

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO PROGRAMA DE
MELHORAMENTO DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), UTILIZANDO MARCADORES
TRAP E SRAP

ELIZANGELA FARIAS DA SILVA

MANAUS

2014

ELIZANGELA FARIAS DA SILVA
DIVERSIDADE GENÉTICA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*
(Mart.) Ducke), UTILIZANDO MARCADORES TRAP E SRAP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELIZANGELA FARIAS DA SILVA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO PROGRAMA DE
MELHORAMENTO DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*
var.sorbilis (Mart.) Ducke), UTILIZANDO MARCADORES
TRAP E SRAP

Dissertação apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia,
área de concentração Agroflorestal.

Orientador: Dr. Rogério Eiji Hanada

Co-Orientador: Dra. Nelcimar Reis Sousa

MANAUS

2014

Ficha catalográfica

Elemento obrigatório, a ficha catalográfica deve ser elaborada conforme o Código de Catalogação Anglo Americano vigente e a Classificação Decimal Universal – CDD, sendo necessário o auxílio de um bibliotecário.

Para as teses e dissertações da UFAM, as fichas catalográficas serão produzidas pela Biblioteca Central

ELIZANGELA FARIAS DA SILVA

DIVERSIDADE GENÉTICA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO
DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana var.sorbilis* (Mart.) Ducke),
UTILIZANDO MARCADORES TRAP E SRAP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de Agroflorestal.

Aprovado em 28 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rogério Eiji Hanada, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dra. Nara Fernandes Moura, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dr. André Luiz Atroch, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária - EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Dedico todas as minhas conquistas a Dona Itelvina Farias da Silva (*in memoriam*) e a minha mãe Ana Maria Farias da Silva por tudo o que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Ao plano superior pela força invisível;

A minha avó materna Itelvina (*in memoriam*) que mesmo ausente, sempre esteve presente em minha memória, com fortes lembranças de seu ensino e conselhos, o que me guia nessa caminhada a seguir em frente e nunca desistir.

A minha mãe Ana Maria e meus irmãos Elison e Everton que sempre estiveram ao meu lado e me deram suporte, amo vocês.

Aos meus tios Alcilene e Beto pela força e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus primos Alan, Arlinson e Sandra pela força e momentos ímpares que fazia meus dias mais felizes.

A minha família pela compreensão perante a minha ausência em momentos tristes e alegres devido à dedicação exclusiva ao mestrado.

Ao meu amigo Fagner Luiz Freitas por me ouvir, orientar e chamar atenção quando era necessário.

Ao meu afilhado Samir, um ser tão pequeno, mas com grande importância na minha vida.

Ao Dr. Rogério Eiji Hanada e Dra. Nelcimar Reis, pela aceitação, orientação, incentivo e disponibilidade durante toda a execução deste trabalho;

Aos Doutores André Luis Atroch e José Firmino do Nascimento Filho, pela concessão das amostras do programa de melhoramento do guaranzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental Jeferson Cruz, pelas orientações técnicas dadas durante o desenvolvimento dos experimentos e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio, cumplicidade e momentos ímpares que vivenciamos.

À Universidade Federal do Amazonas, por proporcionar minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

A Embrapa Amazônia Ocidental por propiciar a realização deste projeto de pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro ao projeto e concessão da bolsa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

AGRADEÇO

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da região amazônica rica em cafeína natural. A Embrapa Amazônia Ocidental desenvolve programa de melhoramento de guaranazeiro baseado em seleção clonal e seleção recorrente para obtenção de cultivares e progênies com características agronômicas desejáveis. O uso de marcadores moleculares tem sido aplicado com sucesso em programas de melhoramento para monitorar a diversidade genética e auxiliar na seleção assistida por marcadores. Com isso, a presente pesquisa visa avaliar a diversidade genética do programa de melhoramento do guaranazeiro, usando TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) e o SRAP (*Sequence-Related Amplification Polymorphism*). O trabalho foi dividido em duas partes: a primeira para testar o potencial dos marcadores TRAP e SRAP, usando 60 subamostras do BAG (Banco Ativo do Germoplasma) e a segunda para análise da diversidade genética de seis progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. No BAG observou-se um percentual de polimorfismo de 79% (TRAP) e 74,5% (SRAP). O coeficiente de *Dice* variou de 0,64 a 0,87, formando quatro grupos no dendrograma, onde um deles concentrou 82% do material estudado. Nas progênies de meios irmãos, o percentual de polimorfismo foi 85% para o TRAP e 76% para SRAP. A diversidade genética de *Nei* (H) foi de 0,20 e o índice de *Shannon* (I) de 0.30. A AMOVA mostrou que o maior percentual de variação se encontra dentro das progênies (54%). Com estes resultados, os marcadores TRAP e SRAP mostraram potencial em estudos de diversidade genética no programa de melhoramento de guaranazeiro.

Palavras-chaves: Germoplasma, progênies, clones, Espécies amazônica, poliplóides.

ABSTRACT

The guarana (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (Mart.) Ducke) is a native species from the Amazon region rich in natural caffeine. Embrapa Western Amazon develops guarana breeding program based on clonal selection and recurrent selection to obtain cultivars and progenies with desirable agronomic characteristics. The use of molecular markers has been successfully applied in breeding programs to monitor genetic diversity and assist in marker-assisted selection. Thus, the present study aims to evaluate the genetic diversity of guarana improvement program, using TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) and the SRAP (Sequence-Related Amplification Polymorphism). The work was divided into two parts: the first to test the potential of TRAP and SRAP markers, using subsamples of 60 BAG (Active Germplasm Bank) and the second to analyze the genetic diversity six progenies of half brothers guarana. In the BAG a polymorphism observed percentage of 79% (TRAP) and 74.5% (SRAP). The Dice coefficient ranged from 0.64 to 0.87, forming four groups in the dendrogram, where one concentrated 82% of the studied material. In the progenies of half brothers, polymorphism percentage was 85% for the TRAP and 76% for SRAP. The genetic diversity of Nei (H) was 0.20 and the Shannon index (I) of 0.30. The AMOVA showed that the highest percentage of variation is within the progenies (54%). With these results, the TRAP and SRAP markers showed potential genetic diversity studies in guarana breeding program.

Keywords: Amazon species, clones, Germplasm, progeny, polyploid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características morfológicas do fruto do guaranazeiro	18
Figura 2 - Produção do guaraná no Brasil de 2009 à 2013.....	21
Figura 3 - Dendrograma da análise combinada dos marcadores TRAP e SRAP baseado no coeficiente de similaridade de Dice, gerado pelo método UPGMA.....	37
Figura 4 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranazeiro usando marcador TRAP.....	42
Figura 5 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranazeiro usando marcador SRAP.....	42
Figura 6 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranazeiro usando a análise combinada dos marcadores.	43
Figura 7 - Percentual de variância molecular AMOVA dentro e entre as progênies de guaranazeiro.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção do guaraná ano 2013	21
Tabela 2 - Identificação das subamostras clonais do BAG de guaranazeiro da Embrapa Amazônia Ocidental.....	29
Tabela 3 - Lista dos <i>primers</i> fixos <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) desenhados e testados em guaranazeiro.....	30
Tabela 4 - Combinações dos <i>primers</i> TRAP utilizados nas análises de diversidade do germoplasma clonal e das progênies de guaranazeiro do programa de melhoramento da Embrapa-AM.....	31
Tabela 5 - Combinações dos <i>primers</i> SRAP utilizados nas análises de diversidade do germoplasma clonal e das progênies de guaranazeiro do programa de melhoramento da Embrapa-AM.....	32
Tabela 6 - Níveis de polimorfismos e valor do PIC, apresentados pelas combinações dos <i>primers</i> do TRAP e SRAP usados na análise de diversidade genética em germoplasma clonal de guaranazeiro.....	34
Tabela 7 - Nível de polimorfismo e valor do PIC apresentados pelas combinações dos primers do TRAP e SRAP, usado na análise de diversidade genética em seis progênies de guaranazeiro.....	40
Tabela 8 - Índices de diversidade genética (média e desvio padrão) obtida pelas análises com marcadores TRAP e SRAP e análise combinada em seis progênies do guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i>) do programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Ocidental.	41

SUMÁRIO

1.0.	INTRODUÇÃO.....	13
2.0.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Geral.....	16
2.2.	Específicos.....	16
3.0.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1.	Guaranazeiro.....	17
3.2.	Importância Sócio-Econômica.....	20
3.3.	Estrutura Genômica.....	21
3.4.	Variabilidade Genética.....	22
3.5.	Recursos Genéticos.....	23
3.6.	Programa de Melhoramento do Guaranazeiro.....	23
3.7.	Marcadores Moleculares.....	24
3.8.	TRAP (Target Region Amplyfication Polymorfism).....	27
3.9.	SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism).....	27
3.10.	Seleção Assistida por Marcadores Moleculares.....	28
4.0.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1.	Material Estudado.....	29
4.2.	Extração de DNA.....	30
4.3.	Marcador TRAP.....	30
4.4.	Marcador SRAP.....	31
4.5.	Eletroforese em gel de agarose.....	32
4.6.	Análises de dados.....	33
5.0.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1.	Análise do Germoplasma Clonal.....	34
5.2.	Análises das Progênes de Meios Irmãos do Guaranazeiro.....	39
6.0.	CONCLUSÃO.....	45
7.0.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1.0. INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana var. sorbilis*) é um poliplóide complexo com 210 cromossomos, nativo da região Amazônica (Freitas *et al.*, 2007). Rico em cafeína natural, o guaranazeiro apresenta um potencial para as indústrias de bebidas e energéticos (Smith *et al.*, 2010). O Brasil é o único produtor mundial, sendo os Estados da Bahia e do Amazonas os maiores responsáveis por essa demanda (Nascimento-Filho *et al.*, 2009).

A Embrapa Amazônia Ocidental mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com 270 clones para fornecer variabilidade genética aos programas de melhoramento e conservação da espécie para as demandas futuras (Atroch *et al.*, 2009). A seleção clonal é um dos métodos de melhoramento utilizado atualmente para obtenção de cultivares recomendadas para produção comercial de guaranazeiro. Apesar dos avanços rápidos, a estratégia traz alguns riscos em longo prazo, como limitações da diversidade genética, maior suscetibilidade dos genótipos devido à uniformidade do plantio e a redução da possibilidade de ganhos adicional futuros, uma vez que o programa de seleção passa a manejar um pool gênico limitado (McKey *et al.*, 2009). Ademais, a Embrapa desenvolve a seleção recorrente, cujo método de melhoramento populacional tem por objetivo aumentar as médias de características agronômicas, assim como também reduzir a possibilidade da perda da variabilidade genética do guaranazeiro (Atroch *et al.*, 2009).

