

31 Dessa forma, o objetivo do trabalho foi identificar QTL's relacionados a
32 resistência do cupuaçuzeiro à *M. perniciosa*, através da genotipagem de uma progênie
33 contrastante entre os clones 174 (susceptível) x 1074 (resistente).

34

35

MATERIAL E MÉTODOS

36

Foi empregado uma progênie de cupuaçuzeiro, com 147 indivíduos, obtidos por
37 meio de polinização controlada entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível), na
38 base experimental da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – Pará.

39

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido foliar no Laboratório de Genética
40 da Embrapa Amazônia Oriental, utilizando-se o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990)
41 com algumas modificações (Figueira et al., 2003). A qualidade do DNA foi avaliado
42 em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e a concentração determinada por
43 fluorometria (DyNA Quant 2000, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). As
44 amostras foram ajustadas para a concentração de 5ng DNA/ μ l.

45

Empregou-se 29 primers heterólogos desenvolvidos para *Theobroma*
46 *grandiflorum*, onde foram feitas as reações de PCR com volume final de 13 μ l,
47 contendo 15 ng de DNA genômico, 100 μ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP,
48 dGTP); 0,2 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*); tampão da enzima (50 mM KCl; 10
49 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % Triton X – 100; 1,5 mM MgCl₂), 1 unidade de Taq DNA
50 polimerase (NeoTaq DNA Polymerase Kit). Esses tubos foram submetidos a um
51 programa de amplificação em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied
52 Biosystems, Foster City, EUA), programados, inicialmente, conforme Lanaud et al.
53 (1999a): um ciclo de desnaturação à 94°C por quatro minutos, seguido de 30 ciclos de
54 94°C por 30s, 49°C ou 55°C por 60s e 72°C por 60s. Foram testados posteriormente
55 outras temperaturas de anelamento para melhorar a resolução de fragmentos
56 amplificados. O marcador 10 Kb Plus DNA ladder foi utilizado como referência de peso
57 molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação (Alves, 2007).

58

Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida a 7%. A
59 coloração foi em solução de nitrato de prata(Creste et al., 2001) e a genotipagem através
60 da leitura direta das bandas no gel em um transiluminador.

61

A diversidade genética foi analisada pelo número total de alelos no loco (A),
62 Heterozigosidade Esperada (He), Heterozigosidade Observada (Ho), Equilíbrio de
63 Hard-Weinberg (HW), presença ou não de polimorfismo, utilizando o programa
64 GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012).

65

RESULTADOS E DISCUSSÃO

66 Os 16 primers utilizados na genotipagem dos 147 indivíduos, demonstraram boa
67 amplificação . (Tabela 1).

68

69 Tabela 1 Parâmetros de diversidade genética de uma população contrastante de *T. grandiflorum*, onde *A*:
70 número total de alelos nos locos; *Ae*: número efetivo de alelos nos locos; *Alelos estimados*: peso
71 molecular dos alelos; *He*: heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho*:
72 heterozigosidade observada; ; HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o *P* a presença ou não de
73 polimorfismo.

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Alelos Estimados</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>HW</i>	<i>P</i>
mTgM 9	2	174 e 169	0,555	0,401	***	*
mTgM 11	3	233, 218 e 213	0,503	0,595	***	*
mTgM 13	2	208 e 220	0,582	0,413	***	*
mTgM 17	2	220 e 212	0,449	0,348	***	*
mTgM 20	2	203 e 200	0,429	0,337	***	*
mTgM 21	2	250 e 225	0,986	0,500	***	*
mTgM 30	3	180 e 177	0,733	0,628	***	*
mTgM 31	2	158 e 150	0,497	0,373	***	*
mTgM 39	2	171 e 169	0,517	0,383	***	*
mTgM 43	3	169, 161 e 148	0,803	0,637	***	*
mTgM 44	2	190 e 180	0,986	0,500	***	*
mTgM 47	3	303, 195 e 190	0,748	0,621	***	*
mTgM 48	2	155 e 140	0,469	0,359	***	*
mTgM 54	2	138 e 135	0,531	0,390	***	*
mTgM 62	2	209 e 178	0,456	0,352	***	*
mTgM 64	2	110 e 108	1,000	0,500	***	*
mTgM 65	2	240 e 220	0,565	0,405	***	*
mTgM 70	1	110	0,000	0,000	-	0
mTgM 71	1	140	0,000	0,000	-	0
mTgM 72	2	145 e 140	0,463	0,356	***	*
mTgM 76	2	200 e 220	0,449	0,348	***	*
mTgM 77	2	125 e 120	0,425	0,500	NS	*
mTgM 88	2	110 e 100	0,542	0,500	NS	*
mTgM 89	2	130 e 120	0,500	0,375	***	*
mTgM 90	2	120 e 115	0,986	0,500	***	*
mTgM 102	2	120 e 119	0,507	0,497	NS	*
mTgM 108	2	97 e 83	0,500	0,488	NS	*
mTgM 113	2	110 e 105	0,476	0,499	NS	*
mTgM114	2	140 e 135	0,441	0,344	***	*
Média	2,06	-	0,555	0,419		

