

RELATÓRIO TÉCNICO

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.

Etapa II: Análise Genética das Populações de *Ceiba pentandra* L. (samaúma)

Maio/2013

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



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

RELATÓRIO TÉCNICO

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
LABGEMVEC

Biólogos

Rudson de J. Holanda

Doutorando em Biologia Molecular e Experimental/ UNIR

Edileia F. Monteiro

Bióloga/UNIR

Estagiários

Sueli Borges de Castro

Graduanda

Mai/2013

1. INTRODUÇÃO

Este relatório parcial, da primeira etapa, tem o objetivo apresentar 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. Etapa II: Análise Genética das Populações de *Ceiba pentandra* L. (samaúma)

2. OBJETIVOS

- Otimizar um protocolo de extração de DNA com as amostras dos acessos de *C. pentandra* L.
- Purificar os gDNAs das populações *C. pentandra* L. ocorrentes ao longo do rio Madeira.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Caracterização das amostras

As amostras biológicas selecionadas para realização da extração de gDNA foram folhas frescas e/ou secas de acessos de samaúma, encontrados ao longo das margens do rio Madeira (Figura 01).



Figura 01. Amostras de *C. pentandra* coletadas nas proximidades da UHE Santo Antônio, no rio Madeira.

As coletas do material biológico foram realizadas no período de 1 a 4 de abril de 2013 e levados para o Banco de Germoplasma/UNIR, perfazendo um total de 48 amostras divididas em duas populações; uma obtida à montante e a outra á jusante da UHE Santo Antonio, no rio Madeira (Figura 02).

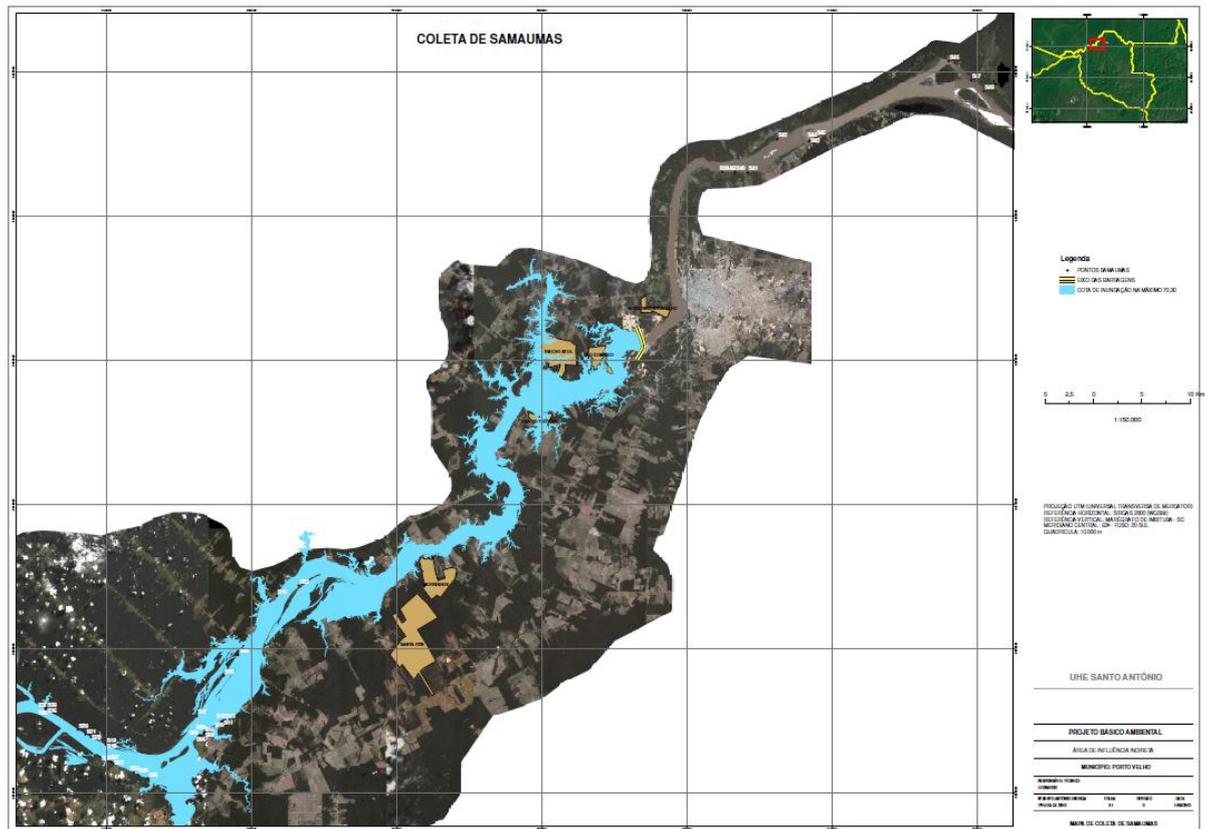


Figura 02. Mapa da área de coleta das amostras de samaúma.

