

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



Documentos 35

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Levy de Carvalho Gomes
José Jackson Bacelar Nunes Xavier
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Eduardo Lleras Pérez
Luadir Gasparotto
Adônis Moreira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 621-0300

Fax: (92) 3621-0320 / 3621-0317

www.cpa.embrapa.br

sac@cpaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Jackson Bacelar Nunes Xavier

Membros: Adauto Maurício Tavares

Cíntia Rodrigues de Souza

Edsandra Campos Chagas

Francisco Célio Maia Chaves

Gleise Maria Teles de Oliveira

José Clério Rezende Pereira

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paula Cristina da Silva Ângelo

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Sebastião Eudes Lopes da Silva

Revisor de texto: Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica: Maria Augusta Abtibol Brito

Diagramação e arte: Gleise Maria Teles de Oliveira

Capa: Doralice Campos Castro

1ª edição

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**Cip-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Gomes, Levy de Carvalho et al.

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Levy de Carvalho Gomes et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004.

137 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 35).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Ajustes para purificação pré-seqüenciamento de produtos de amplificação de insertos de DNA de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* utilizando exonuclease e fosfatase alcalina

Christiane Lopes Oliveira⁽¹⁾ e Paula Cristina da Silva Angelo⁽²⁾.

⁽¹⁾Bolsista Pibic/CNPq. ⁽²⁾Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010, km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, 69010-970. Manaus - AM. E-mail: paula@cpaa.embrapa.br

Resumo - O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma planta da família botânica das Sapindaceae, cuja área de ocorrência geográfica abrange os Estados do Acre, Amazonas e Pará, chegando até o Rio Pindaré, no Estado do Maranhão; a maior parte das Guianas; parte da Venezuela; Bolívia; Colômbia e Loreto, no Peru. Na Amazônia Brasileira, atualmente, é muito difícil encontrar populações naturais da espécie. É, ainda, uma espécie de valor comercial pouco explorada do ponto de vista da diversidade genética. Foi eleita como objeto de estudos do primeiro projeto da Rede da Amazônia Legal de Pesquisas Genômicas - Realgene, do qual faz parte a Embrapa. Para este primeiro projeto foram propostos o seqüenciamento de até 50 mil ESTs ("expressed sequence tags") de frutos e folhas de guaranazeiro e a geração de bibliotecas genômicas enriquecidas para *loci* microssatélite que deverão ser seqüenciadas para permitir a construção de "primers" específicos para amplificar estes *loci*. Neste trabalho estão descritos resultados da evidenciação do DNA clonado em plasmídeo via PCR e da preparação para o seqüenciamento automático, via tratamento dos insertos amplificados com as enzimas exonuclease I (EXO) e fosfatase alcalina de camarão (SAP). Foi avaliado o número de seqüências com boa qualidade de leitura obtido após o seqüenciamento automático, utilizando condições diferentes para as PCRs e quantidades diferentes das enzimas EXO e SAP.

Termos para indexação: guaraná, ESTs, EXO/SAP.

Adjustment for purifying the amplification products from guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) DNA inserts using exonuclease i and shrimp alkaline phosphatase

Abstract - Guaranaezeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) is a Sapindaceae, naturally found in the Brazilian States of Acre, Amazonas, Pará, and Maranhão, in the region of River Pindaré most of the Guyanas; part of Venezuela; Bolivia; Colombia and Loreto, in Peru. Actually in the Brazilian Amazon region it is very difficult to find native populations of this species, which genetic intraespecific diversity has not been properly explored for the improvement of commercially valuable agricultural characteristics. It was elected as the first target for REALGENE Rede da Amazônia Legal de Pesquisas Genômicas (The Genomic Research Group of the Brazilian Amazon Region) that is prompted to sequence up to 50.000 ESTs (expressed sequence tags) from fruits and leaves and to develop primers for guaranaezeiro microssatelite *loci*. In this work are described and discussed the results attained by treating the products from amplification reactions of guaranaezeiro DNA inserts with exonuclease I (EXO) and shrimp alkaline phosphatase (SAP) as a pre-sequencing purification step. The number of automatic sequenced reads with good and acceptable scores of quality counted after the application of different PCR conditions for amplification and using different EXO/SAP concentrations per purification reaction was evaluated.

Index terms: guarana, ESTs, EXO/SAP.