A diversidade genética de espécies cultivadas é avaliada por caracteres fenotípicos e marcadores moleculares. Em guaranazeiro, Nascimento-Filho *et al.*, (2001) aplicaram técnicas multivariadas baseadas em fenótipos agronômicos e encontraram pouca divergência entre clones. Na caracterização do germoplasma,

utilizando marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), foi observada pouca variabilidade (Sousa *et al.*, 2003). E os microssatélites desenvolvidos e testados até o momento, apresentaram polimorfismo insuficiente ou complexo para análise de diversidade genética em guaranazeiro (Atroch *et al.*, 2009).

Sequências depositadas em banco de dados genômicos tornaram possível o desenvolvimento de marcadores conhecidos como marcadores pós-genômico (Buyarapu *et al.*, 2011). Entre eles está o TRAP (*Target Region Amplification Polymorfism*), que utiliza dois *primers*: o fixo e o aleatório. O *primer* fixo é desenhado a partir de EST (*Expressed Sequence Tags*) e o aleatório é uma sequência descrita na literatura, rica em CG, que irá se anelar em éxons ou íntrons (Zhang *et al.*, 2012). As combinações desses *primers* amplificam regiões funcionais do genoma. Além disso, o TRAP é uma técnica simples, de baixo custo e alta reprodutibilidade, que vem sendo aplicado em estudos de diversidade, mapeamentos e quantificação de genes (Alwala *et.al.*, 2006; Khan *et al.*, 2011).

Outro marcador que vem sendo utilizado com êxito em estudo de diversidade genética é o SRAP (*Sequence Related Amplified Polimorsfism*). A técnica também utiliza dois primers, o *forward* e o *reverse*. Esses primers possuem em suas sequências motivos constituídos por CCGG em *forward* e AATT em *reverse*. Esses motivos possibilitarão que esses *primers* se anelem e amplifiquem regiões ORFs (*Open Region Frame*), uma vez que regiões codificantes em proteína contêm sequências ricas em CG e regiões de UTRs (*Untranslated Region*) são ricas em AT (Poczai *et al.*, 2013). O SRAP vem sendo utilizado juntamente com outros marcadores, apresentando um potencial nas análises da diversidade genética, mapeamento e marcação de genes, identificação de híbridos e determinação do sexo. Além disso, traz como vantagem

baixo custo e o número relativamente elevado de produtos amplificados (Li *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011).

Os programas de melhoramento genético clássico podem ser acelerados pela utilização de marcadores moleculares, que podem auxiliar na seleção de genótipos/populações com ampla diversidade genética. Haja vista que, o guaranazeiro apresenta descritores morfológicos de frutos e de folhas que indicam a existência de variabilidade fenotípica entre germoplasma clonal e cultivares recomendadas. Não obstante a isso, os marcadores moleculares aplicados até o momento não detectaram a variabilidade existente, o que reforça a necessidade de aplicação de outros marcadores para encontrar regiões com polimorfismo suficiente para gerar informações sobre a diversidade genética do programa de melhoramento. Além disso, em poliplóides mais complexos, todo marcador é analisado como dominante. Com base nisso, foram selecionados os marcadores TRAP e SRAP para avaliar a diversidade genética no programa de melhoramento do guaranazeiro.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a diversidade genética do programa de melhoramento de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbillis*).

2.2. Específicos

- Analisar o polimorfismo apresentado pelos marcadores TRAP e SRAP em três grupos de clones do programa de melhoramento de guaranazeiro.
- Estimar a diversidade entre seis progênies de meios irmãos selecionadas no programa de melhoramento populacional de guaranazeiro utilizando os marcadores TRAP e SRAP.

3.0. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie típica da região Amazônica, domesticada pelos povos indígenas Sateré-Maué. É uma planta perene, dicotiledônea pertencente à família Sapindaceae. O gênero *Paullinia* está distribuído pela América tropical e subtropical e na África tropical com apenas uma espécie descrita, *P. pinnata*. Em seu habitat natural, geralmente em mata fechada possui aspecto de uma liana, enquanto em cultivo a céu aberto apresenta-se na forma de um arbusto lenhoso (Ângelo *et al.*, 2007; Ângelo *et al.*, 2010; Atroch *et al.*, 2009b).

Segundo a literatura, o guaranazeiro foi observado pela primeira vez em 1810 pelos naturalistas europeus quando viajavam pelo sul da Venezuela. Este material foi descrito e classificado por *Kunth* como *Paullinia cupana* e tem procedência conhecida apenas das áreas ao sul das cachoeiras Atures e Maipures, no rio Orenoco, e na região do alto rio Negro e seus afluentes, região das fronteiras entre Brasil, Venezuela e Colômbia. Anos mais tarde, *Martius* viajando pelo rio Amazonas coletou um material botânico e classificou como *Paullinia sorbilis*. Esse guaranazeiro já era cultivado e subespontâneo na região de Maués. Dessa forma, *Paullinia cupana* var. *cupana* foi classificada como a forma típica e é raramente encontrada; enquanto que *Paullinia cupana* var. *sorbilis* é a forma cultivada, comumente encontrada na região amazônica (Clement *et al.*, 2010; Smith, *et al.*, 2010).

Paullinia cupana var. *sorbilis* possuem folíolos menos lobados quando jovens e são providas de gavinhas quando adultas. As flores são ligeiramente menores, os frutos também têm metade ou um terço do volume e cor vermelho-vivo e bastante brilhantes.

A inflorescência é um cacho com tamanho variável chegando a ultrapassar 25 cm e ocorre geralmente na axila das folhas ou na base de uma gavinha (FIG.1). O fruto é uma cápsula deiscente e quando maduro tem coloração, que vai desde amarelo-alaranjada, passando por vermelho-amarelada até vermelho-vivo e brilhante. Quando abre, deixa aparecer a semente castanho-escura envolta parcialmente por um arilo branco. A maioria das sementes tem forma arredondada. Frutos com um, dois ou três óvulos fecundados são comuns (Ângelo *et al.*, 2008). As sementes de guaranazeiro é que detêm valor comercial, pois são secas ou torradas, dando origem ao produto comercial com alto teor de cafeína (2,5 a 6%), cerca de 2 a 5 vezes mais que as sementes de café (Souza *et al.*, 2010).



Figura 1 - Características morfológicas do fruto do guaranazeiro
Foto: Nelcimar Reis

Quanto à floração, há indícios que flores masculinas e femininas estejam presentes na mesma inflorescência, onde o grau de floração é dessincronizado, ou seja, quanto mais longo for o período da inflorescência, maior será a possibilidade de ocorrer mais de um período de floração feminina. Isso explica o aparecimento de flores e frutos em estágios diferentes de maturação numa mesma inflorescência (Ângelo *et al.*, 2007; Atroch *et al.*, 2009b). A polinização do guaranazeiro esta restrita aos hymenoptera, sendo as espécies *Melipona seminigra*, *Xylocopa muscaria* e *Apis mellifera* os mais importantes polinizadores, porém existem outros polinizadores ocasionais (Gondin *et al.*, 1978). Quanto à reprodução, estudos revelam que a espécie apresenta mecanismos morfológicos favoráveis à alogamia. (Atroch *et al.*, 2009b).

Além da cafeína, o guaraná apresenta outras propriedades químicas, quais sejam, flavonóides e taninos, que lhe conferem características estimulantes e medicinais. Ademais, insta salientar que as propriedades farmacológicas do guaraná vêm sendo avaliadas e testadas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Em face de tais estudos, foram comprovadas atividades antioxidantes (Portella *et al.*, 2013), antibacterianas e antifúngicas (Basile *et al.*, 2005), além da ação antiplaquetárias, diminuindo o risco de trombose e doenças cardiovasculares (Ravi *et al.*, 2008).

Em relação a doenças cancerígenas, o guaraná apresentou-se como uma alternativa barata e não tóxica para auxiliar no tratamento em curto prazo (Campos *et al.*, 2011). Além disso, possui ação positiva na memória e no desempenho cognitivo (Haskell *et al.*, 2007) e efeito antidepressivo visto em camundongos submetidos à exaustão física (Campos *et al.*, 2005). Com isso, além de ser um importante produto agrícola, o guaranazeiro tornou um interessante objeto de estudo para pesquisadores de diversas áreas.

3.2. Importância sócio-econômica

No Amazonas, o guaraná é explorado há séculos, haja vista que os povos indígenas faziam o seu uso em rituais sagrados ou como fitoterápicos. Visto isso, os colonizadores da época se interessaram e começaram a explorá-lo de forma comercialmente. Até a década de 80, o Estado do Amazonas era o maior produtor de guaraná no Brasil, sendo o Município de Maués o principal responsável por essa demanda. Porém, problemas fitossanitários afetaram a cultura na região, fazendo com que a mesma perdesse o posto para o Estado da Bahia (Bentes *et al.*, 2011).

Atualmente, o Amazonas é o segundo maior produtor do Brasil, onde grupos empresariais são donos de plantios que variam de 80 a 500 hectares, e os pequenos produtores são famílias que residem no Município de Maués (AM) e possuem uma área média de três hectares de plantio, representando 35% da área plantada e da produção estadual (Atroch *et al.*, 2009b).

O Brasil é o único produtor mundial de guaraná, sendo 70% dessa produção empregado na fabricação de refrigerantes e o restante comercializado na forma de xarope, bastão, pó, extrato e outras (Antonelli-Ushirobira *et al.*, 2010). Vale lembrar que, além do Amazonas e Bahia, Acre, Pará, Rondônia, Roraima e Mato Grosso e Amapá produzem guaraná comercialmente, porém em menor escala (Nascimento-Filho *et al.*, 2009). Segundo dados do IBGE, a produção de guaraná em grãos da safra 2013 ficou em torno de 3.676 toneladas (Tabela 1). Porém, pode-se observar uma redução com o volume colhido na safra do ano passado. Já em relação à média dos últimos cinco anos, ela apresentou um recuo da ordem de 8,29%, tendo em vista a ocorrência de problemas de ordem climática, doenças e pragas, que prejudicaram, sobremaneira, a

produtividade dos guaranizeiros nos Estados com maior produção, especialmente no Amazonas, onde se registrou a maior perda (Figura 2).

