

Anais



VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue
Regina Caetano Quisen
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Cheila de Lima Boijink
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara
Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus - AM
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.cpa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*
José Ricardo Pupo Gonçalves
Lucinda Carneiro Garcia
Luis Antonio Kioshi Inoue
Maria Augusta Abtibol Brito
Maria Perpétua Beleza Pereira
Paulo César Teixeira
Raimundo Nonato Vieira da Cunha
Ricardo Lopes
Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (7. : 2010 :
Manaus).
Anais... / editores Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue, Regina Caetano Quisen,
Ronaldo Ribeiro de Moraes e Cheila de Lima Boijink. – Manaus: Embrapa Amazônia
Occidental, 2010.
1 CD-ROM; 4^{ks} pol.

ISBN 978-85-89111-11-9

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. II. Quisen,
Regina Caetano. III. Moraes, Ronaldo Ribeiro de. IV. Boijink, Cheila de Lima. V. Título.

CDD 501

Diversidade Intra e Interespecífica de *Paullinia* spp. com Base em Produtos Amplificados por ERIC-PCR e REP-PCR

Daphne Cristine Bertho da Silva
Nelcimar Reis Sousa
Gilvan Ferreira da Silva
Firmino José Nascimento Filho

Introdução

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie amazônica de elevado valor industrial devido ao conteúdo de cafeína em suas sementes. Nos relatos de domesticação não há registros de associações entre locais de coleta e diversidade genética, também não há registros da existência de populações naturais de guaranazeiro, o que exige maior empenho da pesquisa para definir estratégias de coleta e organização da variabilidade genética cultivada.

Os recursos genéticos são úteis para os programas de melhoramento, tornando-se necessários estudos da variabilidade genética entre e dentro das espécies. O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) é o local onde se encontra toda a variabilidade genética, e, para ser estudado, é preciso fazer avaliação agrônômica e caracterização, que pode ser por descritores morfológicos, botânicos e marcadores moleculares.

A caracterização molecular do germoplasma de guaranazeiro tem sido possível com a utilização de sequências universais (SOUSA, 2003). Os resultados indicaram a existência de pouca variabilidade genética na coleção de clones de guaranazeiro, apesar da poliploidia constatada por Freitas (2007), sugerindo que os métodos utilizados ainda não foram suficientes para discriminar a variabilidade do germoplasma. A continuidade das pesquisas no BAG de guaranazeiro se faz necessária para auxiliar a gestão e utilização da variação existente no programa de melhoramento.

As técnicas de marcadores moleculares disponíveis apresentam vantagens e desvantagens relacionadas com custo, rapidez e reprodutibilidade. O mais acessível em custo é o RAPD, porém apresenta a limitação da baixa reprodutibilidade. Destacam-se

entre os de custo elevado o AFLP e o SSR, porém são mais informativos. Além do custo, os SSR necessitam de desenvolvimento de *primers* específicos (REDDY et al., 2002; SOUFRAMANIEN e GOPALAKRISHNA, 2004). Na ausência de *primers* específicos, têm sido adotadas técnicas que adicionam a vantagem de baixo custo pelo uso de produtos amplificados por *primers* universais.

Os polimorfismos moleculares obtidos por elementos repetitivos podem ser utilizados para detecção de variações genéticas entre e dentro de espécies vegetais, animais e microrganismos, como ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (GILLINGS e HOLLEY, 1997). Os elementos ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) foram descobertos em regiões intergênicas do genoma de eubactéria, são caracterizados como pequenas unidades repetitivas de 127 pb contendo região central altamente conservada com repetições invertidas de 40 pb), enquanto as sequências REP são caracterizadas por serem complementares a unidades repetitivas e conservadas de 35-40pb (VERSALOVIC et al., 1991). Em plantas, as técnicas de ERIC-PCR e REP-PCR não amplificam necessariamente regiões intergênicas, contudo os perfis de bandas obtidos permitem a geração de *fingerprintings*.

