

RELATÓRIO TÉCNICO

SAE.DS.024.2012

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

**Fundação Universidade Federal de Rondônia
Laboratório de Germoplasma – Genética Molecular Fisiologia Vegetal e
Conservação**

Dezembro/2012

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
LABORATÓRIO DE GERMOPLASMA – GENÉTICA MOLECULAR FISILOGIA
VEGETAL E CONSERVAÇÃO

RELATÓRIO TÉCNICO

SAE.DS.024.2012

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

Estagiária

Jeane N. Moraes

Dezembro/2012

1. INTRODUÇÃO

Este relatório tem o objetivo de apresentar as atividades relacionadas à amplificação dos marcadores EST-SSRs (“Expressed Sequence Tags” ou Etiquetas de Sequências Expressas – Sequências Simples Repetidas) das amostras de camu-camu da segunda etapa de 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. OBJETIVOS

- a) Estabelecer os protocolos de amplificação dos fragmentos alvos, referente a seis *primers*, que correspondem aos marcadores moleculares do tipo codominantes, EST-SSRs.
- b) Adequar os produtos amplificados (amplicons) na concentração correta para genotipagem (sequenciamento).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Padronização das concentrações das amostras de gDNA

Para padronização das concentrações das amostras de gDNA, para amplificação via técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as mesmas foram quantificadas por espectrofotometria em ondas de 260nm e 280nm, que após os cálculos revelaram a real concentração total das soluções de gDNA de cada amostra. Após essa quantificação as soluções foram diluídas em água milliq autoclavada para uma concentração final de 10ng/μL, cada amostra (tabela 1).

3.2. Protocolo de amplificação dos marcadores EST-SSRs para PCR

Para amplificação dos marcadores moleculares EST-SSRs foram selecionados seis *primers*, dos oitos publicados no trabalho de Rojas (2007). Os mesmos foram desenhados a partir das sequências ESTs depositada por Santo (2006) no Banco de Dados Mundial NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os reagentes para realizar a técnica de PCR foram padronizados de acordo com as molaridades e quantidades correspondentes ao desenvolvimento da técnica, considerando os seguintes parâmetros; i) o tipo de marcador genético, neste caso EST-SSRs; ii) o tamanho do fragmento e; iii) o tipo do aparelho, termociclador, onde

ocorre a biossíntese dos fragmentos alvos, baseado nas variações de temperaturas, divididas em três etapas: 1ª Desnaturação, 2ª Anelamento e 3ª Extensão.

Após os testes para otimização da amplificação das bandas (alelos), via PCR, os protocolos estabelecidos seguiram as referidas proporções para uma reação com volume total de 25µL, foi adicionado a cada amostra: tampão 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1X; dNTPs a 2,5 µM; MgCl₂ a 25 mM, *primer Forward* e *Reverse* a 10 µM, cada um, *Taq DNA Polymerase* 1u/µL e gDNA a 10 ng/µL.

A reação foi realizada no termociclador *amplitherm* Gradient, seguindo o programa de ciclagem: um ciclo de 96°C por cinco minutos, em seguida 94°C por 40 seg, as temperaturas de anelamentos variaram entre 55,5 °C a 60 °C por um minuto, dependendo do *primers* e, 72°C por um minuto, essas tres ultimas temperaturas seguiu um ciclo de 30 vezes e no final uma extensão a 72 °C por 10 min. Em seguida os produtos da PCR foram retirados do termociclador e armazenados em freezer a -20 °C até o momento da análise por eletroforese.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etidio (10mg/mL) ou *blue green loading Dye I*, visualizados sobre luz UV, fotografados em sistema *Docprint VX2* e, as imagens digitalizadas foram arquivadas para análises da visualização (amplificação) ou não do fragmento alvo (Figs.1, 2, 3, 4, 5, e 6).

Os fragmentos das amostras que não foram visualizadas foram repetidos até a sua visualização. Após essa etapa, os fragmentos foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata a 10%, para verificar a concentração da banda amplificada, para aperfeiçoar o produto da PCR para a etapa seguinte, o sequenciamento, deixando o fragmento na concentração adequada para a leitura no sequenciador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 30 amostras de DNA de camu-camu foram quantificadas, a partir das quais foi conhecida a exata concentração da solução do gDNA de cada um dos acessos (tabela 1).

