

Análise Preliminar de Marcadores Microsatélite para Guaranazeiro

Paula Cristina da Silva Angelo¹; Manuella Villar Amado²; Maria do Perpétuo Socorro Lira³; André Luiz Atroch¹; Izeni P. Farias⁴; Spartaco Astolfi Filho⁴

Introdução

O guaranazeiro é uma dicotiledônea, nativa da Amazônia e pertencente à família Sapindaceae. O gênero *Paullinia* possui aproximadamente 147 espécies, distribuídas pela América Tropical e Subtropical, das quais nove ocorrem na Amazônia brasileira, inclusive *P. cupana* (H.B.K.), sendo a variedade *sorbilis*, o guaraná verdadeiro, cultivado comercialmente. Os frutos são cápsulas e, após sofrerem beneficiamento primário (torrefação e limpeza), liberam as amêndoas, que são industrializadas. Estima-se que, da oferta nacional de sementes de guaraná, cerca de 70% seja absorvida pelos fabricantes de refrigerantes. A Embrapa Amazônia Ocidental mantém, em Manaus (AM), um Banco de Germoplasma com 250 acessos de guaranazeiro e um programa de melhoramento desta espécie, há mais de vinte anos.

Parte da variabilidade apresentada por plantas de guaranazeiro está disponível para a análise e o aproveitamento racional em projetos de pesquisa nos Bancos de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM. A manutenção dos Bancos de Germoplasma e o reconhecimento da diversidade genética existente entre as plantas lá preservadas é importante para seleção de acessos de coleção para os programas de melhoramento, para a construção de coleções nucleares, para realizar estudos básicos de evolução da espécie e para o planejamento eficiente da introdução de novos acessos na coleção (Moreira et al., 1994).

¹Pesquisador Embrapa Amazônia Ocidental. C.P. 319, CEP. 69011-970 Manaus, Amazonas. paula@cpaa.embrapa.br

²M.Sc., colaboradora eventual do Projeto Biotecnologias para o guaranazeiro/Fapeam.

³Professora Substituta, Universidade Federal do Amazonas.

⁴Professores, Universidade Federal do Amazonas.

Uma maneira de acessar a diversidade genética presente em um grupo de plantas é utilizando marcadores moleculares. Entre os marcadores moleculares, tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores microssatélites possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, são abundantes, apresentam ampla distribuição no genoma e apresentam a possibilidade de detectar variações de seqüência por meio de um ensaio simples (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Grattapaglia, 2001), com a vantagem de que podem ser realizados em laboratório e são independentes dos fatores ambientais (Souza, 2001). Os dados gerados pelo emprego dos marcadores microssatélites na caracterização do grau de diversidade genética entre as plantas dos Bancos de Germoplasma poderão ser correlacionados com dados morfológicos e fisiológicos para apoiar a seleção de acessos utilizados nos programas de melhoramento. Além disto, uma vez desenvolvidos, os marcadores microssatélites poderão ser empregados na identificação das cultivares desenvolvidas por melhoristas e ainda na verificação da pureza varietal de lotes de sementes (Grattapaglia, 2001; Souza, 2001). Dependendo do grau de polimorfismo encontrado em cada espécie, utilizando dados de poucos *loci* microssatélites é possível genotipar populações inteiras de plantas.

Objetivo

Avaliar o número de alelos informativos para a genotipagem de quatro microssatélites de guaranazeiro

Material e Métodos

Foram construídas quatro bibliotecas genômicas enriquecidas para dinucleotídeos CA, CT, CA + CT e AT, utilizando sondas com 12 repetições. O enriquecimento das bibliotecas genômicas e isolamento de microssatélites foi realizado conforme protocolo descrito por He et al. (2003), para a biblioteca enriquecida em AT e por Tenzer et al. (2003) modificado por Gautschi et al. (2001) e Farias et al. (2003) para as demais. Pares de "primers" específicos para quatro *loci* foram sintetizados com média de 20 bases cada "primer" e marcados com fluorocromo HEX. O padrão de tamanho para bandas amplificadas utilizado foi o ET400-ROX (Amersham - GE Healthcare). As genotipagens foram realizadas em seqüenciador automático MegaBASE (Amersham - GE Healthcare) e a análise dos genótipos foi realizada utilizando o aplicativo Fragment Profiler (Amersham - GE Healthcare).

