidade genética entre genótipos de cupuí, utilizando marcadores moleculares ISSR. Os dez marcadores utilizados amplificaram 42 fragmentos, sendo 35,71% polimórficos, e a dissimilaridade genética, estimada a partir do coeficiente de Jaccard, variou de 0,02 a 0,26, indicando a existência de variabilidade genética entre os genótipos estudados. O método de agrupamento UPGMA alocou os vinte genótipos de cupuí analisados em três grupos, enquanto o método de otimização de Tocher distribuiu os mesmos em oito grupos, confirmando, portanto, a existência de diversidade genética entre os materiais avaliados. Os dois métodos de agrupamento revelaram que os indivíduos MN08, MN09 e MN10 são os mais divergentes e, portanto, os mais indicados para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: ISSS, *Theobroma subincanum*, Variabilidade genética.

Abstract. *Theobroma subincanum* Mart. popularly known as cupuí, belongs to the family Malvaceae. It is a wild fruit species native to the Amazon and is found in mainland forests, being characterized by its great alimentary and ecological importance. The cupuí presents genes that can be used for the crop breeding of commercial species of the genus, so that many studies have been carried to characterize genotypes through molecular markers, among which ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) have been widely used. In this context the objective of the study was to analyze the genetic diversity among cupuí genotypes, using molecular markers ISSR. Ten markers used amplified 42 fragments, being 35.71% polymorphic, and the genetic dissimilarity, estimated from the Jaccard coefficient, varied from 0.02 to 0.26, indicating the existence of genetic variability among the studied genotypes. The UPGMA grouping method allocated the twenty genotypes of cupuí analyzed in three groups, while the Tocher optimization method distributed the same in eight groups, thus confirming the existence of genetic diversity among the evaluated materials. The two methods of grouping revealed that the MN08, MN09 and MN10 individuals are the most divergent and therefore the most suitable for conservation and breeding programs of the species.

Keywords: ISSR, *Theobroma subincanum*, Genetic variability.

Introdução

O *Theobroma subincanum* Mart., popularmente conhecido como cupuí, é uma espécie frutífera, nativa e endêmica, com origem e distribuição ao longo de toda floresta Amazônica (Figura 01) (Flora do Brasil, 2018). Embora seja menos conhecido que o cacau (*Theobroma cacao*) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), seus

parentes próximos, o cupuí apresenta um grande potencial econômico para a região pois seus frutos são comestíveis, sua polpa é consumida tanto *in natura* quanto em forma de suco, néctar ou bebidas leves, e suas sementes podem ser utilizadas para produção de chocolate (Arenas-de-Souza et al., 2015). As plantas de *T. subincanum* tem preferência por áreas florestais de terra firme, apresentam porte

medianamente arbóreo, raramente atingindo 20 metros de altura (Do Nascimento, 2012).



Figura 01. Indivíduo de *Theobroma subincanum* (A); Flor em antese (B); Fruto (C).

A diversidade genética do cupuí, assim como de outras espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia brasileira, está ameaçada pelo desmatamento e pela expansão da área urbana das cidades sobre as áreas florestais, o que torna essencial a realização de pesquisas sobre a variabilidade genética em populações remanescentes, pois o entendimento da diversidade genética dentro de uma população é fundamental para o conhecimento de diferentes ações de conservação e manejo, favorecendo assim a preservação das espécies (Rivas et al., 2013).

A obtenção de toda e qualquer informação a respeito da estrutura e da diversidade genética torna acessível o conhecimento da organização e distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais de uma determinada espécie. Tal conhecimento, aliado à caracterização demográfica destas populações, é muito importante para escolha acertada de estratégias de conservação e exploração consciente da espécie em seu habitat natural, garantindo assim a sustentabilidade e a preservação do recurso genético vegetal (Mariot et al., 2014).

Avanços na área de biologia molecular proporcionaram melhores possibilidades de pesquisas de caracterização molecular e avaliação da diversidade genética, contribuindo para projetos que visem a conservação de espécies. Atualmente, a variação encontrada em plantas ou animais pode ser analisada ao nível do DNA, graças aos chamados marcadores moleculares que detectam o polimorfismo ao nível do DNA e vêm sendo empregados com sucesso em estudos de genética de populações vegetais (Borém & Caixeta, 2016).

