



CONCENTRAÇÃO E QUALIDADE DE DNA'S DE AÇAIZEIRO TIPO BRANCO (*EUTERPE OLERACEA MART.*) OBTIDOS DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

(Angela Maria de Sousa)⁽¹⁾; Maria do Socorro Padilha de Oliveira⁽²⁾. Leonaria Silva Souza⁽³⁾

⁽¹⁾ Engenheira Agrônoma, Estudante de mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária. Universidade Federal Rural da Amazônia; Universidade Federal Rural da Amazônia, Rua Quinta das Carmitas, 182-PS Manoel Ribeiro. Ananindeua, CEP 67030 370; agro_angela@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Engenheira Agrônoma, Doutora em genética e Melhoramento de Plantas; Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, S/nº, Belém, PA, CEP 66095-100, Caixa Postal 46. ⁽³⁾ Química Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, S/nº, Belém, PA, CEP 66095-100, Caixa Postal 46.

RESUMO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira perene, tropical e frutífera cujo habitat natural se encontra nas várzeas da Amazônia, onde o Pará vincula como principal produtor e consumidor. Destaca-se mundialmente pela polpa congelada e diversos subprodutos. Essa palmeira é constituída por algumas variedades que diferem especialmente, pelo tamanho e coloração dos frutos, dentre elas tem-se o açaí branco que vem sendo objeto de vários estudos nas instituições da Amazônia. Objetivou-se determinar a concentração e a qualidade de DNA's de açaizeiros tipo branco obtidos na Embrapa Amazônia Oriental. Foram coletados folíolos de folhas de 222 plantas de açaí tipo branco conservado no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. A extração de DNA foi feita pelo método de CTAB (Brometo de Cetil Trimetilamônio) utilizando o protocolo de Doyle e Doyle com modificações. Os DNA's foram quantificados em gel de agarose a 0,8% com o auxílio de três concentrações de DNA lambda (50, 100 e 200 ng/ul) como padrão e as imagens obtidas foram capturadas e lidas no software Labimage. As concentrações foram analisadas por estatísticas descritivas. As 222 amostras de DNA apresentaram 100% de aproveitamento, mas os pellets obtidos apresentaram tamanhos distintos e foram diluídos em volumes distintos, variando entre 50 a 250µl. As quantidades dos DNA's obtidos variaram de 101,37 a 620,27 ng.µl⁻¹ apresentando média de 269,39 ng.µl⁻¹. As bandas obtidas apresentaram arrastes e presença de RNA, sendo submetidas a tratamentos para melhoria das qualidades. Portanto, pode-se considerar que os DNA's de açaizeiro tipo branco obtidos possuem excelentes concentrações e qualidades.

PALAVRAS-CHAVE: açaí, palmeira, quantificação de DNA, técnica molecular

ABSTRACT:

The açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) Is a perennial palm tree, tropical fruit and whose natural habitat is in the floodplains of the Amazon, where Para links as main producer and consumer. Stands out worldwide for frozen pulp and various by-products. This palm is composed of some varieties which differ especially, the size and color of the fruits, among them has white acai that has been the subject of several studies in the institutions of the Amazon. The objective was to determine the concentration and the DNA's quality white type

açazeiros obtained at Embrapa Amazônia Oriental. We collected leaflets leaves of 222 plants of white type acai stored in the Active Germplasm Bank of Embrapa Amazônia Oriental. The DNA extraction was taken by CTAB method (Bromide Cetyl Trimethylammonium) using the protocol Doyle and Doyle with modifications. The DNA's were measured in 0.8% agarose gel with the aid of three lambda DNA concentrations (50, 100 and 200 ng.µl⁻¹) as standard and the images were captured and read in Labimage software. The concentrations were analyzed by descriptive statistics. The 222 DNA samples showed 100% success, but the pellets showed different sizes and were diluted in different volumes, ranging from 50 to 250µl. The amounts of DNA's obtained ranged from 101.37 to 620.27 ng.µl⁻¹ with a mean of 269.39 ng.µl⁻¹. The bands obtained showed drags and presence of RNA, being subjected to treatments for improving qualities. Therefore, it can be considered that the DNA's açazeiro white type obtained have excellent concentration and qualities.

KEY WORDS: acai, palm, DNA counts, molecular technique.

INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira perene, tropical e frutífera que ocorre naturalmente nas várzeas da Amazônia, com predomínio no Estuário amazônico. Destaca-se, mundialmente, pela polpa extraída dos frutos, além de seus inúmeros subprodutos, energéticos, cosméticos, fitoterápicos entre outros, como também pela produção de palmito (FAVACHO et al., 2011; MENESES et al., 2008, HOMMA et al., 2002;). Em suas populações naturais ocorrem algumas variedades como açai branco, cuja polpa processada apresenta coloração creme-esverdeada (OLIVEIRA et al., 2000). Esta variedade, apesar de não ser a mais consumida é a que apresenta maior preço para venda e vem sendo objeto de vários estudos nas instituições da Amazônia, mas o conhecimento do genoma dessa variedade tem sido negligenciado.

Marcadores moleculares foram desenvolvidos com o objetivo de auxiliar no melhoramento de plantas, permitindo a seleção indireta de gerações segregantes precoces, além de ser importante nos estudos genéticos, podendo detectar variações em seus genomas (BORÉM et al 2006). Uma das etapas essencial em estudos dessa natureza envolve a obtenção de DNA de concentração adequada e qualidade, sendo fundamental para a eficiência das reações de PCR (reação de polimerase em cadeia), para que não ocorram falhas nas etapas seguintes. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA1996).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo determinar a concentração e a qualidade do DNA de açazeiros tipo branco conservado na Embrapa Amazônia Oriental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de folíolos de folhas de 222 plantas de açai tipo branco conservadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras

foram colocadas em sacos plásticos, identificadas e colocadas em isopor com gelo para serem transportadas ao Laboratório de Genética dessa instituição, sendo imediatamente acondicionadas sobre refrigeração até o momento da extração.

A extração de DNA das 222 amostras foi feita pelo método de CTAB (Brometo de Cetil Trimetilamônio) utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações (COSTA; OLIVEIRA, 2002). Os DNA's foram quantificados em gel de agarose a 0,8% com o auxílio de três concentrações de DNA lambda (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}) como padrão.

As quantificações foram realizadas, em gel de agarose a 0,8% utilizando como comparação três padrões DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}), sendo as amostras e os padrões corados com Gel Red, no momento das aplicações. As corridas foram realizadas em cuba de eletroforese contendo TBE 0,5X, a 100W, 90mA por 15 min.

As imagens obtidas foram visualizadas sob luz ultravioleta e capturadas para a interpretação da qualidade dos DNA's e suas concentrações avaliadas no software Labimage 1D L340 da Loccus Biotecnologia. As concentrações obtidas foram submetidas à análise de estatística descritiva no programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 222 amostras de DNA apresentaram 100% de aproveitamento, mas os pellets obtidos apresentaram tamanhos distintos e foram diluídos em volumes distintos, variando entre 50 a 250 μl , o que fornece indícios dos DNA's apresentarem concentrações variáveis.

Pela interpretação das imagens obtidas foi confirmada presença de DNA em todas 222 amostras, algumas acompanhadas por arrastes, possivelmente ocasionadas pela presença de proteínas (Figura 1a). Ferreira e Grattapaglia (1996), afirmam que resultados como estes podem ocorrer devido a vários motivos, tais como, DNA concentrado e concentrações de impurezas nas amostras, como a presença de proteínas. Assim, foi acrescida proteinase nas amostras com arraste (50 a 150 μl) sendo submetidas à nova quantificação.

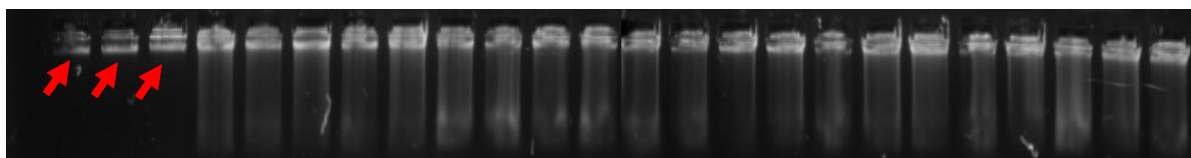


Figura 1- Perfil de gel de agarose contendo os três padrões do DNA λ de 50, 100, 200 ng. μl^{-1} (setas vermelhas) e 21 amostras de DNA de soja tipo branco obtidos do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

As concentrações de DNA nas amostras variaram de 101,37 a 620,27ng. μl^{-1} , com média de 269,39 ng. μl^{-1} e coeficiente de variação de 25,78%. A variação detectada pode está

associada ao estágio da folha, sendo coletados folíolos de folhas jovens, maduras e algumas já em senescência. Esse fato deu-se em função das plantas estarem com onze anos de plantio, plantas bem altas e com inflorescências e cachos, dificultando a coleta apenas de folíolos de folhas jovens.

