

ESTABELECIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM THEOBROMA CACAO UTILIZANDO O SISTEMA MULTIPLEX EM SEQUENCIADOR ABI PRISM 377

Milton Macoto Yamada¹, Karina Peres Gramacho¹, Fábio Gelape Faleiro², Alfredo Dantas Neto¹, Reinaldo Figueiredo dos Santos¹

¹CEPLAC, CEPEC, Laboratório de Biotecnologia, Caixa postal 7, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil

²EMBRAPA Cerrados, BR 020, km 18, 08223, 73301-970, Planaltina- Distrito Federal, Brasil.

O uso de marcadores microssatélites em cacau vem crescendo desde o desenvolvimento dos primeiros *primers*. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e otimizar uma metodologia para obtenção desses marcadores em cacau, utilizando o sequenciador automático ABI Prism 377 no sistema multiplex. A metodologia de extração de DNA e a reação de PCR que vinham sendo utilizadas no laboratório do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) para obtenção de microssatélites em géis de agarose foi mantida. Testando diversas diluições, o melhor procedimento foi adicionar 1,5 µL do produto da PCR de cada 3 *primers* marcados em 25 µL de H₂O desionizada e, deste, retirar 3 µL para ser adicionado a 1,5 µL do tampão de carregamento.

Palavras-chave: marcadores moleculares, metodologia, gel de poliacrilamida.

Establishment and protocol optimization to obtaining microsatellites markers in Theobroma cacao using multiplex system in ABI PRISM 377 sequencer. The use of microsatellite markers in cocoa is growing since the development of the first primers. The objective of this work was to establish and to optimize a methodology for obtaining of those markers in cocoa, using the automatic sequencer ABI Prism 377 in mutiplex system. The methodology of DNA extraction and PCR reaction is the same as has been used in Cocoa Research Center (CEPEC) for microsatellite in agarose gel. Testing several dilutions, the best procedure was to add 1,5 µL of the PCR product for each 3 marked primers in 25 µL of deionided water and from this take 3 µL to be added to 1,5 µL of loading buffer.

Key words: molecular markers, methodology, polyacrilamide gel.

O uso de marcadores moleculares para auxiliar no programa de melhoramento genético do cacau vem se tornando rotina desde o descobrimento da técnica de RAPD (Williams et al.1990).O uso de marcadores microssatélites vem crescendo desde o desenvolvimento dos primeiros *primers* (Lanaud et al. 1999) culminando com o mapeamento genético do cacau usando 201 marcadores microssatélites (Pugh et al. 2004). No Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), os marcadores microssatélites vêm sendo utilizados para estudos de diversidade genética (Yamada et al. 2003, Faleiro, F.G. et al. 2004, Faleiro, A.S.G.et al.2004) e também para o mapeamento genético (Faleiro et al. 2006). Os marcadores microssatélites podem ser obtidos usando agarose em cuba horizontal (Yamada et al.2003), poliacrilamida em

gel vertical (Creste, Tulmann Neto e Figueira, 2001) ou em poliacrilamida usando o sequenciador automático. O último método vem recebendo atenção especial, considerando que os resultados são consistentes, podem correr mais *primers* ao mesmo tempo no mesmo gel e a estimativa do tamanho de cada alelo é mais precisa, possibilitando a união de dados de genotipagem obtidos em diferentes géis e em diferentes laboratórios. Atualmente, são encontrados diferentes protocolos para obtenção de microssatélites em cacau, e neste trabalho, o objetivo foi estabelecer e otimizar uma metodologia para obtenção dos marcadores, utilizando o sequenciador automático ABI Prism 377.

A metodologia de extração de DNA otimizada por Faleiro et al. (2002) e a reação de PCR que vinham sendo utilizadas