Devido aos baixos custos de desenvolvimento, e por poderem ser utilizados para qualquer espécie de planta, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são

frequentemente empregados em estudos de diversidade e variabilidade genética de populações. Dentre os diferentes tipos de marcadores, os ISSR têm sido muito utilizados por serem amplamente variáveis, devido a grande ocorrência e distribuição no genoma, por não requererem informações prévias do genoma e por revelarem padrões altamente polimórficos, mostrando-se úteis em estudos de diversidade genética (Lima et al., 2015).

Considerando a importância do conhecimento sobre a diversidade genética de espécies nativas, o presente estudo tem por objetivo caracterizar a diversidade genética de *T. subincanum* por meio de marcadores moleculares ISSR e assim fornecer informações que poderão ser úteis para o estabelecimento de programas de melhoramento genético, manejo e conservação da espécie.

Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) da Universidade do Estado de Mato Grosso, campus de Alta Floresta, e avaliou a diversidade genética entre 20 indivíduos de cupuí de uma população natural, localizada na comunidade Mundo Novo (9° 51' 3,36" Sul; 55° 53' 5,75" Oeste), zona rural do Município de Alta Floresta, MT, Brasil.

Para a extração de DNA foram coletadas folhas em estágio intermediário de maturação, sendo o material foliar devidamente identificado, armazenado em sílica gel ainda em campo e, posteriormente, armazenado no GenBioMol para posterior utilização.

A extração do DNA total foi realizada seguindo protocolo de CTAB desenvolvido por Doyle & Doyle (1987), com modificações sugeridas por Faleiro (2002), eficientes na extração do DNA de folhas de *Theobroma cacao*.

A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, sendo as amostras diluídas em água ultrapura e padronizadas em 10 ng μL^{-1} .

Para amplificação do DNA foram testados 35 *primers* ISSRs, dos quais foram selecionados os 10 iniciadores que produziram bandas mais nítidas e resultaram em maior polimorfismo (Tabela 01).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 μL em termociclador MJ 96 (Biocycler), utilizando o programa de amplificação proposto por Charters & Wilkinson (2000). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A coloração do gel foi feita com brometo de etídio (0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo fotografado sob luz ultravioleta usando Transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia) e câmera digital HX1 9.1 megapixels (Sony). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb (InvitrogenTM).

A partir da avaliação visual das bandas mais definidas para cada *primer* e para cada um dos 20

indivíduos analisados, foi construída uma matriz binária, de presença e ausência, onde 1 representa a presença do produto amplificado e 0, a sua ausência.

Os dados da matriz binária de presença/ausência foram analisados para obtenção do percentual de polimorfismo (%P), utilizando a fórmula abaixo:

$$\%P = \frac{nbp}{ntb} \times 100$$

Onde:

%P = percentual de polimorfismo do *primer*;

nbp = número de bandas polimórficas; e

ntb = número total de bandas amplificadas.

Com auxílio do software Genes (Cruz, 2013), e ainda a partir da matriz binária, foi calculada a matriz de dissimilaridade genética, por meio do coeficiente de Jaccard, e realizadas as análises de agrupamento.

Resultados e discussão

Os 10 *primers* de ISSR selecionados amplificaram um total de 42 fragmentos, dos quais 35,71% foram polimórficos. Giustina et al. (2014) ao avaliarem 18 indivíduos de *Theobroma speciosum* encontraram 26,73% de polimorfismo. Não muito discrepantes foram os resultados obtidos por De Oliveira et al. (2014) que observaram 27% de polimorfismo em seus estudos realizados com *Theobroma grandiflorum*.

O número de bandas amplificadas variou entre 3 (UBC 840) e 5 (UBC 808, UBC 811 e UBC 835), com média de 4,2 por *primer* (Tabela 01).

Alves et al. (2013), em trabalho realizado com *Theobroma grandiflorum*, encontraram uma variância de um a sete no número de alelos por locus, com uma média de 3,21, tendo, portanto, encontrado uma média inferior para o cupuaçu em relação à média encontrada para o cupuí neste trabalho.

A dissimilaridade genética, estimada a partir do coeficiente de Jaccard, variou de 0,02 (entre os indivíduos MN19 e MN05) a 0,26 (entre os indivíduos MN08 e MN04), o que permite inferir que há variabilidade genética entre os indivíduos de cupuí avaliados neste estudo (Tabela 02).

