

**ANÁLISE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Myrciaria dubia* (H.B.K.) MC VAUGH
(CAMU-CAMU) E *Ceiba pentandra* L. (SAMAÚMA) OCORRENTES NA ÁREA DE
INFLUÊNCIA DA UHE SANTO ANTÔNIO**

RELATÓRIO TÉCNICO

SAE.DS.011.2012

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
LABORATÓRIO DE GERMOPLASMA: CONSERVAÇÃO, GENÉTICA MOLECULAR E
FISIOLOGIA VEGETAL – LABGETVEG

Março 2012
Porto Velho – RO

SANTO ANTÔNIO ENERGIA DS/ABR/2012 08:39 000008245

EQUIPE TÉCNICA

Coordenadores

Renita B. C. Frigeri

Bióloga, doutora em Biologia Vegetal, professora da UNIR e coordenadora LABIFISIO

Francisca de J. Holanda

Bióloga, doutora em Genética Vegetal, professora da FIMCA e coordenadora do
LABGETVEG

Biólogos

Rudson de J. Holanda

Doutorando em Biologia Molecular e Experimental/ UNIR

Semiriam C. Amoedo

Ediléia F. Monteiro

Estagiários

Edilaine A. P. Borges

Jeane N. Moraes

Tatiane C. Gomes

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVO	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1 Caracterização das amostras	4
3.2 Tratamento e armazenamento das amostras.....	7
3.3 Otimização do protocolo de extração de DNA das amostras do camu-camu.	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
5. CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIA	12

1. INTRODUÇÃO

Este relatório apresenta as atividades relacionadas à execução do projeto de pesquisa intitulado *Análise Genética das Populações de Myrciaria dubia (camu-camu) e Ceiba pentandra (samaúma) Ocorrentes na Área de Influência da UHE Santo Antônio.*

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Análise Genética das Populações de *Myrciaria dubia* (camu-camu) e *Ceiba pentandra* (samaúma).

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de extração de DNA das plantas de *Myrciaria dubia* e *Ceiba pentandra*;
- Purificar os gDNAs obtidos com o protocolo estabelecido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das amostras

As amostras biológicas selecionadas para realização das análises foram folhas frescas e/ou secas de acessos de camu-camu coletadas ao longo do rio Madeira próximo a antiga cachoeira de Teotônio (Figura 1).



Figura 1. A) Coleta de camu-camu próximo a antiga cachoeira de Teotônio, Porto Velho – RO; B) Ilhas de pedra onde o camu-camu se desenvolve (Fonte: Santo Antônio Energia, 2011)

As amostras (parte aérea contendo galhos e folhas) foram coletadas e georreferenciadas pela equipe da SAE (Figura 2 e Tabela 1) e entregues dia 10 de

novembro de 2011 no Banco de Germoplasma/UNIR, perfazendo um total de trinta (30) plantas, ou seja; trinta amostras.