A Figura 2 representa a distribuição de frequências das concentrações das 222 amostras de DNA. Percebe-se a maior e a menor concentração ocorrerem em duas amostras uma apresentando $101,37 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ e outra $620,27 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Vale ressaltar que a maioria das amostras, ou seja, 195 delas apresentou quantidade de DNA distribuída em quatro classes, cujos pontos médios alcançaram $181 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $221 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $261 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $301 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ e $341 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Tais resultados evidenciam que todas as amostras exibiram excelentes concentrações e que poderão ser utilizadas com sucesso nas PCR's, pois as soluções trabalhos das referidas amostras serão preparadas para uma concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Gaioto et al (2001), utilizaram concentrações de $7,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de DNA de *E. oleracea* para realizar PCR's com marcadores microssatélites e obtiveram resultados confiáveis.

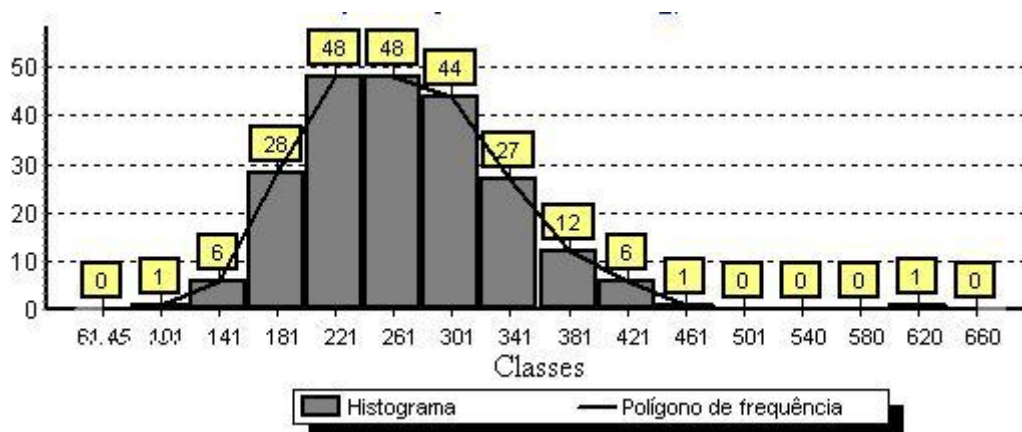


Figura 2- Distribuição de frequência para as concentrações das 222 amostras de DNA de açaizeiro tipo branco pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

CONCLUSÃO

Os DNA's apresentam boa qualidade e excelentes concentrações e devem ser indicados para uso em PCR's e demais estudos moleculares que acessem os genomas dos açaizeiros tipo branco conservados na Embrapa Amazônia Oriental.

LITERATURA CITADA

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 1^a. ed. Viçosa: MG, 2006.

COSTA, M.R.; OLIVEIRA, M. DO S.P. **Extração de DNA de açaizeiro a partir de folhas**. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos 127. 2002.

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

FAVACHO, A.S.H.; OLIVEIRA, B.R.; SANTOS, K.C.; MEDEIROS, B.J.L.; SOUZA, P.J.C.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n. 1, p. 105-114, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Curitiba: Biosystems, 1996. 220p.

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Pamae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.1, n.1/2, p. 86-88, Mar./June 2001.

HOMMA, A.E.O.; Frazão DACO **despertar da fruticultura amazônica**. Fruticultura em Revista. Novembro, p. 27-31, 2002.

MENEZES, EMS.; TORRES, AT.; SRUR, AUS. **Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) liofilizada**. Acta Amazônica, v.38, n.2, p. 311-316, 2008.

OLIVEIRA, M.S.P de; CARVALHO, J.E.U de; NASCIMENTO, W.M.O do; MULLER, C.H. **Cultivo do açaizeiro visando à produção de frutos**. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 18p (Circular Técnica, 026).