Os indivíduos de cupuí avaliados neste estudo foram agrupados, de acordo com suas similaridades genéticas, por meio do método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*) e do método de otimização de Tocher.

O agrupamento hierárquico, pelo método UPGMA, organizou os indivíduos em três grupos (Figura 02), sendo o grupo I representado por 85% dos indivíduos, o grupo II formado apenas pelo indivíduo MN09 e o grupo III, pelos indivíduos MN08 e MN10.

De acordo com o método de Tocher, os indivíduos de cupuí foram distribuídos em oito grupos (Tabela 03), sendo que 50% dos indivíduos foram alocados no grupo 1, enquanto os grupos 2, 3 e 4 são constituídos por dois indivíduos cada e o restante dos grupos (5, 6, 7 e 8) são compostos por apenas um indivíduo cada.

Tabela 01. *Primers* ISSRs utilizados para avaliação da diversidade genética de cupuí, suas respectivas seqüências, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e percentual de polimorfismo por *primer* (%P)

Primer	Seqüência (5' → 3')	NTB	NBP	%P
UBC 808 (AG) ₈ C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	5	1	20,0
UBC 809 (AG) ₈ G	AGAGAGAGAGAGAGAGG	4	1	25,0
UBC 811 (GA) ₈ C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	5	1	20,0
UBC 826 (AC) ₈ C	ACACACACACACACACC	4	2	50,0
UBC 827 (AC) ₈ G	ACACACACACACACACG	4	2	50,0
UBC 835 (AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	5	1	20,0
UBC 840 (GA) ₈ YT	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	3	2	33,3
UBC 855 (AC) ₈ YT	ACACACACACACACACYT	4	2	50,0
UBC 873 (GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	4	2	50,0
UBC 889 DBB (AC) ₇	DBDACACACACACACAC	4	1	25,0
Total		42	15	-

Y= C ou T; B = C, G ou T; D = A, G ou T

Tabela 02. Matriz de dissimilaridade genética entre 20 indivíduos de cupuí calculada com base no complemento do coeficiente de Jaccard, utilizando 42 fragmentos ISSR.

01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
0	0,09	0,13	0,15	0,10	0,19	0,15	0,18	0,15	0,15	0,11	0,19	0,17	0,10	0,15	0,18	0,11	0,08	0,08	0,11	01
	0	0,12	0,17	0,12	0,21	0,16	0,18	0,17	0,19	0,15	0,19	0,19	0,12	0,17	0,17	0,11	0,08	0,10	0,08	02
		0	0,10	0,07	0,13	0,11	0,15	0,13	0,11	0,13	0,10	0,11	0,11	0,11	0,05	0,12	0,07	0,04	0,10	03
			0	0,08	0,14	0,13	0,26	0,17	0,18	0,16	0,17	0,10	0,11	0,08	0,11	0,12	0,11	0,10	0,14	04
				0	0,06	0,09	0,15	0,15	0,13	0,11	0,08	0,03	0,08	0,05	0,07	0,10	0,05	0,02	0,07	05
					0	0,08	0,14	0,13	0,21	0,14	0,06	0,08	0,08	0,08	0,14	0,18	0,12	0,08	0,09	06
						0	0,13	0,11	0,13	0,15	0,14	0,08	0,05	0,04	0,15	0,10	0,09	0,07	0,07	07
							0	0,18	0,13	0,14	0,11	0,12	0,17	0,15	0,16	0,20	0,11	0,13	0,14	08
								0	0,19	0,13	0,17	0,19	0,05	0,15	0,17	0,14	0,14	0,13	0,12	09
									0	0,16	0,12	0,08	0,18	0,13	0,11	0,15	0,10	0,11	0,16	10
										0	0,10	0,14	0,11	0,16	0,14	0,10	0,10	0,09	0,12	11
											0	0,09	0,15	0,12	0,05	0,19	0,13	0,10	0,14	12
												0	0,11	0,06	0,09	0,13	0,03	0,06	0,10	13
													0	0,11	0,16	0,12	0,06	0,05	0,03	14
														0	0,11	0,10	0,10	0,07	0,12	15
															0	0,17	0,12	0,09	0,14	16
																0	0,10	0,08	0,08	17
																	0	0,02	0,07	18
																		0	0,05	19
																			0	20

