

PROJETO: Análise Genética das Populações de *Myrciaria dubia* (camu-camu) e *Ceiba pentandra* (samaúma) ocorrentes na área de Influência da UHE Santo Antônio.

Análise Genética de *Ceiba pentandra* (samaúma) ocorrentes na área de Influência da UHE Santo Antônio.

Porto Velho, março de 2014

Fundação Universidade Federal de Rondônia
Genética Molecular Aplicada e Conservação

Análise Genética de *Ceiba pentandra* (samaúma) ocorrentes na área de
Influência da UHE Santo Antônio.

EQUIPE TÉCNICA

Francisca de J. Holanda
Coordenadora e Pesquisadora

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

Rudson de J. Holanda
Doutorando em Biologia Molecular e Experimental/ UNIR

Rosimeire Dallas Marta
Doutoranda em Biologia Molecular e Experimental/ UNIR

Estagiária
Edilaine A. Borges
Bióloga

Porto Velho, março de 2014

1. INTRODUÇÃO

Este relatório tem o objetivo de apresentar as atividades relacionadas à amplificação dos marcadores SSRs (“Sequências Simples Repetidas) das amostras de samaúma (*Ceiba pentandra*) 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 / Sub-Projeto: Análise Genética de 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 corresponde aos marcadores moleculares do tipo codominantes, SSRs.
- b) Otimizar e adequar os amplicons na concentração correta para genotipagem sequenciador ABI.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Otimização do protocolo de Amplificação

As amostras de gDNA, para amplificação devem apresentar um padrão de concentração, para que amplificação via técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ocorra com acurácia. Para tanto, as amostras 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. Posterior a essa quantificação, as soluções foram diluídas em água milliq autoclavada, para uma concentração final de 10ng/μL por amostra.

3.2. Amplificação dos marcadores SSRs

Para amplificação dos marcadores moleculares SSRs foram selecionados seis *primers*, publicados por Brondani *et. al.* (2003), selecionados a partir do Banco de Dados Mundial NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As reações com a técnica de PCR foram realizadas de acordo com as molaridades e quantidades correspondentes ao desenvolvimento da técnica, considerando os seguintes parâmetros; i) o tipo de marcador genético, neste caso marcadores codominantes tipo 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* a 1u/µL e gDNA a 10 ng/µL.

A reação de PCR foi realizada considerando o protocolo de Gribel *et al.* (1998), com modificações, no termociclador *amplitherm*, admitindo o seguinte 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 três últimas temperaturas repetiram-se num 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 etídio (10mg/mL) ou *blue green loading Dye I* e foi visualizada sobre luz UV, fotografados em sistema *Docprint VX2* e as imagens digitalizadas foram arquivadas para análises da visualização (amplificação) ou não do fragmento alvo como mostrados nas Figs.1, 2, 3 e 4.

Após a análise de amplificação dos fragmentos de cada amostra, em gel de agarose, em seguida, os amplicons serão analisados em gel de poliacrilamida, para verificar o produto de PCR quanto à concentração, tamanho e especificidade do marcador, otimizando assim os fragmentos alvos obtidos para a etapa seguinte, a genotipagem, deixando o fragmento na concentração adequada para a leitura no sequenciador ABI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram coletadas e organizadas em duas populações, amostras coletadas acima da UHE Santo Antônio, sentido Acre e, abaixo da UHE, sentido Humaitá-AM. Perfazendo um total de 48 acessos.

As amostras de gDNA de cada acesso foram, primeiramente, padronizadas em uma única concentração, para otimizar a amplificação pela reação de PCR, garantindo assim a amplificação das bandas, pois se não houver visualização dos fragmentos alvos no gel de agarose, descarta-se a possibilidade do erro na concentração, se alta ou baixa do gDNA, fator que impede a amplificação do fragmento específico.

As figuras dos géis 1, 2 e 3 apresentam os fragmentos alvos amplificados, de algumas amostras de samaúma deste estudo.

Os amplicons obtidos, nestas análises, correspondem aos tamanhos dos fragmentos publicados por Brondani, *et al.* (2003) e, com às sequencias dos *primers* selecionados para esta pesquisa. Como pode ser visto na figura 1; CP1 (*primer 01*) — desta pesquisa, correspondente ao código Clone 02c1, publicado no GenBank: AF503157.1 e, abaixo da figura do Gel 1 sua sequencia com os microsstaellites,.

Dos seis *primers* selecionados neste projeto, algumas amostras não amplificaram para os marcadores moleculares SSR como pode ser visto na figuras 2. Entretanto, a maioria foram amplificadas com êxito, a partir dos protocolos de amplificação otimizados para as amostras de *C. pentandra*.

