

Metodologia de Extração de DNA para Análise Genética de Populações de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.)¹

Ahmad Abdul Latif Hamze²

Antonio Nascim Kalil Filho³

Valderês Aparecida de Sousa⁴

Álvaro Figueredo dos Santos⁵

Edinelson José Maciel Neves⁶

RESUMO

A extração do DNA é passo imprescindível para análise genética de populações de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.). O objetivo foi disponibilizar uma metodologia prática e funcional de extração de DNA de pupunha. Para o desenvolvimento da sequência de extração e purificação do DNA foram utilizadas folhas de pupunha recém-coletadas, congeladas por três semanas e secas. Ao final do procedimento de análise do DNA de pupunha, o mesmo resultado foi obtido para as três amostras. Em gel de agarose a 2%, as bandas contendo DNA apresentaram coloração intensa, evidenciando a grande quantidade extraída, e com excelente resolução, mostrando êxito na extração do DNA, tanto para folhas recém-coletadas quanto para folhas congeladas e secas.

Palavras-chave: palmito, arecáceas, protocolo.

¹ Trabalho financiado com recursos do Prodetab

² Estudante de Biologia – Unesp – Assis. abdul_hamze@hotmail.com

³ Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. kalil@cnpf.embrapa.br

⁴ Engenheira Florestal, Doutora, Pesquisadora da *Embrapa Florestas*. valderes@cnpf.embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. alvaro@cnpf.embrapa.br

⁶ Engenheiro-florestal, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. eneves@cnpf.embrapa.br

DNA Extraction Methodology for Genetic Analysis of Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth.) Populations

ABSTRACT

DNA extraction is a very important step for DNA genetic analysis in peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth.). The aim of this work was to develop a methodology of DNA extraction. Fresh, frozen and dried leaves were utilized. DNA from fresh leaves were purified one time while frozen and dried leaves was purified two times. DNA bands were coloured intensively showing a high amount of purified DNA and with an excellent resolution in agarosis gel 2%, such for fresh leaves as much as for frozen and dried leaves.

Key-words: heart-palm, arecaceae, protocol.

Estudos genéticos em populações de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e outras espécies de arecáceas têm sido desenvolvidos no Brasil, utilizando-se marcadores moleculares. Através de marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Poymorphic DNA), por exemplo, têm-se determinado as distâncias genéticas entre raças primitivas de pupunha (Sousa et al., 2001) e entre espécies de arecáceas (Sawazaki et al., 1998). Gaiotto (2001) utilizou marcadores microssatélites (SSR), co-dominantes, para estudar a herança quantitativa e a estrutura genética de populações naturais de juçara (*Euterpe edulis*). Entretanto, não há na literatura relato sobre a metodologia para a extração do DNA de pupunha. A extração do DNA é o passo inicial e imprescindível para marcadores moleculares microssatélites, RFLP, RAPD, AFLP, dentre outros. Nesta fase é desejável um DNA não denaturado e com maior grau de pureza possível. Esses fatores são importantes, pois afetam a resolução das bandas resultantes da migração dos fragmentos do DNA. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um protocolo experimental para extração do DNA a ser utilizado em análises genéticas de pupunha. As amostras utilizadas foram de folhas coletadas horas antes do processo de extração, uma folha congelada por três semanas e uma folha seca não

congelada. O protocolo de extração do DNA de pupunha deve seguir os seguintes passos:

Extração de DNA

- 1) Macerar 200g de folha da amostra com o auxílio de nitrogênio líquido, em almofariz, até obter um pó bem fino e seco;
- 2) Transferir o macerado para um tubo com capacidade de 1,5 ml e acrescentar 700µl de tampão de extração, adicionando-se 2µl de 2-mercaptoetanol gelado para cada ml de tampão de extração e ainda 45,5 µl de SDS 20% em cada tubo;

Tampão de extração:

Para 10ml:

1,4 mol L⁻¹ NaCl -----0,812 g

20 mM EDTA -----0,4 ml estoque 0,5 mol l⁻¹

100 mM Tris-HCl pH 8,0----- 1 ml estoque 1 mol l⁻¹

H₂O milli-Q----- 10 ml

Obs.: O reagente 2-mercaptoetanol deve ser adicionado somente no momento em que vai se proceder a maceração.

