

EXTRAÇÃO DE DNA E OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DIFERENTES ESPÉCIES DE INTERESSE PARA O CERRADO

Graciele Bellon¹; Fábio G. Faleiro¹, Ana Maria Barros¹; Cláudio T. Karia¹; Ronaldo P. Andrade¹;
Maria C. R. Cordeiro¹; Alberto C. Pinto¹; Nilton T. V. Junqueira¹; Ailton V. Pereira¹;
Elainy B. C Pereira^{1,2}; Francisco D. Fernandes¹; Márcio E. Ferreira³.

¹Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; ²Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário; ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o agronegócio passou a ocupar posição de destaque no processo de desenvolvimento brasileiro, provindo as populações urbanas com alimentos a custos reais decrescentes, oferecendo matéria-prima para a agroindústria de insumos e fortalecendo o setor de serviços. Participando diretamente da expansão do agronegócio brasileiro, a região do Cerrado emergiu desse processo como uma das mais expressivas devido à sua extensa área geográfica, cujas características edafoclimáticas propiciaram o desenvolvimento de inúmeras atividades agrícolas.

Várias espécies de plantas têm sido utilizadas ou apresentam grande potencial de utilização nas atividades agrícolas no Cerrado. A realização de programas de conservação e uso de germoplasma e de seleção e melhoramento genético são essenciais para a utilização econômica e racional de tais espécies. Marcadores do DNA estão sendo utilizados como ferramentas em diferentes estudos genéticos de grande utilidade para tais programas. A etapa básica para tais estudos é a extração de DNA genômico em quantidade e qualidade adequadas à obtenção dos marcadores. Nesse sentido, Faleiro et al. (2003) desenvolveram uma metodologia para operacionalizar a extração de DNA de várias espécies nativas do Cerrado, a qual tem sido também utilizada para outras espécies estudadas na Embrapa Cerrados.

OBJETIVO

Validar a metodologia de extração de DNA otimizada por Faleiro et al. (2003) e testar *primers* decâmeros em amostras de DNA genômico de 46 espécies de plantas que estão sendo estudadas atualmente na Embrapa Cerrados.

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico de cada uma das 46 espécies (Tabela 1) foi extraído utilizando a metodologia descrita por Faleiro et al. (2003). A Figura 1 ilustra os principais grupos de espécies analisadas. A quantificação do DNA foi feita com base na absorbância a 260nm, a análise de pureza com base na relação de absorbância a 260 e 280nm e a integridade com base na eletroforese em agarose 0,8%. Foram testados 24 *primers* decâmeros para analisar a amplificação do DNA via PCR. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 uM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 uM de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. As amplificações foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio. A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta para a análise dos produtos de amplificação.