Introdução

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma planta trepadeira que pode atingir até dez metros de altura na mata. Quando cultivada em áreas abertas, através de estacas, as raízes são fasciculadas, sem sistema pivotante, e as plantas crescem no máximo até dois a três metros. A inflorescência tem forma de cacho, com cerca de 25 cm de comprimento (Faria, 2000; Souza et al., 1996). As flores são parcialmente unissexuais e apresentam simetria irregular, com cinco sépalas, quatro pétalas, oito estames e três carpelos fundidos. Flores masculinas têm ovários rudimentares, e flores femininas apresentam estames com anteras indeiscentes. O ovário é trilocular, com um óvulo por lóculo, podendo ser fecundados um, dois ou os três óvulos. O estigma é trífido (Escobar et al., 1984). São atribuídas ao guaraná, entre outras, as seguintes propriedades: estimulante, afrodisíaco, ação tônica cardiovascular, desinfetante intestinal, combate a cólicas, nevralgias e enxaquecas.

Proposta de pesquisa aprovada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em dezembro de 2002, incluída em ação induzida para o desenvolvimento de Projetos Genoma Regionais, previa a organização de uma rede de laboratórios na Região Amazônica, a Realgene, que se dedica, numa primeira instância, ao seqüenciamento do genoma funcional e à genética genômica do guaranazeiro. Deverão ser seqüenciadas até 50 mil ESTs ("expressed sequences tags") de frutos/sementes e folhas da planta e desenvolvidos marcadores microssatélites para utilização no estudo da variabilidade genética preservada no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental.

Este trabalho teve como objetivo testar a purificação, com as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina, do DNA de guaranazeiro clonado em plasmídios, depois de amplificado por PCR, como preparação para as reações de marcação com dideoxinucleotídeos ligados a grupos cromogênicos e para o processo de seqüenciamento automático. Estes procedimentos, que se pretende sejam mais rápidos e baratos e igualmente eficientes,

poderão ser adotados como alternativa ao cultivo de células bacterianas hospedeiras de bibliotecas de cDNA ou genômicas e à extração de plasmídios de cada clone antes da marcação e do seqüenciamento automático.

Material e Métodos

Primeira Etapa

O lisado de células bacterianas hospedeiras das seqüências recombinantes de DNA foi preparado com 2 μ L do estoque de glicerol (30%) dos clones, previamente organizado em placas "multiwell" identificadas. Esta fração do estoque de cada clone foi aquecida a 95 °C, por 10 minutos, em 50 μ L de tampão TTE (Triton X-100 1%; 20 mM de Tris-HCl, pH 8,5; e 2 mM de EDTA, pH 8,0) e centrifugada, por 5 minutos, a 4.000 rpm (CYMMIT).

Foram utilizados 2 μ L do lisado para amplificar o DNA clonado em plasmídio e o resultado foi analisado em gel de agarose a 1%. Para reação de amplificação com volume final de 25 μ L foram utilizados o **PAR DE "PRIMERS" I** (5' GTAAAACGACGGCCAG 3' e 5'- CAGGAAACAGCTATGAC - 3'), a 5 pmoles, cada; dNTPs a 0,25 mM; cloreto de magnésio a 2,5 mM e 1,5 U de Taq DNA polimerase. O termociclador (Perkin Elmer 2.400) foi programado para o ciclo I: pré-ciclo: 95°C, por 2 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 40 segundos, 55°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos e pós-ciclo: 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

Após a evidenciação do DNA clonado utilizando PCR, os produtos de amplificação foram submetidos ao tratamento de purificação com as enzimas EXOI/SAP (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão, Amersham) em duas concentrações (preparo dos mix, conforme a Tabela 1). A concentração do cloreto de magnésio foi ajustada para alcançar a concentração ótima de atividade para a fosfatase alcalina de camarão (10 mM), depois da adição aos produtos de amplificação por PCR.