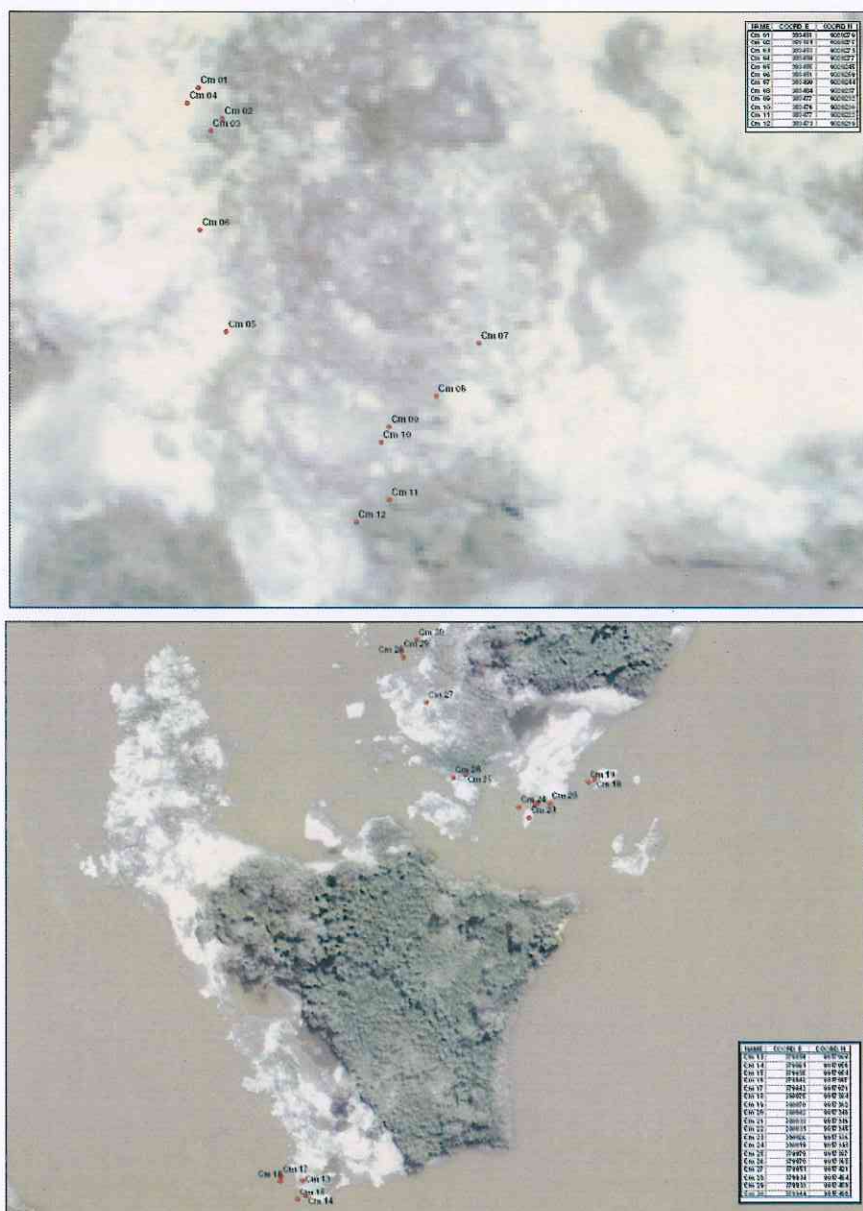


Figura 2. Imagens de satélite do rio Madeira destacando as áreas onde foram coletadas as amostras. Os pontos vermelhos indicam os acessos e respectivos números amostrais das plantas de camu-camu (Fonte: Santo Antônio Energia, 2011).

Tabela 1. Coordenadas dos acessos e respectivos números de amostras das plantas de *M. dubia* coletadas na área de influência da UHE Santo Antônio no rio Madeira (Fonte: Santo Antônio Energia, 2011).

Amostra	Coordenada (E)	Coordenada (N)
Cm 01	383451,0889	9020279,0511
Cm 02	383454,4102	9020274,8342
Cm 03	383452,7742	9020273,1520
Cm 04	383449,5740	9020276,9336
Cm 05	383454,8445	9020245,3436
Cm 06	383451,2739	9020259,4120
Cm 07	383489,7665	9020243,7841
Cm 08	383483,8877	9020236,5381
Cm 09	383477,2351	9020232,3206
Cm 10	383476,1534	9020230,1950
Cm 11	383477,2732	9020222,1811
Cm 12	383472,7099	9020219,0910
Cm 13	379858,7734	9017067,7276
Cm 14	379860,8265	9017056,0183
Cm 15	379854,7135	9017053,5441
Cm 16	379842,2016	9017067,4285
Cm 17	379842,6896	9017070,7017
Cm 18	380074,5463	9017363,8036
Cm 19	380069,7409	9017361,7411
Cm 20	380041,7292	9017346,0970
Cm 21	380032,7695	9017346,2190
Cm 22	380030,7449	9017345,1286
Cm 23	380026,3114	9017335,7174
Cm 24	380019,0074	9017343,2960
Cm 25	379979,2467	9017367,2676
Cm 26	379970,3859	9017365,1376
Cm 27	379950,5337	9017420,7917
Cm 28	379933,8180	9017453,6454
Cm 29	379932,5786	9017458,2204
Cm 30	379943,6520	9017466,4926

3.2 Tratamento e armazenamento das amostras

As amostras na forma de estacas foram tratadas com auxina sintética – ANA (ácido-naftalenoacético), plantadas seguindo as condições já descritas em estudos de estaquia com camu-camu (Figura 03) e mantidas em casa de vegetação até a extração do DNA de todas as amostras.



Figura 3. Estacas de plantas de *Myrciaria dubia* coletadas na área de influência da UHE de Santo Antônio no rio Madeira, Porto Velho/RO sendo mantidas em casa de vegetação na UNIR, para posterior extração do DNA.