A padronização de todas as amostras em uma única concentração foi realizada para otimizar a reação por PCR, garantindo assim, a amplificação das bandas, pois se não houver visualização das mesmas no gel, elimina-se, desta maneira, a possibilidade de erro devido a variação na concentração do gDNA.

A técnica de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA fita simples) utilizados como *primers* que flanqueiam a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Esses *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas da região alvo. Se a quantidade de DNA na reação estiver em baixa ou alta concentração, esta situação acarretará inibição da reação em função ausência de competição dos *primers* pelo sítio da região alvo.

Se todas as concentrações, dos reagentes da PCR, estiverem equivalentes, otimiza-se então a etapa da ciclagem, que corresponde ao aumento e baixa da temperatura, regulada no termociclador (aparelho). O ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA alvo é desnaturada por meio da elevação da temperatura para aproximadamente 94°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida e varia entre 35°C a 60°C, dependendo do tamanho e da sequência dos *primers* utilizados, permitindo a hibridização exata de cada um com as sequências complementares da região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C que ativa a enzima *Taq* DNA polimerase a realizar a extensão a partir de cada extremidade 3' dos *primers*. Essa adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo do DNA produz inicialmente uma cópia que dá origem aos milhões de cópias desta sequência nos ciclos da PCR.

Tabela 1. Apresenta as concentrações ([]) das soluções de gDNA, quantificados por espectrofotômetro de cada amostra.

nº das amostras	[] ng/µL
1	1.027,30
2	794,4
3	276,5
4	2.074,40
5	1.282,40
6	1.272,60
7	1.513,50
9	1.413,10
10	503,60
11	1.724,80
12	1.522,30
13	1.227,50
15	1.553,30

16	1.008,20
18	2.056,60
19	884,20
20	822,00
21	1.338,60
23	909,90
24	553,00
25	1.471,00
26	816,10
28	1.463,00
29	853,50
30	908,50

Para cada um dos seis *primers* selecionados neste estudo, todos os marcadores moleculares EST-SSR das 30 amostras de camu-camu foram obtidos com êxito, a partir dos protocolos de amplificação otimizados. As figuras dos géis 1, 2, 3, 4, 5 e 6, apresentam os fragmentos alvos amplificados, de algumas amostras de camu-camu, correspondentes às sequências de cada *primer*, MDI004, MDI007, MDI009, MDI0010, MDI0013 e MDI0015, respectivamente. Abaixo de cada figura do gel, com seus respectivos *primers*, estão as sequências EST e nelas inseridas as sequências dos marcadores SSR, correspondentes aos fragmentos de interesse do presente estudo, depositado no NCBI pela pesquisadora Santos (2006).

Os pares de bases presentes nas figuras dos géis representado por Pb, são padrões de pesos moleculares que indicam, quando comparado com os fragmentos amplificados, se o tamanho da banda observada no gel corresponde ao tamanho do fragmento de interesse. Neste caso todos corresponderam às sequências em estudo.

Os tamanhos dos fragmentos dos seis *primers* que amplificam os marcadores moleculares do tipo EST-SSR neste estudo, foram desenhados e publicados por Rojas (2007), que estudou amostras de camu-camu de algumas localidades da região Amazônica e registrou para os *primers* aqui estudados os seguintes tamanhos: MDI004 sequências com tamanhos que variam entre 201 a 219, MDI007 de 172 a 212, MDI009 de 172 a 214, MDI0010 de 221 a 249, MDI0013 de 174 a 184 e MDI0015 de 202 a 228.

