



EXTRAÇÃO DE DNA DE BAMBU DO GÊNERO *Guadua* UTILIZANDO DIFERENTES PARTES DO TECIDO VEGETAL PARA OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO.

RESUMO: As florestas abertas com bambu do gênero *Guadua* “Tabocais”, no Acre, são incomuns na Amazônia, mas no sudoeste da bacia, cobrem áreas extensas. *Guadua* é um dos gêneros de bambu com maior amplitude de distribuição no novo mundo. Devido as suas características de durabilidade, resistência, facilidade de manuseio, impermeabilidade, baixa combustão e alto poder calorífico, o bambu vem sendo utilizado em diversas atividades que incluem do paisagismo à construção civil. Nesse sentido, é que se tornam importantes os estudos genéticos, a fim de estimar a diversidade genética em populações naturais. O presente trabalho tem o objetivo de aperfeiçoar o protocolo para a extração do DNA de Bambu do gênero *Guadua*, para que posteriormente sejam feitas as análises necessárias. A coleta do bambu foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre). Foram selecionadas partes do colmo jovem, bainha do colmo jovem e folha jovem, para que os testes de extração fossem realizados. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo CTAB 2%. O tecido que apresentou maior concentração de DNA foi a folha jovem, com 300 ng/μl. Com base nos resultados recomenda-se a utilização do tecido foliar de Bambu do gênero *Guadua* para a extração de DNA, a fim de que se possa obter uma maior quantidade de estoque de material para futuras análises genéticas.

Palavras-chave: EXTRAÇÃO DE DNA, BAMBU, *Guadua*, CONSERVAÇÃO GENÉTICA, AMAZÔNIA

BAMBOO DNA EXTRACTION OF GENDER *Guadua* USING DIFFERENT FABRIC PARTS PLANT TO PROTOCOL OPTIMIZATION

ABSTRACT: Open forests with Bamboo *Guadua* gender "Tabocais" in Acre, are unusual in the Amazon, but in southwestern basin, cover extensive areas. *Guadua* is one of the bamboo genera with greater amplitude distribution in the new world. Due to its characteristics of durability, strength, ease of handling, proofing, low combustion and high calorific value, bamboo has been used in various activities that include landscaping to construction. Therefore, it is important that become genetic studies in order to estimate the genetic diversity in natural populations. This study aims to improve the protocol for extraction of DNA from Bamboo *Guadua* gender, so that the necessary analyzes are subsequently made. The collection of bamboo was held in Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre). Parts of the young culm, sheath of the young culm and young leaf, so that the



extraction tests were performed were selected. The genomic DNA extraction followed the 2% CTAB protocol. The tissue with the highest concentration of DNA was the young leaf, with 300 ng / μ l. Based on the results it is recommended to use the bamboo leaf tissue of *Guadua* for DNA extraction, so that it can obtain a larger amount of stock material for further genetic analysis.

