XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura
Bento Gonçalves - RS
22 a 26 de outubro de 2012

DIVERSIDADE GENÉTICA DO GUARANAZEIRO POR MEIO DE RAPD E ISSR

NELCIMAR REIS SOUSA[1]; GILVAN FERREIRA DA SILVA[2]; FIRMINO JOSÉ DO NASCIMENTO FILHO[3]; ANDRÉ LUIZ ATROCH [4]

INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie amazônica de alto valor industrial devido a produção de extrato rico em cafeína utilizado na composição de bebidas energéticas e *blends* de sucos de naturais. A espécie conquistou mercado internacional beneficiada pela origem geográfica e pelos modernos hábitos de consumo de produtos funcionais. A experiência de outras espécies frutíferas tem mostrado que a sustentabilidade do agronegócio de espécies nativas depende fortemente de resultados das pesquisas em genética e melhoramento. A Embrapa Amazônia Ocidental é responsável pela conservação de germoplasma clonal da variabilidade genética do guaranazeiro visando suprir as demandas de conhecimentos necessárias para a obtenção de avanços no programa de melhoramento, visando principalmente a geração de clones e populações superiores em produção e resistência a estresses bióticos e abióticos.

O acesso a diversidade genética intraespecifica tem sido realizada predominantemente por meio da avaliação da produção e caracterização morfo-agrônomica de frutos (NASCIMENTO FILHO et al 2001; SOUSA, 2003). Até o momento, os resultados indicam a existência de pouca variabilidade genética na coleção de clones de guaranazeiro, apesar da poliploidia da espécie. Em função disso, os programas de conservação e melhoramento demandam a continuidade das pesquisas para ampliar o conhecimento da variabilidade genética disponível e direcionar ações de gestão e utilização do germoplasma de guaranazeiro.

Os marcadores moleculares têm ampla aplicação em estudos ecológicos, evolutivos, taxonômicos, filogenéticos e genéticos de espécies vegetais (AGARWAL et al 2008). A decisão de escolha do marcador molecular depende do custo, da capacidade laboratorial, do objetivo da pesquisa e, no caso exclusivo do guaranazeiro, acrescenta-se a inexistência de marcadores específicos disponíveis. Entre os marcadores mais acessíveis, operacionalmente e biologicamente,

[1] Engª Agrônoma , Pesquisadora Embrapa Amazônia Ocidental. Email:nelcimar.sousa@cpaa.embrapa.br
[2] Biólogo Molecular, Pesquisador Embrapa Amazônia Ocidental. Email:gilvan.silva@cpaa.embrapa.br
[3] Engº Agrônomo, Pesquisador Embrapa Amazônia Ocidental. Email:firmino.filho@cpaa.embrapa.br
[4] Engº Agrônomo, Pesquisador Embrapa Amazônia Ocidental. Email:andré.atroch@cpaa.embrapa.br

destacam-se RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat)*.

Nesse sentido, a caracterização genética dos clones de diferentes origens utilizando marcadores moleculares poderá contribuir para o desenvolvimento de novas cultivares de guaranazeiro com ampla base genética, bem como na complementação da identificação grupos de divergentes no Banco de Germoplasma. O objetivo do trabalho foi comparar a identificação de grupos na analise de diversidade genética do germoplasma clonal de guaranazeiro utilizando marcadores RAPD e ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular e utilizou 47 clones da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental com origem de três municípios amazônicos: Iranduba, Maués e Manaus (Tabela 1). O protocolo CTAB de extração de DNA foi otimizado para resolver os problemas de elevada quantidade de polifenóis e oxidação. A amplificação de DNA seguiu o procedimento básico de testes de concentrações e gradientes para otimizar a temperatura de anelamento dos *primers* de ISSR. Os primers selecionados foram 16 primers RAPD e 12 ISSR-UBC. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose e convertidos em uma matriz de 0 (ausência) e 1 (presença). O coeficiente de similaridade de Dice foi estimado e a análise de agrupamento dos clones foi pelo método UPGMA.

Tabela 1 - Origem geográfica, identificação numérica de clones de guaranazeiro analisados utilizando RAPD e ISSR.

Origem geográfica - UF	**Identificação** [+]	**Nº de Clones**
Iranduba - AM	**CIR** (217, 819)	02
Maués - AM	**CMU** (300, 375, 381, 385, 388, 389, 500, 505, 601, 605, 607, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 616, 617, 619, 623, 624, 625, 626, 631, 648, 861, 862, 871, 882, 899, 908, 932, 948, 949	35
Manaus-AM	**CMA** (189, 222, 223, 224, 225, 227, 274, 276, 347, 372,	10
Total		**47**

*CIR (clone de Iranduba), Clone de Maués (CMU) e Clone de Manaus (CMA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de RAPD, dezesseis *primers* geraram um total de 150 bandas polimórficas. O número variou de acordo com o *primer*, com mínimo de cinco (OPA05) e máximo de treze bandas

(OPA09 e OPA20). O intervalo de similaridade interclonal foi de 0,63 a 0,82 e os clones geneticamente mais relacionados foram CMU948 e CMU949. No dendrograma foram identificados cinco grupos compostos por mais de três indivíduos com similaridade aproximada de 0,70. Os três primeiros reuniram a maior parte dos clones, sendo o grupo I formado por treze (CMA189 a CMU619), grupo II por onze (CMA225 a CMU605) e grupo III por sete (CMA223 a CMA611). Os demais clones ficaram isolados ou distribuídos em pequenos agrupamentos (Figura 1A).

