



ANAIS - II CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS

11-SESSÃO PÔSTER 02
26/09/2012 17:30-18:30
CAMAROTE A/B

[Trabalho 415]

 **Clique para abrir o Artigo Completo/Click to open the paper**

VEGETAL

COMPARAÇÃO DE SEIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM BABAÇU.

JOÃO PAULO GOMES VIANA¹; SULIMARY OLIVEIRA GOMES²; ANGELA CELIS DE ALMEIDA LOPES³; REGINA LUCIA FERREIRA GOMES⁴; PAULO SARMANHO DA COSTA LIMA⁵; SÉRGIO EMÍLIO DOS SANTOS VALENTE⁶; 1,2,3,4,6. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ, TERESINA, PI, BRASIL; 5. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, TERESINA, PI, BRASIL; jpgv2004@hotmail.com

Resumo:

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é uma das palmeiras mais importantes do Brasil. Estudar a variabilidade disponível em populações desta espécie é necessário a fim de se estabelecer estratégias de conservação. O estudo da variabilidade genética pode ser feita por meio de marcadores moleculares e muitas destas preparações exigem DNA de qualidade e em quantidades adequadas. Este estudo objetivou avaliar seis métodos de extração de DNA em babaçu. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com os protocolos originais. A qualidade e concentração de ácidos nucleicos foram reveladas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. Com base nos dados obtidos por espectrofotometria foi possível observar que na aplicação de alguns métodos obteve-se alta concentração de ácidos nucleicos, no entanto, em algumas amostras não foi possível encontrar valores adequados das relações A260/280 e A260/230 os quais fornecem um indicativo de qualidade. Após a eletroforese em gel de agarose foi possível verificar a concentração e integridade do DNA. Com a obtenção dos resultados, constatou-se que apenas um dos métodos não forneceu quantidades satisfatórias de DNA. Os demais métodos foram eficientes no isolamento de altas concentrações de DNA de babaçu, mas dentre estes, alguns não foram adequados para o isolamento de DNA em qualidade satisfatória. Com este estudo, sugere-se então o método mais eficiente na extração de DNA de babaçu em quantidade e qualidade satisfatória.



COMPARAÇÃO DE SEIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM BABAÇU

Resumo: O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é uma das palmeiras mais importantes do Brasil. Estudar a variabilidade disponível em populações desta espécie é necessário a fim de se estabelecer estratégias de conservação. O estudo da variabilidade genética pode ser feita por meio de marcadores moleculares e muitas destas preparações exigem DNA de qualidade e em quantidades adequadas. Este estudo objetivou avaliar seis métodos de extração de DNA em babaçu. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com os protocolos originais. A qualidade e concentração de ácidos nucleicos foram reveladas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. Com base nos dados obtidos por espectrofotometria foi possível observar que na aplicação de alguns métodos obteve-se alta concentração de ácidos nucleicos, no entanto, em algumas amostras não foi possível encontrar valores adequados das relações $A^{260/280}$ e $A^{260/230}$ os quais fornecem um indicativo de qualidade. Após a eletroforese em gel de agarose foi possível verificar a concentração e integridade do DNA. Com a obtenção dos resultados, constatou-se que apenas um dos métodos não forneceu quantidades satisfatórias de DNA. Os demais métodos foram eficientes no isolamento de altas concentrações de DNA de babaçu, mas dentre estes, alguns não foram adequados para o isolamento de DNA em qualidade satisfatória. Com este estudo, sugere-se então o método mais eficiente na extração de DNA de babaçu em quantidade e qualidade satisfatória.

Palavras-chave: germoplasma, recursos genéticos, variabilidade genética

Introdução

A espécie *Orbignya phalerata* Mart., conhecida popularmente como babaçu, é uma palmeira nativa do Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. O nordeste brasileiro é a região que possui maior ocorrência desta espécie, mantendo a maior produção de amêndoas devido à atividade extrativista a qual reflete sua elevada importância socioeconômica.

O germoplasma de uma espécie deve ser protegido de eventuais perdas genéticas e para o desenvolvimento de estratégias de conservação genética são necessários estudos da distribuição de variabilidade genética dentro e entre as populações. Os rápidos avanços na biologia molecular têm



fornecido um número de novos métodos para estudos genéticos de populações naturais. O estudo da variabilidade genética pode ser feita por meio de marcadores moleculares e muitas destas preparações exigem DNA de qualidade e em quantidades adequadas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar protocolos de extração do DNA genômico em *Orbignya phalerata* para identificar quais resultam em DNA de qualidade e em quantidade adequada para uso em estudos moleculares.

Material e Métodos

O material vegetal consistiu de folhas jovens, livres de ectoparasitas e organismos epibióticos. As folhas foram envolvidas com papel toalha, colocadas em sacos plásticos que foram imersos em caixas de isopor® contendo gelo e para ser levado ao laboratório onde foram realizadas as extrações. Os protocolos avaliados foram os descritos por Dellaporta et al. (1983), Doyle e Doyle (1987), e Grattapaglia e Sederoff (1994), Romano e Brasileiro (1998), Khanuja et al. (1999) e Warude et al. (2003), todos de acordo com as recomendações originais, excetuando a quantidade de tampão de extração por amostra que foi adaptada para 100mg de tecido vegetal. A qualidade e concentração de ácidos nucleicos foram reveladas por espectrofotometria, por meio do equipamento NanoDrop® 2000-2000c, onde foi considerado os valores emitidos para as razões $A^{260/280}$ (indicam a concentração de DNA em relação a de proteínas) e $A^{260/230}$ (indicam a concentração do DNA em relação a metabólitos secundários e componentes do tampão de extração). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, usando o intercalante GelRED™ e o agente carreador Azul de Bromofenol. O gel foi visualizado sob incidência de luz UV e fotografado com auxílio do equipamento MINIBis Pro®.