KEYWORDS: EXTRATION DNA, BAMBOO, *Guadua*, GENETIC CONSERVATION, AMAZON

INTRODUÇÃO

As florestas abertas com bambu do gênero *Guadua*, “Tabocais”, no Acre, são incomuns na Amazônia, mas no sudoeste da bacia, cobrem áreas extensas (SILVEIRA, 2001). Dentre as onze tipologias florestais identificadas no Acre, o bambu ocorre em cinco (GOVERNO DO ESTADO DO ACRE, 2000). O bambu é uma planta pertencente à família Poaceae (Gramineae), subfamília Bambusoideae, espalhados em cerca de 88 gêneros e, aproximadamente, 1400 espécies (LIN et al., 2012). De maneira geral, o bambu pode ser dividido em dois grandes grupos: os bambus considerados “lenhosos”, mais facilmente identificáveis e de maior importância econômica (pertencentes às tribos Arundinarieae e Bambuseae), e os bambus “herbáceos”, característicos de áreas de sub-bosques (pertencentes à tribo Olyreae), que são mais raros, representando possivelmente um clado originado dos bambus lenhosos (YANG et al., 2008; KELCHNER, 2013). As espécies do gênero *Guadua* são arborescentes, em geral apresentam espinhos nos colmos e ramos, e assim como outros bambus, são semelparas (um único evento de reprodução sexuada) e monocárpicas (morrem após esse evento) (SILVEIRA 2001). *Guadua* é um dos gêneros de bambu com maior amplitude de distribuição no novo mundo (LONDOÑO; PETERSON 1991), e a maioria das 33 espécies ocorre no México, América Central e na América do Sul, com exceção do Chile, em savanas, cerrados e florestas de galeria, florestas montanas baixas e florestas tropicais de terras baixas (CLARK, 1995). Devido as suas características de durabilidade, resistência, facilidade de manuseio, impermeabilidade, baixa combustão e alto poder calorífico, o bambu vem sendo utilizado em diversas atividades que incluem do paisagismo à construção civil. Além disso, é também uma realidade como matéria prima para a alimentação humana e animal, o bambu também é utilizado na recuperação de áreas degradadas, no controle da erosão e no enriquecimento físico e químico do solo. Por se tratar de um gênero promissor, e por ser muito comum na região do estado do Acre, políticas públicas estão sendo criadas para o uso desse gênero como fonte de renda para as famílias e para o desenvolvimento da economia local e nacional. Partindo desse princípio, programas que visem à conservação da espécie do ponto de vista populacional e genético são importantes para manutenção das populações naturais, e para posterior manejo das espécies do gênero *Guadua*. Partindo desse princípio, esse trabalho teve como objetivo, testar diferentes partes de bambu do gênero *Guadua* na extração de DNA e determinar qual a melhor estrutura a ser utilizada, para que posteriormente sejam feitas as análises genéticas necessárias em estudos de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do bambu foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre). Foram selecionadas partes do colmo jovem, bainha do colmo jovem e folha jovem, para que os testes de extração fossem realizados (FIGURA 1). Após a coleta, as folhas jovens e a bainha do colmo jovem foram armazenadas em sacos de polietileno transparente com sílica gel azul, para que fossem desidratadas. O colmo jovem foi acondicionado imediatamente após a coleta em microtubos contendo 1,0 mL de tampão de transporte (30% de tampão de extração CTAB a 2%: 70% Etanol) e levado para o laboratório onde foi armazenado a -20°C para posterior extração de DNA. Os testes de extração foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular (Labmol) da Embrapa Acre. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987) adaptado por Ferreira e Grattapaglia (1998) sendo que os tecidos selecionados para os testes foram macerados usando um macerador automático Fast Prep[®] (Termo Savant) com 100mg dos materiais selecionados, utilizando duas beads de tungstênio com 3mm de diâmetro para trituração do material, por tempo de 80s, com frequência de 4rpm. Depois de extraído, o DNA genômico foi quantificado em eletroforese submarina em gel de agarose (1%) por 60 min sob 70 Volts (V) e 45 miliAmpere (mA). As concentrações de DNA foram comparadas por meio da análise comparativa de cada amostra com o DNA padrão fago λ de peso molecular conhecido (50 e 100 ng). Após a quantificação o DNA foi visualizado por meio do transilluminator UVP.



Figura1. Coleta dos tecidos bainha do colmo jovem e colmo jovem (A). Vista da touceira de bambu do gênero *Guadua* (B).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas concentrações significativas para todos tecidos de bambu selecionados no teste. Para a folha jovem a maior concentração encontrada foi 300ng/ μ l, para o colmo jovem foi encontrado 200ng/ μ l e para a bainha do colmo 100ng/ μ l. Os tecidos analisados demonstraram boa qualidade de DNA (FIGURA 2). A parte do tecido de Bambu que obteve maior concentração de DNA foi a folha jovem. Como os bambuzais são de difícil acesso, a coleta de folhas facilita o trabalho e garante um melhor acesso ao material, sendo que o seu armazenamento é bem mais simples e permite que um volume maior por amostra seja conservado e mantido em boas condições de armazenamento. Comparado ao colmo jovem, que precisa ser armazenado em tampão de transporte e que necessita de refrigeração

após a coleta. Levando em consideração áreas de coleta de difícil acesso, como em florestas naturais, a coleta de folhas é bem mais viável, tanto para a coleta, quanto para o armazenamento, e por fim, mostrou uma maior concentração de DNA extraído, em relação às outras partes que foram analisadas. Rugeles-Silva (2012) e Zappelini (2014) também obtiveram boas concentrações de DNA proveniente de folhas para esse mesmo gênero. Para a bainha do colmo jovem, a sílica não é uma boa forma de armazenagem, pois pelo que foi verificado além de resultar em baixas concentrações de DNA total, com um valor mínimo de 10ng/μl a estrutura sofre uma oxidação aparente, ficando o tecido escurecido. Essa oxidação pode ter afetado a baixa concentração de DNA comparada às demais estruturas.