	Área colhida (hectares)	Produtividade (kg/hectare)	Produção (toneladas)	Participação na produção (%)
Brasil	11.884	309	3.676	100%
Bahia	6.669	401	2.682	72,7%
Amazonas	4.753	156	740	20,1%

Tabela 1- Produção do guaraná ano 2013

Fonte: IBGE/2014

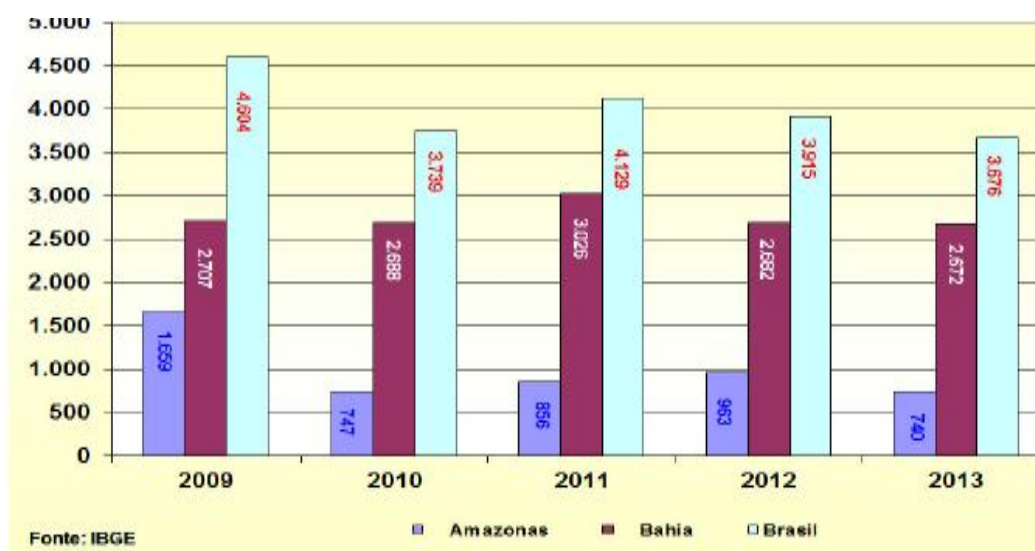


Figura 2 - Produção do guaraná no Brasil de 2009 à 2013

Fonte: IBGE/2014

3.3. Estrutura Genômica

O conhecimento sobre a estrutura genômica é essencial para se conhecer origem, domesticação e evolução de qualquer espécie. Estudos realizados por Freitas *et al.*, (2007) revelam que o guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é um poliplóide, com 210 cromossomos e conteúdo médio de DNA por núcleo diplóide de 22,8 pg. Esses resultados confirmam as contagens iniciais de Nascimento-Filho *et al.*, (2007).

Em razão do número e tipo de cromossomos e a ausência de outras espécies próximas que se pareçam a essa estrutura, estudos indicam que o guaranazeiro é de origem complexa, que incluiu eventos de poliploidização e rearranjo numérico, sugerindo que é um autoalopoliplóide derivado da combinação de pelo menos duas espécies. (Freitas *et al.*, 2007). Esse conhecimento e outros que virão será de grande importância para a compreensão da origem evolutiva dessa espécie (Atroch *et al.*, 2009).

Diferenças comuns em plantas poliplóides podem explicar as diferenças claras entre *P. cupana* e outras espécies como o guaranarana. Saber o tipo de ploidia se faz necessário quanto à análise biométrica, uma vez que o guaranazeiro é um alopóliploide, a abordagem biométrica deve ser similar à de diplóide, ou no caso for um autopoliplóide, os modelos genéticos empregados devem ser outros, isto porque não é possível estimar a variância genética aditiva e a herdabilidade individual no sentido restrito, baseado apenas na avaliação de progênies de meios-irmãos ou de progênies e filhos (Resende *et al.*, 2002).

3.4. Variabilidade Genética

O guaranazeiro apresenta variabilidade fenotípica baseada em caracteres morfológicos, sendo esta usada para selecionar genótipos superiores para o programa de melhoramento da espécie. No entanto, estudos realizados com marcadores moleculares aplicados até o momento não conseguiram acessar esse polimorfismo. Essas diferenças dadas pela análise fenotípica e genética ainda não estão bem claras, porém, deve-se considerar que o guaranazeiro é um poliplóide complexo e há indícios que sua domesticação foi recente, não tendo tempo suficiente para realizar todos os rearranjos cromossômicos para restabelecer seu genoma (Clement *et al.*, 2010). Pode-se considerar

também a epistasia, fenômeno onde vários genes codificam um mesmo produto, influenciando assim nas características morfológicas, além da plasticidade fenotípica que os poliplóides tendem a apresentar (Freitas *et al.*, 2007).

3.5. Recursos Genéticos

A Embrapa Amazônia Ocidental é a instituição responsável pela conservação dos recursos genéticos do guaranazeiro no Brasil e possui um banco de germoplasma clonal com 270 subamostras clonais de guaranazeiro. A coleção encontra-se no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na rodovia AM-010, Manaus – Itacoatiara, no km 29, no município de Manaus. Todo germoplasma de guaranazeiro em cultivo comercial no Brasil é originário do Município de Maués - Amazonas, e o germoplasma que deu origem aos programas de melhoramento genético foram coletados em poucas populações de cultivo comercial, em locais próximos às cidades de Maués e de Manaus (Atroch *et al.*, 2009).

3.6. Programa de melhoramento do guaranazeiro

O melhoramento de plantas surgiu junto com a prática da agricultura, sendo que ambas evoluíram paralelamente na direção de aumento na qualidade e na produtividade das culturas domesticadas pelo homem (Borém *et al.*, 2009). O principal objetivo do melhoramento é a identificação e a seleção de genótipos superiores quanto à produtividade, visando a um ideótipo de planta (Atroch *et al.*, 2009b).

O guaranazeiro possui um único programa de melhoramento, coordenado pela Embrapa Amazônia Ocidental e tem como objetivos selecionar clones de guaraná com produtividade acima de 1,0 kg de sementes por planta, ampla adaptabilidade, boa estabilidade, resistência às principais doenças como a antracnose e superbrotamento,

com melhor qualidade de frutos (alto teor de cafeína), resistência à queda na maturação e maturação mais uniforme (Souza *et al.*, 2012).

No melhoramento do guaranazeiro, os métodos utilizados até o momento variaram de acordo com o objetivo do programa, recursos humanos, materiais e infraestrutura disponíveis para a condução dos trabalhos (Atroch *et al.*, 2009b). Atualmente, seguem-se duas abordagens complementares: seleção clonal e melhoramento populacional. A seleção recorrente está sendo adotada para obtenção de populações melhoradas com características morfo-agronômicas desejáveis e recomendadas para os produtores regionais.

3.7. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados, transmitidos de uma geração para a seguinte. É uma importante ferramenta utilizada em programas de melhoramento, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente do crescimento, diferenciação ou desenvolvimento da célula e são invariáveis com efeitos do meio ambiente, pleiotrópicos e epistáticos, (Agarwal *et al.*, 2008).

Um marcador molecular pode ser codominante ou dominante. Marcadores codominantes são mais informativos, conseguem distinguir alelos homocigoto e heterocigoto e os marcadores dominantes acessam regiões polimórficas, porém não conseguem distinguir os alelos, de forma que o resultado da amplificação é ausência ou presença da banda num determinado loco (Lopes *et al.*, 2002).

Vários tipos de marcadores moleculares de DNA estão disponíveis, diferenciando quanto habilidade de detectar polimorfismo, custo de aplicação, facilidade de uso e

confiabilidade dos resultados. Esses marcadores vêm sendo utilizados em estudos de diversidade genética, *fingerprinting*, análise de pureza, melhoramento assistido, mapeamento genético, marcação de genes (Borém *et al.*, 2009). Além disso, o uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento pode ser associado com características fenotípicas de uma dada espécie, possibilitando um melhor entendimento de como o genoma está organizado e como os genes estão se expressando no ambiente em que vive.

Os estudos de genética de populações avançaram significativamente na década de 60, a partir do desenvolvimento de técnicas de marcadores moleculares. Há uma variedade de ferramentas que podem ser utilizadas em trabalhos de caracterização de diversidade genética, como os marcadores fenotípicos e moleculares: Isoenzimas, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Grande parte desses permite a caracterização de forma rápida e fácil da variabilidade genética nas espécies de interesse (Agarwal *et al.*, 2008).

O marcador RFLP foi a primeira técnica a ser desenvolvida, sua metodologia é complexa e demorada para análise genômica (Agarwal *et al.*, 2008). Vale ressaltar que esse foi o primeiro marcador a ser aplicado em programas de melhoramento vegetal (Alzate-Marin *et al.*, 2005). Com o advento da PCR (*Polymerization Chain Reaction*), outros marcadores foram desenvolvidos, entre eles o RAPD (*Random Amplification Polymorphism DNA*), uma técnica de baixo custo com capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, bastante utilizado em *fingerprinting*, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones (Agarwal *et al.*, 2008). Na caracterização do banco de germoplasma do guaranazeiro com marcadores RAPD,

porém, foi observada pouca diversidade entre os clones, não associando – os com os locais de coleta (Sousa *et al.*, 2003).

As técnicas de PCR, clonagem e sequenciamento de DNA têm possibilitado um rápido acúmulo de informações de genomas e tem contribuído para a caracterização de cultivares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A disseminação do seu uso contribuiu para a descoberta e estudo de diversas classes de seqüências de DNA repetitivos, como os microssatélites.

Os marcadores microssatélites consistem em seqüências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado locus (Salla *et al.*, 2002). A técnica envolve o desenvolvimento de primers específicos, um processo elaborado e caro. Mas, uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se à de RAPD, com exceção dos géis para separar os fragmentos de DNA devem ser de poliacrilamida e esses são de custo mais elevado. A maior vantagem dessa técnica é a distinção dos alelos em homocigoto e heterocigoto, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade (Agarwal *et al.*, 2008). Estudos relatam a aplicação desses marcadores em análise da diversidade genética na bananeira (Amorim *et al.*, 2009), mandioca (Pereira *et al.*, 2007), acerola (Salla *et al.*, 2002). Em guaranazeiro, foram desenvolvidos dez locos microssatélites, sendo que cinco deles apresentaram padrões monomórficos e os outros cinco apresentaram polimorfismo, porém insuficiente para análise de diversidade genética (Atroch *et al.*, 2009b)

Os marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente à proporção que dados de genoma vem sendo disponibilizado, o que contribuiu para o desenvolvimento de técnicas mais avançadas de marcadores conhecido como pós-genômico.

