

ANÁLISE DE PATERNIDADE POR EXCLUSÃO EM *Theobroma cacao* L. COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Milton Macoto Yamada, Helaine Cancela Ramos, Uilson Vanderlei Lopes, Wilson Reis Monteiro, Reinaldo Figueiredo dos Santos, José Raimundo Pereira dos Santos.

CEPLAC/CEPEC, caixa postal 7, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil

O presente trabalho objetivou determinar a paternidade dentre os quatro possíveis pais, baseado em 20 plantas de uma população desconhecida. Foram usados os quatro possíveis pais mais sete clones como controle. O estudo foi realizado usando três primers de microssatélites no total de dez alelos. Os dados foram codificados pelo tamanho de fragmento e a análise utilizada foi de exclusão dos possíveis pais. Com esse método foi identificado o possível pai que originou a população.

Palavras-chave: Cacau, marcadores moleculares.

Paternity analysis by exclusion in *Theobroma cacao* L. based on microsatellites markers.

The objective of this work was to determine paternity within four possible parents, based on 20 plants of the populations. Four accessions were used with seven clones used as control. Three microsatellite primers were used in the total of ten alleles. The data were coded based on size of fragments and the method used was the exclusion of possible parents. It was possible to identify the possible parent that originated the population.

Key words: Cocoa, molecular markers.

Introdução

A análise de paternidade vem se tornando de grande importância no programa de melhoramento genético do cacauero do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) desde que se iniciaram as seleções de cacaueros resistentes a vassoura-de-bruxa (VB) em fazendas. Os estudos de diversidade e distâncias genéticas nem sempre estão relacionados com a origem dos clones. Para estudar com precisão a origem genética de um acesso ou de uma população, a análise de paternidade é essencial (Yamada e Lopes, 1999). Além disso, a análise de paternidade ou origem genética, é importante para a confirmação da autenticidade do cruzamento ou identificação de progênies contaminantes resultantes de polinizações.

O presente trabalho objetivou determinar a paternidade dentre quatro prováveis genitores, baseado em 20 plantas de uma população de origem desconhecida.

Materiais e Métodos

Material genético:

Para identificar a ancestralidade de uma dada população

de cacaueros constituída por 20 plantas derivadas do cruzamento entre TSA 644 (?) X CCN 51, foram utilizados os seguintes clones:

- TSA 644, SIC 864, ICS 1, SCA 6,P18, SCA 12,ICS 95 (usados como controle); e
- Duas plantas selecionadas dentro da progênie de TSA 644 auto (Planta 1, repetição 4 (R4-P1); e Planta 9, repetição 4 (R4-P9) e outras duas selecionadas na progênie de TSA 644 x Cepec 11 (Planta 11, repetição 3 (R3-P11); e planta 10, repetição3 (R3P10), todas consideradas como genitores candidatos.

Existia a suspeita de que as 20 plantas da referida população não descendessem diretamente do TSA 644, mas sim de um dos quatro genitores candidatos acima indicados.

Obtenção de marcadores microssatélites:

Folhas de cada acesso de *T. cacao* foram coletadas e armazenadas a -80 °C, até o momento da extração do DNA. O DNA genômico de cada acesso foi extraído utilizando o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações.

As reações de amplificação para microssatélites foram feitas em um volume total de 15 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 150 µM de

cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos dois “primers” (F e R), uma unidade da enzima Taq-polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, de acordo com o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 60 °C -1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 48 °C + 90 segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C. Após amplificação a temperatura das amostras foi reduzida a 4°C.

Os primers de microsatélites utilizados foram os desenvolvidos em CIRAD na França (CIRAD 24, CIRAD 30 e CIRAD 35).

Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida no seqüenciador ABI 377 utilizando primers marcados e analisados com os programas genescan e genotyper.

Os dados registrados por tamanho de fragmentos foram convertidos em informações alélicas, de modo que cada acesso apresentasse dois números iguais (homozigotos) ou diferentes (heterozigotos).

Resultados e Discussão

A análise de paternidade neste trabalho foi baseada na segregação das plantas da população, semelhante à técnica usada em rabanete (Ellstrand, 1984). Foram observados 3,3 e quatro alelos para CIRAD 30, 24 e 35, respectivamente (total de dez alelos). No caso do CIRAD 30 (Tabela 1 e Figura 1) sendo as 20 plantas todas homozigotas tendo o alelo 3, os pais só podem estar portando o alelo 3. Nesse caso foi excluído o TSA 644 (R4-P9) possuindo os alelos 1.1. Considerando o CIRAD 35, excluiu-se o TSA 644 (R3-P10), porque o fragmento 1 não aparece nas progênies. No caso do CIRAD 24, o R4-P1 foi excluído porque não aparece o alelo 2 nas progênies. Então o único progenitor poderia ser o TSA 644 (R3-P11), dentre os quatro que foram testados. O TSA 644 foi excluído porque observando o CIRAD 30 não apareceu nas progênies plantas com alelo 1 e no CIRAD 24 plantas com alelo 2.