TTTTGCTGCCAAATTGAGGCCCTCACCCATACCCGTTATGCGTGGACGTCCATCA
GTGAA
AAGAGCAATCCGTATCTGCGGCCAGCCTCGCTGGGTGTTTGTCTCGATATTTGCC
TCTGG
GAGTCTCATGCTTTGGTATGTTTCCTGTGGAATCTTGACTGTCCTCTGGGCTTTTG
CCAT
TGGACTCCTTGCTACTGTCCTTCATGCAAGTTTCAGACACCCAATCTGAAAGCAGC
CTAA
ATACATTTCTGTGAAGAGTTTCGAGCAGTTTGGCGCAATTACAGTGACCTTTAATGA
ACA
GAATAGGGATTACAGAGATTATACTCCTTTGCCAGGTGTAAACTCGCTGGTCTGCA
GATG
TAATTGACATAAGCCCTGTGTCAGCAGGGGCAGTACACGCATTTTCGTTACAG

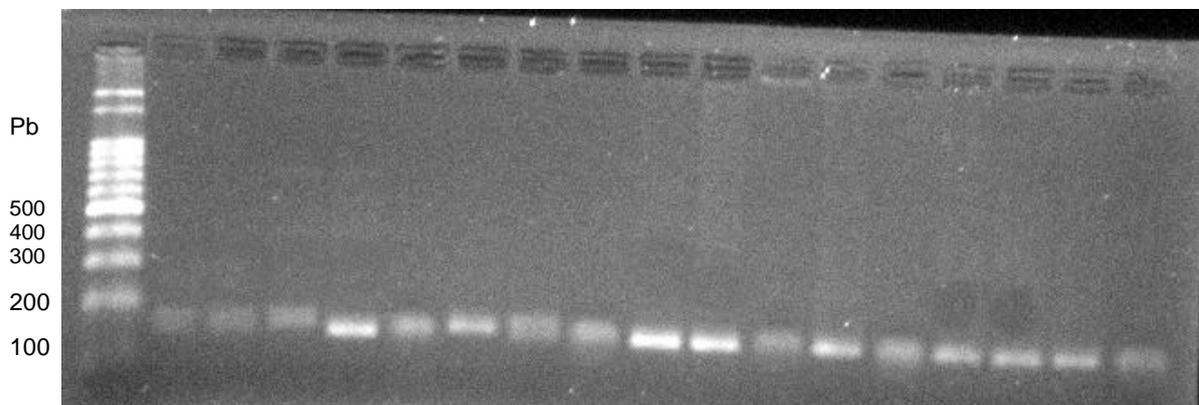


Fig. 5. Perfil eletroforético dos produtos de PCR de algumas amostras de camu-camu. Pode-se observar bandas de 174 pb, amplificadas com o *primer* MDI0013. O primeiro pocinho corresponde ao marcador de pares de bases, *ladder* de 100pb.

SEQUENCE MDI0013 CAMUEST Myrciaria dubia cDNA clone MDIEST_7 5-, mRNA sequence (Espírito-Santo, 2006)

GAAAATTTGGCCGGCTCTCTCTCTCTTTCTCGACCTCTCCCCGGAAGTCCCCT
CCCTC
CCCGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGATCCCCAAGATTCGTGAGCCG
AAAT
GGCGTTCCGGCGACCGACCCACTGGCCCAGCTGAGCCTGCCACCGGGATTCC
GGTTTTA
CCCGACCGACGAGGAGCTCCTCGTCCAATACCTCTGCCGAAAGGTGGCTGGTCA
CCAATT
TAGTCTGCAGATCATTGGGGAGATCGATCTGTACAAGTTGACCCCTTGGGACTTG
CCAAG
CAAGGCGATATTTGGCGAGAAGGAGTGGTACTTCTTCAGCCCCAGAGACAGGAA
GTACCC
GAACGGGTCTAGGCCGAACCGGGTCGCCGGGTCCGGGTACTGGAAGGCCACCG
GCACCGA
CAAGGTCATCACCACCGCTGGCCGCAAAGTCGGCATCAAGAAGGCCCTCGTCTT
CTACGT
CGGCAAGGCACCCAAGGGCACCAAGACCAACTGGATCATGCACGAGTACCGCCT
CCTCGA

AACTACCCGGAAGATCGGAAGCTCTAAGTTGGATGAGTGGGTCCTGTGTCNAATC
TACAA
GAAGAGCTCGGGCTCGCAGAAGCCGAACACGTGCGACTTCTTCGAGCAAAGACAC
AGCCAC
GGGTCGCAGTCCTCTTCCTCATCGTTGGACGACATGTTGGAGACTTTGCCCGAGA
TCGAC
GACCGTTCTTTTGC GTTGC GCGCGTGA ACTCGTTCCGGATCCACAGCAGCAGC
AGCAGC
GGGACGAGGAGCCCACCTGCAA ACTCTGATGGGTA