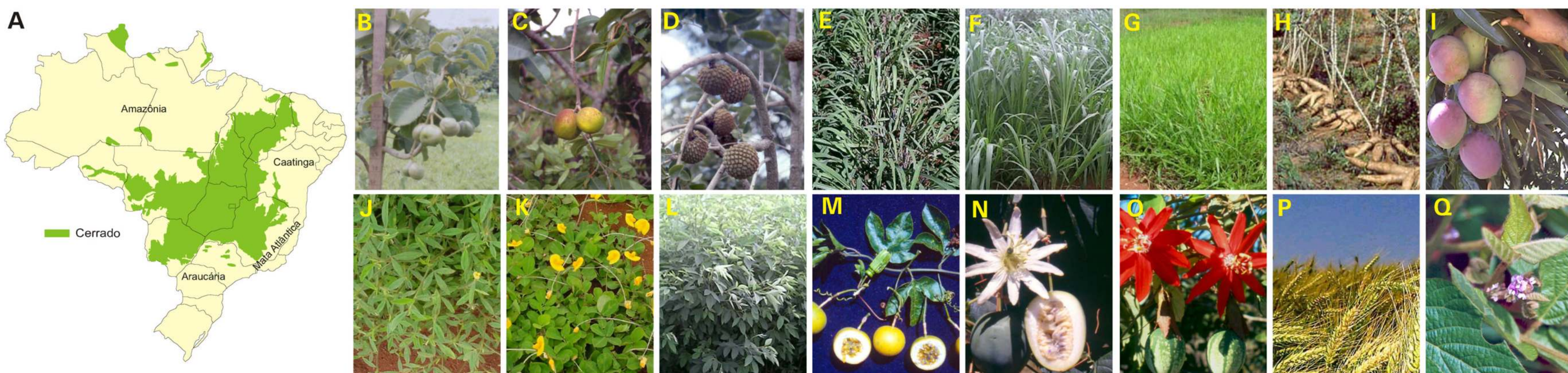


Tabela 1. Região do Cerrado (A), Pequi (B), Mangaba (C), Araticum (D), Panicum (E), Capim-elefante (F), Brachiaria (G), Mandioca (H), Manga (I), Estilosantes (J), Amendoim-Forrageira (K), Guandu (L), Maracujás (M, N, O), Trigo (P) e Soja (Q).

RESULTADOS

Foram obtidas amostras de DNA genômico em quantidade e qualidade para as 46 espécies testadas (Tabela 1). A relação A₂₆₀/A₂₈₀ variou de 1,471 a 2,184, sendo que em 78% das espécies, ficou entre 1,7 a 2,1, evidenciando a pureza e qualidade das amostras extraídas. A concentração do DNA em 150 uL, variou de 95 a 2225 ng/uL. Os testes dos *primers* decâmeros evidenciaram a qualidade das amplificações via PCR e a tendência de funcionalidade dos mesmos *primers* para as diferentes espécies (Tabela 2).

Tabela 1. Qualidade dos produtos de amplificação de DNA genômico de oito espécies de plantas gerados por 24 *primers* decâmeros.

PRIMER	SEQUÊNCIA	MARACUJÁ	MANGABA	PANICUM	GUANDU	PEQUI	ESTÉVIA	GUEROBA	MANDIOCA
OPD4	TCTGGTGAGG	F	+	+	+	F	+	+	+
OPD7	TTGGCACGGG	F	+	+	+	+	+	+	+
OPD8	GTGTGCCCCA	+	+	+	+	+	+	+	+
OPD10	GGTCTACACC	F	+	F	F	-	-	+	F
OPD16	AGGGCGTAAG	+	+	+	+	-	+	+	+
OPE 4	GTGACATGCC	-	-	-	-	-	-	-	-
OPE 10	CACGAGTGTA	-	-	-	-	-	-	-	-
OPE12	TTATCGCCCC	-	F	+	-	-	-	-	F
OPE 18	GGACTGCAGA	+	+	+	+	+	+	+	+
OPE 20	AACGGTGACC	F	+	+	+	+	+	+	+
OPF1	ACGGATCCTG	F	+	+	-	P	+	+	+
OPF13	GGCTGGAGAA	-	+	F	P	-	F	F	P
OPF14	TGCTGAGGT	+	+	+	+	+	+	+	-
OPF15	CCAGTACTCC	-	+	+	-	-	+	+	+
OPF17	AACCCGGGAA	F	+	+	F	+	+	+	P
OPG 1	CTACGGAGGA	F	F	+	P	-	+	-	F
OPG 8	TCACGTCCAC	+	+	+	+	+	+	+	+
OPG 9	CTGACGTAC	+	+	+	+	+	+	+	+
OPG 14	GGATGAGACC	-	-	-	-	-	-	-	+
OPG 17	ACGACCGACA	+	+	+	+	+	F	+	+
OPH 10	CCTACGTCAG	F	F	F	-	-	+	-	P
OPH 12	ACGCGCATGT	+	+	+	+	+	+	-	+
OPH 16	TCTCAGCTGG	+	+	+	+	+	+	+	P
OPH 17	CACCTGCTCT	+	+	+	F	+	+	+	+

+ Amplificação com muitas marcas
P Amplificação com poucas marcas
F Amplificação fraca
- Amplificação ausente

Tabela 1. Absorbância a 260 e 280 nm, relação A₂₆₀/A₂₈₀ e concentração de amostras de DNA genômico de 46 espécies extraídas com base na metodologia de Faleiro et al. (2003).

