

Microssatélites para o Guaranazeiro

Paula Cristina da Silva Angelo

Ana Yamaguichi Ciampi

André Luis Atroch

Doriane P. Rodrigues

Descrição da ação

Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélite que sejam úteis para avaliar a similaridade genética entre clones, atividade incluída no Plano de Ação "Biotecnologias", do projeto de Melhoramento Genético do Guaranazeiro.

Objetivos

Desenvolver "primers" para blocos de repetições encontrados no banco de "expressed sequences tags (ESTs)" de frutos e sementes de guaranazeiro e validá-los quanto à reprodutibilidade e ao padrão de segregação em progênies de guaranazeiro; testar "primers" desenvolvidos para lychia, quanto à transferibilidade para guaranazeiro.

Metodologia

"Primers" foram desenvolvidos por busca em banco de dados de ESTs de frutos com semente de guaranazeiro, utilizando o conjunto de aplicativos STADEN/TROLL. A localização dos blocos de repetições nas sequências de ESTs foi determinada por comparação com sequências ortólogas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). "Primers" desenvolvidos e testados para lychia (VIRUEL E HORMAZA, 2004) foram sintetizados e testados quanto à transferibilidade e polimorfismo em plantas de guaranazeiro. Os marcadores úteis estão sendo utilizados para genotipar acessos do Banco de Germoplasma e tentar determinar a variância interclonal.

Principais resultados

A busca por regiões do genoma do guaranazeiro com blocos de repetições úteis para o desenvolvimento de marcadores foi iniciada em 2004, em projeto coordenado pela Embrapa Amazônia Ocidental, com a colaboração da Universidade Federal do Amazonas (Ufam) e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa), financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam). Das sequências com qualidade suficiente para análise (688) identificadas por enriquecimento de bibliotecas genômicas, 28% apresentaram blocos perfeitos com pelo menos quatro repetições. Os blocos perfeitos com quatro repetições foram significativamente mais frequentes (80% aproximadamente, em média) do que blocos com cinco repetições (13%) e com seis, sete e oito repetições reunidos (menos de 10% cada). Nenhum bloco com número de repetições acima de oito foi encontrado, com exceção de um com 26 repetições AG/TC. A porcentagem média de enriquecimento (blocos complementares à sonda) das bibliotecas foi de 13,8%. Nas ESTs de frutos com sementes foram identificados 4.999 blocos repetitivos, sendo 3.814 blocos de dinucleotídeos, 1.093 blocos de trinucleotídeos e 92 blocos de tetranucleotídeos. Entre os dinucleotídeos, os blocos mais frequentes foram compostos de repetições AG/TC, seguidos por repetições de AC/TG, TA e GC. Trinucleotídeos compostos por combinações de G e A foram prevalentes. Entre os tetranucleotídeos repetidos foram mais frequentes combinações de adenina e timina. As frequências relativas de blocos perfeitos com número maior ou igual a oito repetições de dinucleotídeos foi 0,77% (66/8597) no banco de ESTs e 0,29% (2/688) nas bibliotecas genômicas e não diferiram estatisticamente. O enriquecimento com sondas repetitivas (TC) n e (AC) n foi bem-sucedido para muitas outras espécies de vegetais. Para as análises de diversidade em eucalipto, kiwi, coqueiro, oliveira e maçaranduba, por exemplo, microssatélites com números mínimos de 15, 8, 13 e 9 repetições de dinucleotídeos, respectivamente, e número máximo sempre superior a 20 repetições, em arranjos perfeitos, e também arranjos compostos. Portanto, é possível considerar que blocos perfeitos com mais de oito repetições são raros no guaranazeiro ou são muito difíceis de isolar. Há trabalhos que correlacionam negativamente o número de SSRs com o tamanho do próprio genoma, e o guaranazeiro tem um genoma extenso, composto de 210 cromossomos, provavelmente resultante de alo-autopoliploidização muito recente. Foram testados 10 pares de "primers" para repetições de di, trinucleotídeos e compostas, para

genotipar até 30 acessos do BAG. Os “loci” GRN 01 a 05 foram isolados por enriquecimento de bibliotecas genômicas e os demais foram identificados em bibliotecas de ESTs. Cinco desses pares de “primers” (GRN02, 03, 10, 13 e 16) geraram padrões de genotipagem monomórficos, com até três alelos por indivíduo. É interessante acrescentar que entre esses indivíduos foi incluído pelo menos um representante de cada um dos agrupamentos divergentes definidos por Nascimento Filho et al. (2001), com base em caracteres morfológicos. Para os outros cinco “loci” (GRN01, 04, 05, 07 e 08) foi observado polimorfismo em padrões, por vezes, muito complexos, com número de tipos de alelos variando de um a cinco por indivíduo. Essa complexidade resultou, pelo menos em parte, da poliploidia. “Primers” para mais sete “loci”, indentificados em ESTs possivelmente relacionadas com a produtividade, foram sintetizados. Esses “primers” serão utilizados para genotipar 16 cultivares clonais lançadas, com a expectativa de que haverá menor número de alelos por “locus” e polimorfismo mais útil para análise de diversidade, preservando-se a característica de co-dominância dos marcadores. Este trabalho deverá ser concluído com a colaboração da Profa. Dra. Doriane P. Rodrigues, da Ufam. Os melhores resultados dos testes de transferibilidade de 12 pares de “primers” de *Litchi chinensis*, Nephelieae, Sapindaceae) para guaranazeiro foram a amplificação de fragmentos entre 200 e 300 pb, revelados em géis de poliacrilamida corados com prata, para dois desses pares (LY05 e 8). Até quatro fragmentos amplificados por indivíduo, nessa faixa de tamanho, foram observados para o “locus” LY08 para os genótipos de guaranazeiro testados (CMA 367, CMU 611, CMA 189 e CMA 274), com possível polimorfismo para um deles. LY05 foi monomórfico.