



## DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES DE GUARANAZEIRO E *Paullinia spp*

Joelma dos Santos Fernandes<sup>1</sup>; Nelcimar Reis Sousa<sup>2</sup>; Gilvan Ferreira da Silva<sup>3</sup>; Firmino José do Nascimento Filho<sup>4</sup>; André Luiz Atroch<sup>5</sup>; Elizangela Farias da Silva<sup>6</sup>

1. UEA-Embrapa, Manaus, AM; 2, 3, 4, 5 Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil; 6 PPGbiotec-Ufam, Manaus, AM, Brasil

**Resumo:** O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*) é um poliplóide que apresenta grande importância econômica para a região amazônica, devido a alto teor de cafeína em suas sementes. A análise genética utilizando marcadores moleculares pode auxiliar a caracterização morfoagronômica do germoplasma de guaranazeiro considerando seu elevado poder de discriminação. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética entre clones cultivados e espécies afins de guaranazeiro utilizando marcador ISSR. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. As amostras de tecido foliar foram coletadas no Banco de Germoplasma de guaranazeiro, sendo 37 clones cultivados e 13 de espécies afins. A extração, amplificação e visualização do DNA em gel de agarose seguiram protocolo existente para espécie. Doze *primers* produziram bandas com variação de tamanho entre 290pb e 2200pb e estimativas coeficiente de similaridade *Jaccard* entre 0,36 e 0,99. No dendrograma verificou-se a separação de três grupos distintos, sendo o primeiro grupo formado somente pelos clones cultivados de guaranazeiro e os demais grupos foram compostos pelas espécies afins. Os resultados comprovaram que o marcador ISSR foi consistente na análise de diversidade genética separando clones cultivados das espécies silvestres.

**Palavras-chave:** germoplasma, espécies nativas, marcador genético, inter-microsatélites.

### Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*) apresenta grande importância econômica para a região amazônica, visto que suas sementes na forma de pó ou xarope são matéria-prima para produtos industriais com propriedades estimulantes e energéticas devido a alto teor de cafeína. A espécie é um poliplóide com pequena variabilidade genética, porém tem sido suficiente para a seleção e recombinação de indivíduos para obtenção de clones de guaranazeiro com características comerciais qualitativas e quantitativas (SOUSA, 2003; ATROCH, 2009). A caracterização genética utilizando marcadores moleculares pode auxiliar a caracterização morfoagronômica do germoplasma de guaranazeiro considerando seu elevado poder de discriminação de indivíduos, populações e espécies relacionadas. O marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é bastante utilizado por ser um método

que apresenta poucas limitações, é rápido, e na identificação de polimorfismo são produzidos fragmentos com grande reprodutibilidade quando comparado a outros marcadores moleculares, além de requerer pouca infra-estrutura de laboratório (REDDY et. al., 2002; UYSAL et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética entre clones cultivados e espécies afins de guaranzeiro utilizando marcador ISSR.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. As amostras de tecido foliar foram coletadas no Banco de Germoplasma de guaranzeiro, sendo 37 clones cultivados e 13 de espécies afins. O protocolo de extração do DNA genômico adotado foi CTAB 2% e a quantificação foi determinada em espectrofotômetro UV. A padronização da reação de amplificação foi realizada com base nos resultados dos testes com gradientes de temperatura de anelamento para cada *primer* ISSR-UBC (808, 812, 813, 815, 822, 823, 825, 834, 835, 844, 880, 886). A reação padronizada foi preparada para o volume final de 20 $\mu$ L, contendo tampão IB 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), DNTP a 0,8 mM, *primer* a 5mM, 1U *Taq polimerase* (Phonectria), 50 ng DNA. O programa de amplificação foi 3 min. a 94 °C no primeiro estágio; 1 min. a 94°C, 2 min. para a temperatura de anelamento e 2 min. a 72°C durante 40 ciclos no segundo estágio; 7 min. a 72 °C no terceiro estágio. A visualização dos produtos amplificados foi em gel de agarose 1,5%. Os dados foram analisados com base no coeficiente de similaridade *Jaccard* e no método de agrupamento UPGMA.

### **Resultados e Discussão**

Os 12 *primers* produziram bandas com variação de tamanho entre 290pb e 2200pb. As estimativas de similaridade genéticas entre os clones cultivados e as espécies relacionadas tiveram valor mínimo de 0,36, enquanto o valor máximo de 0,99 foi observado entre os clones cultivados (CMA 274 e CMA 276). No dendrograma foram identificados três grupos distintos de germoplasma com coeficiente de similaridade de 0,50, o primeiro grupo foi formado somente por clones cultivados, os demais grupos foram compostos pelas espécies afins. Apenas uma das espécies ficou isolada dos dois primeiros grupos, o que demonstra a sua distância genética em relação aos outros genótipos analisados. Entre os clones cultivados é clara a formação de dois subgrupos mais homogêneos com 0,75 de similaridade, sendo um composto por nove clones (CMA228 a CMA225) e o outro por sete clones (CMU611 a CMU628) (Figura 1).

Os resultados da análise de diversidade genética entre os clones de guaranazeiro e *Paullinia spp* foram consistentes comprovando que o marcador ISSR foi eficiente em separar germoplasma de guaranazeiro e de espécies relacionadas.