Resultados e Discussão

Das 15 placas de seqüências clonadas com 96 poços cada uma, foram seqüenciadas 10. Entre as seqüências que apresentaram pelo menos 100 bases com qualidade acima de 20 (PHRED) não foi observado microssatélite com mais de 11 repetições. Das seqüências selecionadas da biblioteca enriquecida em CT, 6,1% continham microssatélites, sendo 75% deles do tipo esperado, ou seja, complementares a CT. Da biblioteca enriquecida por CT + CA, 7,3% das seqüências continham microssatélites, sendo 75% destes do tipo esperado. Nos dois casos, 25% dos arranjos eram de repetições AT, não esperadas.

O enriquecimento para CT e CA foi bem sucedido, por exemplo, para eucalipto (Brondani *et al.* 1998), "kiwi fruit" (Huang *et al.*, 1998), coqueiro (Perera *et al.*, 1999); oliveira (Carriero *et al.*, 2002), pequi (Collevatti *et al.*, 1999), carvalho (Hodgetts *et al.*, 2001) e para *Ophrys araneola*, uma Orchidaceae (Soliva *et al.*, 2000). Em eucalipto, "kiwi", coqueiro e oliveira foram encontrados microssatélites com números mínimos de 15, 8, 13 e 9 repetições do dinucleotídeo componente do "núcleo", respectivamente, e número máximo sempre superior a 20 repetições, em arranjos perfeitos e, também, arranjos compostos. Para plantas de arroz (*Oryza sativa*) os microssatélites que apresentaram maior diversidade genética tinham "núcleos" GA (Cho *et al.*; 2004). Para guaranazeiro, não houve diferença significativa entre o número de clones positivos selecionados pelas duas

estratégias de enriquecimento (utilização de sonda CT ou de sondas CT + CA em conjunto) e uma freqüência muito baixa de microssatélites com mais de sete repetições (tanto para arranjos perfeitos e quanto para arranjos compostos) foi encontrada.

Devido à aparente abundância de repetições AT nas bibliotecas enriquecidas para CA e CT, uma nova biblioteca foi enriquecida com sonda (AT)₁₂, foi construída com o objetivo de encontrar microssatélites com um maior número de repetições e perfeitos. No entanto, o resultado do seqüenciamento das primeiras placas desta última biblioteca revelou resultados semelhantes aos obtidos para as bibliotecas anteriores (CT e CA + CT): freqüência baixa de microssatélites "ideais" e alta freqüência daqueles constituídos de quatro repetições do dinucleotídeo AT ou de outros dinucleotídeos. Quando encontrados, os microssatélites mais extensos estavam freqüentemente interrompidos, com organização complexa das bases que constituem o "núcleo" propriamente dito e daquelas que o flanqueiam. Quatro microssatélites foram selecionados, embora não apresentem arranjos do "núcleo" comumente utilizados para genotipagem, pares de "primers" específicos foram sintetizados e utilizados para genotipar plantas de seis acessos do Banco de Germoplasma (Tabela I).

Quadro I. Denominação de quatro *loci* de microssatélites; composição do "núcleo"; tamanho, em pares de bases, das bandas amplificadas (candidatos a alelos - AL) e genótipo de plantas representantes de seis acessos do Banco de Germoplasma do Guaranazeiro (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 2005).

LOCUS	NÚCLEO	AL	CIR203	CMA372	CMU505	CMU609	CMU610	CMU902	
GRN01	(CA) ₆ .(CA) ₃	122							
		124	x					x	
		126	x	x	x	x	x	x	x
		128		x	x	x	x		
GRN03	(AC) ₄ t(TA) ₃ (TG) ₂	165	x	x	x	x	x	x	
		203							
		204							
		207	x	x	x	x	x	x	
		226							
		246	x	x	x	x	x	x	
GRN04	ca(CCA) ₄ ca(CCA)	140							
		218							
		222							
		228							
		231							
		236							
		239							
		242	x	x	x	x	x	x	
GRN05	(TA) ₅ .(AT) ₅	258	x						
		259							
		260							
		261						x	
		262	x	x	x	x	x		
		263							

Obs.: os fragmentos amplificados que apresentaram os maiores picos de intensidade de fluorescência, com tamanho justificado pela localização dos sítios de anelamento dos "primers" na seqüência utilizada como modelo estão marcados com x.

