



MAPEAMENTO DO CUPUAÇUZEIRO – FASE INICIAL DE GENOTIPAGEM

Resumo: O programa de melhoramento do cupuaçuzeiro visando obtenção de plantas resistentes a *Moniliophthora perniciosa* exige informações detalhadas sobre o tipo de herança e a localização de genes de resistência no genoma. O presente estudo teve como objetivo detectar *locus* controladores de características quantitativas (QTLs) ligados à resistência à vassoura-de-bruxa em uma progênie obtida do cruzamento entre pais com resistência contrastante. Os estudos foram conduzidos na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, empregando os DNAs extraídos do tecido foliar de 202 indivíduos obtidos a partir de polinizações controladas entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível). Após a extração, foi realizado um teste com 23 primers microssatélites os quais demonstraram ótima amplificação e polimorfismo. Foi obtido um total de 48 alelos, com média de 2.087 alelos/loco, sendo três o máximo de alelos por loco. O fingerprint de cada indivíduo será utilizado para a elaboração dos mapas de ligação.

Palavras-chave: árvore frutífera, diversidade, heterozigosidade, *Theobroma grandiflorum*,

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum) é uma árvore frutífera, que pertence à família Malvaceae, típica da região Norte do Brasil. Sua polpa tem bom valor nutricional, e das sementes pode ser extraído óleo para emprego na indústria de cosméticos.

O aumento das áreas cultivadas foi acompanhado pelo incremento dos condicionantes fitopatológicos, especialmente doenças causadas por fungos. Destas doenças, destaca-se o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa, considerada a doença mais prejudicial do cupuaçuzeiro (Alves, 2002).

Muitas ferramentas genéticas vêm sendo desenvolvidas ao longo do tempo para auxiliar os pesquisadores em seus estudos, uma delas é o aprimoramento do uso de marcadores moleculares, que consistem em revelar polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados, podendo ainda identificar QTLs (Quantitative Trait Loci) associados à resistência a patógenos e outras características de interesse (Araújo, et al., 2009).



A determinação de *loci* controladores de características quantitativas (QTLs) associada ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Este trabalho teve por objetivo a determinação de QTLs ligados à resistência à *M. pernicioso*, a partir da genotipagem de uma progênie de cupuaçuzeiro contrastante quanto à resistência à vassoura-de-bruxa, dando sequência ao trabalho iniciado por Kempler et al., (2011).

Material e Métodos

Para este trabalho, utilizou-se uma progênie de cupuaçuzeiro obtida por meio de uma polinização controlada entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível) realizada em uma área experimental da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – Pará.

A determinação genotípica foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental - Belém, Pará. A extração do DNA das plantas foi realizada a partir de folhas jovens e sadias, seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações.

A qualidade dos DNA's foi avaliada em gel de agarose a 0,8% e utilizando-se do corante brometo de etídio. A determinação da concentração da solução de DNA foi realizada através do método de fluorometria (DyNA Quant 2000, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). As amostras de DNA obtidas foram diluídas para a concentração final de 5 ng/μl (solução de trabalho) e posteriormente armazenadas a 20°C negativos. As reações de PCR foram elaboradas com volume final de 13 μl, contendo 15 ng de DNA genômico, 100 μM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 0,2 μM de cada primer (*forward* e *reverse*); tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % Triton X – 100; 1,5 mM MgCl₂), 1 unidade de Taq DNA polimerase (NeoTaq DNA Polymerase Kit). As amplificações foram realizadas em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) fazendo a utilização de programas do tipo touch down, de acordo com a temperatura de anelamento de cada primer. O programa de seleção para primers que anelam a 51 °C é constituído da etapa inicial de desnaturação a 94 °C durante 4 min, uma etapa de anelamento a 65 °C por 40 s, seguido por 10 ciclos touch down decrescendo 10 °C por ciclo até 55 °C, a partir da qual seguiram-se 30 ciclos a 55 °C por 40 s. O programa para primers que anelam a 46 °C, difere apenas na etapa de touch down, que decresce de 55 °C para 45 °C.



Para o seguinte estudo, foram analisados 34 primers específicos de cupuaçuzeiro. Destes, 23 primers foram utilizados para a genotipagem de 202 indivíduos (Tabela 1). A genotipagem amplificada foi analisada em gel de poliacrilamida à 7%, em cuba vertical de eletroforese e corado em uma solução de nitrato de prata durante 20 minutos.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a genotipagem de uma progênie com 202 indivíduos de cupuaçuzeiro, obtidos do cruzamento contrastante para resistência a *M. pernicioso* entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível).