O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade intra e interespecífica de *Paullinia* spp. com base em produtos amplificados por ERIC-PCR e REP-PCR.

Material e Métodos

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. Foram

analisadas 13 espécies afins (*Paullinia* spp.) pertencentes ao BAG e 2 clones melhorados de guaranazeiro comercial (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) do Programa de Melhoramento Genético. O DNA foi extraído das 20 amostras de tecidos foliares coletadas para a extração de DNA de acordo com o método CTAB 2% e quantificado no equipamento *Nanodrop*; com base nas concentrações foram feitas as diluições.

Para as reações de amplificação foram utilizados individualmente os *primers*: ERIC1R (5' - ATGTAAGCTCCTGGGGTTCAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGA GCG-3'), e REP1R-I (5'- IICGICGICATCI GGC-3') e REP2-I (5'- ICGICTTATCIGGCC TAC-3'). As reações de PCR serão realizadas em volume de 20 µL contendo 20 ng de DNA genômico, 1X de tampão (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X- 100) 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM de dNTP, 0,5 µM de *primer* e 2U de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação serão: 94 °C por 3 min e seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, e 65 °C por 5 min e extensão final de 65 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Os dados foram analisados no programa NTSYS-pc, v. 2.2.

Resultados e Discussão

Os resultados de qualidade e quantidade de polimorfismo observados em gel agarose 1,5% indicaram que os marcadores ERIC-PCR foram mais eficientes do que o REP-PCR para separar as espécies afins do guaranazeiro cultivado (Figuras 1 e 2). Em razão disso, os marcadores ERIC-PCR foram selecionados para análise de diversidade interespecífica.

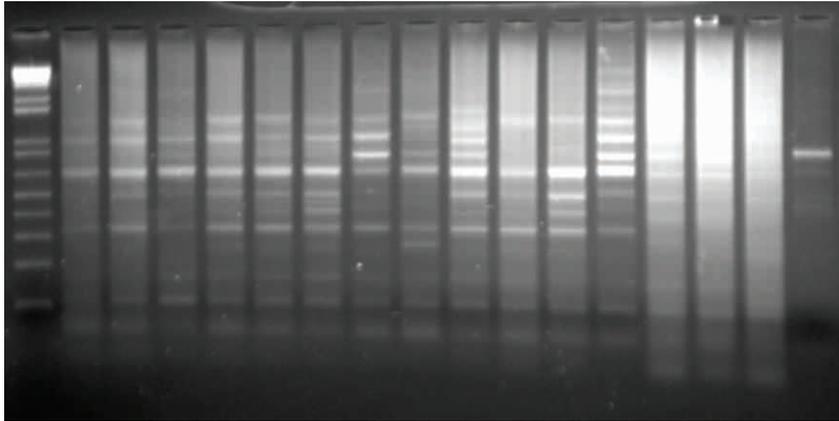


Figura 1. Padrões de REP-PCR para *Paullinia* spp. em gel de agarose 1,5%.

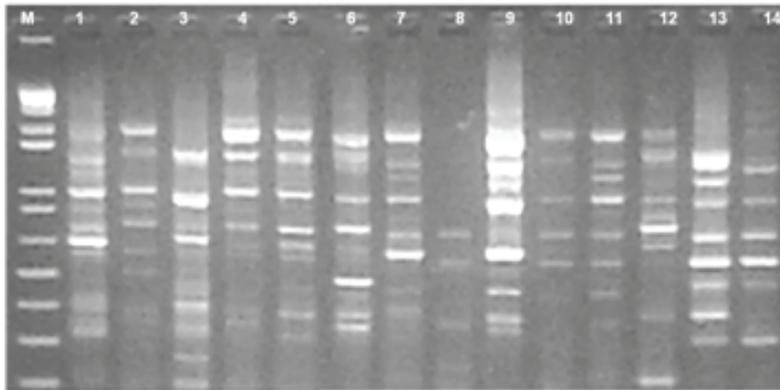


Figura 2. Padrões de ERIC-PCR para *Paullinia* spp. em gel de agarose 1,5%.