Os galhos dos acessos coletados foram trazidos ao laboratório (Figura 4) para limpeza e retirada das folhas, que foram identificadas e armazenadas com sílica gel em sacos de papel (ver Figuras 4B e 4C) em câmara fria Eletrolab a 15° C, no Laboratório de Germoplasma (ver Figura 4D) para garantir, também, disponibilidade de material biológico para futura extração de DNA, caso houvesse necessidade em razão da perda de alguma estaca.

Essas medidas foram adotadas com o objetivo de garantir material biológico de qualidade para futuros estudos com essa fração amostral.



Figura 4. (A) assepsia dos galhos coletados das plantas de camu-camu, (B e C) armazenamento de folhas em sílica gel e (D) armazenamento na câmara fria amostras da parte aérea *in natura* no laboratório de Germoplasma, tanto as partes guardadas nos sacos de papel com sílica gel quanto os galhos coletados das 30 plantas do estudo.

3.3 Otimização do protocolo de extração de DNA das amostras do camu-camu.

Estudos com amostras de camu-camu discutem as dificuldades de extração dos ácidos nucleicos dessa espécie, tanto DNA quanto RNA, devido ao elevado teor de ácido ascórbico que essas plantas apresentam.

Para estabelecer o protocolo de extração de DNA de camu-camu para esse projeto, foram testados três métodos de extração de DNA de plantas, a saber: a) método CTAB proposto Doyle & Doyle (1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996); b) método Dellaporta (1983) modificado e; c) método comercial Kit Plant DNAzol.

- a) O método proposto por Ferreira & Grattapaglia tem como base um forte detergente o Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) a 2%.

- b) O método Dellaporta se baseia na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos por alta concentração de acetato de potássio na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Este método é considerado um dos mais laboriosos devido à necessidade de várias etapas de purificação.
- c) Quanto ao Kit comercial Plant DNAzol, os reagentes não são descritos. Porém é o protocolo mais utilizado na extração de DNA de plantas.

Os testes de extração de DNA foram realizados com 60 a 100 mg de amostras de folhas frescas de quatro (04) acessos de camu-camu coletados das estacas (Figura 5).



Figura 5. Folhas de *M. dubia* selecionadas para os testes dos protocolos de extração de DNA com os seus respectivos números de acesso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos de identificação e de caracterização da diversidade genética das plantas, por meio de técnicas moleculares, envolvem métodos rápidos e precisos de extração de DNA. O co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal, podendo danificar o mesmo e inibir a ação da enzima *Taq* polimerase na amplificação do fragmento alvo. O sucesso na análise genética de populações de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade (KIDWELL & OSBORN, 1992) isto é, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas (MILACH, 1998) e ser passível de amplificação.

Considerando o exposto, foram testados três protocolos: a) método CTAB proposto Doyle & Doyle (1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996); b) método Dellaporta (1983) modificado e; c) método comercial Kit Plant DNAzol. Os resultados das análises da extração dos gDNAs, verificados pelos três testes, estão representados na Figuras 6 e 7. Conforme pode ser observado, o protocolo mais adequado, ou seja; aquele em que se obteve maior êxito na extração do DNA foi o CTAB. O protocolo utilizando-se o DNAzol não foi eficaz para amostras de folhas frescas de camu-camu, como pode ser observado na Figura 7; poços b1,b2,b3 e b4. O método proposto por Dellaporta (1983) foi eficaz apenas em duas amostras, poços c3 e c4 conforme Figura 7.

A partir dos resultados obtidos com os testes realizados utilizando-se os protocolos descritos acima foi selecionado para otimização o protocolo do CTAB a 2% proposto por Doyle & Doyle (1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996), com adequação às condições deste laboratório. Na Figura 8 pode-se observar a boa qualidade e integridade dos gDNAs submetidos à quantificação em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio a 10µg/mL.

Foram extraídos gDNA das 30 amostras e destes, purificados mais de 90% e fotografadas com o sistema Docprint VX2 (Figura 8). A quantificação foi analisada a partir de um padrão de 300ng. Em relação ao padrão utilizado as amostras variaram entre 30 a 200ng. As bandas das amostras de camu-camu observadas no gel, não apresentaram arrasto vertical característico de um DNA pouco íntegro, nem mesmo em forma de cone, característicos de alta concentração de polissacarídeos. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) a integridade do DNA é fundamental na amplificação dos fragmentos por PCR.



Figura 6. Preparação das amostras de DNA extraída de *M. dubia* para quantificação através do perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% (imagem da esquerda).