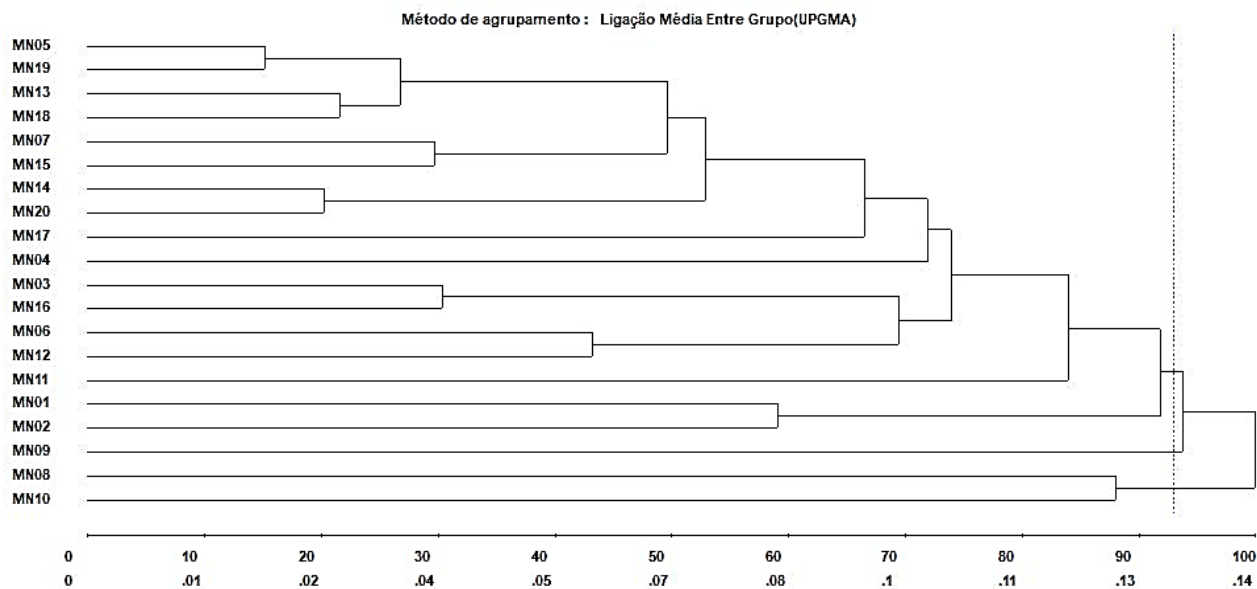


Figura 02. Dendrograma de dissimilaridade genética entre os 20 indivíduos de cupuí, obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade. CCC: 0,7.

Tabela 03. Agrupamento pelo método de Tocher, baseado na matriz de dissimilaridade de Jaccard, a partir da análise molecular por meio dos marcadores ISSR dos 20 indivíduos de cupuí.

Grupos	Indivíduos
1	MN05, MN19, MN18, MN13, MN15, MN07 MN14, MN20, MN06, MN03
2	MN12, MN16
3	MN01, MN02
4	MN11, MN17
5	MN04
6	MN09
7	MN10
8	MN08

Comparando os dois métodos de agrupamento utilizados, observa-se uma concordância considerável entre eles, apesar do número de grupo formados divergirem, sendo oito grupos no método de Tocher e três grupos no UPGMA, em ambos, os indivíduos MN05, MN19, MN18, MN13, MN15, MN07 MN14, MN20, MN06 e MN03 fazem parte de um mesmo grupo, e o MN09 está em um grupo sozinho nos dois métodos. Outros trabalhos com espécies arbóreas relatam a coincidência na formação destes agrupamentos (Oliveira et al., 2014; Ramalho et al., 2016; Rocha et al., 2017).

A concordância entre os dois métodos na distinção dos agrupamentos genotípicos fornecem bases para inferências mais seguras sobre a diversidade genética entre os indivíduos avaliados. O uso de mais de um método de agrupamento, dadas as diferenças de hierarquização, otimização e ordenação de grupos, permite que suas classificações sejam complementares, em função do critérios que cada método utiliza, impedindo inferências errôneas de serem adotadas na alocação de materiais dentro de um determinado grupo de genótipos (Arriel et al., 2006).

