

OPERACIONALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA DE ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO VISANDO ANÁLISES MOLECULARES

Fábio Gelape Faleiro, Alessandra S. Gelape Faleiro, Maria Cristina R. Cordeiro, Cláudio Takao Karia

(Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, Planaltina, DF, CEP 73301-970, e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br)

INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares do DNA, especialmente aqueles baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*), estão sendo utilizados como ferramenta muito útil em diferentes estudos genéticos e a etapa básica para tais estudos é a extração de DNA genômico em quantidade e qualidade adequadas para que a PCR permita a obtenção de marcas moleculares nítidas e reprodutivas.

Algumas espécies de planta, incluindo algumas nativas do cerrado, apresentam alto nível de polifenóis e presença de mucilagens foliares o que torna o procedimento de extração e amplificação de DNA mais complexo, necessitando de otimizações que possam facilitar a operacionalização (Couch e Fritz, 1990).

OBJETIVO

Neste trabalho, objetivou-se operacionalizar o processo de extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a obtenção de amostras de DNA com qualidade, estabilidade e em quantidade para realização de análises genéticas com base em marcadores moleculares.

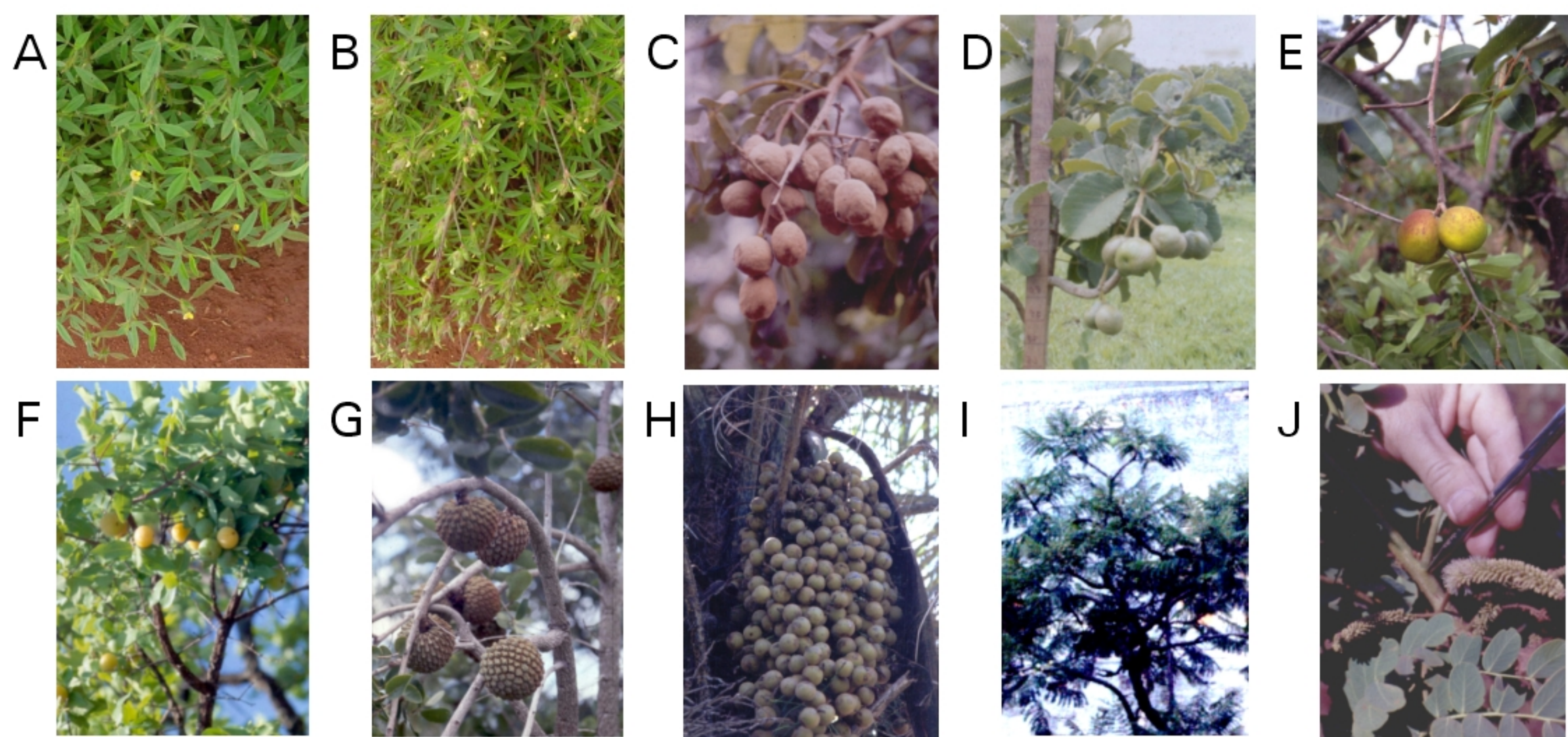


Figura 1. Espécies utilizadas para extração do DNA. *Stylosanthes guianensis* (A), *S. macrocephala* (B) [Leguminosas forrageiras]; Barú- *Dypterix alata* (C), Pequi- *Caryocar brasiliense* (D), Mangaba- *Hancornia speciosa* (E), Cagaita- *Eugenia dysenterica* (F), Araticum- *Annona crassiflora* (G) [fruteiras]; Macaúba- *Acrocomia aculeata* (H) [produção óleo], Faveira- *Dimorphandra mollis* (I) e Barbatimão- *Stryphnodendron adstringens* (J) [plantas medicinais]. Fotos C-J foram gentilmente cedidas pelo Dr. J. Felipe Ribeiro (Proj. CMBBC).