Tabela 1. Mix preparados para os testes de purificação de produtos de amplificação de 24 insertos de DNA de guaranzeiro, como preparação para o processo de marcação com dideoxynucleotídeos e de seqüenciamento. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM. 2003.

| Reagentes | Protocolo 1 (µL) | Protocolo 2 (µL) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| EXO I [diluída para 1U/µL] | 3,0 | 9,9 |
| SAP [1 U/µL] | 3,0 | 9,9 |
| MgCl ₂ [500 mM] | 3,6 | 3,6 |
| ÁGUA | q.s.p. | q.s.p. |
| Volume total do mix | 30,0 | 60,0 |
| Tratamento térmico | 15' a 37°C e 15' a 80°C | 30' a 37°C e 15' a 80°C |

Para o pré-tratamento com EXO/SAP, foram adicionados a 6 µL dos produtos de cada reação de amplificação dos insertos, 1 µL do mix preparado para o protocolo 1, ou, a 5 µL dos produtos de cada reação de amplificação, 2 µL do mix preparado para o protocolo 2 e as reações foram submetidas aos tratamentos térmicos indicados na Tabela 1. As concentrações finais das enzimas EXO/SAP nas reações de purificação, de volume final igual a 7 µL, realizadas conforme o protocolo I foram 0,1 unidade de cada uma e, nas reações realizadas conforme o protocolo II, foram 3,3 unidades de cada uma.

Prosseguiu-se com as reações de marcação com dideoxynucleotídeos: tomou-se 5 µL de cada reação de purificação descrita acima para 3 µL de solução Big Dye (Amersham) e 5 pmol de "primer", sendo o volume final de 10 µL. O termociclador foi programado para as temperaturas descritas no ciclo I. As reações de marcação foram precipitadas (1/10 volume de acetato de amônia e 2 volumes de etanol absoluto), ressuspendidas para 10 µL, e parte delas foi injetada no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham).

Segunda Etapa

Para a segunda etapa foi utilizado o **PAR DE " PRIMERS " II**: 5' - CGTGACTGGGAAAACCCTGC - 3' e - 5' - TCACACAGGAAACAGCTATGAC - 3'. Foram testados dois ciclos de amplificação: o ciclo I, descrito para a primeira etapa e o ciclo

II: pré-ciclo: 95°C, por 2 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; pós-ciclo: 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

Resultados e Discussão

Para seqüenciar um fragmento de DNA amplificado por PCR é necessário "purificar" o produto da amplificação, eliminando o excedente de nucleotídeos e "primers" antes de executar a reação de marcação com dideoxynucleotídeos vinculados a grupos cromogênicos e injeção no seqüenciador automático.

O presente trabalho propôs, como alternativa para diminuir gastos, mão-de-obra e tempo para a obtenção de seqüências marcadas, a evidenciação do DNA por PCR e utilização de protocolos desenvolvidos para a purificação pré-seqüenciamento com as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. O procedimento pré-seqüenciamento utilizado atualmente nos laboratórios da Realgene é a cultura das células bacterianas, obtenção do DNA plasmidial através de lise alcalina em minipreps para, só então, realizar a marcação com os dideoxynucleotídeos vinculados a grupos cromogênicos e injetar no seqüenciador automático.

Durante a primeira etapa deste trabalho, observou-se um pequeno número de seqüências (5,26%) com qualidade boa e aceitável de leitura, geradas pelo protocolo 1 (Tabela 1) para EXO /SAP (0,1 U de cada enzima). Utilizando-se o protocolo 2 (3,3 U de cada enzima, Tabela 1) houve um aumento no número de seqüências com qualidade boa e aceitável (88,89%) geradas pelo MegaBACE (Figura 2), o que superou inclusive a quantidade de seqüências com a mesma qualidade obtida pelo cultivo de células bacterianas, extração plasmidial, marcação com dideoxynucleotídeos e só então injeção no seqüenciador automático MegaBACE

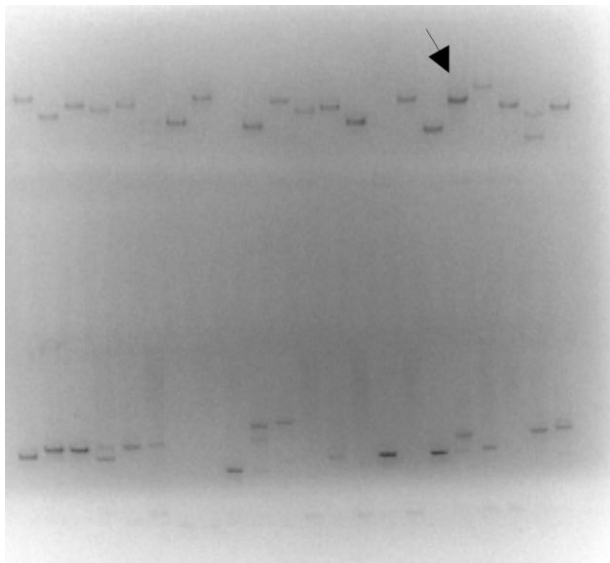


Figura 1. Imagem negativa do gel de eletroforese (agarose 1%) para a resolução de produtos de amplificação de insertos de DNA de guaranzeiro (clone BRS-Amazonas) contido no lisado de células bacterianas, utilizando o par de "primers" I e o ciclo I de amplificação. Observar que, para a maioria dos clones, foi gerado apenas um fragmento, o que significa que os "primers" anelaram em sítios específicos dos plasmídios e que só havia um plasmídio recombinante em cada reação de amplificação. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM, 2003.

