



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

**GENOTIPAGEM DE PLANTAS DE CUPUAÇUZEIRO, OBTIDAS DE UMA POPULAÇÃO
CONTRASTANTE PARA RESISTÊNCIA A *Moniliophthora perniciosa*, PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE QRL'S**

Tamiris Kempner¹, Rafael Moysés Alves², Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque³ Hellen Oliveira
de Oliveira⁴

¹ Acadêmica do 9^o semestre do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista do PIBIC; e-mail: tamireskempner@yahoo.com.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental; Trav.Eneás Pinheiro S/N; CEP 66095-100, Belém-PA; e-mail: rafael@cpatu.embrapa.br

³ Pesquisador da CEPLAC-ERJOH, BR 316 Km 17, CP 46, Marituba, PA, CEP 67105-970. E-mail: psbalbuq@oi.com.br

⁴ Acadêmica do 3^o semestre do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da EMBRAPA; e-mail: hellenoliveira17@gmail.com

Resumo: O mapeamento molecular visando à identificação de locos quantitativos associados à resistência a patógenos é uma ferramenta que poderá ser muito útil ao programa de melhoramento do cupuaçuzeiro. O objetivo desta pesquisa foi realizar a primeira etapa para identificar *locus* controladores de resistência à vassoura de bruxa, efetuando a genotipagem de uma família cujos pais apresentavam resistência contrastante àquela enfermidade. Para a obtenção da progênie foram realizadas polinizações controladas entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível). Obtida a família com 200 indivíduos, foi feita a extração do DNA de tecido foliar, e o teste dos primers. Foram testados 31 primers microssatélites de cacau e 42 de cupuaçuzeiro. Dos quais foram selecionados 16 primers, sendo 10 de cacau e 6 cupuaçuzeiro, que demonstraram boa amplificação e polimorfismo. Foi obtido um total de 36 alelos, com média de 2,25 alelos/loco, sendo 3 o máximo de alelos por loco. O fingerprint de cada indivíduo será utilizado para a elaboração dos mapas de ligação.

Palavras-chave: mapa de ligação, variabilidade, *Theobroma grandiflorum*.

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum), fruteira nativa da região amazônica, tem sua polpa empregada para diferentes fins, tanto comestível quanto cosméticos (LIMA & SOUZA, 2008). Porém, a expansão das áreas cultivadas, devido ao aumento da demanda, tem aumentado os problemas com doenças, principalmente o fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da vassoura-de-bruxa que é considerada a principal doença da cultura.



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

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). No caso do patossistema cacaueiro x *M. pernicioso*, QRLs (*loci* quantitativos de resistência), foram localizados nos grupos de ligações I e IX de uma população F2 do cruzamento entre os clones ‘SCA 6’ e ‘ICS 1’ (QUEIROZ et al., 2003 e BROWN et al. 2005). No entanto, a resistência do parental ‘SCA 6’, tem sido sistematicamente “quebrada” pelo *M. pernicioso* em Países como Equador, Peru e região norte do Brasil (BARTLEY, 1981 e RIOS-RUIZ, 2001).

Este trabalho teve por objetivo realizar a genotipagem de uma progênie de cupuaçuzeiro contrastante quanto à resistência a vassoura-de-bruxa, para a determinação de QRL’s ligados a resistência a *M. pernicioso*.

Material e Métodos

Foi empregada uma progênie de cupuaçuzeiro obtida através de polinização controlada entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível), realizada em uma quadra experimental da Base Física da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – Pará.

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Ceplac – Marituba, Pará, e no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, conforme metodologia abaixo.

A extração do DNA das plantas foi realizada a partir de folhas jovens e saudáveis, seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações.

A qualidade do DNA das amostras foi avaliada em gel de 0,8% agarose, corado com brometo de etídio. A concentração da solução de DNA foi determinada por fluorometria (DyNA Quant 2000, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). As amostras de trabalho tiveram suas concentrações ajustadas para 5 ng DNA/ μ l e foram conservadas a 20 °C negativos.

As reações de PCR foram preparadas com volume final de 13 μ l, contendo 15 ng de DNA genômico, 100 μ M de cada dNTP; 0,2 μ M de cada primer; 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. As amplificações foram realizadas em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) utilizando programas do tipo touch down, conforme temperatura de anelamento de cada primer. O programa para primers que anelam a 51 °C, constituiu-se 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



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

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.

Foram testados 31 primers de microssatélites heterólogos de cacauzeiro e 42 primers específicos de cupuaçuzeiro. Destes, 16 primers foram empregados na genotipagem dos 200 indivíduos (Tabela 1), os quais foram analisados em gel de poliacrilamida à 7%, em cuba vertical de eletroforese e corados com prata.

Resultados e Discussão

Os 16 primers utilizados na genotipagem dos 200 indivíduos, demonstraram boa amplificação e polimorfismo. (Tabela 1).