As amostras foram tratadas, ordenadas e armazenadas a 4°C até o momento da extração. A outra parte da amostra foi identificada e armazenada com sílica gel em sacos de papel (Figura 03) em câmara fria *Eletrolab* a 15° C, no Laboratório de Germoplasma para garantir, também, disponibilidade de material biológico para futura extração de DNA, caso haja necessidade ou em razão de obtenção de gDNA com pouca integridade ou de baixa concentração, isto é, que não esteja adequado às análises moleculares. Além disso, essas medidas foram adotadas, pois elas podem garantir material biológico de qualidade para futuros estudos com essas duas populações.



Figura 03. Amostras de samaúma sendo tratadas e ordenadas para serem armazenadas a 4°C.

3.1 Otimização do protocolo de extração de gDNA das amostras dos acessos de *C. pentandra* L.

Foram selecionados dois métodos de extração de gDNA para otimização do protocolo de extração de amostras de *C. pentandra* L.

a) Método CTAB proposto Doyle & Doyle (1987) modificado Ferreira & Grattapaglia (1996) e;

b) Método comercial Kit *Plant DNAzol* (Invitrogen).

O primeiro método (a) de Doyle & Doyle (1987), demanda maior tempo e tem como base um forte detergente o *Brometo de Cetiltrimetilamônio* (CTAB) a 2%, apresentando bons resultados.

O Kit comercial *Plant DNAzol*, reque menos passos na extração do gDNA, portanto menor tempo e com boa eficácia, também.

Os testes de extração de DNA foram realizados com 60 a 100 mg de amostras de folhas frescas de quatro acessos de *C. pentandra* L (Figura 04).



Figura 04. Amostras de samaúma utilizadas nos teste de otimização do protocolo de extração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

São vários os protocolos, publicados para extração de gDNA de plantas, porém a maioria são derivados, isto é utilizam o mesmo princípio, apenas com modificações para adequar as condições do laboratório. Como as plantas produzem compostos secundários, tais como fenóis, polissacarídeos entre outros, deve-se atentar para que a extração de gDNA não permita o co-isolamento com esses compostos, pois esse é um dos principais problemas encontrados no isolamento e purificação de DNA vegetal, o que poderá impedir o seguimento da análise molecular via PCR (reação em Cadeia da Polimerase) pois, a presença destes compostos na reação inibe a ação da enzima na polimerização dos fragmentos alvo (LODHI, *et al.*, 1994).

Portanto, a amostra de gDNA obtido deve estar íntegra, livre de impurezas para que haja acesso direto a região de investigação. Então na análise genética de populações de plantas, este é o passo chave para obtenção de resultados robustos (MILACH, 1998; KIDWELL & OSBORN, 1992).

Considerando o exposto, foram testados dois protocolos: método CTAB proposto Doyle & Doyle (1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996) e método comercial *Kit Plant DNAzol*. Os resultados das análises da extração dos gDNAs, mostraram que os dois métodos são eficientes para isolar gDNAs de samaúma. Porém, o protocolo adotado e otimizado, para este estudo, na extração de gDNA das amostras de samaúma foi o *Kit* comercial *Plant DNAzol* da *Invitrogen*, por ser eficaz, menos elaborado e mais rápido, com modificações às condições do laboratório (Figura 05).



Figura 05. Perfil eletroforético dos gDNAs de 18 amostras de acessos de samaúma coletadas a montante da UHE de Santo Antônio. Porto Velho/RO, revelados em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio.

Foram extraídos gDNA de 48 amostras, purificadas, em seguida foram quantificados para se conhecer a concentração real da solução dos gDNAs (Tabela 01). A quantificação foi analisada a partir de um padrão de 300ng. Em relação ao padrão utilizado, as amostras variaram entre 195 a 1.344ng/μL.

As bandas observadas no gel revelam a alta concentração de gDNA na solução (Figura 04). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) a integridade do DNA é fundamental na amplificação dos fragmentos por PCR.

Tabela 01. As amostras de samaúma e suas respectivas concentrações.

Amostras	Concentração ng/μL
S1	534,5
S2	397,2
S3	487,5
S4	868,2
S5	547,5
S6	1.344,70
S7	835,8
S8	589,1
S9	458,4
S10	838,7
S11	887,9
S12	1.144,60
S13	835,8
S14	740,5
S15	483,9
S16	853,7
S17	360,3
S18	387,2
S19	417,8
S20	309,2
S21	568,9
S22	675,8
S23	397,4
S24	366,4
S25	443,2
S26	271,5
S27	378,8
S28	542,7
S29	368,3
S30	521,3
S31	195,8

S32	465,1
S33	345,8
S34	298,6
S35	396,5
S36	436,9
S37	376,4
S38	743,2
S39	733,1
S40	583,3
S41	734,8
S42	271,6
S43	468,2
S44	545,6
S45	791,3
S46	759,8
S47	267,6
S48	580,1

5. CONCLUSÃO

A otimização do protocolo de extração de gDNA de boa qualidade para as plantas de *C. pentandra* foi executada com êxito, conforme cronograma. A partir desta primeira etapa conclui-se que o material genômico está pronto para que se dê prosseguimento à segunda etapa, isto é, a amplificação dos marcadores moleculares para análise da estrutura populacional das plantas de *C. pentandra* ocorrentes na área de influência do UHE.

6. REFERENCIAS

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).

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and -Vitis species.

Plant Molecular Biology Reporter, v.12, p.6-13, 1994.

MILLACH, S.C.K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p