Os alelos encontrados no genoma das seis plantas, que representam os dois maiores picos de fluorescência, ou o maior deles, com tamanho justificado pela localização dos sítios de anelamento dos "primers" (região de abrangência), na seqüência utilizada como modelo (clone da biblioteca enriquecida) estão indicados por "x" no Quadro I.

Há indícios de que o guaranazeiro é espécie poliplóide, com número de cromossomas por célula de ponta de raiz

estimado, preliminarmente, entre 168 e 210 (Nascimento-Filho, F.J., comunicação pessoal). Esta informação permitiu incluir no Quadro 1, como quadrículas coloridas, para cada *locus* um número de marcações para alelos maior que uma (o que seria verificado para homocigotos diplóides) ou duas (o que seria verificado para diplóides heterocigotos), para cada planta. O perfil do *locus* GRN01 da planta do acesso CMU902 é um dos que mais claramente suportam a hipótese de estarem sendo

detectados mais de dois alelos por *locus*: existem quatro picos (com 122, 124, 126 e 128 pares de bases) de fluorescência bem definidos (Figura 1), o que pode ser esperado para indivíduos poliplóides.

A detecção de quatro possíveis alelos neste *locus*, no entanto, não informa qual é o número de cópias de cada um deles. Para as plantas CIR203, CMU505 e CMU610 foram detectados apenas três tipos de alelos (124, 126 e 128 pares de bases) no mesmo *locus*. Para o *locus* GRN03 foram encontrados três picos de intensidade aproximada, na região de abrangência dos “primers” para cada uma das plantas genotipadas e existe a

possibilidade de existirem mais alelos no mesmo *locus*. Para o GRN04, um alelo de cerca de 140 pares de bases, fora da região de abrangência esperada para os “primers” específicos esteve presente como pico bem definido, nos perfis de genotipagem de todas menos uma (CMA372) das plantas. Dentro da região de abrangência dos “primers” para GRN04, a interpretação dos genótipos é dificultada pela diferença extrema de intensidade dos picos de fluorescência que indicam a amplificação de um mesmo fragmentos (alelo 239, por exemplo) em plantas diferentes (Figura 2).

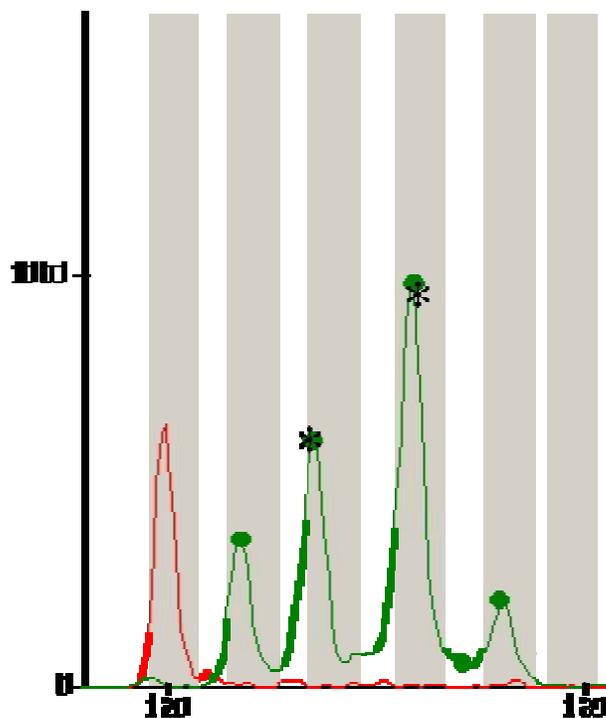


Figura 1. Perfil de genotipagem da planta do acesso CMU902 do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental para o *locus* de microsatélite GRN01. Os picos de fluorescência marcados com asteriscos são os alelos indicados por “x” no Quadro I. Os quatro picos estão marcados com quadrículas coloridas naquele Quadro. O pico representado em vermelho é um dos fragmentos do padrão ET-ROX.

