

Extração de DNA do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para análises de marcador AFLP

DNA extraction of physic nut (*Jatropha curcas* L.) for analyses of AFLP marker

Tuany Priscila P. Costa¹; Carlos Antônio F. Santos²; Marciene A. Rodrigues¹; Hugo Leonardo C. Ribeiro¹; Maria Maiany de Oliveira³; Jucilene S. Araújo; Marcos Antônio Drumond²

Resumo

O pinhão manso é uma oleaginosa, da família *Euphorbiaceae*, que tem grande potencial para a produção de biodiesel. Este trabalho teve como objetivo utilizar o protocolo geral de extração de DNA CTAB 2x para a espécie de pinhão manso, visando estudos de diversidade genética através de marcadores de AFLP. O DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e saudáveis de plantas de pinhão-manso, segundo protocolo do CTAB 2x com algumas adaptações (500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB 0,2% (p/v); 2% β -mercaptoetanol; 20 mM de EDTA). A concentração e a integridade do DNA genômico foram observados em géis 0.8% de agarose, comparado a um DNA lambda de 30, 50 e 100 ng/ μ L. O protocolo CTAB 2x proporcionou a extração de DNA genômico de boa qualidade, sem indícios de degradação para as 60 amostras de pinhão manso. A concentração estimada de DNA variou de 50 ng/ μ L a 200

¹Estudante de Ciências Biológicas da UPE, Estagiário da Embrapa Semi-Árido; C. P. 23, CEP 56302-970 Petrolina-PE; ²Pesquisador da Embrapa Semi-Árido; ³Estudante de Ciências Biológicas da UPE, Bolsista da Embrapa Semi-Árido/ CNPq. casantos@cpatsa.embrapa.br

ng/μL, indicando que o protocolo proporcionou concentrações adequadas para os trabalhos com PCR. As reações de AFLP com o DNA extraído com o protocolo CTAB 2x foram eficientes, apresentando polimorfismo compatível com outras espécies vegetais, indicando que o protocolo é eficiente para extração de DNA do pinhão manso.

Palavras-chave: Oleaginosa, PCR, CTAB 2x.

Introdução

O Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta da família *Euphorbiaceae*. O gênero *Jatropha* possui cerca de 175 espécies distribuídas pela América Tropical, Ásia e África. Apresenta grande destaque entre as oleaginosas por ser uma planta adaptada a diversos ambientes, rústica, perene, pouco atacada por pragas e doenças entre outros atributos, despertando interesse em diversos setores (Saturnino, 2005).

Diversas técnicas de biologia molecular estão atualmente disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA via PCR (*Polimerase Chain Reaction*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microsátélites visando a detecção de polimorfismo genético. Tais marcadores de DNA podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como no melhoramento de plantas e animais (Ferreira e Grattapaglia, 1995). A identificação e caracterização da diversidade genética de plantas por meio de técnicas moleculares envolvem a avaliação de vários indivíduos, necessitando-se, portanto, de métodos rápidos e precisos de extração do DNA.

Este trabalho teve como objetivo ajustar o protocolo geral de extração de DNA CTAB 2x para a espécie de pinhão manso (*J. curcas* L.), visando estudos de diversidade genética através de marcadores de AFLP.

Material e Métodos

Foram coletadas folhas sadias de 60 acessos do pinhão manso, das quais foi extraído DNA genômico segundo protocolo de CTAB 2x (Doyle e Doyle, 1990) com algumas adaptações (500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB 0,2% (p/v); 2% β-mercaptoetanol; 20 mM de EDTA). Foi utilizada concentração do β-mercaptoetanol de 2%, um aumento de 10x em relação ao protocolo padrão.

Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foi pulverizado em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido, para romper as paredes e membranas celulares. Posteriormente, o tecido pulverizado foi coletado com uma espátula de plástico descartável, evitando-se contaminação na tampa do microtubo, para suspensão em 950 μ L tampão de extração CTAB 2x em microtubos. Todas as amostras maceradas foram mantidas a temperatura ambiente até a obtenção de um lote de para compor o rotor da microcentrifuga. A suspensão foi incubada a temperatura de 60 °C durante 30 minutos em banho-maria e homogeneizada por inversão cuidadosa dos tubos a cada 10 minutos. Após a retirada dos tubos do banho-maria, deixou-se esfriar por 5 minutos, adicionando-se 950 μ L de Clorofórmio + Álcool Isoamílico (24:1), seguido da centrifugação das amostras por 10 minutos a 6000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo, adicionando-se 2/3 do volume alíquotado (~320 μ L) de álcool isopropílico (-20 °C) para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos foram mantidos no gelo por aproximadamente 30 min. Logo após, centrifugou-se por 10 min a 11000 rpm, descartando-se o sobrenadante em recipiente apropriado, utilizando-se uma capela de exaustão. Esperou-se a evaporação do álcool por 2h e o DNA foi diluído em 20 μ L de TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA), armazenando-se em geladeira. No dia seguinte, adicionou-se 10% do volume da solução de DNA de RNase (10 mg/ μ L) em cada microtubo e colocou-se em banho-maria à 37°C por 30 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C. Todo o material de extração de DNA (almofariz, pistilo e espátula de plástico descartável) foi tratado com ácido clorídrico 3 N para evitar-se contaminações.

A concentração e a integridade do DNA genômico foram observadas em géis 0.8% de agarose comum, comparando-se o DNA lambda de 30, 50 e 100 ng/ μ L. Para cada amostra, foram alíquotadas 5 μ L do DNA estoque e 3 μ L do tampão de carregamento (azul de bromofenol e glicerol), submetendo-se em seguida a uma corrida em eletroforese a 100 V, por uma hora. O DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Olympus.

Resultados e Discussão

O protocolo CTAB 2x proporcionou a extração de DNA genômico de boa qualidade, sem indícios de degradação para as 60 amostras de pinhão manso (Fig. 1). A concentração estimada de DNA variou de 50 ng/ μ L a 200 ng/ μ L (Tabela 1), indicando que o protocolo proporcionou concentrações adequadas para trabalhos com PCR. De modo geral as concentrações de DNA para trabalhos com PCR são de 10 a 20 ng/ μ l para RAPD, 20 a 30, ng/ μ L para SSRs e 50 ng/ μ L para AFLP (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Tabela 1. Concentração DNA do Pinhão-manso extraído pelo método do CTAB 2x.

| Identificação | Concentração de DNA (ng/ μ l) | Identificação | Concentração de DNA (ng/ μ l) |
|-----------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Triunfo 1 | 100 | Tanzânia 1 | 200 |
| Triunfo 2 | 100 | Tanzânia 2 | 65 |
| Triunfo 3 | 100 | Tanzânia 3 | 100 |
| Triunfo 4 | 100 | Tanzânia 4 | 100 |
| Triunfo 5 | 100 | Tanzânia 5 | 80 |
| Brasil 1 | 250 | Pará 3. 1 | 100 |
| Brasil 2 | 250 | Pará 3. 2 | 100 |
| Brasil 3 | 250 | Pará 3. 3 | 100 |
| Brasil 4 | 250 | Pará 3. 4 | 100 |
| Brasil 5 | 250 | Pará 3. 5 | 130 |
| R. Dominicana 1 | 150 | Pará 1. 1 | 50 |
| R. Dominicana 2 | 150 | Pará 1. 2 | 50 |
| R. Dominicana 3 | 100 | Pará 1. 3 | 150 |
| R. Dominicana 4 | 100 | Pará 1. 4 | 60 |
| R. Dominicana 5 | 125 | Pará 1. 5 | 60 |
| S. Paulo 1 | 50 | Juazeiro 1 | 100 |
| S. Paulo 2 | 100 | Juazeiro 2 | 150 |
| S. Paulo 3 | 100 | Juazeiro 3 | 100 |
| S. Paulo 4 | 100 | Juazeiro 4 | 100 |
| S. Paulo 5 | 100 | Juazeiro 5 | 50 |
| Janaúba 1 | 50 | Paraguai 1 | 100 |
| Janaúba 2 | 100 | Paraguai 2 | 175 |
| Janaúba 3 | 200 | Paraguai 3 | 200 |
| Janaúba 4 | 100 | Paraguai 4 | 200 |
| Janaúba 5 | 100 | Paraguai 5 | 100 |
| Pará 2. 1 | 50 | Petrolina 1 | 50 |
| Pará 2. 2 | 100 | Petrolina 2 | 50 |
| Pará 2. 3 | 200 | Petrolina 3 | 50 |
| Pará 2. 4 | 200 | Petrolina 4 | 50 |
| Pará 2. 5 | 150 | Petrolina 5 | 60 |