No entanto, a quantidade de enzimas para a purificação utilizadas no protocolo I (0,1 unidade de cada enzima por reação de purificação) deveria ser mais do que o suficiente para a eliminação dos grupamentos fosfato em nucleotídeos e para a eliminação de moléculas de "primers" não utilizadas durante a amplificação, o que tem o objetivo de impedir o desequilíbrio dos componentes da reação subsequente, que é de marcação com dideoxinucleotídeos mais grupos cromogênicos reação de Sanger realizada antes da injeção no seqüenciador automático. Segundo o catálogo do fornecedor, uma unidade da exonuclease I (Amersham, código de catálogo E70073) catalisa a liberação de 10 nmol de nucleotídeos a partir de DNA fita simples, em reações de 30 minutos a 37°C, sob condições padrão. Uma unidade de fosfatase alcalina de camarão (Amersham, código de catálogo E70092) é suficiente para hidrolisar 1 µmol de p-nitrofenil-fosfato por minuto, em pH 10,4, a 37°C. Esta última enzima é fornecida com o tampão de reação em pH 8,0 e as reações foram realizadas a pH nesta faixa de 8,0. Portanto, os motivos pelos quais um pequeno número de seqüências com boa qualidade de leitura foi obtido na primeira etapa quando utilizou-se o protocolo I poderiam não estar resumidos à quantidade de enzimas utilizadas para as reações de purificação.