74 NS = não significante, ** = significante para o nível de 5% , *** = significante para o nível de 0.1%. Os
75 níveis de significancia incluem a correção de Bonferroni.; *Presença de Polimorfismo; 0: ausência de
76 polimorfismo.

77

78 Foi obtido um total de 60 alelos, com média de 2,06 alelos/loco, sendo que o
79 máximo foi 3 alelos/loco. A heterozigosidade observada, em sua maioria, foi maior do que a
80 esperada, com exceção dos locos mTgM_11, mTgM_54, mTgM_77 e mTgM_113,
81 apresentando nesses indivíduos um maior nível de homozigose. Assim, as amostras em

82 geral apresentaram déficit no nível de homozigose, possivelmente devido a uma seleção
83 contrária a formação de homozigotos na progênie.

84 Dos 16 *primers* avaliados os locos mTgM_77, mTgM_88, mTgM_102,
85 mTgM_108 e mTgM_113 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e deverão ser
86 descartados por não serem interessantes para mapas genéticos.

87 Todos os primers apresentaram boa amplificação e polimorfismo, exceto os
88 mTgM_70 e mTgM_71, com apenas 1 alelo/loco. Os heterólogos mTgM_11, mTgM_30,
89 mTgM_43 e mTgM_47 obtiveram destaque por apresentar 3 alelos/loco.

90 De um modo geral, em decorrência dessa população ser constituída por uma
91 progênie de irmãos completos, os locos analisados apresentam um baixo conteúdo de
92 informação polimórfica, sendo esperado um máximo de 2 alelos/loco.

93 Os marcadores monomórficos poderão se tornar eficientes no estudo de outras
94 populações. O fingerprint de cada indivíduo será utilizado para a elaboração dos mapas de
95 ligação.

96

97

CONCLUSÃO

98 a) Primers microssatélites heterólogos podem auxiliar a identificação de QTL's
99 relacionados a resistência do cupuaçuzeiro à *M. perniciosa*.

100 b) A maioria dos locos pesquisados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg;

101 c) A heterozigosidade observada em geral foi maior do que a esperada em decorrência,
102 provavelmente, da seleção contra homozigotos numa espécie essencialmente
103 alógama.

104

105

REFERÊNCIAS

106 ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma***
107 ***grandiflorum* (Willd.ex.Spreng.) Shum., por marcadores microssatélites e**
108 **descritores botânicos-agronômicos.** Piracicaba, 2003, 146f. Tese (Doutorado) –
109 Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba,
110 2003.

111 FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores**
112 **moleculares em análise genética.** 3ª ed. Documento. Embrapa – Cenargen, Brasília,
113 n.20, 220p., 1998.

114 FIGUEIRA, A. V. O.; CASCARDO, J. C. M. Marcadores moleculares no
115 melhoramento. In: DIAS, L.A.S. (Ed.). Melhoramento genético do cacauzeiro. Viçosa:
116 FUNAPE, UFG, 2001. p. 385-438

117 MORGANTE, M.; OLIVEIRI, A. M. PCR- amplified microssatélites as markers in
118 plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.