O presente estudo revelou que há variabilidade genética considerável nos indivíduos naturais do cupuí. Essa diversidade dos genes pode estar relacionada ao tipo de reprodução ou aos tipos de polinizadores e dispersores da espécie, de modo que a realização de mais estudos sobre a espécie são necessários para obtenção de resultados mais conclusivos. Entretanto, fica evidente que o cupuí apresenta genes e genótipos disponíveis para o melhoramento genético de outras espécies do gênero *Theobroma*, principalmente para espécies com grande potencial de comercialização como é o caso do cacau e cupuaçu.

Conclusões

Por meio da análise molecular verificou-se a ocorrência de diversidade genética entre os vinte genótipos de cupuí estudados por meio da técnica de marcadores do tipo ISSR. Os resultados indicam, portanto, que a técnica ISSR é eficaz para identificar a diversidade genética em populações naturais de cupuízeiro. Os dois métodos de agrupamento (UPGMA e Tocher) revelaram que

os indivíduos MN08, MN09 e MN10 são os mais divergentes e, portanto, os mais indicados para programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, à SEDUC/MT e à UNEMAT.

Referências

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

ARENAS-DE-SOUZA, M.D., ROSSI, A.A.B., VARELLA, T.L., DA SILVEIRA, G.F., SOUZA, S.A.M. Stigmatic receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: Fruit species from the amazon region. Revista Brasileira de Fruticultura, 38 (4): 757, 2015.

ARRIEL, N.H.C. et al. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41 (5): 801-809, 2006.

BORÉM, A., CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. 3. ed. Viçosa: UFV. 385p. 2016.

CHARTERS, Y.M., WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. Theoretical and Applied Genetics, 100 (1): 160-166, 2000.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum, 35 (3): 271-276, 2013.

DE OLIVEIRA, H.O. et al. Otimização das temperaturas de anelamento de marcadores microssatélites *Theobroma grandiflorum* para caracterização de resistência à *Moniliophthora perniciosa*. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA.2014, Cuiabá. Anais eletrônicos... Cuiabá: Sociedade Brasileira de

- Fruticultura. 2014. Genetics and Molecular Research, 16 (3): <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108548/1/TRA3599.pdf> gmr16039706, 2017.
- DO NASCIMENTO, W.M.O., DE CARVALHO, J.E.U. Sensibilidade de sementes de Cupuí (*Theobroma subincanum*) à redução do grau de umidade e a exposição à baixa temperatura. Revista Brasileira de Fruticultura 34 (3): 915-920, 2012.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19 (1): 11-15, 1987.
- FALEIRO, F.G. et al. Otimização de extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. Agrotrópica, 14 (2): 31-34, 2002.
- FLORA DO BRASIL. Flora do Brasil 2020 em construção. *Theobroma*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23623>
- GIUSTINA, L.D. et al. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex. Spreng (Malvaceae). Genetics and Molecular Research, 13 (2): 3510-3519, 2014.
- LIMA, E.N., DE ARAUJO, M.E.B., BERTINI, C.H.C.M., MOURA, C.F.H., HAWERROTH, M.C. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. Comunicata Scientiae, 6 (2): 174-180, 2015.
- MARIOT, A., MANTOVANI, A., BITTENCOURT, R., DOS REIS, M.S. Aspectos da biologia reprodutiva de *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) em Floresta Ombrófila Mista, Sul do Brasil. Ciência Florestal, 24 (4): 877-888, 2014.
- OLIVEIRA, T.C., GONÇALVES, D.L., ELIAS, J.C.F., CASTRO, M.S., BARELLI, A.A.A. Caracterização morfológica de acessos de cagaiteira na região de Cáceres - MT, Agrarian Academy, 1 (2): 26-36, 2014.
- RAMALHO, A.B. et al. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. Floresta, 46 (2): 207-214, 2016.
- RIVAS, L.H. et al. Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. Genetics and Molecular Research, 12 (4): 4998-5006, 2013.
- ROCHA, V.D. et al. Genetic diversity among *Hymenaea courbaril* L. genotypes naturally occurring in the north of Mato Grosso State, Brazil,