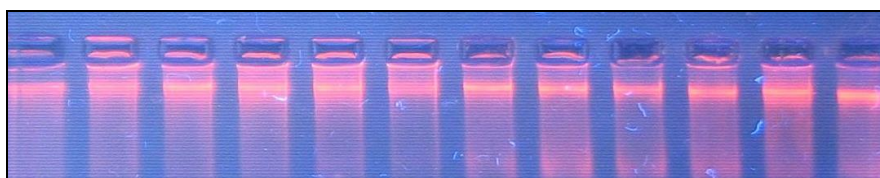


Figura 2. Imagem da quantificação de DNA de Bambu.

CONCLUSÕES

Com base nesses resultados, recomenda-se a utilização do tecido foliar de Bambu do gênero *Guadua* para a extração de DNA, a fim de que se possa obter uma maior quantidade de estoque de material para futuras análises genéticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Doutorado de Biotecnologia e Biodiversidade/Bionorte. A Embrapa Acre pela Infraestrutura Laboratorial, aos Analistas da Embrapa Acre Lucielio Manoel da Silva pela ajuda no laboratório e nas coletas de campo, e ao Bruno Imbroisi na identificação do material. A doutoranda Hellen Azevedo por auxiliar nas atividades desenvolvidas no laboratório. E a Capes pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

CLARK, L.G. Diversity and distribution of the Andean woody bamboos (Poaceae: Bambuseae). **Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forest**. (Ed. by S.P. Churchill, H. Balslev, H. Forero & J.L. Luteyn). New York, The New York Botanical Garden. 1995. pp.501-512

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus Rockville**, v.12, n.1, p.13-15. 1987.



FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed, Brasília: Embrapa – Cenargen, p. 220.1998.

GOVERNO DO ESTADO DO ACRE, Rio Branco. **Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre: Recursos Naturais e Meio Ambiente**, vol.1. Rio Branco, Ministério do Meio Ambiente/Cooperação Brasil-Alemanha/PPG-7. 2000.

LIN X.; HUANG, L.; FANG W. **Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis**, DR. KEN-ICHI SATO (ED.), ISBN: 978-953-51-0466-7, INTECH, DOI: 10.5772/37138. 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/bamboo-regeneration-via-embryogenesis-and-organogenesis>.

LONDOÑO, X.; PETERSON, P.M. *Guadua sarcocarpa* (Poaceae:Bambuseae), a new species of Amazonian bamboo with fleshy fruits. **Systematic Botany**,v.16, 630-638. 1991

KELCHNER, S.A. & BAMBOO PHYLOGENY GROUP. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**,v. 67, pp. 404–413, 2013.

RUGELES-SILVA. et al. Caracterización molecular de *Guadua angustifolia* Kunth mediante marcadores moleculares RAMs. **Acta Agronómica**. V.61, p. 325-330. 2012.

SILVEIRA, M. **A floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas**. 2001. Tese de Doutorado em Ecologia, Departamento de Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2001.

YANG, H.Q.; YANG, J.B.; PENG, Z.H.; GAO, J.; YANG, Y.M.; PENG, S. & LI, D.Z. A molecular phylogenetic and fruit evolutionary analysis of the major groups of the paleotropical woody bamboos (Gramineae: Bambusoideae) based on nuclear ITS, GBSSI gene and plastid trnL-F DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**,v. 48, p.p., 809–824, 2008.

ZAPPELINI, J. **Diversidade genética de espécies de Bambu na ilha de Santa Catarina: Observações preliminares**. Florianópolis. 2014. 30p.