3.8. TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*)

O TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) é um marcador derivado de sequências depositadas em bancos genômicos, voltado para locos específicos ou famílias gênicas. Sua técnica é baseada no uso de dois primers: o fixo e o aleatório. O primer fixo é desenhado a partir de EST (*Expressed Sequence Tag*) e o primer aleatório é uma sequência rica em CG que possibilita o anelamento em regiões de íntrons ou éxons (Hu *et al.*, 2003). Com isso, os *amplicons* gerados pela combinação desses primers estarão relacionados com regiões expressas e, esse diferencial torna o TRAP uma ferramenta valiosa para estudos de diversidade genética em programas de melhoramento (Agarwal *et al.*, 2008). O potencial desse marcador para estudos de diversidade genética foi confirmado em cana-de-açúcar (Alwala *et al.*, 2006), café (Al-Murish *et al.*, 2013), caqui (Luo *et al.*, 2013), trigo (Barakat *et al.*, 2013), espinafre (Hu *et al.*, 2007)

3.9. SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*)

O SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) é uma técnica que utiliza dois primers, o *forward* e o *reverse*, com sequências aleatórias, porém com um motivo de CCGG para *forward* e AATT para *reverse*. Esses motivos aumentam a possibilidade de anelamento dos *primers* em regiões ORFs (*Open Region Frame*) devido às repetições de CG para codificantes de proteínas e AT nas regiões de UTRs (*Untranslated Region*) (Poczai *et al.*, 2013). A técnica combina simplicidade, confiabilidade, sofisticação

moderada e o número relativamente elevado de produtos amplificados e bem definidos. E juntamente com outros marcadores, vem sendo aplicado com sucesso na construção de mapas genéticos, marcação de genes e análise da variabilidade genética (Li *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011).

3.10. Seleção assistida por marcadores moleculares

Em programas de melhoramento, os marcadores moleculares permitem compreender e organizar a variabilidade genética de forma única, isto é, acessando a variabilidade do DNA que não é influenciada pelo ambiente. Uma das vantagens disto é a possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa, de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites, diferenças essas que muitas vezes não podem ser observadas em nível de fenótipo. Outra vantagem é a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em “pools” gênicos, facilitando a escolha de parentais e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelos melhoristas. Como consequência do estudo da variabilidade genética, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (*fingerprinting*) de genótipos de interesse, que podem ser, posteriormente, utilizados para a manutenção da diversidade do germoplasma (Milach *et al.*, 1998).

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material estudado

Foram analisados 60 subamostras clonais do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e seis progênies de meios-irmãos do programa de melhoramento de guaranazeiro da Embrapa Amazônia Ocidental situada no Km 29, da Rodovia AM-010, Manaus-AM. O trabalho foi dividido em duas partes de acordo com o tipo de material estudado. A primeira para testar o potencial dos marcadores TRAP e SRAP usando 60 subamostras do BAG, representando três grupos de genótipos clonais: 18 cultivares clonais divergentes, oito clones similares para caracteres morfoagronômicos (Nascimento-Filho *et al.*, 2001) e 34 genótipos clonais de três origens geográficas (Tabela 2). E a segunda parte se concentrou na análise de diversidade genética de seis progênies de guaranazeiro (PGRN: 305, 207, 70, 319, 64 e 382) selecionadas por Atroch *et al.*, (2009) no programa de melhoramento desenvolvido pela Embrapa Amazônia Ocidental. Foram analisados 40 genótipos de cada progênie utilizada no presente estudo.

Cultivares Clonal		Clones similares	Germoplasma Clonal			
BRS-CG372	BRS- Maués	CMA222	CMA186	CMU385	CMU625	CMU948
BRS-CG505	BRS-Manaus	CMA223	CMA375	CMU389	CMU623	CMU952
BRS-CG608	BRS-Amazonas	CMA224	CMA436	CMU500	CMU628	CIR196
BRS-CG610	BRS-Andira	CMA225	CMA498	CMU502	CMU862	CIR202
BRS-CG611	BRS-Luzeia	CMA227	CMA514	CMU607	CMU872	CIR215
BRS-CG612	BRS-Marabitaná	CMA228	CMA604	CMU609	CMU874	CIR217
BRS-CG648	BRS-Mudurucania	CMA274	CMA831	CMU614	CMU899	CIR819
BRS-CG850	BRS-Cereçaporanga	CMA276	CMA838	CMU617	CMU908	-
BRS- CG882	BRS-Saterê	-	CMU381	CMU619	CMU932	-

* locais de coleta: CMA (Manaus), CMU (Maués) e CIR (Iranduba)

Tabela 2 - Identificação das subamostras clonais do BAG de guaranazeiro da Embrapa Amazônia Ocidental.

4.2. Extração de DNA

As amostras do material vegetal foram preparadas para extração de DNA no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. A extração do DNA genômico seguiu as recomendações de Doyle e Doyle (1990) pelo método CTAB 2% com algumas modificações para a espécie. A quantificação foi realizada no Nanodrop e confirmada em gel de agarose 0,8%. A diluição do DNA para uma concentração final de 50ng foi padrão para todas as amostras.

Primer Fixo	Sequências	Homologos	Função
HAP	F: GTATCGGTTCCCTCCTCACA R: GCATTATTCGGACGACGATT	HAP3 transcriptional-activator	Floração
LEAFY	F: TCTTTTCCTTACCGTCACC R: GTCATGTTCTCTTACGGTGC	Leafy cotyledon1-like protein	Floração
LHY	F: GACAAAGACTGCTGTGCAG R: GTCATCCTCTGTCCATCGT	Late elongated hypocotyl-lhy	Controle da Floração
AUX	F: TACTCGTTGGTGACGATCCA R: CACAGACCCCGCCTTATAAA	Auxin response factor	Crescimento Vegetal
AUX-A	F: CAGCAGTATGGACTTGCCAA R: CATCATCACCCGCTTGTATG	Auxin/aluminum-responsive protein	Crescimento Vegetal
AUX-I	F: TAAGGCAGCATTTACCCAGG R: CCACAAGGACCACTCCAAC	Auxin-induced protein	Crescimento Vegetal
CYST	F: AAGAGGTGGTCATGGTCCTG R: CACTCTCGCAACTCCAACA	Cysteine proteinase inhibitor	Desenvolvimento da planta
CYST	F: GGTGAAGCCATGGATGAATT R: TGAGAGTCCTTGCAGTCGTG	Cysteine proteinase inhibitor	Desenvolvimento da planta

Tabela 3 - Lista dos *primers* fixos *forward* (F) e *reverse* (R) desenhados e testados em guaranazeiro.

4.3. Marcador TRAP

Para análises com marcador TRAP, foram desenvolvidos primers fixos a partir de ESTs, depositadas em banco genômicos do guaraná. Para o desenho dos primers, utilizou-se a ferramenta da bioinformática *Primer3*. As sequências dos primers foram relacionadas a regiões expressas envolvidas no crescimento, desenvolvimento e floração do guaranazeiro (Tabelas 3).

Das 96 combinações testadas entre 16 primers fixos e seis aleatórios, foram selecionadas cinco por produzirem locos polimórficos, visivelmente fortes e reprodutíveis para análise de guaranazeiro (Tabela 4).

Primer Fixo	Primer Aleatório	T _m
AUXAR (CATCATCACCCGCTTGTATG)	T13 (GCGCGATGATAAATTATC)	53
AUXR (CACAGACCCCGCCTTATAAAA)	T03 (CGTAGCGCGTCAATTATG)	52
AUXR (CACAGACCCCGCCTTATAAAA)	T13 (GCGCGATGATAAATTATC)	52
CYSTF (AGGAGGTGGTCATGGTCCTG)	T03 (CGTAGCGCGTCAATTATG)	54
CYSTF (AGGAGGTGGTCATGGTCCTG)	T14 (GTCGTACGTAGAATTCCT)	55

Tabela 4 - Combinações dos *primers* TRAP utilizados nas análises de diversidade do germoplasma clonal e das progênes de guaranazeiro do programa de melhoramento da Embrapa-AM.

As reações de PCR foram padronizadas e otimizadas seguindo o protocolo já descrito por Hu e colaboradores (2003) com modificações para a presente espécie. Os ajustes foram nas concentrações dos reagentes e temperatura de anelamento para amplificação de cada combinação de *primer*. As reações foram preparadas para o volume final de 15µL, com as seguintes concentrações: 1X de tampão; 1,5 mMol de Cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,8 mMol de dinucleotídeos tri-fosfatados (dNTP); 50ng de DNA; 2,25 pMol de *primer* Fixo e 1,5 pMol de *primer* Arbitrário e 1U de enzima (PROMEGA). O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por cinco ciclos de 94°C por 45 segundos, 35°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Outros 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (T_m) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Extensão a 72°C por 7 minutos.

4.4. Marcador SRAP

Para a técnica SRAP foram escolhidos primers descritos na literatura por Li *et al.* (2001), sendo dez *Forward* e dez *Reverse*, combinados e testados em clones de

guaranazeiro. Oito combinações foram selecionadas para o presente estudo pelo polimorfismo produzido e pela resolução das bandas em gel (Tabela5).

<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Tm
Me02 (TGAGTCCAAACCGGAGC)	Em05 (GACTGCGTACGAATTAAC)	53
Me04 (TGAGTCCAAACCGGACC)	Em03 (GACTGCGTACGAATTGAC)	52
Me05 (TGAGTCCAAACCGGAAG)	Em01 (GACTGCGTACGAATTAAT)	51
Me05 (TGAGTCCAAACCGGAAG)	Em03 (GACTGCGTACGAATTGAC)	55
Me01 (TGAGTCCAAACCGGATA)	Em10 (GACTGCGTACGAATTGAC)	54
Me10 (TGAGTCCTTTCCGGTCC)	Em07 (GACTGCGTACGAATTCAA)	52
Me15 (TGAGTCCAAACCGGCAT)	Em03 (GACTGCGTACGAATTGAC)	50
Me19 (GACTGCGTACGAATTCAA)	Em07 (GACTGCGTACGAATTCAA)	53

Tabela 5 - Combinações dos *primers* SRAP utilizados nas análises de diversidade do germoplasma clonal e das progênes de guaranazeiro do programa de melhoramento da Embrapa-AM.

A padronização das reações de PCR seguiu as recomendações de Li *et al.* (2001) com modificações para o guaranazeiro. O preparo do mix foi realizado para um volume final de 15 μ L com as seguintes concentrações: 1X de tampão; 1,5 *mMol* de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$); 0,8 *mMol* de dinucleotídeos tri-fosfatado (dNTP); 50ng de DNA; 0,33 *pMol* de cada *primer* e 1U de enzima (PROMEGA). O programa de amplificação foi desnaturação a 94°C por 2 minutos, amplificação em duas etapas, uma com cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, outra com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento (T_m) por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 7 minutos.

4.5. Eletroforese em gel de agarose

As separações dos produtos da amplificação foram realizada através da eletroforese horizontal em gel de agarose tratados com brometo de Etídio. A concentração do gel variou conforme o marcador, sendo 2% para o TRAP e 1,5% para o SRAP. Os géis foram visualizados e fotografados no transluminador de UV e as

imagens capturadas foram arquivadas em computador, para posterior análise dos padrões e contagem de bandas.