RESULTADOS

O programa desenvolvido na planilha Excel for Windows facilita o processo de avaliação da pureza, quantificação e diluição do DNA (Figura 2). As leituras médias de absorbância a 260 nm e as estimativas da quantidade do DNA extraído a partir de tecidos foliares de cada espécie estudada neste trabalho mostraram que foi possível, a partir do único protocolo otimizado, extrair mais de 37 g de DNA de cada amostra (Tabela 1).

A análise de pureza do DNA extraído verificada pela relação A_{260}/A_{280} mostrou que foram obtidas amostras de boa qualidade (Tabela 1). Apenas o DNA obtido da Faveira apresentou relação A_{260}/A_{280} menor que 1,5, indicando a presença de maior teor de proteínas nas amostras de DNA. A análise da integridade do DNA verificada pela eletroforese em gel de agarose 0,8% é apresentada na Figura 3. Foram obtidas amostras íntegras de DNA de todas espécies analisadas neste trabalho. A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

CONCLUSÕES

1. É possível a obtenção de amostras de DNA de todas 10 espécies nativas do cerrado em quantidade e qualidade satisfatórias para análises genéticas com base em marcadores moleculares.
2. Considerando a diversidade dos tecidos foliares das 10 espécies analisadas neste trabalho, acredita-se ser possível, a partir do mesmo protocolo, a extração de DNA de amostras de tecidos foliares de outras espécies.
3. A utilização de um protocolo único de extração de DNA e de aplicativos específicos estão sendo de extrema importância para operacionalizar o processo de extração de DNA, aumentar a qualidade das amostras, diminuir o tempo gasto em cada extração, otimizar o uso de reagentes e equipamentos e melhorar a reprodutibilidade das análises moleculares realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para operacionalizar o processo de extração, foi desenvolvido um protocolo otimizado único com base na metodologia de extração descrita por Doyle e Doyle (1990) e modificada por Faleiro et al. (2002). As otimizações feitas estão relacionadas ao aumento da concentração do CTAB, diminuição da quantidade de tecido foliar e aumento do período de desproteínização.

Para representar as espécies nativas do cerrado com importância econômica atual ou potencial, foram utilizadas 10 espécies, as quais apresentam diferenças marcantes em seus tecidos foliares como a quantidade de pelos e nervuras, presença de mucilagens, produção de látex, entre outras (Almeida et al., 1998). As espécies utilizadas são ilustradas na Figura 1.

Para a extração do DNA, foram coletadas folhas em estágio intermediário de maturação de cada espécie. A extração foi realizada a partir de aproximadamente 500 mg de tecido foliar, o qual foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N_2 líquido. Parte do macerado foi colocado em um tubo plástico de 2,0 mL, ocupando $\frac{1}{4}$ do seu volume. Em seguida, foi adicionado 800 L de tampão de lise constituído por Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, CTAB 2,8%, NaCl 1,3 M, Polivinilpirrolidona 1% e 2-mercaptoetanol 0,2%. O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por uma hora, sendo agitados, a cada 10 minutos. Após a incubação, foi realizada a desproteínização, adicionando-se 700 L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 minutos e centrifugadas a 4 °C, a 18845 g, por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2,0 mL limpos, foi adicionado 55 L de CTAB 7% e o processo de desproteínização foi repetido.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final 700 L de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a 20 °C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 150 L de água contendo RNase na concentração de 40 g/mL e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspensionado em 150 L de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989). A relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. Para facilitar o processo de avaliação da pureza, quantificação e diluição do DNA foi elaborado um programa dentro do aplicativo Excel for Windows. Este programa tem como *input* as leituras de absorbância a 260 e 280 nm e como *output* a relação A_{260}/A_{280} , a concentração do DNA extraído em ng/L, a quantidade total de DNA em ng, e o volume de DNA concentrado e de água para o preparo de 300 L de DNA na concentração de 10 ng/L.

