

**OTIMIZAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE ANELAMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES *Theobroma grandiflorum* PARA CARACTERIZAÇÃO DE
RESISTÊNCIA À *Moniliophthora perniciosa***

HELLEN OLIVEIRA DE OLIVEIRA¹; RAFAEL MOYSÉS ALVES²; CAROLINA
RAMOS DOS SANTOS³; ILENILCE CASTRO DA SILVA⁴; ALAN EDIR NAHON⁵

INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) é uma enfermidade que compromete a produção comercial do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) na Amazônia. Na tentativa de reduzir a incidência de ataques da doença, programas de melhoramento genético dessa espécie têm sido conduzidos na Amazônia Oriental (Alves, 1999) e na Amazônia Ocidental (Souza et al., 2002) e, mais recentemente, em todos os estados da região Norte.

A variabilidade genética dessa espécie torna-se uma matéria-prima valiosa para ações de melhoramento em busca de genótipos mais adequados ao sistema intensivo de cultivo. Para isso, é necessário o desenvolvimento de trabalhos relativos à caracterização e avaliação para posterior seleção dos genótipos com caracteres de interesse.

Os marcadores moleculares permitem acessar a variabilidade diretamente em nível de DNA, sem influência do ambiente e não dependem da fase de desenvolvimento da planta. Por isso, os marcadores de DNA podem ser utilizados tanto em estudos de pré-melhoramento quanto na seleção assistida (Leite, et al., 2007).

Para amplificar uma ilha de microssatélite, utiliza-se um par de *primers*, que são sequências únicas de oligonucleotídeos, homólogos as regiões flangeadoras dos microssatélites. Assim é possível obter uma amplificação específica da região que contém a sequência repetida, e o polimorfismo entre bandas será decorrente dos números diferentes de elementos simples repetidos. Cada segmento diferente de DNA representa um alelo daquele loco específico (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O objetivo desse trabalho foi identificar a temperatura ótima para anelamento de cada primer microssatélite, desenvolvidos para trabalhos de biologia molecular com a espécie *Theobroma grandiflorum*, ligados a resistência à *M. perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram testadas diferentes temperaturas para anelamento de 30 pares de primers microssatélites específicos para o cupuaçuzeiro. Utilizou-se DNA genômico oriundo de amostras de uma progênie de irmãos completos, obtidos 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. Foram empregados 5 indivíduos para realização de cada teste.

O DNA dos indivíduos foi extraído a partir de tecido foliar, utilizando-se o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Figueira et al., 2003). A quantificação 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.

No laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, foram feitas as reações de PCR 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). Esses tubos foram submetidos a um programa de amplificação em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em gradiente. Partindo-se da temperatura padrão de 55°C utilizada para a maioria dos primers foram testadas seis temperaturas de anelamento: T1 = 49°C; T2 = 52°C; T3 = 55°C; T4 = 58°C; T5 = 61°C e T6 = 64°C, para cada primer. O marcador 10 Kb Plus DNA *ladder* foi utilizado como referência de peso molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação.

Após a amplificação, os produtos foram separados em gel de poliacrilamida 7% e corados em uma solução de nitrato de prata e avaliados através da leitura direta das bandas no gel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 relaciona os 30 *primers* testados e suas correspondentes temperaturas ótimas de anelamento, possibilitando a identificação do número de alelos no loco e a presença ou não de polimorfismo na população estudada.

Tabela01: Representação do locus com as temperaturas ótimas de anelamento de cada primer; A: número de alelos no loco; Polimorfismo: presença ou ausência. Belém, 2014.

Locus	Temp. Anelamento (°C)	A	Polimorfismo
mTgM02	-	0*	-
mTgM04	-	0*	-
mTgM05	58	2	**
mTgM06	55	2	**
mTgM08	58	2	**
mTgM16	58	2	**
mTgM36	-	0*	-
mTgM40	-	0*	-
mTgM51	-	0*	-
mTgM52	58	2	**
mTgM53	-	0*	-
mTgM55	-	0*	-
mTgM56	-	0*	-
mTgM59	-	0*	-
mTgM63	-	0*	-
mTgM68	64	2	**
mTgM79	-	0*	-
mTgM84	55	2	**
mTgM85	-	0*	-
mTgM87	58	2	**
mTgM95	-	0*	-
mTgM98	-	0*	-
mTgM104	-	0*	-
mTgM105	-	0*	-
mTgM106	-	0*	-
mTgM107	-	0*	-
mTgM110	-	0*	-
mTgM111	-	0*	-
mTgM112	-	0*	-
mTgM116	-	0*	-

0* Amplificação Inespecífica

**Presença de Polimorfismo; 0: ausência de polimorfismo.

Dentre os 30 pares de primers testados, 8 apresentaram amplificação no gradiente das seis temperaturas, sendo identificada a temperatura ótima para o anelamento que cada primer.

Regra geral, observou-se que somente nas temperaturas mais elevadas houve possibilidade de anelamento do primer ao DNA, com o conseqüente aparecimento das bandas no gel de acrilamida. Tiveram o melhor comportamento na temperatura de anelamento 58°C os primers mTgM 05, mTgM 08, mTgM 16, mTgM 52 e mTgM 87. Na temperatura de 55°C os que tiveram boa amplificação foram os primers mTgM 06 e mTgM 84. E por fim, o loco mTgM 68 com amplificação ótima à 64°C.

Nessas oito amplificações, todos os primers apresentaram polimorfismo com presença de dois alelos/loco. Vale ressaltar que o máximo de alelos esperados eram dois, visto que, o material empregado era uma progênie de irmãos completos.

Os locos com amplificação inespecífica, em sua maioria, apresentaram multibandas fracas e indefinidas.

CONCLUSÕES

Foi possível determinar a temperatura ótima de anelamento de 27% dos primers testados. Os iniciadores mTgM 05, mTgM 06, mTgM 08, mTgM 16, mTgM 52, mTgM, mTgM 68, mTgM 84 e mTgM 87, poderão ser empregados nas pesquisas de biologia molecular do cupuaçuzeiro.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.M. EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécie vegetal para a Amazônia Oriental**. Belém, 1999. P.37-45. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220P.

LEITE, T.L.; FERREIRA. M.A; TARCHETTI. B.D. **Análise de Transferibilidade de primers microssatélites de *Cucumis melo* para *Cucurbita moschata* E *Luffa cylindrica***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

SOUZA, A. G. C. ; RESENDE, M. D. V. ; SILVA, S. E. L. ; SOUZA, N. R. **The cupuaçuzeiro genetic improvement program at Embrapa Amazônia Ocidental**. Crop Breeding And Applied Biotechnology, Londrina, v. 2, n. 3, p. 471-478, 2002.