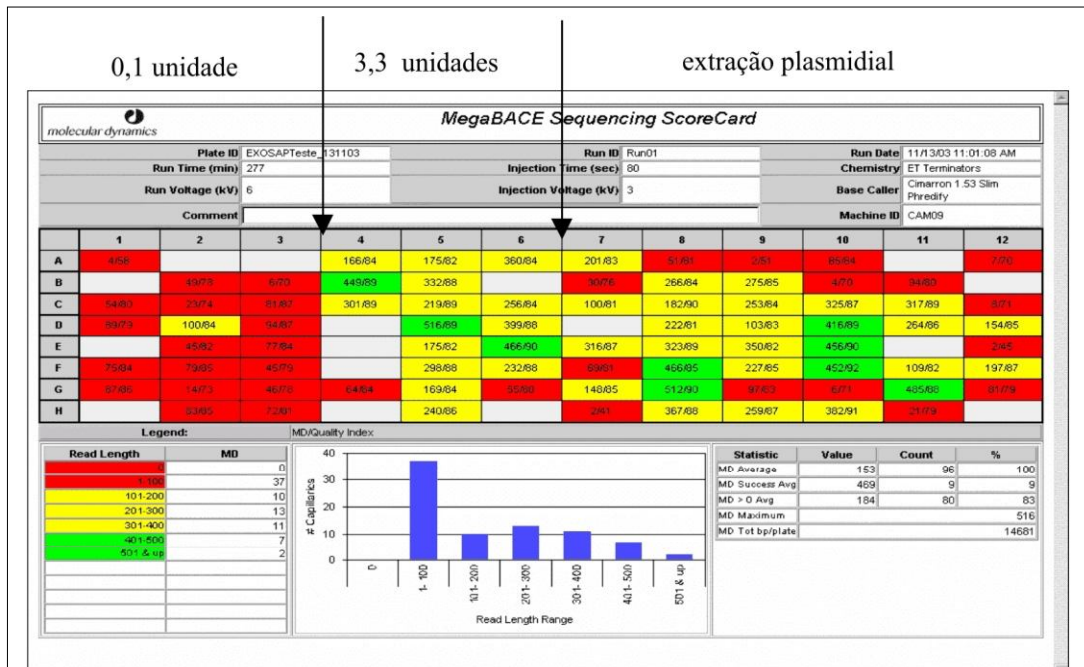


Figura 2. Imagem do score card gerado pelo software vinculado ao seqüenciador automático MegaBACE, indicando a qualidade das seqüências de DNA. A qualidade é indicada pelas cores: vermelho = seqüência de má qualidade (interferência na leitura não permitiu boa resolução dos dideoxinucleotídeos marcados com grupamentos cromogênicos); amarelo = seqüência com qualidade aceitável e verde = seqüência com boa qualidade. Em destaque, na elipse, estão as seqüências produzidas na primeira etapa dos experimentos: colunas 1, 2 e 3 seqüências produzidas após pré-tratamento com 0,1 unidade das enzimas EXO/SAP e colunas 4, 5 e 6 - seqüências produzidas após pré-tratamento com 3,3 unidades das enzimas EXO/SAP. Os scores nas colunas restantes pertencem a seqüências geradas após o cultivo das células bacterianas e a extração de plasmídios por lise alcalina. Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, 2003.

A fim de verificar se o problema fora causado por baixas concentrações de DNA resultante das ampliações ineficazes (Figura 1) ou concentrara-se realmente na atividade enzimática pouco eficiente durante a purificação, para a segunda etapa do experimento adotaram-se "primers" redesenhados com objetivo de aumentar a quantidade de DNA obtido por PCR. No entanto, estes "primers" utilizados para a segunda etapa geraram fragmentos "secundários" em quase todas as reações de amplificação (Figura 3), quando foi utilizado o ciclo I para o termociclador. Então, um ciclo diferente para as PCR - ciclo II - foi utilizado para reamplificar os fragmentos gerados utilizando o ciclo I. Nas reações de reamplificação (Figura 4) verificou-se o surgimento de um número ainda maior de fragmentos "secundários", e concluiu-se que as reações estavam contaminadas e que o DNA contaminante fora reamplificado também.

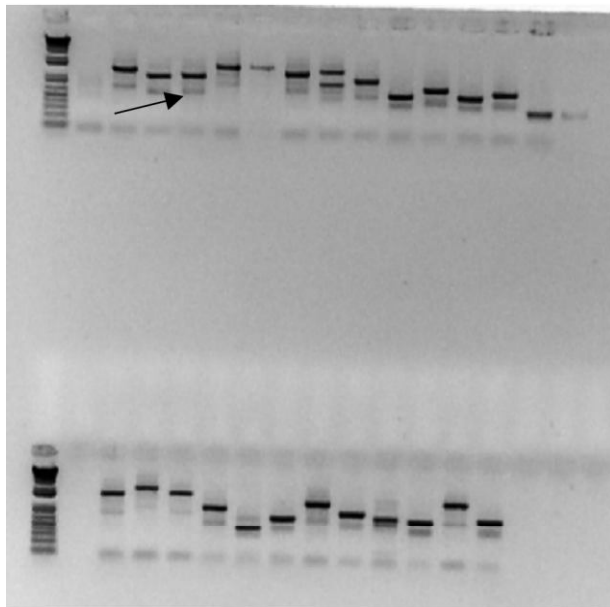


Figura 3. Imagem negativa do gel de eletroforese (agarose 1%) para a resolução de produtos de amplificação de inserções de DNA de guaranazeiro (clone BRS-Amazonas) contidos em lisado de células bacterianas, utilizando o ciclo I do termociclador e o par de "primers" II. Observar que, para a maioria dos clones, foi gerado mais de um fragmento (setas indicando fragmentos "secundários"), o que indica que os "primers" utilizados para essas reações não anelaram em sítios únicos de um único plasmídeo. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM, 2004.

