

# DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA TRAP (TARGET REGION AMPLIFICATION POLYMORPHISM) PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GUARANAZEIRO

SANDRA BARBOSA DE SOUSA<sup>1</sup>; NELCIMAR REIS SOUSA<sup>2</sup>; GILVAN FERREIRA DA SILVA<sup>3</sup>;  
1.INPA, MANAUS, AM, BRASIL; 2,3.EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, MANAUS, AM, BRASIL;

**Resumo:** O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de importância econômica devido ao conteúdo de cafeína em suas sementes. A Embrapa Amazônia Ocidental tem concentrado esforços para a conservação clonal da variabilidade genética do guaraná. O objetivo desse trabalho foi desenhar e otimizar a técnica de TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) para as aplicações diversas das análises de diversidade genética em guaranazeiro. Oito *primers* fixos desenhados para seqüências relacionadas com proteínas envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas juntamente com seis *primers* arbitrários, constituídos por seqüências aleatórias foram utilizados em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Das 180 combinações possíveis, treze foram selecionadas por proporcionarem padrão de amplificação que podem ser otimizado e utilizado como marcador TRAP no guaranazeiro, apresentando número total de bandas que variou entre 5 e 15 com tamanhos entre 80 a 300pb.

**Palavras-chave:** EST's, germoplasma, marcador molecular, *Paullinia cupana*

## Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da Amazônia de importância econômica devido ao conteúdo de cafeína em suas sementes. No Amazonas seu cultivo é feito tanto por pequenos como por grandes produtores, sendo o município de Maués o maior produtor estadual. A Embrapa Amazônia Ocidental tem concentrado esforços para a conservação clonal da variabilidade genética do guaranazeiro visando suprir a necessidade de conhecimentos básicos e, ao mesmo tempo, encontrar solução para os principais problemas da cultura; especialmente a baixa produtividade dos plantios e incidência da doença antracnose (Nascimento Filho et al., 2001a). A caracterização molecular do germoplasma de guaranazeiro tem sido possível com a utilização de seqüências universais (Sousa, 2003). Porém os resultados indicaram a existência de pouca variabilidade genética na coleção apesar da poliploidia, sugerindo, que os métodos utilizados não foram suficientes para identificar variabilidade no germoplasma cultivado. Portanto, com o seqüenciamento de transcritos de guaraná que geraram um banco de ESTs com 2.628 *contigs* e 5.969 *singletons*,

com comprimento médio de 773 pares de bases (Ângelo et al., 2008). Essas sequências também poderão contribuir para o desenvolvimento de novos marcadores moleculares.

Os recursos genéticos são úteis para os programas de melhoramento atuais e futuros. Dentre as técnicas para avaliar e caracterizar Bancos de Germoplasma o uso de marcadores moleculares vem sendo muito utilizados porque permite a detecção de variação no DNA, excluindo, portanto, influências ambientais. O TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) é apresentado como uma técnica que utiliza ferramentas de bioinformática e dados de EST's (*Expressed Sequence Tags*) para gerar marcadores a partir de seqüências alvo de genes candidatos. A técnica possui como vantagens, a alta reprodutibilidade, simplicidade, o acesso a regiões relacionadas a genes e a capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes ao da técnica de AFLP (Hu & Vick 2003). O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um primer fixo, desenhado a partir de uma seqüência EST de interesse, e um primer arbitrário. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenhar e otimizar a técnica de TRAP para as aplicações diversas das análises de diversidade genética em guaranazeiro.

### **Material e Métodos**

Foram realizadas buscas no banco de dados do guaraná (<https://helix.biomol.unb.br/GR/head.jsp>) através de palavras chave usando os nomes dos genes de interesse das seqüências depositadas. Para desenho dos primers fixos foram escolhidas as seqüências que apresentavam maior identidade e similaridade como o gene de interesse, utilizando o software *Primer3* v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Seis *primers* constituídos por seqüências aleatórias (GA3, T04, T03, T13, T14, SA4) foram testados em combinações com os primers fixos. As reações da PCR foram otimizadas em volume final de 20µL, contendo 1X de tampão IB (phoneutria), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6mM de dNTP, 50ng de DNA do clone 300, 1,5pM de *primer* Fixo, 0,75pM de *primer* arbitrário e 1,5U de *Taq* polimerase. O programa de amplificação utilizando foi: 94°C de desnaturação por 2 minutos, seguido de 5 ciclos de pré amplificação, sendo 94°C por 45 segundos, 35°C por 45 segundos e 72°C por um minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação sendo 94°C por 45 segundos, 50-60°C por 45 segundos e 72°C por um minutos, A reação finalizada com 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com coloração de brometo de etídeo.