Na análise de ISSR, doze primers produziram um total de 130 bandas polimórficas. O número de bandas por *primer* variou de sete *ISSR812 e ISSR835* a 14 (*ISSR808 e ISSR880*). As repetições dos dois *primers* com maior número de bandas foram respectivamente um com âncora $(AG)_8T$ *e* outro sem âncora $(GGAGA)_3$. O coeficiente de similaridade variou de 0,65 a 0,99 e os clones que tiveram similaridade máxima foram CMA227 e CMA276. No dendrograma houve distanciamento do clone CMU614 dos demais clones reunidos em um único grupo com similaridade aproximada de 0,70 (Figura 1B).

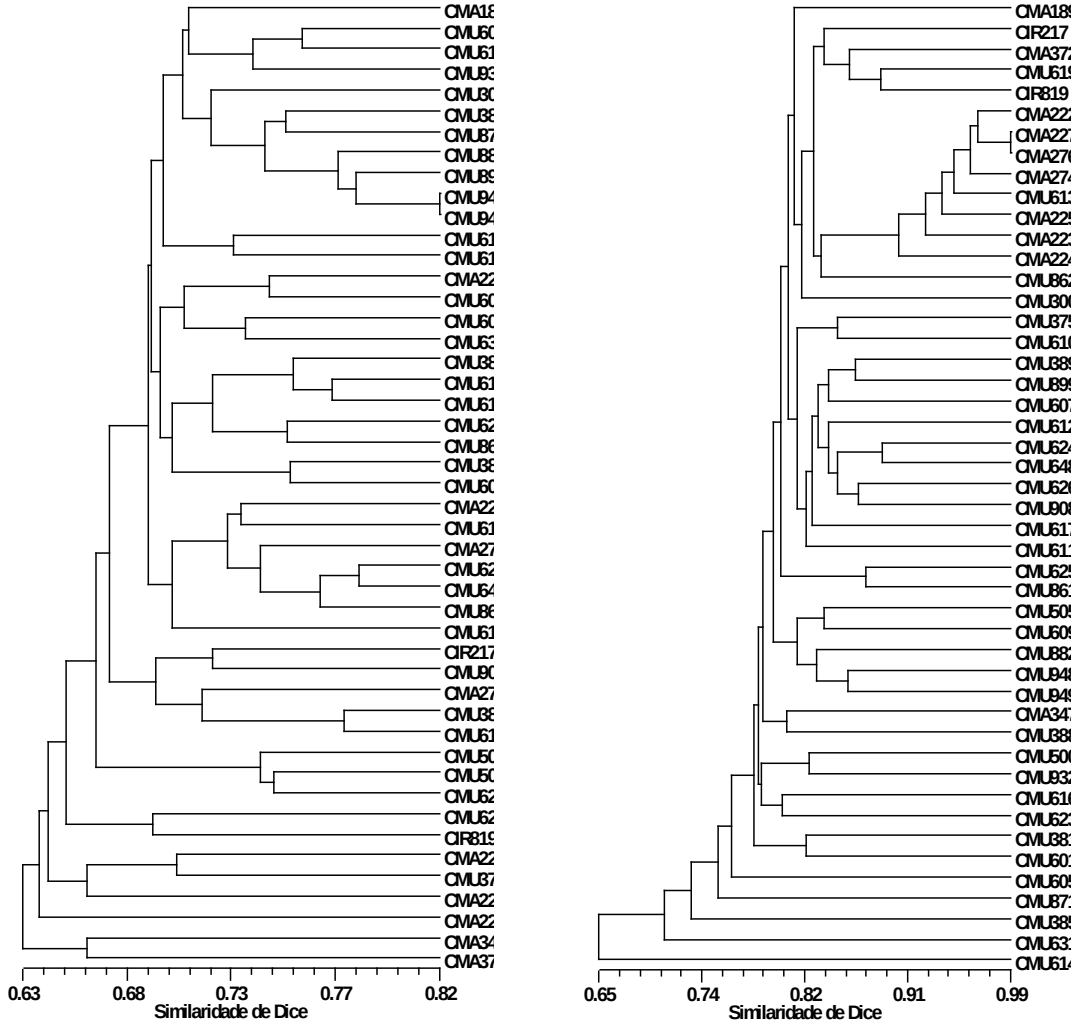

Figura 1 - Dendrograma dos clones analisados com base no método UPGMA (A) marcador *RAPD* e (B) marcador *ISSR*..

Também foi claro a formação de um pequeno grupo com oito clones da origem de Manaus (CMA) com 0,90 similaridade genética. Os mesmos clones, exceto CMA223, foram agrupados em analise de diversidade utilizando dados fenotípicos (NASCIMENTO FILHO et al 2001), o que atesta o elevado grau de relacionamento genético desses clones.

CONCLUSÕES

A identificação de grupos similares variou em função do marcador utilizado, porém o poder de discriminação do marcador ISSR foi mais consistente.

Os resultados dos dois marcadores sugerem que o guaraná pode ser considerado uma única população com pouca variação intraespecífica.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; Shrivastava, N.; Padh, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell. Rep**., v.27, p.617-631, 2008.

NASCIMENTO FILHO, F. J. do, ATROCH, A. L.; SOUSA, N. R. de, GARCIA, T. B.; CRAVO, M. da S.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 501-506, 2001.

SOUSA, N.R. **Variabilidades genéticas e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro**. Lavras, 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.