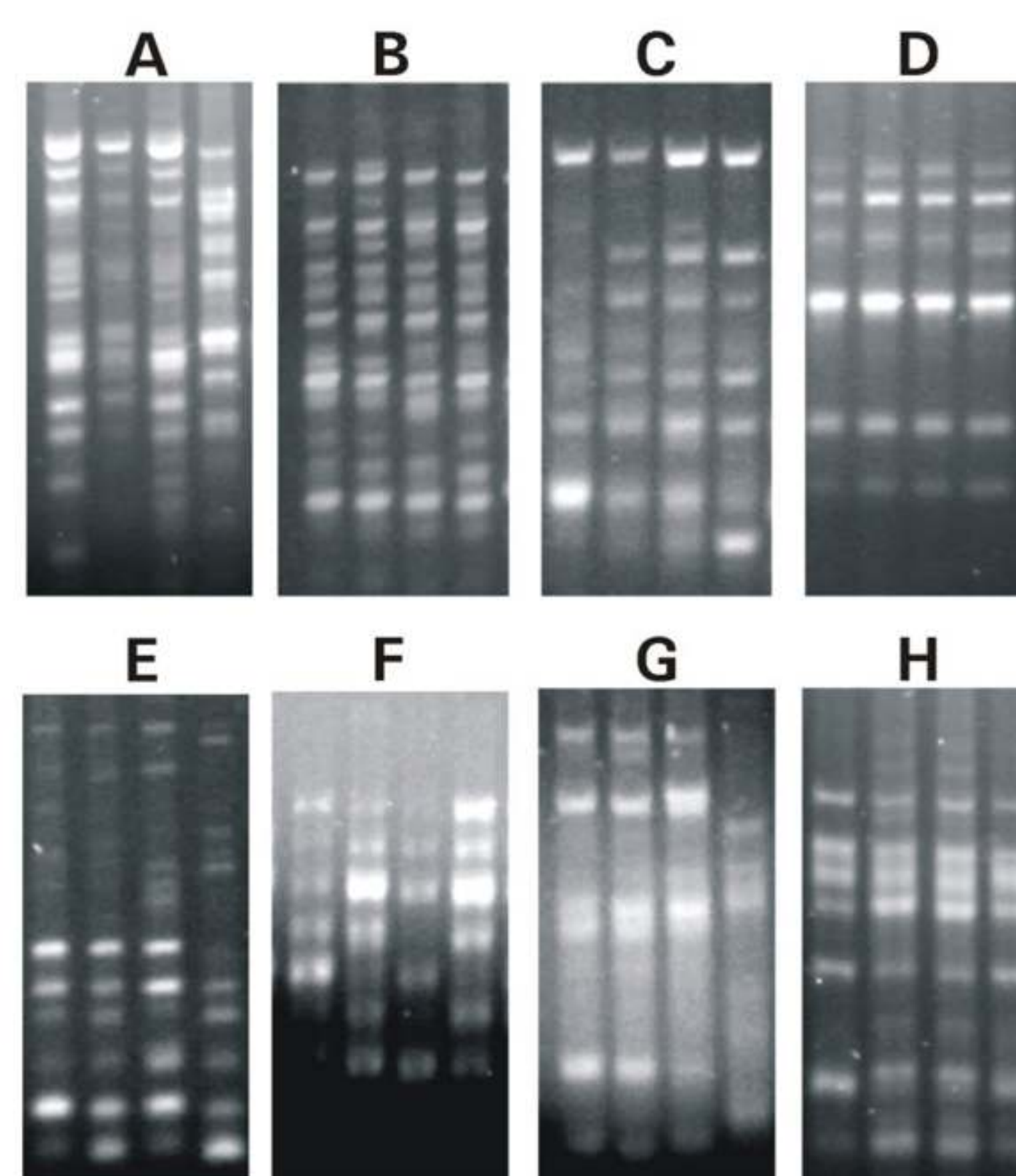


Figura 2. Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico de Maracujá (A), Mangaba (B), Panicum (C), Guandú (D), Pequi (E), Estévia (F), Guerooba (G) e Mandioca (H) gerados com o uso de *primers* decâmeros.