4.6. Análises de dados

Para análise de dados, foi construída uma matriz binária para cada marcador, codificada para presença (1) e ausência (0) dos fragmentos amplificados. O valor do PIC (*Polymorphism Information Content*) de cada combinação de *primers* e a média para o marcador foram obtidos através do software *PICcalc* (Nagy *et al.*, 2012). Os níveis de polimorfismo de cada marcador foram calculados através da média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos (Tabela 6).

A diversidade do germoplasma clonal para cada marcador foi estimada pelo coeficiente de similaridade de Dice, usando o *software* NTSYSpc-2.02 com 1000 permutações (Rohlf *et al.*, 2000). A matriz de similaridade obtida foi utilizada para agrupamento em dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Averages*). Foi também realizado teste de Mantel para estimar a coerência dos agrupamentos dos marcadores TRAP e SRAP.

As análises da diversidade genética das progênies foram realizadas utilizando o *software* Popgene versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) e o percentual da variação genética dentro e entre as progênies estimadas pela AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) usando o *software* Genalex (Peakall *et al.*, 2012).

5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do germoplasma clonal

As cinco combinações de *primers* do TRAP produziram 79% de polimorfismo ao amplificarem 136 bandas de 200 a 800 pares de bases. A média de locos produzidos por combinação foi de 27,2, sendo AuxR+T13 a combinação que produziu maior número de locos (38). Quanto aos níveis de polimorfismo, as combinações AuxR+T03(97%) e CystF+T03(55%) foram as que apresentaram o maior e o menor nível de polimorfismo (Tabela 6).

	Combinação dos primers	LT	LP	P (%)	PIC
TRAP	AuxAr/T13	19	13	68,5%	0,31
	AuxR/T03	32	31	97%	0,36
	AuxR/T13	38	33	87%	0,35
	CystF/T03	22	12	55%	0,29
	CystF/T14	25	18	72%	0,33
SRAP	Me02/Em05	16	13	81%	0,37
	Me04/Em03	17	14	82%	0,37
	Me05/Em01	14	10	71%	0,37
	Me05/Em03	14	10	71%	0,29
	Me01/Em10	10	7	70%	0,37
	Me10/Em07	19	13	68%	0,35
	Me15/Em03	18	13	72%	0,35
	Me19/Em07	14	11	79%	0,34

LT=Locos totais; LP=Locos polimórficos; P=nível de polimorfismo.

Tabela 6 - Níveis de polimorfismos e valor do PIC, apresentados pelas combinações dos *primers* do TRAP e SRAP usados na análise de diversidade genética em germoplasma clonal de guaranazeiro.

O PIC mede o conteúdo da informação como capacidade do marcador em distinguir genótipos, não é uma medida de diversidade, porém alguns estudos o consideram, por estar relacionada com a heterozigosidade de um loco (Laurentin *et al.*, 2009). Em marcadores dominantes o valor do PIC pode chegar a 0,5 no máximo, uma vez que o mesmo não possui a capacidade de distinguir alelos homozigotos e heterozigotos (Suman *et al.*, 2008). Considerando o TRAP, os valores de PIC obtidos variaram

conforme as combinações de *primers*, apresentando uma amplitudes de 0,36 para AuxR+T03 e 0,29 para CystF+T03. A média foi de 0,33, valor similar àqueles encontrados pelo mesmo marcador em cultivares de cana-de-açúcar (Alwala *et al.* 2006b) e superior quanto aos valores obtidos em 30 genótipos de cana (PIC=0,24) descrito por Alwala *et al.* (2006a) e em 82 cultivares de cana do Brasil (PIC=0,28) revelados por Creste *et al.*(2010), confirmando assim a eficácia desse marcador para estudos em guaranazeiro.

O percentual de polimorfismo encontrado pelo TRAP no presente trabalho foi próximo daqueles encontrados em estudos de diversidade da cana-de-açúcar (Alwala *et al.*, 2008; Devarumath *et al.*, 2013). Comparando com outros estudos, o polimorfismo do presente trabalho foi superior aos níveis encontrados em espécies cultivadas (Hu *et al.*, 2005), em poliplóides (Barakat *et al.*, 2013) e germoplasma (Hu *et al.*, 2007). Porém, inferior quando comparadas aos apresentados em espécies cultivadas e selvagens (Zhang *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013). O percentual de polimorfismos gerados pelas combinações dos primers AuxAR, AuxR e CystF indicam diferenças nas regiões codantes relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do guaranazeiro, podendo ser associado ou não, com características fenotípicas do guaranazeiro apresentadas no campo. Estas associações é uma das vantagens apresentada pelo TRAP em programas de melhoramento e seleção assistida por marcadores (Barakat *et al.*, 2013).

As oito combinações de primers do SRAP produziram 122 locos entre 100 a 700pb com 74,5% de percentual de polimorfismo. O nível desse percentual variou de 82% (Me04+Em03) e 68% (Me10+Em07). A média de locos produzidos por combinação foi 15,25 sendo Me10+Em07(19) e Me01+Em10(10) representaram a amplitude da quantidade de locos. Quanto ao valor do PIC obtido na presente análise 50% das

combinações (Me02+Em05, Me04+Em03, Me05+Em01 e Me01+Em10) apresentaram um PIC de 0,37 e a combinação Me05+Em03 apresentou o menor valor de PIC (0,29). A média entre combinações do marcador SRAP ficou em torno de 0,35 (Tabela 6).

O percentual de polimorfismo revelado pelo marcador SRAP (74,5%) foi superior aos níveis observados em germoplasma de amora (71,1%) descrito por Zhao *et al.*, (2009), em cultivares de tomate (55,10%) encontrado por Ruiz *et al.*, (2005) e cultivares de plantas ornamentais (65%) encontrados por Yang *et al.*, (2012). Além disso, o número de combinações de primers descritos nos trabalhos citados acima foram bem maiores, numa proporção de 100% ou mais das oito combinações utilizadas na presente análise, indicando o potencial desse marcador para estudo de diversidade, inclusive em guaranazeiro. Esse potencial foi confirmado pelo valor PIC (0,35) que foi superior quando comparado com aqueles observado em germoplasma de cana-de-açúcar e amora (0,22/0,13) respectivamente (Suman *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2009).

O SRAP é um sistema de marcador que, apesar de utilizar primers aleatórios, estes se anelam a regiões do genoma associadas a transcritos de proteínas, características estas comprovadas com o sequenciamento de seus produtos de PCR (Amar *et al.*, 2011). Além disso, ele pode ser associado com outros marcadores (Al-murish *et al.*, 2013), sendo aplicados com frequência em estudos de diversidade genética, genotipagem, *fingerprinting*, construção de mapas genéticos e marcação de genes (Zhao *et al.*, 2009).

Na análise combinada dos marcadores o coeficiente de similaridade de Dice variou de 0,64 a 0,87, sendo os clones CMU389, CMU952 e CMA514 os mais divergentes e os clones CMA227 e CMA276 os mais similares (Figura 3). Houve a formação de quatro grupos, sendo o grupo um (G1) o mais importante por concentrar a maior parte do material estudado (81%).

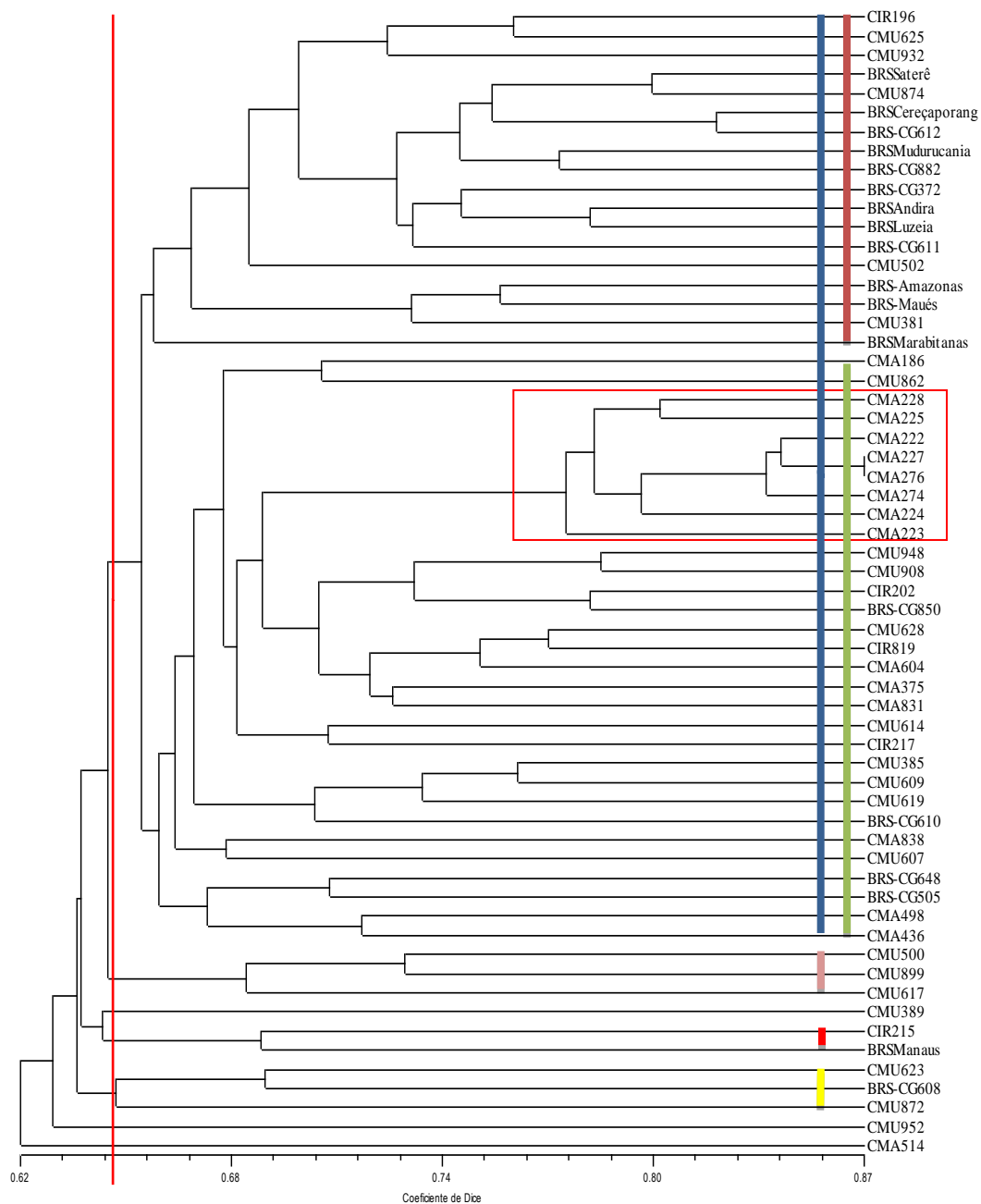


Figura 3 - Dendrograma da análise combinada dos marcadores TRAP e SRAP, baseado no coeficiente de similaridade de Dice, gerado pelo método UPGMA.