A diversidade genética foi estimada com base em 18 bandas polimórficas, com tamanho variando de 200 a 3.000 pb. A similaridade de Jaccard (Fig.3) variou de 0,13 (entre espécies afins) a 0,88 (entre cultivares clonais de guaranazeiro). A análise de agrupamento pelo método UPGMA revelou elevado poder de discriminação da técnica de ERIC-PCR, que foi capaz de separar as espécies afins do guaranazeiro cultivado.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de pesquisa. À Embrapa Amazônia Ocidental, principalmente ao Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio logístico e pela infraestrutura. À Dra. Nelcimar, pela orientação e pela paciência. Aos colegas e técnicos do Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

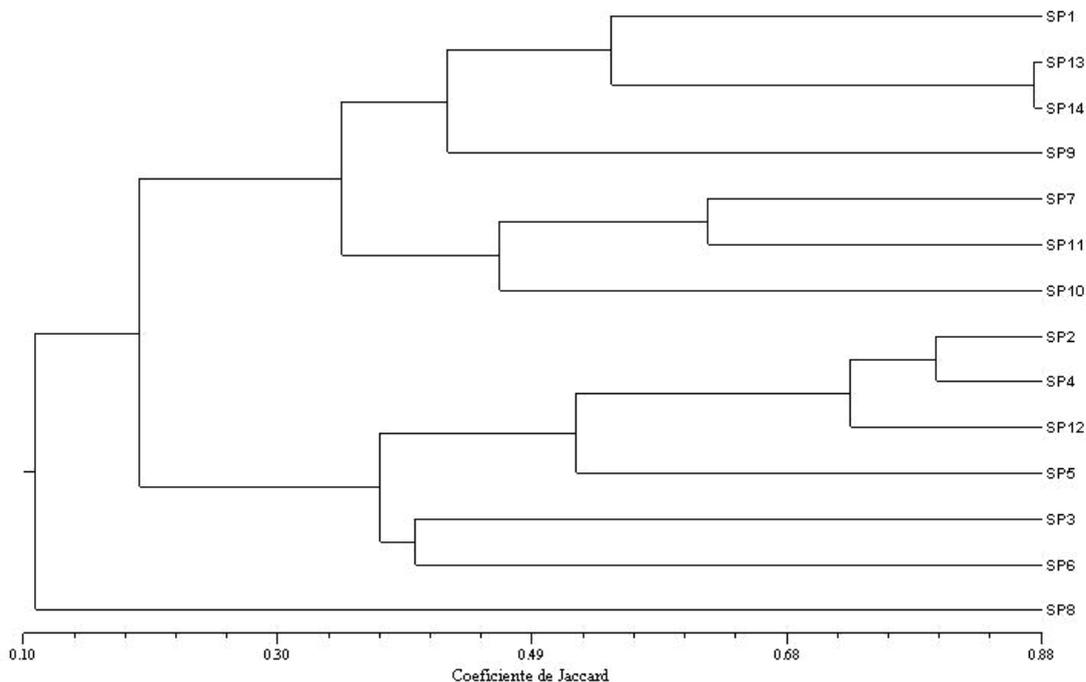


Figura 3. Dendrograma obtido com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Referências

- FREITAS, D. V. de; CARVALHO, C. R.; NASCIMENTO FILHO, F.J. do; ASTOLFI FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* 'Sorbilis'). **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 3, p. 399-404, 2007.
- GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p.17–27, 1997.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. v.128, p. 9-17, 2002.
- SOUZA, N.R. **Variabilidades genéticas e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro**. Lavras, 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.
- STEBBINS, G. **Chromosomal evolution in higher plants**. London, UK: Addison-Wesley. 1971. 216 p.
- SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T.: A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl.Genet.* v. 109, n. 8, p.1687-1693. 2004.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. and LUPSKI, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.