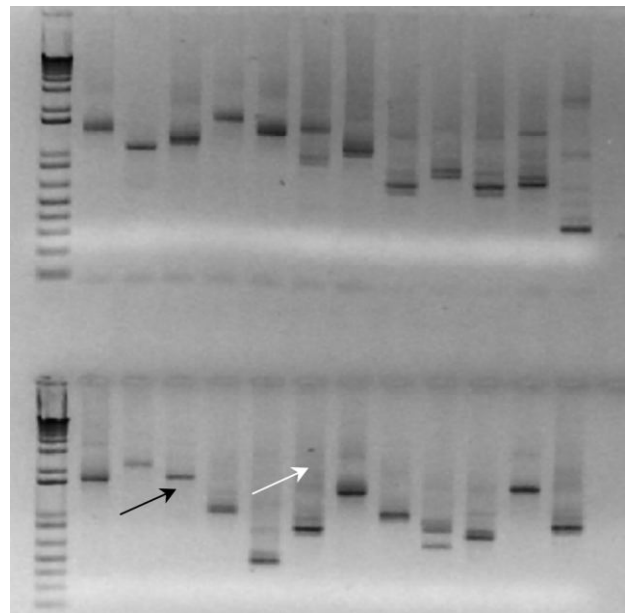


Figura 4. Imagem negativa do gel de eletroforese (agarose 1%) para a resolução dos fragmentos gerados por reamplificação dos produtos de PCR mostrados na Figura 3. Foram utilizados o ciclo II do termociclador e o par de "primers" II. Observar o aumento, inesperado, do número de fragmentos amplificados na maioria das reações (exemplo indicado pela seta branca). Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM, 2004.

Para minimizar o problema gerado pela contaminação, mais experimentos foram realizados tomando novas alíquotas, diretamente do lisado de células bacterianas, para ampliações segundo o ciclo II do termociclador utilizando o par de "primers" II. Fragmentos "secundários" continuaram a ser percebidos, mas em número menor de reações (Figura 5).

A presença de mais de um fragmento amplificado em uma reação de seqüenciamento certamente prejudica a qualidade da leitura pelo seqüenciador automático. Ainda assim, os experimentos foram conduzidos até a fase de seqüenciamento e os testes de purificação foram realizados com 0,1; 1,5 e 3,3 U de enzimas por reação (Figura 6). O número de seqüências com boa qualidade e qualidade aceitável, verificado entre reações preparadas utilizando 0,1 U de enzimas (26,67%), foi superior ao verificado na primeira etapa (5,26%, Figura 2). O número de seqüências com boa qualidade ou qualidade aceitável verificado para reações preparadas utilizando 1,5 U de enzima foi 66,67% do total, superior à que foi alcançada pela preparação para seqüenciamento via cultivo de células e

extração de plasmídios, na primeira etapa (65,12%, Figura 2), segundo os *scores* fornecidos pelo software associado ao MegaBACE. Reações com qualidade boa e aceitável produzidas pelo pré-tratamento com 3,3 unidades de enzima atingiram, na segunda etapa, apenas 75% das seqüências que foram lidas (Figura 6).

Uma vez que a maior diferença entre as reações tratadas com EXO/SAP na primeira etapa (Figura 1, amplificação pouco eficiente e específica) e na segunda etapa (Figura 5, amplificação eficiente mas pouco específica) do trabalho foi a quantidade e a qualidade dos fragmentos amplificados submetidos à purificação, e já que houve tanto melhora (para reações com 0,1 U de enzima, 5,26% na primeira etapa e 26,67% na segunda etapa) quanto piora (para reações com 3,3 U de enzima, 88,89% na primeira etapa e 75,00% das reações, na segunda etapa) nos resultados da segunda etapa com relação aos resultados alcançados na primeira etapa, sugere-se que o processo de purificação por tratamento com EXO/SAP seja testado novamente, quando todos os outros passos do seqüenciamento - qualidade e quantidade de inserto amplificado por PCR - estiverem estabilizados.

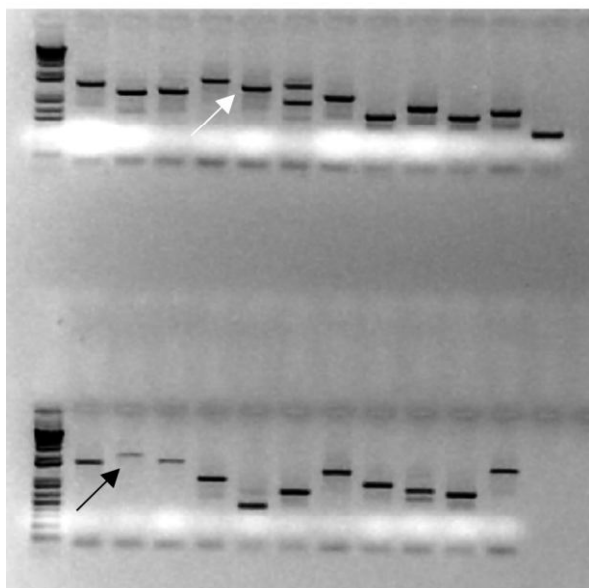


Figura 5. Imagem negativa do gel de eletroforese (agarose 1%) para a resolução de produtos de amplificação de insertos de DNA de guaranazeiro (clone BRS-Amazonas) contidos no lisado de células bacterianas, utilizando o ciclo II do termociclador e o par de "primers" II. Observar, por comparação com a Figura 3, o desaparecimento (seta preta) dos fragmentos "secundários" em algumas das reações e a persistência (seta branca) desses fragmentos em outras reações. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM, 2004.