Espécie	Nome comum	A260	A280	A260/A280	Conc. DNA (ng/ul)
<i>Acrocomia aculeata</i>	Macacúba	0.118	0.07	1.686	590
<i>Andropogon gayanus</i>	Andropogon	0.03	0.017	1.765	150
<i>Annona crassiflora</i>	Araticum	0.111	0.063	1.762	555
<i>Arachis pintoi</i>	Amendoim forrageiro	0.100	0.051	1.961	500
<i>Avena sativa</i>	Áveia	0.115	0.053	2.170	575
<i>Bactrys gasipaes</i>	Pupunha	0.084	0.053	1.585	420
<i>Brachiaria brizantha</i>	Brachiaria	0.041	0.025	1.640	205
<i>Brachiaria decumbens</i>	Brachiaria	0.027	0.014	1.929	135
<i>Brachiaria humidicola</i>	Brachiaria	0.023	0.012	1.917	115
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Brachiaria	0.047	0.025	1.880	235
<i>Cajanus indicus</i>	Guandu	0.186	0.096	1.938	930
<i>Caryocar brasiliense</i>	Pequi	0.1	0.053	1.887	500
<i>Dimorphandra mollis</i>	Faveira	0.05	0.034	1.471	250
<i>Dyptenix alata</i>	Baru	0.076	0.041	1.854	380
<i>Eugenia dysenterica</i>	Cagaita	0.075	0.042	1.786	375
<i>Glycine max</i>	Soja	0.233	0.124	1.879	1165
<i>Hancornia spiciosa</i>	Mangaba	0.053	0.031	1.71	265
<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	0.173	0.087	1.989	865
<i>Mangifera indica L.</i>	Manga	0.043	0.023	1.870	215
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca	0.081	0.042	1.929	405
<i>Melinis minutiflora</i>	Capim gordura	0.019	0.010	1.900	95
<i>Oriza sativa</i>	Arroz	0.125	0.068	1.84	625
<i>Panicum maximum</i>	Capim colômbio	0.146	0.073	2.00	730
<i>Paspalum atratum</i>	Capim pojeira	0.023	0.012	1.917	115
<i>Passiflora amethystina</i>	Maracujá	0.114	0.063	1.810	570
<i>Passiflora careulea</i>	Maracujá	0.278	0.149	1.866	1390
<i>Passiflora coccinea</i>	Maracujá	0.122	0.072	1.694	610
<i>Passiflora edulis</i>	Maracujá azedo	0.347	0.164	2.116	1735
<i>Passiflora gibertii</i>	Maracujá	0.281	0.139	2.022	1405
<i>Passiflora laurifolia</i>	Maracujá	0.445	0.246	1.809	2225
<i>Passiflora nitida</i>	Maracujá	0.231	0.11	2.100	1155
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Maracujá	0.211	0.105	2.010	1055
<i>Passiflora setacea</i>	Maracujá	0.398	0.202	1.970	1990
<i>Passiflora tenuifolia</i>	Maracujá	0.263	0.154	1.708	1315
<i>Pennisetum glaucum</i>	Milheto	0.028	0.015	1.867	140
<i>Pennisetum purpureum</i>	Capim elefante	0.107	0.049	2.184	535
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	0.058	0.028	2.071	290
<i>Stevia rebaudiana</i>	Estévia	0.095	0.05	1.9	475
<i>Styphphodendron adstringens</i>	Barbatimão	0.084	0.05	1.68	420
<i>Stylosanthe guyanensis</i>	Estilosantes	0.095	0.048	1.979	475
<i>Stylosanthe macrocephala</i>	Estilosantes	0.103	0.059	1.746	515
<i>Syagrus oleracea</i>	Guerooba	0.086	0.049	1.755	430
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Jerivá	0.077	0.047	1.638	385
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	0.091	0.047	1.936	455
<i>vPassiflora mucronata</i>	Maracujá	0.173	0.089	1.944	865
<i>Zea mays</i>	Milho	0.113	0.056	2.018	565

CONCLUSÕES

A metodologia de extração otimizada por Faleiro et al. (2003) foi validada para todas as 46 espécies analisadas, o que tem contribuído para operacionalizar o processo e otimizar o uso de reagentes e equipamentos no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados.

LITERATURA CITADA

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003 (Comunicado Técnico n.92) 6p.