O grupo dois (G2) foi composto por três germoplasma clonal, CMU500, CMU899 e CMU617, todos providos do município de Maués - AM. O grupo três (G3) composto pelo germoplasma clonal CIR215 e pela cultivar BRS-Manaus. E o grupo quatro (G4)

composto por dois germoplasma clonal (CMU623 e CMU872) e a cultivar clonal BRS-CG608 (Figura 3).

O grupo um (G1), formado por 49 das 60 subamostras clonais, dividiu-se em dois subgrupos (Sub1 e o Sub2). O Sub1 agrupou 30% de todo material estudado, sendo que 12 das 18 cultivares clonais divergentes analisadas se encontravam nesse subgrupo (Sub1). E o Sub2 agrupou 52% de todo material estudado, sendo quatro cultivares divergente (BRS-CG: 850, 610, 648 e 505) e 27 germoplasma clonais. Dentre esses germoplasma clonais, houve o agrupamento de oito clones similares para caracteres morfoagronômicos CMA (228, 225, 222, 227, 276, 274, 224 e 223) os mesmo encontrados por Nascimento-Filho *et al.*, (2001).

O coeficiente de similaridade de Dice tem sido usado com frequência em estudos de diversidade de germoplasma e cultivares (Laurentin *et al.*, 2009). O resultado obtido na presente análise revelou um alto grau de similaridade entre as subamostras clonal, maiores que 0,60, porém, não foram observados materiais repetidos apesar dos clones CMA227 e CMA276 apresentaram um grau de similaridade igual (0,87), considerando que ainda existem 0,13 de distinção entre elas.

Foi possível observar também três germoplasma clonal divergente (CMU389, CMU952 e CMA514) e indicá-los como progenitores dos possíveis cruzamentos existentes no programa de melhoramento do guaranazeiro. Quantos aos oito clones similares CMA (228, 225, 222, 227, 276, 274, 224 e 223), recomendam-se avaliações que possam diferenciá-las, caso não haja diferença, sugere-se que selecione apenas um, o clone CMA223, por ser a mais divergente entre eles, uma vez que em programas de melhoramento não é viável manter genótipos similares ou ocorrência de duplicação de material.

Os marcadores TRAP e SRAP apresentaram resultados semelhantes, porém a combinação dos dois marcadores melhorou a eficácia para a avaliação da diversidade e relações genéticas do germoplasma e das cultivares de guaranazeiro. Seu alto poder de resolução, juntamente com o fato de que seus produtos da amplificação podem acessar regiões gênicas ou relacionadas a genes, fazem dos mesmos uma importante ferramenta a ser aplicadas no processo de seleção assistida em programas de melhoramento, mesmo em espécies com base genética estreita. Os resultados obtidos fornecem uma base para futuros estudos sobre relações filogenéticas do banco de germoplasma, assim como na identificação de possíveis clones a serem melhorado e recomendado como cultivares, além de auxiliar em estratégias de melhoramento que visam aumentar a produtividade do guaranazeiro na região.

5.2. Análises das progênes de meios irmãos do guaranazeiro

Nas progênes, o TRAP gerou 154 locos com 85% de polimorfismo. As combinações, AuxR+T03 e CystF+T03, foram as que apresentaram maior (97%) e menor (81%) nível. A média de locos produzidos foi de 30,8/combinção de *primers*. Os pares AuxR+T13 produziram 44 bandas enquanto CystF+T03 produziram 23 bandas, com nível de polimorfismo de 86% e 70%, respectivamente. O SRAP gerou 128 locos com 75% de polimorfismo. As combinações Me04+Me03 e Me10+Em07 apresentaram polimorfismo máximo (82%) e mínimo (68%) gerado pelo marcador. A média de locos entre as combinações de *primers* foi de 16, sendo o maior número locos observado em Me10+Em07 (19). Para ambos marcadores, o tamanho dos fragmentos amplificados foram entre 100 a 800 pb e o valor PIC variou entre 0.31 a 0.37 para o TRAP e 0,30 a 0,37 para o SRAP (Tabela 7).

	Combinação de primers	LT	LP	P (%)	PIC
TRAP	AuxAr/T13	27	22	81%	0,37
	AuxR/T03	33	32	97%	0,37
	AuxR/T13	44	38	86%	0,33
	CystF/T03	23	16	70%	0,31
	CystF/T14	27	23	85%	0,35
SRAP	Me02/Em05	16	13	81%	0,37
	Me04/Em03	17	14	82%	0,37
	Me05/Em01	18	14	77%	0,37
	Me05/Em03	14	10	71%	0,30
	Me01/Em10	12	9	75%	0,37
	Me10/Em07	19	13	68%	0,35
	Me15/Em03	18	13	72%	0,35
	Me19/Em07	14	11	78%	0,34

LT=Locos totais; LP=Locos polimórficos; P=nível de polimorfismo.

Tabela 7 - Nível de polimorfismo e valor do PIC apresentados pelas combinações dos primers do TRAP e SRAP, usado na análise de diversidade genética em seis progênes de guaranzeiro.

Considerando o marcador TRAP, as medidas de diversidade genética variaram pouco entre as progênes estudadas. A média de diversidade de Nei (H) foi de 0.18 e o índice de Shannon (I) de 0.26. Observou-se que as progênes PGRN305 e PGRN70 apresentaram maiores índices de diversidade genética ($H_o = 0.19$ e $I = 0.28$) enquanto a progênie PGRN64 apresentou o nível mais baixo de diversidade ($H_o = 0.16$ e $I = 0.24$).

No SRAP, as médias de diversidade genética entre as progênes foram de 0.24 e 0.35 pelo índice de Shannon. As progênes PGRN305 e PGRN207 apresentam os maiores índices de diversidade ($H = 0.26/ I = 0.37$) e a progênie PGRN64 obteve o menor ($H = 0.22$ e $I=0.31$). Baseada na análise combinada dos marcadores, a diversidade genética de Nei (H) foi de 0,20 e o índice de Shannon (I) de 0.30. A progênie PGRN207 apresentou maiores índices de diversidade ($H= 0,22$ e $I=0,32$) enquanto PGRN64 apresentou os menores índices ($H= 0,18$ e $I=0,27$) (Tabela 8).

Marcador	Progênes	Na	Ne	H	I
TRAP	PGRN 305	1.55±0.49	1.32±0.37	0.19±0.20	0.28±0.28
	PGRN 207	1.49±0.50	1.28±0.35	0.17±0.19	0.25±0.28
	PGRN 70	1.49±0.50	1.33±0.40	0.19±0.21	0.28±0.30
	PGRN 319	1.48±0.50	1.31±0.38	0.18±0.20	0.27±0.29
	PGRN 64	1.43±0.50	1.28±0.37	0.16±0.20	0.24±0.29
	PGRN 382	1.48±0.50	1.33±0.40	0.18±0.21	0.27±0.30
	Média	1.48	1.30	0.18	0.26
SRAP	PGRN 305	1.61±0.49	1.47±0.41	0.26±0.22	0.37±0.31
	PGRN 207	1.61±0.49	1.47±0.41	0.26±0.21	0.37±0.30
	PGRN 70	1.61±0.49	1.46±0.41	0.25±0.21	0.37±0.30
	PGRN 319	1.55±0.50	1.44±0.43	0.24±0.23	0.35±0.32
	PGRN 64	1.52±0.50	1.40±0.41	0.22±0.22	0.31±0.31
	PGRN 382	1.54±0.50	1.45±0.43	0.24±0.23	0.34±0.32
	Média	1.57	1,44	0.24	0.35
TRAP & SRAP	PGRN 305	1.54±0.50	1.37±0.40	0.21±0.21	0.30±0.30
	PGRN 207	1.58±0.49	1.40±0.40	0.22±0.21	0.32±0.30
	PGRN 70	1.54±0.50	1.39±0.40	0.21±0.22	0.31±0.30
	PGRN 319	1.52±0.50	1.39±0.42	0.21±0.22	0.31±0.31
	PGRN 64	1.47±0.50	1.33±0.40	0.18±0.21	0.27±0.30
	PGRN 382	1.51±0.50	1.37±0.41	0.21±0.21	0.30±0.31
	Média	1.52	1,37	0.20	0.30

Na = número de alelos observados; Ne = números de alelos efetivos; H = Índice de diversidade de Nei; I = Índice de Shannon.

Tabela 8 - Índices de diversidade genética (média e desvio padrão) obtida pelas análises com marcadores TRAP e SRAP e análise combinada em seis progênes do guaranzeiro (*Paullinia cupana*) do programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Ocidental.

Baseadas nas três análises, observou-se que as médias de diversidade encontradas foram próximas, indicando pouca divergência entre as progênes. Como o guaranzeiro é espécie alógama e as progênes são de meio irmão, geneticamente aparentadas, há possibilidade de que esteja ocorrendo endogamia, como consequência baixos índices de diversidade, contribuindo para a homogeneidade dentro das progênes (Borém *et al.*, 2009).

As matrizes de distância e identidade de Nei foram usadas para gerar o dendrograma, considerando cada análise. Baseado no TRAP, o dendrograma separou dois grupos: um com as progênes PGRN305, PGRN207 e PGRN382 e outro grupo formado pelas progênes PGRN70, PGRN319 e PGRN64. Observou-se também, que as

progênies PGRN305 e PGRN207 formaram um subgrupo, sugerindo que elas estão altamente relacionadas (Figura 4).

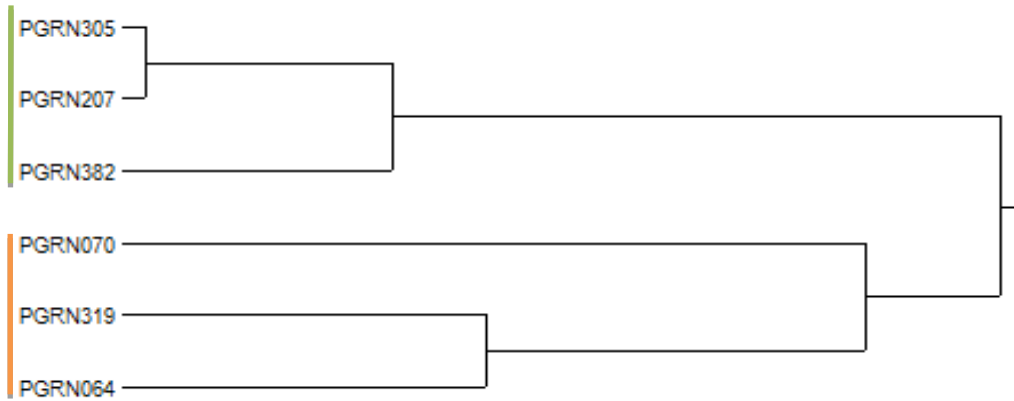


Figura 4 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranazeiro usando marcador TRAP.