- 3) Após a maceração, colocar os tubos em banho-maria a 65° C por 1 hora, agitando-se os tubos de 15 em 15 minutos;
- 4) Retirar os tubos do banho-maria, deixar esfriar na capela de exaustão:
 - Extração com solvente orgânico: adicionar 600µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1).
 - Verter os tubos mais ou menos 20 vezes;

- 5) Centrifugar os tubos em microcentrífuga refrigerada à velocidade de 13.000 rpm por 10 minutos;
- 6) Retirar os tubos da centrífuga com cuidado, evitando-se perturbar a interface entre as duas fases formadas. Colocar a fase aquosa (superior) num novo tubo, regular a pipeta para 180 µl e retirar três alíquotas.
- 7) Repetir os passos 4, 5 e 6 e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- 8) Adicionar 400µl de isopropanol gelado (-20° C). Misturar com o auxílio de um bastonete cuidadosamente para precipitar os ácidos nucleicos;
- 9) Acrescentar 50µl de acetato de amônio 7,5mol l⁻¹ em cada tubo;

Obs.: Se o precipitado não for visível, colocar o tubo a -20° C por, no mínimo, 30 minutos, no caso dos passos seguintes, relativos à purificação do DNA, serem realizados no mesmo dia. Caso a etapa de purificação venha a ocorrer no dia seguinte, colocar o DNA "overnight" em freezer a -20° C.

Purificação do DNA

- 10) Formação do pellet: centrifugar os tubos a 6000-7500 rpm por 5 minutos. Se o pellet não for visível, colocar o tubo a -20° C por 30 minutos ou mais, e centrifugar novamente;
- 11) Descartar a fase aquosa e lavar o pellet de DNA duas vezes em etanol 70% (15 min - 400µl) e uma vez em etanol absoluto (15min. - 400µl). Colocar o pellet para secar na capela de fluxo laminar por aproximadamente 30 minutos;
- 12) Finalmente ressuspender o pellet em 100µl de Tampão TE (Tris-EDTA) com 2µl de RNase a 10µg/ml por 1 hora a 37° C em banho-maria;
- 13) Estocar o concentrado a -20° C.

Obs.: Caso o DNA permaneça sujo, após quantificação por eletroforese em gel de agarose 2% e posterior análise das bandas que apresentem arraste, fazer a seguinte repurificação:

- 1) No tubo com TE e DNA, adicionar 2 volumes (300µl) de isopropanol gelado;
- 2) Verter os tubos cuidadosamente por um minuto, aproximadamente;
- 3) Colocar o tubo no freezer por 5 minutos;
- 4) Centrifugar o tubo por 10 minutos a 13.000 rpm;
- 5) Retirar o sobrenadante com a pipeta e deixar um pouco de isopropanol;
- 6) Lavar o DNA com etanol 70% (2 volumes - 300µl); descolar o pellet antes de centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos;
- 7) Retirar o etanol com a pipeta e deixar secar à temperatura ambiente;
- 8) Acrescentar TE (150 µl) com ou sem RNase; caso seja utilizado a RNase, colocar as amostras no banho-maria a 37° C por uma hora (marcar o tubo com RL para identificação de uma nova lavagem - repurificação);
- 9) Estocar a -20° C.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível desenvolver uma metodologia para a extração do DNA de pupunha. O melhor resultado foi obtido com as folhas recém-coletadas, necessitando apenas de uma repurificação; entretanto, para as folhas congeladas e secas, por terem sido coletadas há mais tempo, foi necessário fazer a repurificação duas vezes. Após as repurificações necessárias a cada

amostra, o resultado obtido foi o mesmo para todas as folhas, podendo assim, se analisar todas as amostras ao final.

Após migração eletroforética, o DNA extraído segundo o protocolo acima descrito, apresentou-se na forma de bandas de coloração intensa (Figura 1– anexo), que evidencia a grande quantidade extraída de DNA com alto grau de pureza, expressa pelas bandas bem delineadas no gel de agarose a 2%, decorrente da excelente resolução.

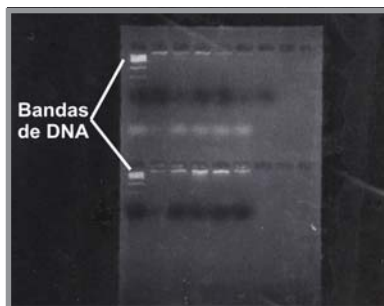


Figura 1– Bandas de DNA de pupunha (*Bactris gasipaes*)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GAIOTTO, F. A. **Influência sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* MART. utilizando marcadores microsatelites.** Piracicaba: ESALQ, 2001. 122 p.

SOUSA, N. R. de; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R.; NAGAO, E. O.; ASTOLFI-FILHO, S. Discriminação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*) na Amazônia brasileira por meio de marcadores moleculares (RAPDs). **Acta Amazônica**, v. 3, n. 4, p. 539-545, 2001.

SAWAZAKI, H. E.; BOVI, M. L. A.; SODEK, L.; COLOMBO, C. A. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 681-691, 1998.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração de Elisa Caroline da Silva Santos, estagiária da *Embrapa Florestas*. Agradecemos a Maria Luciana Ferreira Simeone pela correção deste trabalho.