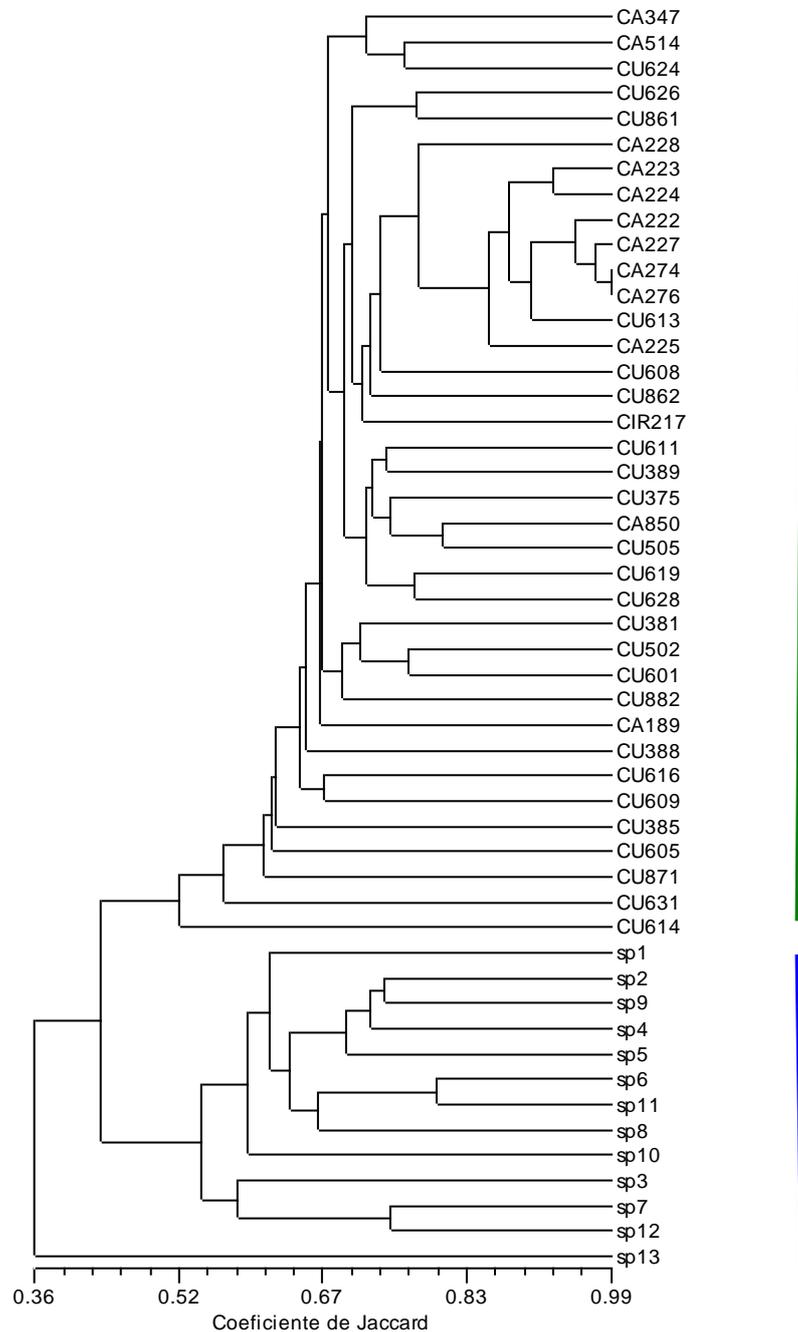


Figura 1: Dendrograma entre clones de guaranazeiro e *Paullinia spp* obtido com base nos dados de polimorfismo de ISSR, coeficiente de similaridade de *Jaccard* e método de agrupamento UPGMA .

A elevada capacidade de discriminação genética do ISSR em relação à análise envolvendo amostras de material cultivado e espécies afins também foi observada em arroz (GIRMA et al., 2010) e

de ecótipos de cevada (WANG et. al., 2012). A moderada amplitude de variabilidade genética do germoplasma cultivado também foi verificada em análise utilizando marcador RAPD (Sousa, 2003).

### **Conclusão**

Considerando a indisponibilidade de locos de microssatélites para o guaranazeiro, os ISSR podem ter ótima aplicabilidade para a análise da diversidade genética do Banco de germoplasma de guaranazeiro. A variabilidade genética do guaranazeiro cultivado foi moderada em comparação aos genótipos de espécies afins.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq pela bolsa concedida, a Embrapa Amazônia Ocidental pela infra-estrutura para desenvolver a pesquisa e, a FAPEAM pelo auxílio no transporte para participação no evento.

### **Referências Bibliográficas**

- ATROCH, A. L. **Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos**. 2009. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva na área de concentração em Genética) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, Amazonas. 2009.
- GIRMA G.; TEFAYE K.; BEKELE E. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**. v. 9 (32), p. 5048-5059, 2010.
- REDDY M. P.; SARLA N.; SIDDIQ E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. v. 128, p. 9–17, 2002.
- SOUSA, N.R. **Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro**. Lavras, 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.
- UYSAL, H.; FU, YB.; KURT O.; PETERSON, G. W.; DIEDERICHSEN A.; KUSTERS P. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. **Research Article**. v. 57, p. 1109-1119, 2010.
- WANG H.; ZONG X.; GUAN J.; YANG T.; SUN X.; MA Y.; REDDEN R. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. **Theor Appl Genet**. v. 124, p 789–797, 2012.