O dendrograma gerado pelo marcador SRAP também separou as progênies em dois grupos. O primeiro formado por PGRN305, PGRN207, PGRN70 e PGRN319 e o segundo grupo formado por PGRN64 e PGRN382. Pode-se observar que as progênies PGRN305 e PGRN207 se separaram em um subgrupo, mostrando uma maior similaridade entre elas (Figura 5).

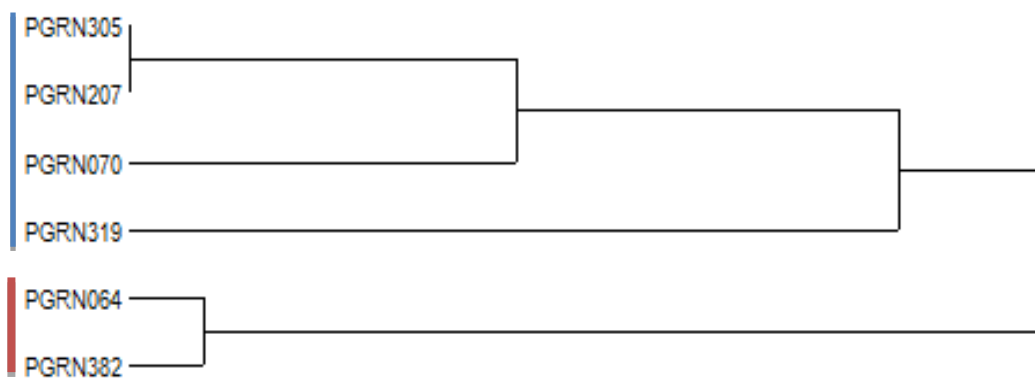


Figura 5 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranazeiro usando marcador SRAP.

Já na análise combinada considerando os dois marcadores, houve a formação de dois grupos: um com as progênies PGRN (305, 207 e 70) e o outro com as progênies

PGRN64 e PGRN382. A progênie PGRN319 não se agrupou, sugerindo que seja a mais distinta entre elas (Figura 6).

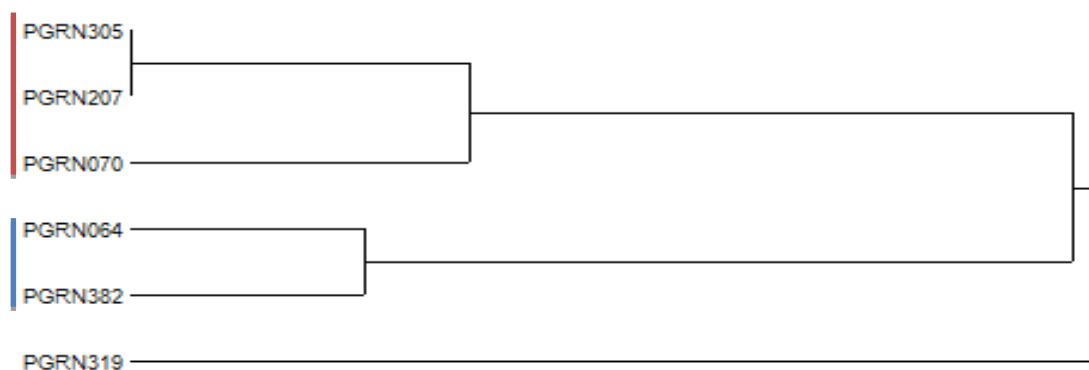


Figura 6 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância de Nei entre progênies de guaranzeiro usando a análise combinada dos marcadores.

Considerando que a distância genética é inversamente proporcional à identidade genética, ou seja, quanto menor for a distância maior será a identidade ou similaridade genética. Baseado nesses conceitos, as progênies PGRN305 e PGRN207 são as mais similares e PGRN 319 foi a mais distinta entre as progênies (Liu *et al.*, 2012).

Na análise de variância das progênies (AMOVA), observou-se que a maior variação se encontra dentro das progênies (54%), porém essa diferença é mínima, mostrando que progênies geneticamente aparentadas, por isso, quase não se diferenciaram (Figura 7).

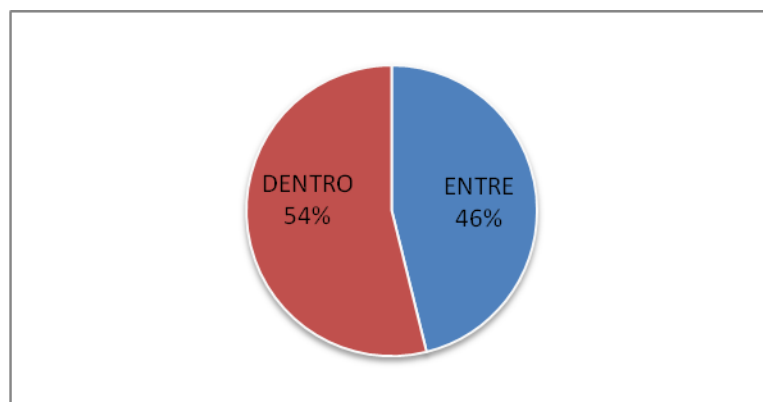


Figura 7 - Percentual de variância molecular AMOVA dentro e entre as progênies de guaranzeiro

Em geral, os resultados obtidos pelos presentes marcadores revelaram uma estreita diversidade entre as progênies, porém, não pode-se afirmar que o guaranazeiro não possui diversidade suficiente para programas de melhoramento pois deve se considerar que os marcadores moleculares usados no presente estudo acessaram uma determinada região do genoma. Além do mais, o guaranazeiro apresenta variabilidade fenotípica em campo o que possibilita a seleção dos mesmos nos programas de melhoramento tanto clonal quanto populacional (Atroch *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Gulsen *et al.*,(2009) indicam que a diversidade genética pode está relacionada com o nível de ploidia da espécie, porém em guaranazeiro esta associação ainda não foi entendida. O fato é que o número de combinações de primers de ambos marcadores, aplicados no presente estudo foi pouco e insuficiente quando comparados com outros estudos que obtiveram ampla diversidade em poliplóides. Além do mais, não dá para sugerir se a diversidade aumenta com o nível de ploidia em guaranazeiro, pois o mesmo não apresenta outros níveis de ploidia que possa comparar.

Avaliações em torno das progênies PGRN305 e PGRN207 são necessárias para diferenciá-las, pois em todas as análises elas se apresentaram altamente relacionadas, sugerindo que se trata de uma única progênie. E destacar a PGRN319 por apresentar os maiores índices de diversidade e maior distância genética, sendo a progênie que mais agrega diversidade dentro do melhoramento. Além disso, pode-se indicar as progênies PGRN305 ou PGRN207 e PGRN319 como possíveis progenitores para seleção recorrente, pois quanto mais divergentes forem os genitores, maior a variabilidade resultante da população segregante e maior a probabilidade de reagrupar os alelos em novas combinações favoráveis (Ferreira *et al.*, 2012).

E, por fim, recomenda-se o TRAP e o SRAP como marcadores a serem utilizados em estudos genéticos nos programas de melhoramento, eficazes por acessarem regiões relacionadas a genes, e os dados obtidos podem ser associados às características fenotípicas. Indicando-os para estudos de diversidade genética, genotipagem, mapeamento gênico, inclusive para seleção assistida por marcadores em guaranazeiro.

6.0. CONCLUSÃO

Em guaranazeiro, o conhecimento sobre a diversidade genética é importante para a conservação e melhoramento da espécie, uma vez que o mesmo apresenta poucos estudos baseados em dados obtidos por marcadores moleculares. Considerando-o um poliplóide complexo com base genética relativamente estreita, faz-se necessário um número elevado de marcador/primers para a maior cobertura do seu genoma e o entendimento sobre sua diversidade. Os marcadores TRAP e SRAP foram eficazes para separar as 18 cultivares divergentes e agrupar os oito clones similares para caracteres morfoagronômicos. Recomenda-se análises em torno dos clones CMU389, CMU952 e CMA514, os quais podem revelar se a diversidade encontrada no presente trabalho está associada a alguma característica fenotípica que as diferenciam em campo. Quanto às progênies, os dados da presente análise demonstraram uma alta relação entre elas, ao apresentarem pouca diversidade. Ressalta-se que as progênies são de meio-irmão, sendo a matriz progenitora comum entre os genótipos. Assim, pode-se concluir que as estimativas de similaridade genética com base em marcadores molecular fornecem informações precisas que podem ser usados no programa de melhoramento do guaranazeiro.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, M.; Shrivastava, N.; Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(0): 617–631.
- Al – Murish, T.M.; Elshafei, A.A.; Al-Doss, A.A.; Barakat, M.N. (2013). Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11 (2): 411-416.
- Alzate-Marin, A.L.; Cervigni, G.D.L.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia brasileira*, 30(4): 333-342.
- Alwala, S.; Suman, A.; Arro, J.A.; Veremis, J.C.; Kimbeng C.A. (2006a). Target region amplification polymorphism (TRAP) for accessing Genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Science*, 46(1): 448-455.
- Alwala, S.; Kimbeng, C.A.; Gravois, C.A.; Bischoff, K.P. (2006b). TRAP, a new tool for sugarcane breeding: comparison with AFLP and coefficient of percentage. *American Society of Sugar Cane Technologists*, 26(0):62–86.
- Alwala, S.; Kimberg, C.A.; Veremis, J.C.; Gravois, C.A. (2008). Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. *Euphytica*, 164(0): 37–51
- Amar, M.H.; Biswas, M.K.; Zhang, Z.; Guo, W.W. (2011). Exploitation of SSR, SRAP and CAPS SNP markers for genetic diversity of Citrus germoplasm collection. *Scientia Horticulturae*. 128(3): 220–227.
- Amorim, E.P.; Lessa, L.S.; Ledo, C.A.S.; Amorim, V.B.O.; Reis, R.V.; Santos-Serejo, J.A.; Silva, S.O. (2009). Caracterização agrônômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(1): 154-161.
- Aneja, B.; Yadav, N.R.; Chawla, V.; Yadav, R.C. (2012). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular Breeding*, 30(0):1635–1648.
- Ângelo, P.C.S.; Atroch, A.L.; Nascimento Filho, F.J.; Sousa, N.R.; Mendonça, W. S.; Fonseca, A.P.A. (2007). Padrões de florescimento de clones de guaranazeiro. *In: Pereira, J.C.R.; Arruda,*

- M.R. (Eds.). Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. p. 244-250.
- Ângelo, 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. (2008). 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(0): 117-124.
- Ângelo, P.C.S.; Moraes, L.A.C.; Sousa, N.R.; Quisen, R.C. (2010). Indução de *calli* em explantes de guaranazeiro visando a embriogênese somática. *Revista Brasileira de Agrociências*, 16(0): 133-137.
- Antonelli-Ushirobira, T.M.; Kaneshima, E.N.; Gabriel, M.; Audi, E.A.; Marques, L.C.; Mello, J.C.P. (2010). Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food and Chemical toxicology*, 48 (0): 1817-1820.
- Atroch, A.L. (2009a). Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (mart.)Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 72p.
- Atroch, A.L.; Nascimento Filho, F.J.; Ângelo, P.C.S.; Freitas, D.V.; Sousa, N.R.; Clement, C.R. (2009b). Domesticação e melhoramento do guaranazeiro. In *Domesticação e Melhoramento de Plantas: Espécies Amazônicas*; Borém, A., Lopes, M.T.G., Clement, C.R., Eds.; Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, p.337-365.
- Atroch, A.L.; Nascimento-Filho, F.J.; Resende, M.D.V.; Lopes, R.; Clement, C.R. (2010). Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. *Revista de Ciências Agrárias*, 53(2): 123-130.