Resultados e Discussão

Alguns métodos resultaram em altos valores de concentração de ácidos nucleicos, indicando uma possível eficácia no isolamento de DNA em alta quantidade. No entanto, as amostras correspondentes a alguns destes métodos apresentaram valores das razões de absorvância $A^{260/280}$ e $A^{260/230}$ fora dos limítrofes indicadores de pureza, que correspondem aos intervalos de 1,8 a 2,0 para a primeira relação e 2,0 a 2,2 para a segunda.



As amostras submetidas aos métodos descritos por Dellaporta et al. (1983), Grattapaglia e Sederoff (1994) e Warude et al. (2003) apresentaram as médias das razões $A^{260/280}$ inferiores ao limítrofe, indicando que pode ter havido contaminação por proteínas durante o processo de extração.

O protocolo descrito por Khanuja et al. (1999) resultou em uma concentração média de 26,57 ng/ μ L, além disso, o método alcançou as melhores razões de pureza dentre os protocolos testados, cujo o valor médio foi 2,04 para a razão $A^{260/280}$ e 1,99 para a razão $A^{260/230}$.

A espectrofotometria fornece um bom indicativo de qualidade das amostras no que se refere à presença de proteínas, metabólitos secundários e componentes do tampão de extração. No entanto, esta técnica detecta a presença de ácidos nucleicos, não apenas de DNA. Logo, as vezes os valores observados podem estar inflacionados pela presença de RNA, além disso, pela espectrofotometria não é possível identificação de DNA degradado através dos valores emitidos. Diante disso, procuram-se métodos adicionais que informem a qualidade do DNA no que diz respeito à integridade, presença de RNA, viscosidade e outros. A eletroforese em gel de agarose é uma técnica eficiente para quantificação do DNA, além de fornecer outro indicativo de qualidade nas amostras.

A Figura 1 mostra o perfil eletroforético das amostras de DNA de babaçu obtidos por meio dos diferentes métodos de extração avaliados no presente estudo. As amostras correspondentes aos métodos de Dellaporta et al. (1983), Doyle e Doyle (1987), Romano e Brasileiro (1998) e Warude et al. (2003) apresentaram, relativamente, altas concentrações de DNA, no entanto, em qualidade insatisfatória devido a presença de DNA degradado. Já o método proposto por Khanuja et al. (1999) foi eficiente no isolamento de DNA em concentrações e qualidade adequada.

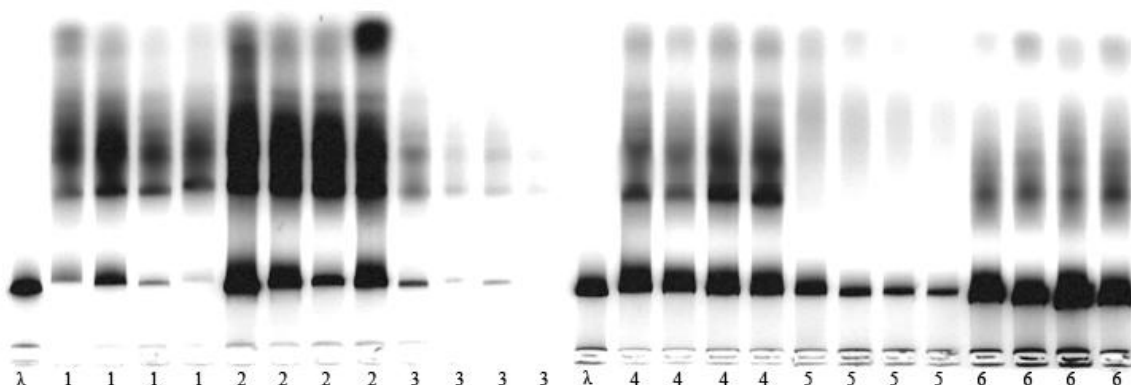




Figura 1 - Perfil eletroforético das amostras submetidas aos protocolos avaliados. 1 - Dellaporta et al. (1983); 2 - Doyle e Doyle (1989); 3 - Grattapaglia e Sederoff (1994); 4 - Romano e Brasileiro (1998); 5 - Khanuja et al. (1999); 6 - Warude et al. (2003).

Conclusão

Sugere-se que na extração de DNA de babaçu (*Orbignya phalerata*) seja utilizado o método proposto por Khanuja et al. (1999), por resultar em DNA em concentração adequada e qualidade satisfatória para estudos moleculares.

Referências Bibliográficas

- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n.4, 1983.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. In: **FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1994.
- KHANUJA, S.P.S.; SHASANY, A.K.; DAROKAR, M.P.; KUMAR, S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, 1999.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: **BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA- CENARGEN, 1998.
- WARUDE, D.; CHAVAN, P.; JOSHI, K.; PATWARDHAN, B. DNA Isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, 2003.