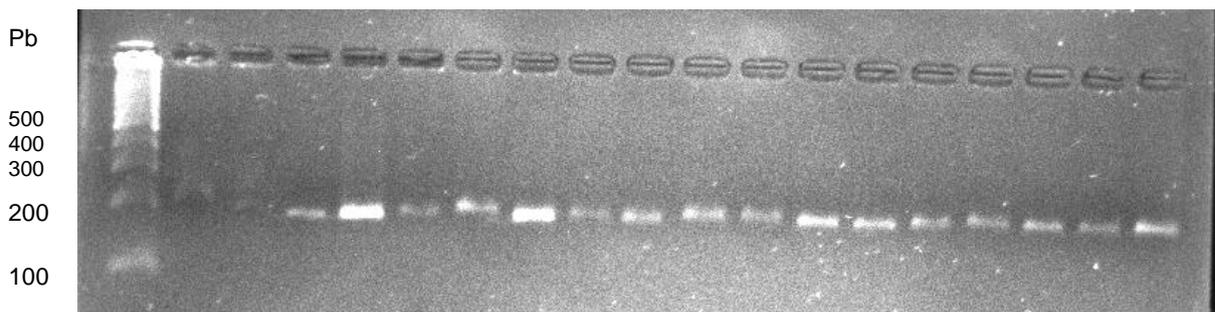


Fig. 6. Perfil eletroforético dos produtos de PCR de algumas amostras de camu-camu. Pode-se observar bandas de 202 pb, amplificadas com o *primer* MDI0015. O primeiro pocinho corresponde ao marcador de pares de bases, *ladder* de 100pb.

MDI0015 CAMUEST Myrciaria dubia cDNA clone MDIEST_8 5-, mRNA sequence
(Espírito-Santo, 2006)

GGACTTCTCAACACCCACGGAGATTTCCCCGGACCTCCTGCCACCTGCTCCAGCC
AATTT
CATCAAACCAAACAAGAGACCTTTGTCTTCCATGACCCCACTCATCATCACCAAGG
ATAA
CCAGTTGGCAGGGGTCATAGGAGGGAGCGGAGGAATGAACATAATTCCAGCAGT
GACCCA
AGTTTTTCTAAATCACTTTGTCTGCGGAATGGAACCATTGGATGCTGTTCCAGGATC
CAAG
GGTCTACCACAGGCTGATACCAAATGTCGTATTGTATGAAA ACTGTACCTGCATCG
ATGG
TGATCACATTGAGCTTGCAGACGACCGAAAGCTTTTCCTAAAAGGGAGAGGTCAT
AAGTT
GGAAGCCATAGAGGGAGGAGCAATCGTCCAGCTTGTCTGTTCAAAGTCTACAAAAC
ACGCT
TGATTCAGGTCGAAAAGTCGCAAGGACTTGAATTCTGGAGTCGTCAGTGGA ACT
CTTAC
TGCTGTAAGTGATCCAAGAAAAGATGGGAGGCCTGCTGCCGTTTAATCTCTCTCT
CTCTC
TCTCTCTCTTAACTAATCGGCGACGAATAATGGCGGATTAGAACGATCTTATGG
CTCA
AATTCGTGGAAGCTGCAAGTGATGCTGCTCGTGTTGTTGAATGTAAGCATGTATGA
TACC
CATTTCTTAGGTAGGCCCGGTCTAGGCTGAAGAATTGTC CCGGATGAATTTAAC
ATAG

AGTGCTTTGTAAAGAATCTAAAGATAGATCGTGAATTGGGTATTGAGATCGCCAGC
CAGT
GCTTTTAATGATGTTTCC

O CAMUEST é uma biblioteca de ESTs construídas a partir do sequenciamento de mRNA de fruto de camu-camu. As sequências de ESTs identificadas neste banco foram depositadas no banco de ESTs por Santo (2006). Esta biblioteca tem sido consultada para a identificação da rota do ácido ascórbico e para obtenção de genes completos desta importante via metabólica (SANTOS, 2006). Estas sequências também estão disponíveis para a obtenção de microssatélites EST.