### **Resultados e Discussão**

Dos oito *primers* fixos desenhados foram possíveis realizar 180 combinações usando seis *primers* arbitrários. As combinações que não amplificaram ou apresentaram número de bandas inferior a três foram desprezadas. Treze combinações foram selecionadas por apresentarem padrões de amplificação que podem ser otimizados e utilizados como marcador TRAP no guaranazeiro: Aux R +T13, Aux R+T03, Aux F+GA3, Cyst1 F+T14, Cyst1 F +T03, Cyst1 F+T04, Aux\_F +T13, Aux\_F +T14, Aux\_F +T03, Aux\_R + T13, Aux\_R + T14, Aux\_R + T03 e Aux\_R + T04. O número total de bandas variou entre 5 e 15 com tamanhos entre 80 a 300pb (Figura 1). O número de combinações selecionadas para o marcador TRAP em guaranazeiro pode ser considerado ótimo em comparação a outras espécies vegetais. Em espinafre foram geradas seis combinações entre seis primers fixos e oito arbitrários, das quais duas combinações de primers amplificaram 111 fragmentos (Hu et al, 2007).

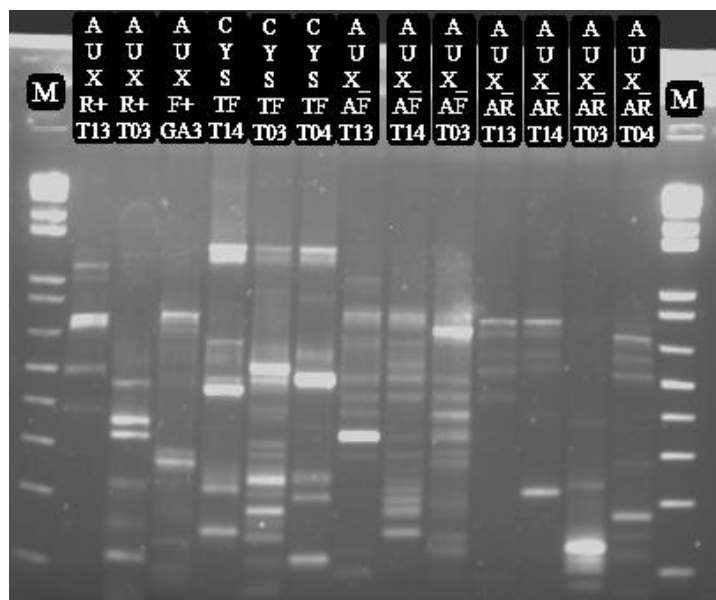


Figura 1: Perfil de amplificação dos primers TRAP, onde M é o marcador molecular, AUX e CYS são respectivamente primers desenvolvidos para os genes da auxina, cisteína em combinações com primers arbitrários (T03, T04, T13, T14 e GA3) .

As seqüências selecionadas para desenvolvimento da técnica TRAP estão relacionadas com proteínas envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas e vias de sinalização e resposta a estresses bióticos e abióticos, tais como a cisteína (Solomon et al, 1999) e auxina (Pop et al., 2011).

### Conclusão

O perfil de amplificação gerado por treze combinações de primers selecionadas neste trabalho sugere que o marcador TRAP apresenta potencial para ser aplicado em análises genéticas de guaranazeiro.

## Referências Bibliográficas

- ANGELO, P.C.S; NUNES-SILVA, C.G.; BRÍGIDO, M.M.; AZEVEDO, J.S.N; ASSUNÇÃO, E.N.; SOUSA, A.R.B.; PATRÍCIO, F.J.B.; REGO, M.M.; PEIXOTO, J.C.C.; OLIVEIRA-JR, W.P.; FREITAS, D.V.; ALMEIDA, E.R.P.; VIANA, A.M.H.A.; SOUZA, A.F.P.N.; ANDRADE, E.V.; ACOSTA, P.O.A.; BATISTA, J.S.; WALTER, M.E.M.T.; LEOMIL, L.; ANJOS, D.A.S.; COIMBRA, R.C.M.; BARBOSA, M.H.N.; HONDA, E.; PEREIRA, S.S.; SILVA, A.; PEREIRA, J.O.; SILVA, M.L.; MARINS, M.; HOLANDA, F.J.; ABREU, R.M.M.; PANDO, S.C.; GONÇALVES, J.F.C.; CARVALHO, M.L.; LEAL-MESQUITA, E.R.R.B.P.; SILVEIRA, M.A.; BATISTA, W.C.; ATROCH, A.L.; FRANÇA, S.C.; PORTO, J.I.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; ASTOLFI-FILHO, S. Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**. 27: 117-124. 2008.
- HU, J.; MOU, B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genet Resour Crop Evol**, n. 54, p.1667–1674, 2007.
- HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique **Plant Mol Biol Reprtr**, v. 21, p. 289–294, 2003.
- NASCIMENTO FILHO, F. J. do; GARCIA, T. B.; SOUSA, N.R.; ATROCH, A. L.. Recursos genéticos de guaraná. In: Sousa, N. R.; Souza, A. das G. C de (Eds) **Recursos Fitogenéticos na Amazônia Ocidental – Conservação, pesquisa e utilização**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001a, p.127-141.
- POP, T.I.; PAMFIL, D, BELLINI, C. *Auxin* control in the formation of adventitious roots. **Not Bot Hort Agrobot Cluj**, v. 39, n.1, p.307-316, 2011.
- SOUSA, N.R. **Variabilidades genéticas e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro**. Lavras, 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.2003.