Seriam necessários mais primers microsatélites em casos que a determinação é baseada em um único genótipo em vez de muitas plantas. No caso de se desconhecer o ancestral paterno e materno, como no de seleções de cacauzeiros resistentes à vassoura-de-bruxa realizadas nas fazendas, a dificuldade é maior. O estudo de paternidade em humanos é facilitado porque, normalmente o ancestral materno é conhecido. A determinação de paternidade em seleção nas fazendas é dificultada porque existe probabilidade de grande número de possíveis pais. No presente estudo, a dificuldade foi pequena porque, a dúvida existia entre os quatro possíveis pais, e mesmo não sabendo o ancestral materno ou paterno, o tipo de segregação, facilitou a determinação.

Tabela 1. Dados codificados de 3 primers microsatélites em 12 clones, sendo 8 controles e 4 possíveis pais e mais 20 plantas da população.

Clone e plantas	CIRAD 35	CIRAD 24	CIRAD 30
TSA 644	1. 3	1. 2	1. 3
SIC 864	4. 4	1. 1	3. 3
ICS 1	4. 4	1. 1	3. 3
SCA 6	3. 3	1. 2	1. 1
P18	3. 4	1. 3	1. 3
SCA 12	4. 4	1. 1	3. 3
ICS 95	2. 4	3. 3	2. 3
TSA 644 (R4-P1)	3. 4	1. 2	3. 3
TSA 644 (R4-P9)	3. 4	1. 2	1. 1
TSA 644 (R3-P11)	3. 4	1. 1	3. 3
TSA 644 (R3-P10)	1. 4	1. 1	3. 3
P1	4. 4		
P2	3. 4	1. 1	3. 3
P3	3. 4	1. 1	3. 3
P4	3. 4	1. 1	3. 3
P5	3. 4	1. 1	3. 3
P6	4. 4	1. 1	3. 3
P7	3. 4	1. 1	3. 3
P8	4. 4	1. 1	3. 3
P9	4. 4	1. 1	3. 3
P10	3. 4	1. 1	3. 3
P11	4. 4	1. 1	3. 3
P12	4. 4	1. 1	3. 3
P13	4. 4	1. 1	3. 3
P14	4. 4		3. 3
P15	3. 4	1. 1	3. 3
P16	4. 4	1. 1	3. 3
P17	3. 4	1. 1	3. 3
P18	3. 4	1. 1	3. 3
P19	3. 4	1. 1	3. 3
P20	4. 4	1. 1	3. 3

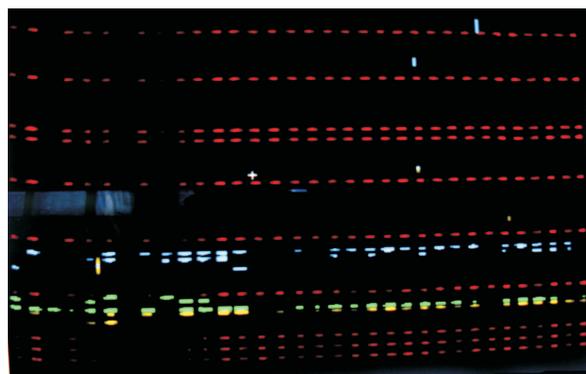


Figura 1. Imagem do gel de microsatélites CIRAD 24, CIRAD 30 e CIRAD 35 de 11 clones e 20 plantas da população.

Literatura Citada

- DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- ELLSTRAND, N. C. 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *Amer. Nat.* 123:819-829.
- YAMADA, M. M. and LOPES, U. V. 1999. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom disease in plantations. *Agrotrópica (Brasil)* 11(2): 83-88. ●

AGRADECIMENTOS AOS CONSULTORES CIENTÍFICOS

Em 2008, a Comissão de Editoração do CEPEC contou com a colaboração de especialistas, pertencentes ou não ao quadro da CEPLAC, que, como consultores científicos, revisaram os trabalhos recebidos para publicação, contribuindo, dessa maneira, para melhorar o seu conteúdo e apresentação.

A todos eles, essa Comissão expressa os seus mais sinceros agradecimentos, esperando continuar recebendo deles a sua valiosa colaboração.

- Antônio Fontes de F. Filho (1) CEPLAC/CEPEC
- Caio Marcio V. C. de Almeida (1) CEPLAC/SUPOC
- Edson Lopes Lima (2) CEPLAC/SUPOR
- Fábio Gelape Faleiro (1) EMBRAPA CERRADOS
- Fernando Antonio Teixeira Mendes (1) CEPLAC/SUPOR
- George Andrade Sodré (2) CEPLAC/CEPEC
- João Rodrigues de Paiva (1) EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL
- Jomar Paes Pereira (1) EMBRAPA/IAPAR
- José Marques Pereira (1) CEPLAC/CEPEC
- José Raimundo Bonadie Marques (1) CEPLAC/CEPEC
- Kazuiyuki Nakayama (1) CEPLAC/CEPEC
- Luis Antônio dos Santos Dias (1) UFV - Viçosa - MG
- Luis Teixeira (1) IAC - Campinas - SP
- Luiza Nakayama (2) CEPLAC/SUPOR
- Manoel Xavier dos Santos (1) EMBRAPA MILHO E SORGO
- Messias Gonzaga Pereira (2) UENF/ CCTA/ RJ
- Milton Macoto Yamada (1) CEPLAC/CEPEC
- Valduino Estefanel (1) Universidade Federal de Santa Maria - RS

*Os números entre parênteses, após os consultores, indicam o número de trabalhos revisados.