0,1 unidade

| | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|------|--|-------|-------|
| 52/87 | 6/67 | | 28/77 | | 78/80 | 103/85 | 350/85 | | | 53/83 | 82/88 |
| 37/77 | | 48/83 | 41/66 | 178/87 | 370/88 | | 161/82 | 3/63 | | | |

1,5 unidade

| | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--|--------|--|--------|--------|--------|--------|-------|
| 80/78 | 73/68 | 217/85 | 115/82 | | 65/67 | | 306/80 | 538/84 | 358/86 | 212/83 | 68/88 |
| 488/82 | 243/82 | | | | 550/68 | | 508/66 | | | | 67/71 |

3,3 unidades

| | | | | | | | | | | | |
|--------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 84/79 | | 208/83 | 747/87 | 129/78 | | 101/84 | 570/87 | 545/88 | 576/85 | 328/84 | 82/82 |
| 684/81 | | 126/80 | 97/85 | 151/80 | 684/86 | 123/87 | 113/81 | 72/82 | 409/84 | 73/81 | |

Figura 6. Imagem do *score card* gerado pelo software vinculado ao seqüenciador automático MegaBACE, indicando a qualidade das seqüências de DNA. A qualidade é indicada pelas cores: vermelho = seqüência de má qualidade (interferência na leitura não permitiu boa resolução dos dideoxinucleotídeos marcados com grupamentos cromogênicos); amarelo = seqüência com qualidade aceitável e verde = seqüência com boa qualidade. Os fragmentos foram amplificados utilizando o ciclo II, par de "primers" II e o número de unidades de enzimas EXO/SAP indicadas acima dos *scores*. Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, 2004.

Conclusões

- ✎ A qualidade dos produtos de amplificação para evidenciação do DNA clonado influenciou diretamente no sucesso das reações de purificação com EXO/SAP;
- ✎ Os resultados indicaram que a utilização de 1,5 unidade de exonuclease e fosfatase alcalina por reação de purificação pré-seqüenciamento foi suficiente para atingir número semelhante de seqüências com qualidade boa e aceitável àquele que é atingido utilizando o cultivo das células bacterianas transformadas e a extração de plasmídios, quando as reações de PCR para evidenciação dos insertos que foram seqüenciados eram relativamente boas;
- ✎ Os testes com quantidades menores que 1,5 unidade das enzimas podem apresentar melhores resultados do que os que foram aqui descritos, quando as reações de PCR para evidenciação dos insertos que serão seqüenciados estiverem aprimoradas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa e apoio financeiro ao projeto; à Embrapa Amazônia Ocidental, por ter cedido instalações e pelo fornecimento de transporte e alimentação para que a bolsista pudesse cumprir estágio; ao técnico do

laboratório de biotecnologia vegetal da Embrapa, Jeferson Chagas da Cruz; ao Prof. Spartaco Astolfi Filho e à Enedina Nogueira Assunção, por terem cedido tempo para me orientarem e fazer meu trabalho na Ufam.

Referências Bibliográficas

C Y M M I T . Disponível em: <<http://www.cimmyt.org/ABC/Protocols/PCRBacterialCultureInserts>>. Acesso em: 15 nov. 2004.

ESCOBAR, J. R.; CORREA, M. P. F.; AGUILERA, F. J. P. Estruturas florais, floração e técnicas para a polinização controlada do guaraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO GUARANÁ, 1., 1983, Manaus. **Anais...** Manaus: EMBRAPA-UEPAE de Manaus, 1984. 547 p. (EMBRAPA-UEPAE de Manaus. Documentos, 3).

FARIA, J. J. P. **Manual de produção do guaraná**. Cuiabá, MT: SEBRAE, 2000. Não paginado.

GSC (Genomic Sequencing Consortium). Disponível em: <[Http://genome.wuatl.edu/gsc/GSC_Protocols/footer.htm](http://genome.wuatl.edu/gsc/GSC_Protocols/footer.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2001.

SOUZA, A. G. C. et al. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1996. 204 p. (Biblioteca Botânica Brasileira, 1).