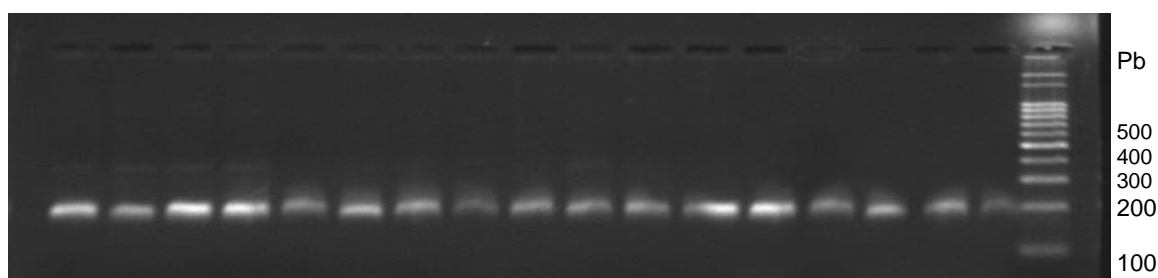


Fig. 1. Perfil eletroforético dos amplicons de 17 amostras dos acessos de samaúma (*C. pentandra*) deste estudo. Canaleta corresponde ao marcador de pares de bases, *ladder* de 100pb.

GenBank: AF503157.1

ORIGIN

```
1 ggactctagg ctctgcteta ctagtctctc tctctctctc tctctctctc  
tctctctctc  
61 tctctctctc tctctctcaa gcaagannaa gtnganaaaa ananaatgan  
ntggtggtgg  
121 tgccgangga aganggaana aaaccnnttt ttttctcttg tccccctnca  
ctctccttgt  
181 gcaccttcca c
```

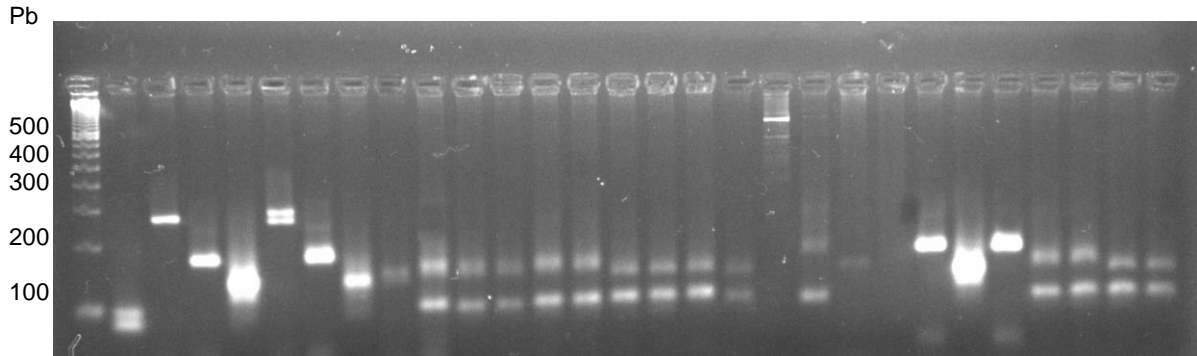


Fig. 2. Perfil eletroforético de 28 produtos de PCR de algumas amostras de acessos de samaúma, deste estudo, coletadas nas proximidades do rio Madeira. A primeira canaleta corresponde ao marcador de pares de bases, *ladder* de 100pb.

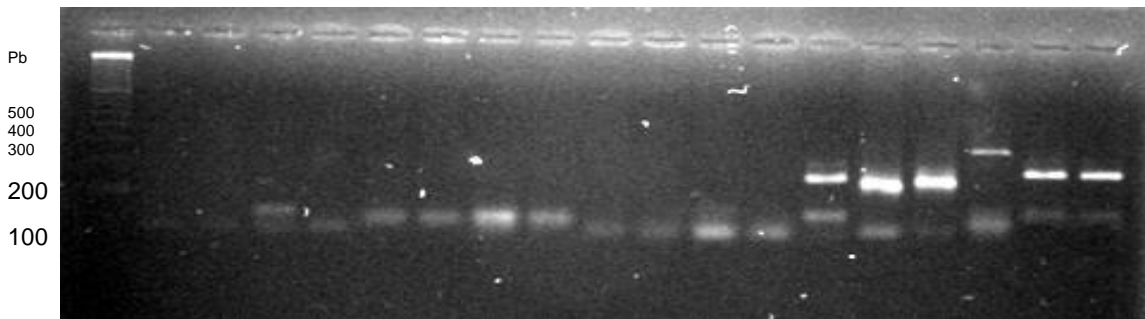


Fig. 3. Perfil eletroforético de 13 produtos de PCR de algumas amostras de acessos samaúma deste estudo. A primeiro canaleta corresponde ao marcador de pares de bases, *ladder* de 100pb.

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

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

Estudos com os marcadores codominantes (SSRs) são úteis para estimar a relação genética entre os indivíduos de uma população ou entre populações e, ao mesmo tempo, é utilizado para análise da diversidade funcional em relação à variação adaptativa do organismo.

5. CONCLUSÃO

A meta de amplificação dos marcadores microssatélites com os seis *primers* selecionados para as 48 amostras de *C. pentandra*, deste estudo, foi obtida com êxito. Concluindo assim a etapa de obtenção dos fragmentos para seguir a etapa final de genotipagem, a partir do qual serão realizados as análises da estrutura genética das duas populações de plantas de samaúma (*C. pentandra*) ocorrentes na área de influência da UHE Santo Antônio.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, R. P. V., GAIOTTO, F. A., MISSIAGGIA, A. A., KIRST, M, GRIBEL, R. and GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon Forest - Article first published online: 4 MAR 2003.

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