Os microssatélites gênicos ou denominados também de EST-SSRs são atualmente muito utilizados nas plantas. EST-SSRs são provenientes de sequências genômicas expressas (“Expressed Sequence Tags”) as quais são sequências obtidas a partir do sequenciamento de mRNA. Como o mRNA contém as informações para a codificação das proteínas, estes marcadores estão relacionados com a função do gene ou produto proteico (RUSSELL, 1992).

Os marcadores EST-SSRs identificam diretamente as variações nas regiões transcritas do genoma, eles podem fornecer informação quanto à genética funcional do indivíduo (FRASER *et al.*, 2003). São marcadores do tipo I, isto é, quando se conhece a função do gene através da amplificação do seu cDNA (DNA complementar) convertido a partir do mRNA extraído. Desta maneira esses marcadores são úteis na seleção de genes de interesse ou candidatos, principalmente em estudo de melhoramento genético, biodiversidade e mapeamento genético (VASEMAGI *et al.*, 2005).

Os ESTs foram originalmente utilizados para identificação de genes, descobriu-se posteriormente que são extremamente úteis como ferramentas de mapeamento de genoma (AYERS, 1997).

Segundo Rojas (2007), estudos com os marcadores EST-SSRs são úteis para estimar a relação genética entre os indivíduos de uma população ou entre populações e, ao mesmo tempo são utilizados para análise da diversidade funcional em relação à variação adaptativa do organismo. Em relação à diversidade funcional, os EST-SSRs presentes nas regiões transcritas podem influenciar na expressão gênica ou no produto gênico. Em estudos com arroz, a variação no $(GA)_n$ e $(CT)_n$ na região 5'UTR do “waxy gen” (gene do óleo) foi correlacionado com o conteúdo de amilase nos grãos (AYERS *et al.*, 1997), o mesmo observado para o milho.

Um problema com marcadores EST-SSRs na estimação de parâmetros genéticos de populações é a seleção dos *loci* que estão relacionados com genes, os quais podem afetar o polimorfismo destes marcadores, pois estão sob ação de seleção.

Segundo estudo de Wang *et al.* (2005), os problemas que existem na amplificação dos marcadores EST-SSR, em muitas espécies, são por varias razões: i) o “*primer*” do EST-SSR pode se estender no “*splice site*” (zona de união de exons e introns); ii) a presença de introns extensos nas sequências genômicas; e iii) pelo uso de sequências questionáveis. Portanto, para minimizar estes problemas é preciso realizar uma seleção apropriada da região flaqueadoras dos “*primers*” para que a amplificação dos fragmentos alvos seja de boa qualidade.

5. CONCLUSÃO

A meta de amplificação dos marcadores EST-SSR, com os seis *primers* selecionados para as 30 amostras de camu-camu deste estudo, foi atingida com êxito concluindo-se assim a etapa de obtenção dos fragmentos para seguir em direção à etapa final isto é, o sequenciamento (genotipagem), a partir do qual se obterá a análises da estrutura genética da população das plantas de *Myrciaria dubia* sob estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYERS, N. M.; MACCLUNG, A. M.; LARKING, P. D.; BLIGH, H. F. J.; JONHS, C. A.; PARK, W. D. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate 97 apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. **Theor. Appl. Genet.** 94, 773–781, 1997.

FRASER, L.G.; HARVEY, C.F.; CROWHURST, R.N.; DE SILVA, H.N. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping, **Theoretical and Applied Genetics** . 108, 1010–1016, 2003.

ROJAS, S.G.; **Análise da variabilidade genética de acessos do banco de germoplasma de (camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc.VAUGH) do INPA, utilizando marcadores microssatélites EST (EST-SSRs). Tese** (defendida no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Brasil, Manaus 2007.

RUSSELL, P. **Genetics**, 3rd edition. Harper Collins Publishers, 1992.

SANTOS, M.L.E Estudo de genes expressos em frutos de camu-camu: sequenciamento de ESTs. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2006.

VASEMAGI, A.; NILSSON, J.; PRIMMER, C.R. Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Molecular Biology and Evolution**, 22, 1067–1076, 2005.

WANG, H., LI, F., XIANG, J. Polymorphic EST–SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture** 249, 07– 114, 2005.