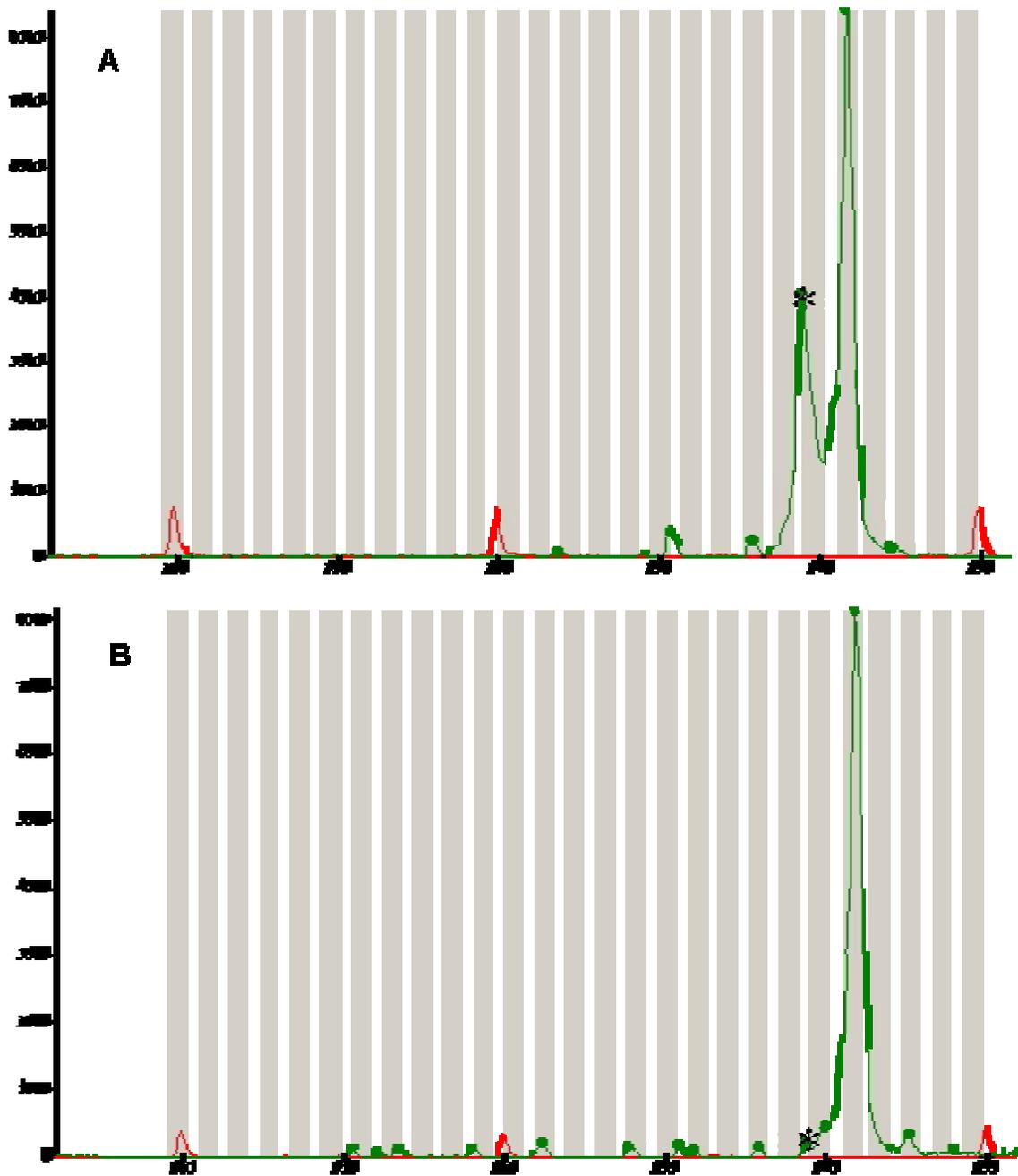


Figura 2. Perfis de genotipagem do *locus* GRN04 para plantas de guaranazeiro. **A** planta de guaranazeiro encontrada no campus da UFAM. **B** planta do acesso CIR203 do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental. O alelo 239 (marcado com asterisco) está presente em intensidades diferentes nos dois perfis. Os picos representados em vermelho são fragmentos do padrão ET-ROX.