Tabela 1 Genotipagem de uma progênie com 200 indivíduos de cupuaçuzeiro, obtidos do cruzamento contrastante para resistência a *M. perniciosa* entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível), onde foram analisados 10 locos heterólogos de cacauzeiro e 6 específicos para cupuaçuzeiro. *A* é o número total de alelos nos locos; *A_e* é o número efetivo de alelos nos locos; *Alelos estimados* é o peso molecular dos alelos; *He* é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho* é a heterozigosidade observada; *F* é o índice de fixação; *PIC* é o conteúdo de informação polimórfica; *I* é o índice de shannon; HW é o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locus	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>Alelos estimados</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>PIC</i>	<i>I</i>	HW
mTcCIR_12	2	1.659	190 e 194	0.549	0.398	-0.374	0,318	0.587	***
mTcCIR_17	2	1.511	280 e 270	0.431	0.339	-0.272	0,281	0.521	**
mTcCIR_25	2	1.995	135 e 138	0.508	0.501	-0.015	0,374	0.692	NS
mTcCIR_26	3	2.627	265, 270 e 280	0.751	0.621	-0.211	0,549	1.032	***
mTcCIR_57	2	1.641	260 e 270	0.532	0.392	-0.360	0,314	0.579	***
mTcCIR_75	3	2.648	110, 117 e 120	0.783	0.624	-0.256	0,552	1.036	***
mTcCIR_134	2	1.559	240 e 220	0.468	0.359	-0.303	0,294	0.544	***
mTcCIR_135	2	1.722	260 e 267	0.598	0.420	-0.424	0,331	0.610	***
mTcCIR_162	3	2.638	188, 185 e 180	0.763	0.622	-0.227	0,551	1.034	***
mTcCIR_276	2	1.613	120 e 118	0.511	0.381	-0.340	0,308	0.568	***
mTgM_13	2	1.684	208 e 220	0.567	0.407	-0.394	0,324	0.596	***
mTgM_17	2	1.544	212 e 220	0.457	0.353	-0.294	0,290	0.537	***
mTgM_20	2	1.619	203 e 200	0.515	0.383	-0.345	0,309	0.570	***
mTgM_30	3	2.564	177, 180 e 185	0.710	0.612	-0.161	0,542	1.019	***
mTgM_31	2	1.606	158 e 150	0.505	0.378	-0.336	0,306	0.565	***
mTgM_39	2	1.563	169 e 171	0.471	0.361	-0.306	0,295	0.546	***
Média	2,25	1,887	-	0.570	0.447	-0.289	0.371	0.68975	-

NS = não significativa, ** = significativa para o nível de 1% , *** = significativa para o nível de 0.1%. Os níveis de significância incluem a correção de Bonferroni.

Foi obtido um total de 36 alelos, com média de 2,25 alelos/loco, sendo que o máximo foi 3 alelos por loco. Em todos os locos a heterozigosidade observada foi sempre maior do que a esperada,



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

assim como o índice de fixação (F) foi baixo, indicando um déficit de homozigose, devido a uma possível seleção contra homozigotos na progênie. Dos 16 locos avaliados apenas o loco mTcCIR_25 não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e deverá ser descartado pois não é interessante para mapas genéticos. Os locos que apresentaram maior heterozigosidade observada (H_o), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e índice de Shannon (I), foram os heterólogos de cacauero, mTcCIR_75, mTcCIR_162 e mTcCIR_26 e o específico de cupuaçuzeiro mTgM_30.

Os resultados indicaram que além dos primers de microssatélites específicos para cupuaçuzeiro, os primers de cacauero também podem ser empregados na genotipagem do cupuaçuzeiro, conforme já tinha sido reportado por Alves et al (2005).

De modo geral, os locos analisados apresentaram um baixo conteúdo de informação polimórfica (PIC), com valores variando de 0,281 para o loco mTcCIR_25 e 0,552 para o loco mTcCIR_75. Isto decorre da população ser constituída por uma progênie de irmãos completos. O fingerprint de cada individuo será utilizado para a elaboração dos mapas de ligação.

Conclusões

- a) Foi confirmada a assertiva de que primers microssatélites heterólogos de cacauero podem amplificar DNA de cupuaçuzeiro;
- b) A maioria dos locos pesquisados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- c) A heterozigosidade observada foi sempre maior do que a esperada em decorrência, provavelmente, da seleção contra homozigotos numa espécie essencialmente alógama.

Referências Bibliográficas

- BARTLEY, B.G.D. **Status of genetic resistance in cacao to *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer**. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 6., 1981, Cartagena. Proceedings... Lagos: Cocoa Producers`Alliance, 1981, p.56-69.
- BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C.; LOPES, U.; KUHN, D.N.; BORRONE, J.W. Resistance gene mapping for witches`broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v.130, n.3, p.366-373, May 2005.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Documento. Embrapa – Cenargen, Brasília, n.20, 220p., 1998.



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

LIMA, M.I.P.M.; SOUZA, A.G.C. **Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex spreng.) Schum.) e seu controle.** Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 18 p.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. **Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease.** Plant Breeding, Berlin, v.122, n.3, p.268-272, june 2003.

RIOS-RUIZ, R.A. **Melhoramento para resistência a doenças.** In: DIAS, L.A.S. (Ed.). Melhoramento genético do cacauzeiro. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. cap.7, p.290-324.