Tabela 1: Genotipagem de uma progênie com 202 indivíduos de cupuaçuzeiro, obtidos do cruzamento contrastante para resistência a *M. pernicioso* entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível), onde foram utilizados 23 locus de cupuaçuzeiro. *A*: número total de alelos nos locos; *Ae*: número efetivo de alelos nos locos; *Alelos estimados*: peso molecular dos alelos; *He*: heterozigiosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho*: heterozigiosidade observada; *F*: índice de fixação.

Locus	A	Alelos Estimados	Ho	He	F
mTgM09	2	174 e 169	0.585000	0.414925	-0.411348
mTgM11	3	233, 218 e 213	0.474747	0.600064	0.209258
mTgM13	2	220 e 208	0.562189	0.405169	-0.388889
mTgM17	2	220 e 212	0.465347	0.357959	-0.300971
mTgM20	2	203 e 200	0.515000	0.383346	-0.344595
mTgM21	2	250 e 225	0.990099	0.501241	-0.980100
mTgM30	3	185, 180 e 177	0.710000	0.612895	-0.158898
mTgM31	2	158 e 150	0.504950	0.378400	-0.335548
mTgM39	2	171 e 169	0.473404	0.362312	-0.307692
mTgM43	3	169, 161 e 148	0.756219	0.622685	-0.215101
mTgM44	2	190 e 180	0.990099	0.501241	-0.980100
mTgM47	3	303, 195 e 190	0.767327	0.630113	-0.218420
mTgM48	2	155 e 140	0.460396	0.355293	-0.296774
mTgM54	2	138 e 135	0.554455	0.401739	-0.381443
mTgM62	2	209 e 178	0.425743	0.335946	-0.268139
mTgM64	2	110 e 108	1.000000	0.501241	-1.000000
mTgM65	2	240 e 220	0.580000	0.412832	-0.406360
mTgM70	1	110	0.000000	0.000000	0.000000
mTgM71	1	140	0.000000	0.000000	0.000000
mTgM72	2	145 e 140	0.455621	0.352870	-0.292308
mTgM76	2	220 e 200	0.440594	0.344385	-0.280255
mTgM77	2	125 e 120	0.492462	0.497601	0.010353
mTgM90	2	120 e 115	0.990099	0.501241	-0.980100
Média	2,087		0.573641	0.411891	-0.362062



Os primers utilizados na genotipagem apresentaram boa amplificação e polimorfismo para os 202 indivíduos (Tabela 1). Foi obtido um total de 48 alelos, com média de 2.087 alelos/loco, sendo que o máximo foi de 3 alelos por loco. Em todos os locos a heteroziguidade observada foi sempre maior do que a esperada, bem como, o índice de fixação (F) foi baixo, indicando um déficit de homozigose, devido a uma possível seleção contra homozigotos na progênie.

Dos locos avaliados apenas os locos mTgM_70 e mTgM_71 não apresentaram heteroziguidade, assim como índice de fixação (F), logo deverão ser descartados por não serem interessantes para mapas genéticos. Os locos que apresentaram maior heteroziguidade observada (H_o), foram os primers específicos de cupuaçuzeiro mTgM_21, mTgM_44, mTgM_64 e mTgM 90.

Conclusão

A heteroziguidade observada foi sempre maior do que a esperada em decorrência, provavelmente, da seleção contra homozigotos numa espécie essencialmente alógama.

Os locos mTgM_21, mTgM_44, mTgM_64 e mTgM 90 apresentaram maior heteroziguidade observada.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração da assistente de laboratório da Embrapa Amazônia Oriental, Auriane Consolação da Silva Gonçalves pelo desempenho na coleta dos dados laboratoriais.

Referências Bibliográficas

ALVES, R. M. **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE CUPUAÇUZEIRO, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., POR MARCADORES MICROSSATÉLITES E DESCRITORES BOTÂNICO-AGRONÔMICOS.** Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde.../rafael.pdf> Acessado em: Julho de 2012.

ARAÚJO I. S.; SOUZA FILHO, G. A.; PEREIRA, M. G.; FALEIRO, F. G.; DE QUEIROZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E.G.; MACHADO, R. C. R.; PIRES, J. L.; SCHENELL, R.; LOPES, U. V.; Mapping of Quantitative Trait Loci for Butter Content and Hardness in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.). **Plant Mol Biol Rep.** n.27 p.177–183, 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Documento. Embrapa – Cenargen, Brasília. 220p. 1998.



KEMPNER, T.; ALVES, R.M.; ALBUGUERQUE, P.S.B.; OLIVEIRA, H.O. GENOTIPAGEM DE PLANTAS DE CUPUAÇUZEIRO, OBTIDAS DE UMA POPULAÇÃO CONTRASTANTE PARA RESISTÊNCIA A *Moniliophthora perniciosa*, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE QRL'S.

Disponível em:<

<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/899673/1/13Resumo2011TamiresQRLsRafael.pdf> >.

Acessado em: Julho de 2012