



17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

AVALIAÇÃO DE UMA PROGÊNIE DE CUPUAÇUZEIRO PARA FINS DE MAPEAMENTO GENÉTICO

Hellen Oliveira de Oliveira¹, Rafael Moysés Alves², Carolina Ramos dos Santos³
Gleyce Kelly de Sousa Ramos¹

¹Graduandos de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental; e-mail: hellenoliveira17@gmail.com; gleyceramos17@yahoo.com.br

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

³Graduanda de Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, email: carolina.santos@icb.ufpa.br

RESUMO: O objetivo do trabalho foi dar continuidade à pesquisa para detectar *loci* controladores de características quantitativas (QTLs) ligados à resistência à vassoura-de-bruxa em uma progênie obtida do cruzamento entre pais com resistência contrastante. Os marcadores genéticos utilizados foram primers microssatélites desenvolvidos para o cupuaçuzeiro. O experimento foi realizado no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, empregando o DNA extraído de tecido foliar sadio de 200 plantas de uma progênie obtida a partir de cruzamentos controlados entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível). Após a extração, foi realizado um teste com 27 *primers* microssatélites os quais demonstraram ótima amplificação e polimorfismo. Foi obtido um total de 55 alelos, com média de 2,037 alelos/loco, sendo três o máximo de alelos por loco. O *fingerprint* de cada indivíduo será utilizado para a elaboração dos mapas de ligação.

INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum) é uma fruteira da região amazônica pertencente à família Malvaceae. O cultivo da espécie representa grande potencial econômico, devido à utilização de sua polpa para fins domésticos e agroindustriais (Souza, et al. 1992). Além disso, o cultivo da espécie é comprometido pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa, principal doença que compromete o cultivo.

Os marcadores microssatélites são ferramentas eficientes para a determinação de diversidade genética, com alta reprodutibilidade, confiabilidade e polimorfismo em termos de números de alelos, podendo ainda identificar QTLs (Quantitative Trait Loci)



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

associados à resistência a patógenos e outras características de interesse (Araújo, et al., 2009), além de identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O objetivo do presente trabalho foi dar continuidade a genotipagem de uma progênie de cupuaçuzeiro, para identificar marcas possivelmente ligadas às sequências responsáveis pela resistência genética dessa espécie ao *M. pernicioso*.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram avaliadas 200 plantas oriundas de uma progênie de cupuaçuzeiro obtida por meio de polinização controlada entre os clones 174 (resistente) e 1074 (susceptível). As polinizações foram realizadas na base experimental da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – Pará.

O DNA genômico dos 200 indivíduos foi extraído a partir de tecido foliar, utilizando-se o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro et al., 2003), no Laboratório de Genética da CEPLAC. A qualidade do DNA das amostras foi avaliada em gel de 0,8% de agarose corado com brometo de etídio e a concentração determinada por fluorometria (DyNA Quant 2000, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). As amostras foram ajustadas para a concentração de 5ng DNA/ μ l e conservadas a 4°C.

Foram empregados 27 *primers* SSR desenvolvidos para cupuaçuzeiro, utilizados para a genotipagem das 200 progênies. As reações de PCR foram elaboradas com volume final de 13 μ l, contendo 15 ng de DNA genômico, 100 μ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 0,2 μ M 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 55°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 40s. O programa para *primers* que anelam a 46°C, difere apenas na etapa de *touch*



17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

down, que decresce de 55°C para 46°C. 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 e avaliadas através da leitura direta das bandas no gel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a genotipagem com 200 indivíduos de cupuaçuzeiro, obtidos do cruzamento contrastante para resistência a *M. perniciosa* entre os clones 174 e 1074.

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 utilizados 27 locos de cupuaçuzeiro. A: número total de alelos nos locos; *Alelos estimados*: peso

Locus	A	Alelos Estimados	Polimorfismo
mTgM05	2	250 e 240	*
mTgM09	2	174 e 169	*
mTgM11	3	233, 218 e 213	*
mTgM13	2	220 e 208	*
mTgM17	2	220 e 212	*
mTgM20	2	203 e 200	*
mTgM21	2	250 e 225	*
mTgM30	3	185, 180 e 177	*
mTgM31	2	158 e 150	*
mTgM39	2	171 e 169	*
mTgM43	3	169, 161 e 148	*
mTgM44	2	190 e 180	*
mTgM47	3	303, 195 e 190	*
mTgM48	2	155 e 140	*
mTgM54	2	138 e 135	*
mTgM62	2	209 e 178	*
mTgM64	2	110 e 108	*
mTgM65	2	240 e 220	*
mTgM70	1	110	0
mTgM71	1	140	0
mTgM72	2	145 e 140	*
mTgM76	2	220 e 200	*
mTgM77	2	125 e 120	*
mTgM85	1	135	0
mTgM90	2	120 e 115	*
mTgM102	2	120 e 118	*
mTgM113	2	110 e 105	*

Média **2,037**
molecular dos alelos e Polimorfismo. Belém, Pará, 2013.



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

* Presença de polimorfismo; 0 Ausência de polimorfismo

Os *primers* utilizados na genotipagem apresentaram boa amplificação e polimorfismo para os 200 indivíduos (Tabela 1). Foi obtido um total de 55 alelos, com média de 2.037 alelos/locos, sendo que o máximo foi de 3 alelos por locos.

Dos locos avaliados apenas os locos mTgM_70, mTgM_71 e mTgM_85 não apresentaram polimorfismo, com apenas 1 alelo por locos, logo deverão ser descartados por não serem interessantes para mapas genéticos para essa população (eles podem ser polimórficos para outros cruzamentos). Todos os demais apresentaram bandas polimórficas, sendo que os *primers* mTgM_11, mTgM_30, mTgM_43 e mTgM_47 apresentaram 3 alelos por locos.

CONCLUSÃO

A população estudada apresenta alto polimorfismo necessário para o trabalho de mapeamento.

A genotipagem com *primers* microssatélites específicos de cupuaçuzeiro foi bastante eficiente com 88% de polimorfismo.

REFERENCIAS

ALVES, R, M. **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE CUPUAÇUZEIRO, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., POR MARCADORES MICROSSATÉLITES E DESCRITORES BOTÂNICO-AGRONÔMICOS.** Piracicaba, SP 2002. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde.../rafael.pdf> Acessado em: Junho de 2013.

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.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental.** Belém, 1999. 137p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documento, 16).



17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

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