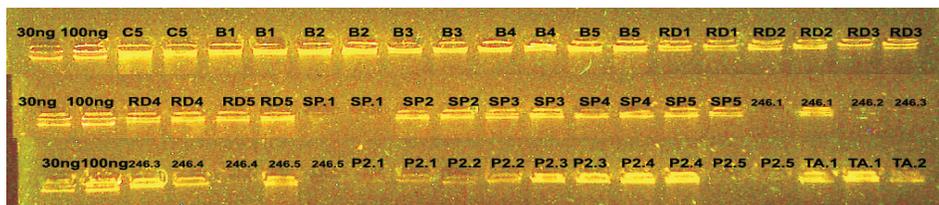


Fig. 1. Géis de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, com padrões de 30, 50 e 100 ng e volume de 2-mercaptoetanol etanol 0,2% (A) e 2% (B).

O objetivo de qualquer protocolo de extração é a obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente. Os protocolos de extração devem evitar a degradação do DNA pelas DNases, eliminar os polissacarídeos que inibem a ação de enzimas, e eliminar as substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA. Geralmente, o que se observa é o uso de protocolos com algumas modificações visando resolver problemas metodológicos da espécie em estudo (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Reações de AFLP com o DNA extraído com o protocolo CTAB 2x foram eficientes (Fig. 2), apresentado polimorfismo compatível com outras espécies vegetais, indicando que o protocolo é eficiente para extração de DNA do pinhão manso.

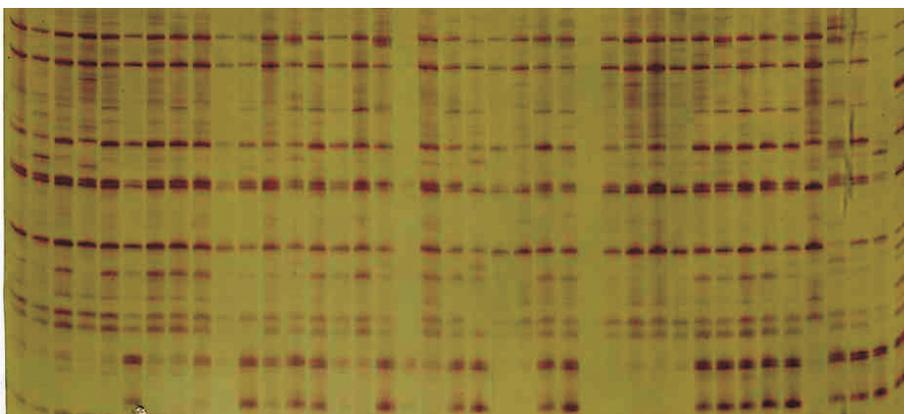


Fig. 2. Gel de poliacrilamida 6% com amostras de DNA de pinhão-manso segundo protocolo AFLP.

Agradecimentos

A Finep pelo apoio financeiro. A Embrapa Semi-Árido pela concessão do estágio e a disponibilização da estrutura física para realização dos trabalhos. Aos estagiários, bolsistas e funcionários do laboratório de genética.

Referências Bibliográficas

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

SATURNINO, H. M. Cultura do pinhão manso. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 299, p. 44-74, 2005.