Figura 7. Extração de gDNA de acessos de *Myrciaria dubia*. Amostras: **a**), utilizando protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998), **b**) protocolo DNAzol e **c**) Dellaporta (1983).

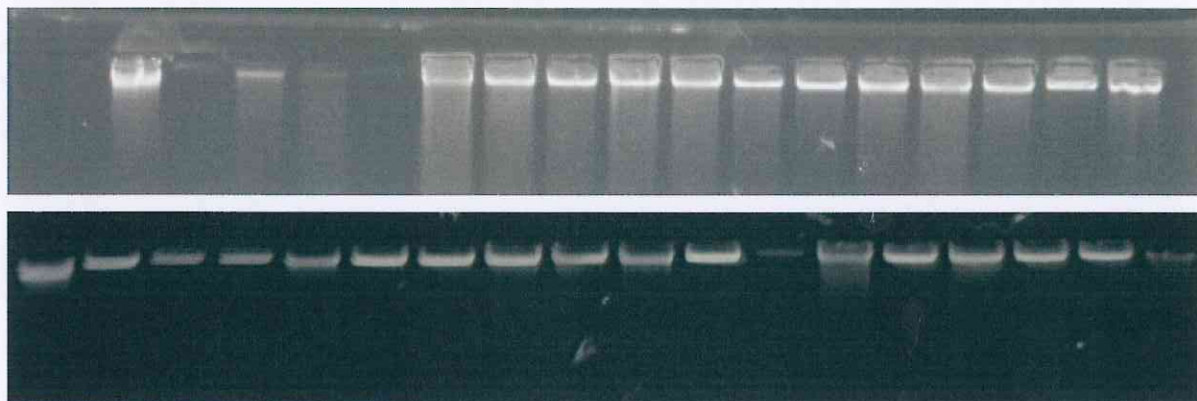


Figura 8. DNAs genômicos extraídos de *M. dubia*, trinta (30) amostras dos acessos coletados na área de influência da UHE de Santo Antônio Energia, utilizando-se o protocolo CTAB (Ferreira & Grattapaglia (1996)).

5. CONCLUSÃO

A meta de otimização do protocolo de extração de DNA de boa qualidade para as plantas de *M. dubia* foi executada com êxito, conforme cronograma. A partir desta primeira etapa conclui-se que o método CTAB a 2% proposto por Ferreira & Grattapaglia (1996) é o mais adequado para esta espécie, pois permitiu a extração de DNA de boa qualidade e integridade das 30 amostras. Esses resultados permitem o avanço para a próxima etapa, isto é, a amplificação dos marcadores moleculares para análise da estrutura populacional das plantas de *Myrciaria dubia* ocorrentes na área de influência da UHE Santo Antônio.

REFERÊNCIA

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v. 1, n. 4, p. 19-20, Sept. 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

MATSUURA, F.C.A.U.; CARDOSO, R.L.; OLIVEIRA, J.R.P.; OLIVEIRA, J.A.B.; SANTOS, D.B. Determinações físico-químicas de frutos de genótipos de acerola (*Malpighia glabra* L.). Congresso Brasileiro de Fruticultura. Poços de caldas, 18-23/10-1998. *Resumos*. Lavras, SBF, p.65, 1998.

SANCHES, J.; KANESIRO, M.A.B.; DURIGAN, J.F. Efeito do tempo de armazenamento na qualidade de polpa de acerola. Congresso Brasileiro de Fruticultura, Poços de caldas, 18-23/10-1998. *Resumos*. Lavras, SBF, p.65, 1998.

YUYAMA, Lúcia K. O.; BARROS, Solimar E.; AGUIAR, Jaime P. L.; YUYAMA, Kaoru; SILVA FILHO, Danilo F. Quantificação de fibra alimentar em algumas populações de cubiu (*Dolanum sessiliflorum* Dunal), camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) e açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), **Acta Amazonica**, v. 32, n.3, pp. 491-497, 2002.

ZAPATA, Sérgio M.; DUFOUR, Jean-Pierre. Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh: chemical composition of fruit. **J. Sci. Food Agric.**, v.61, pp. 349-351, 1995.



Renita B. C. Frigeri

Bióloga, doutora em Biologia Vegetal, professora da UNIR e coordenadora LABIFISIO



Francisca de J. Holanda

Bióloga, doutora em Genética Vegetal, professora da FIMCA e coordenadora do LABGETVEG