Para cada espécie avaliada no trabalho, o processo de extração e as avaliações de quantidade e qualidade do DNA extraído foram repetidos pelo menos duas vezes.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
3	No. TUBO	AMOSTRAS	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[] DNA (ng/μL)	QUANT. TOTAL (ng)	VOL. DNA conc.
4	1	<i>S. guianensis</i>	0,113	0,073	1,548	565	94750	5,3
5	2	<i>S. macrocephala</i>	0,103	0,059	1,746	515	77250	5,3
6	3	Barú	0,076	0,041	1,854	380	57000	282,1
7	4	Pequi	0,100	0,053	1,887	500	67500	8,7
8	5	Mangaba	0,053	0,031	1,710	265	39750	283,3
9	6	Cagaita	0,075	0,042	1,786	375	56250	283,3
10	7	Araticum	0,111	0,063	1,762	555	83250	283,3
11	8	Macaúba	0,118	0,07	1,686	590	88500	283,3
12	9	Faveira	0,050	0,034	1,471	250	37500	283,3
13	10	Barbatimão	0,084	0,050	1,680	420	63000	283,3

Figura 2. Programa do aplicativo Excel for Windows para análise de pureza, concentração e diluição de DNA com base nas leituras de absorbância a 260 e 280 nm.

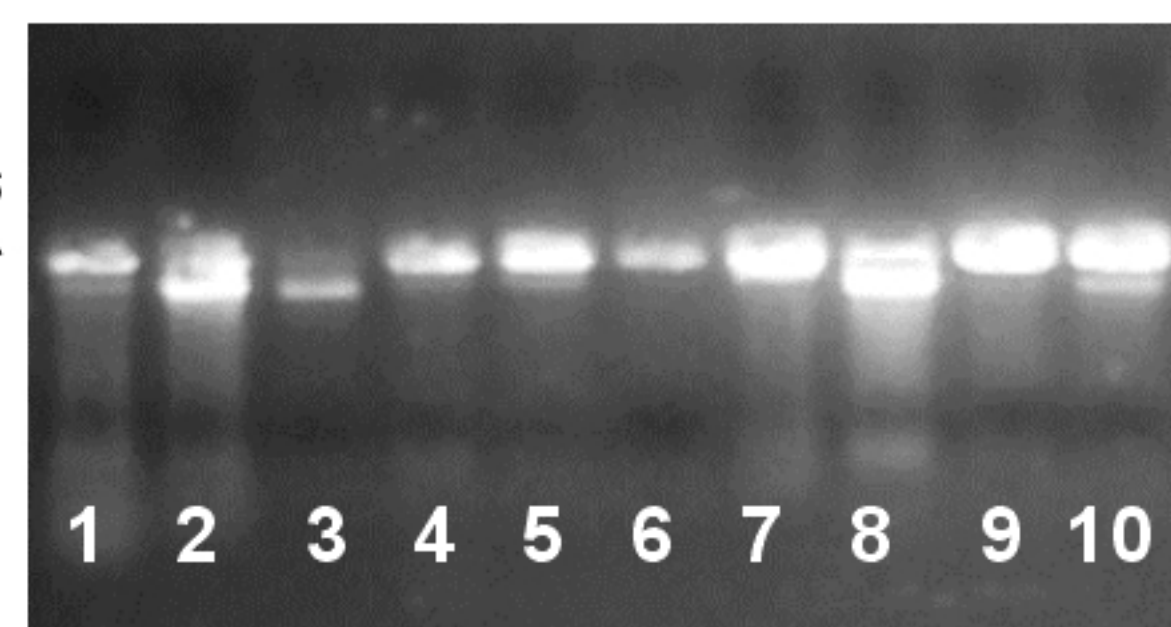
Tabela 1. Quantificação e análise de pureza de amostras de DNA extraídas a partir de tecido foliar de 10 espécies nativas do cerrado, utilizando-se leituras de absorbância a 260 e 280 nm.

Espécie	A ₂₆₀ *	A ₂₈₀ *	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	[DNA] ng/ μL**	Total DNA (μg)
<i>S. guianensis</i>	0,113	0,073	1,548	565	84,75
<i>S. macrocephala</i>	0,103	0,059	1,746	515	77,25
Barú	0,076	0,041	1,854	380	57,00
Pequi	0,100	0,053	1,887	500	75,00
Mangaba	0,053	0,031	1,710	265	39,75
Cagaita	0,075	0,042	1,786	375	56,25
Araticum	0,111	0,063	1,762	555	83,25
Macaúba	0,118	0,07	1,686	590	88,50
Faveira	0,050	0,034	1,471	250	37,50
Barbatimão	0,084	0,050	1,680	420	63,00

* Média de pelo menos duas repetições

** A ressuspensão do DNA foi feita em 150 μL de água.

Figura 3. DNA genômico extraído de 10 espécies nativas do cerrado: 1. *Stylosanthes guianensis*; 2. *S. macrocephala*; 3. Barú; 4. Pequi; 5. Mangaba; 6. Cagaita; 7. Araticum; 8. Macaúba; 9. Faveira e 10. Barbatimão.



LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa - CPAC, 464p., 1998.
- COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenols. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, p. 8-12, 1990.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.; ANHERT, D. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. **Agrotrópica** (no prelo).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 220p., 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 653p., 1989.