A complexidade dos núcleos dos microssatélites analisados e a presença de interrupções são fatores que complicam ainda mais a definição dos genótipos (Quadro I, NÚCLEO). Para o GRN05, por exemplo, as bases que constituem a interrupção do “núcleo” (representadas por um ponto) podem ter contribuído para que alelos com diferença de uma base e não de duas, como esperado para variações do número de repetições de dinucleotídeos, fossem inseridos no Quadro I. Variações de uma e de três bases entre alelos também foram consideradas como hipótese para outros *loci*.

A genotipagem de mais indivíduos, o aprimoramento das condições utilizadas para as amplificações, a repetição das genotipagens e a definição da ploidia do guaranazeiro vão contribuir para elucidar situações como considerar-se a existência de oito alelos para a planta do acesso CIR203 no *locus* GRN04. A busca por microssatélites de núcleo perfeito, que continua, justifica-se pelo objetivo de minimizar esta complexidade.

Situação semelhante, quanto à dificuldade de encontrar microssatélites “ideais” por enriquecimento de bibliotecas genômicas, e a geração de padrões complexos de alelos, foi relatada por Silva (2001), para a cana-de-açúcar que é poliplóide. Para esta espécie, a estratégia que surtiu melhor resultado foi a busca por microssatélites alojados em ESTs (“expressed sequence tags”) de 28 bibliotecas de cDNA construídas para o projeto SUCEST. Foram encontrados 402 *loci* e 20 deles foram utilizados para análises preliminares de alguns genótipos

de duas espécies de cana-de-açúcar e de híbridos cultivados. Buscas do mesmo tipo estão sendo realizadas no banco de ESTs da biblioteca de frutos/sementes do guaranazeiro, mantido pelo Projeto Genoma Funcional/REALGENE.

Agradecimentos

Fapeam, pelo financiamento do projeto. Ufam e Inpa, instituições parceiras na realização das metas. CNPq pela Bolsa para Maria do Perpétuo Socorro Lira. Firmino José do Nascimento Filho, Pesquisador III da Embrapa Amazônia Ocidental, pelas informações sobre a estimativa do número de cromossomas encontrado em células de ponta de raiz do guaranazeiro.

Literatura Citada

- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.**, 97: 816-27.
- CARRIERO, F.; FONTANAZZA, G.; CELLINI, F.; GIORIO, G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSR) in olive (*Olea europaea* L.). **Theor. Appl. Genet.**, 104: 301-7.

CHO, Y.G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; McCOUCH, S.R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. (2004). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, 100:713-22.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. (1999). Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, 83:748-56.

Farias, I.P.; T. Hrbek, H.; Brinkmann, I.; Sampaio, A. Meyer. (2003). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Molecular Ecology Notes**, 3:128-130.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1996). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF. 220p.

Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, Leech SH, Simoes-Wust AP, Ziegler A, (2001). Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. **J Natl Cancer Inst**, 93: 463-71.

GRATTAPAGLIA, D. (2001). Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: Nass, L.L.,

Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C. (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Fundação MT, Rondonópolis/MT.p.967-1010.

HODGETTS, E.B.; ALEKSIUK, M.A.; BROWN, A.; CLARKE, C.; MACDONALD, E.; NADEEM, S.; KHASA, D. (2001). Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species. **Theor. Appl. Genet.**, 102: 1252-8.

HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; GAO, G.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, 3. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/3>.

HUANG, W.G.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. (1998). Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species. **Theor. Appl. Genet.**, 97: 1269-78.

MOREIRA, J.A.N.; SANTOS, J.W.; OLIVEIRA, S.R.M. (1994). **Abordagem e metodologia para a valiação de germoplasma**. Embrapa Algodão, Brasília/DF. 115p.

PERERA, L.; RUSSEL, J.R.; PROVAN, J.; POWELL, W. (1999). Identification and characterization of microsatellite *loci* in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. **Mol. Ecol.**, 8:335-46.

SILVA, J.A.G. (2001). Preliminary analysis of microsatellite markers derived from sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, 24: 155-159.

SOLIVA, M.; GAUTSCHI, B.; SALZMANN, C; TENZER, I.; WIDMER, A. (2000). Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. **Mol. Ecol.**, 9: 2178-9.

SOUZA, A.P. (2001). Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L., Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C. (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Fundação MT, Rondonópolis/MT. p.939-965.

Tenzer, I.; Sd, I.; Morgan, M.; Gessler, C. (1999). Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, 89, 748-753.