- Barakat, M.N.; Al-Doss, A.A.; Elshafei, A.A.; Ghazy, A.I.; Moustafa, K.A. (2013). Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho agronomic traits. *Australian Journal of Crop Science*, 7(1): 104-111.
- Basile, A.; Ferrara, L.; Del-Pezzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of ethnopharmacology*, 102(0):32-36.
- Bentes, J.L.S.; Costa-Neto, P.Q. (2011). Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. *Acta amazônica*, 41(0): 251-256.
- Borém, A.; Miranda, G.V. *Melhoramento de plantas*. 5. ed.: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2009. 529p.
- Buyyarapu, R.; Kantety, R.V.; Yu, J.Z.; Saha, S.; Sharma, G.C. (2011). Development of New Candidate Gene and EST-Based Molecular Markers for *Gossypium* Species. *International Journal of Plant Genomics*. 11(0): 1-9.
- Campos, M.P.O.; Riechelmann, R.; Matins, L.C.; Hassan, B.J.; Casa, F.B.A.; Del-Giglio, A. (2005). Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(6): 505-512.
- Campos, M.P.O.; Riechelmann, R.; Matins, L.C.; Hassan, B.J.; Casa, F.B.A.; Del-Giglio, A. (2011). Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(6): 505-512.
- Produção do Guaraná Ano 2013- Conab, Brasília, p. 2. Acessado em 15/01/2014. (http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_23_08_21_59_guaranabro2013.pdf)
- Clement, C.R.; Cristo-Araújo, M.; Eeckenbrugge, G.C.; Pereira, A.A.; Piçanho-Rodrigues, D. (2010). Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity*, 2(0): 72-106.
- Creste, S.; Accoroni K.A.G.; Pinto L.R.; Vencosvskv, R.; Gimenes, M.A.; Xavier, M.A. (2010). Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphism in sucrose metabolism and drought tolerance genes. *Euphytica* 172(0):435–446.
- Deverumath, R.M.; Kalwade, S.B.; Bundock, P.; Elliott, F.G.; Henry, R. (2013). Independent target region amplification polymorphism and single-nucleotide polymorphism marker utility in genetic evaluation of sugarcane genotypes. *Plant Breeding*, 132(0): 736–747.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L.; Hortorium, L.H.B. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13-15.

- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília. Embrapa, 220p.
- Ferreira, C.B.B.; Lopes, M.T.G.; Lopes, R.; Cunha, R.N.V.; Moreira, D.A.; Barros, W.S.; Matiello, R.R. (2012). Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 47(3): 378-384.
- Freitas, D.V.; Carvalho, C.R.; Nascimento-Filho, F.J.; Astolfi-Filho, S. (2007). Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* ‘Sorbilis’). *Journal of Plant Research*, 120(0): 399-404.
- Gondim, C.J.E. (1978). Alguns aspectos da biologia reprodutiva do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 83p.
- Gulsen, O.; Sever-Mutlu, S.; Mutlu, N.; Tuna, M.; Karaguzel, O.; Shearman, R.C.; Riordan, T.O. Heng –Moss, T.M. (2009). Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (0):1309-1319.
- Hahn, M.A.; Kleunem, M.V.; Muller-Scharer, H. (2012). Increased phenotypic plasticity to climate may have boosted the invasion success of polyploid *Centaurea stoebe*. *Plos one*, 7(11): 1-8.
- Haskell, C.F.; Kennedy, D.O.; Wesnes, K.A.; Milne, A.L.; Scholey, A.B. (2007). A double blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. *Psychopharmacology*, 21(0): 65–70.
- Hu, J.; Vick, B.A. (2003). Target amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(0): 289-294.
- Hu, J.; Ochoa, O.E.; Truco, M.J.; Vick, B.A. (2005). Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica*, 144(0): 225–235.
- Hu, J.; Mou, B.; Vick, B.A. (2007). Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germoplasma accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(0):1667–1674.
- Khan, I.A.; Bibi, S.; Yasmeen, S.; Seema, N.; Khatri, A.; Siddiqui, M.A.; Nizamani, G.S.; Afghan, S. (2011). Identification of elite sugarcane clones through TRAP. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 261-269.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(0): 277–292.

- Li, G.; Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(0):455–461.
- Li, Y.; Liu, Z.; Wang, Y.; Yang, N.; Xin, X.; Yang, S.; Feng, H. (2012). Identification of quantitative trait loci for yellow inner leaves in chinese cabbage (*Brassicarapa* L. ssp. *pekinensis*) based on SSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 133(0): 10–17.
- Lopes, R.; Lopes, M.T.G.; Oliveira, A.V.; Camargo, L.E.A.; Fungaro, M.H.P.; Carneiro, M.S.; Vieira, M.L.C. (2002). Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 29(0): 56-60.
- Luo, C.; Zhang, F.; Guo, D.Y.; Luo, Z.R. (2013). Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. *Genetic and Molecular Research*, 1(0): 1-11.
- McKey, D.; Elias, M.; Pujol, B.; Duputie, A. (2009). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*, 186(0): 318–332.
- Milach, S.C.K. (1998). Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 5(0): 14-17.
- Nagy, S.; Poczai, P.; Cernák, I.; Gorgi, A.M.; Hegedus, G.; Taller, J. (2012). PICcalc: An online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemistry Genetics*, 50(0): 670-672.
- Nascimento-Filho, F.J.; Atroch, A.L.; Sousa, N.R.; Garcia, T.B.; Cravo, M.S.; Coutinho, E.F. (2001). Divergência genética entre clones de guaranazeiro. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 36(3): 501-506.
- Nascimento Filho, F. J.; Perecin, M. L. R. de A.; Vieira, M. L. C. (2007). Estudos preliminares para a determinação do número de cromossomos do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Mart.)Ducke)). In: Pereira, J. C. R.; Arruda, M. R. de (Eds.). *Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas*. Embrapa Amazônia Ocidental, p. 228-231.
- Nascimento-Filho, F.J.; Atroch, A.L.; Cruz, D.C.; Carneiro, P.C.S. (2009). Adaptabilidade e estabilidade de clones de guaraná. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 44(9): 1138-1144.

- Peakall, R.; Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics Advance Access*, 1(0): 1-3.
- Pereira, H.S.; Santos, J.B.; Abreu, A.F.B.; Couto, K.R. (2007). Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 42(5): 707-713.
- Poczai, P.; Varga, I.; Laos, M.; Bell, A.C.N.; Valkonen, J.P.T.; Hyvonen, J. (2013). Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*, 9(6): 1-31.
- Portela, R.F. (2013). Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. *Lipids in Health and Disease*, 12(12): 1-9.
- Ravi, R.; Yunker, R. (2008). Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). *International journal oh vitamin Nutrition Research*, 78(0): 96 -71.
- Resende, M.D.V. (2002). Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasília, 975p.
- Rohlf, F.J. (2009). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.2. Exeter Software, Setauket, NY.
- Ruiz, J.J.; García-Martinez, S. (2005). Related spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *Journal American Society for Horticultural Science*, 130(1): 88-94.
- Salla, M.F.S.; Ruas, C.F.; Ruas, P.M.; Carpentieri - Pípolo, V. (2002). Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighiae marginata* D.C.). *Revista Brasileira Fruticultura*, 24(1): 15-22.
- Semagn, K. (2002) Genetic relationships among ten endod types as revealed by a combination of morphological, RAPD, and AFLP markers. *Hereditas* 137:149-156.
- Smith, N.; Atroch, A. L. (2010). Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(0): 279-282.
- Sousa, N.R. (2003). Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, 99p.
- Souza, H. G.; Doria, K. M. A. B. V. S; Rosa, M. A. B.; Dias, D.; Furtado, E. L.; Marino, C. L. (2010). Diversidade genética em populações núcleo de *Eucalyptus grandis*. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32(0): 621-625.

- Souza, A.G.C.; Sousa, N.R.; Lopes, R.; Atroch, A.L.; Barcelos, E.; Cordeiro, E.; Oliveira, M.S.P.; Alves, R.M.; Neto, J.T.F.; Noda, H.; Filho, D.F.S.; Yuyama, K.; Almeida, C.M.V.C.; Lopes, M.T.G.; Ohashi, S.T. (2012). Contribution of the institutions in the Northern region of Brazil to the development of plant cultivars and their impact on agriculture. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2(0): 47-56.
- Suman, A.; Kimbeng, A.; Edmé, S.J.; Veremis, J. (2008). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germoplasma collections. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 6(3): 222-231.
- Zhao, W.; Fang, R.; Pan, Y.; Yang, Y.; Chung, J.W.; Chung, I.M.; Park, Y.J. (2009). Analysis of genetic relationships of mulberry (*Morus* L.) germplasm using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(11): 2604-2610.
- Zhao, Y.; (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 2(61): 49–64.
- Zhang, J.J.; Shu, Q.Y.; Liu, Z.A.; Ren, H.X.; Wang, L.S.; Keyser, E. (2012). Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. *Plant Cell Reporter*, 31(0): 299-310.
- Zhou, Y.J.; Wang, X.G.; Zhang, X.Q. (2011). Development and application of a SRAP marker for the identification of sex in *Buchloe dactyloides*. *Euphytica*, 181(0): 261–266.
- Yang, M.; Han, Y.; Xu, L.; Zhao, J.; Liu, Y. (2012). Comparative analysis of genetic diversity of *lotus* (Nelumbo) using SSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 142(0): 185–195.
- Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. (1997). POPGENE, the User-Friendly Shareware for opulation Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology*, University of Alberta, Canada.