

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleífera* (Kunth) Cortés POR MEIO DE ONDAS SONORAS DE ALTA FREQUENCIA E AUTOCLAVAGEM.

Luiz Henrique Galli Vargas^I, André Pereira Leão^{II}, Marcelo Picanço de Farias^{III}, Alexandre Alonso Alves^{IV}, Eduardo Fernandes Formighieri^{IV}, Guy de Capdeville^{IV}, Manoel Teixeira Souza Júnior^{IV}

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da fragmentação de DNA genômico utilizando-se ultrassom (sonicador) e calor úmido sob pressão (autoclave). A hipótese em questão é que tais metodologias são alternativas eficientes para substituição de técnicas mais dispendiosas utilizadas para este mesmo fim, como por exemplo, o uso de enzimas de restrição.

O DNA fragmentado resultante será posteriormente utilizado como amostra inicial para o experimento de curva de C_0t em *Elaeis* spp., que se encontra em andamento por este mesmo grupo de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizado em Brasília – DF.

O material utilizado para extração de DNA consistiu em tecido de folha jovem "flecha" de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiaué (*Elaeis oleífera* (Kunth) Cortés) coletados na Estação Experimental do Rio Urubú, localizado a aproximadamente 140 km de Manaus, no Distrito Agropecuário da Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), às margens do Rio Urubú no município de Rio Preto da Eva, Amazonas (Guillaumet *et al.*, 2003). Ao todo foram utilizados quatro acessos, sendo um *Elaeis guineensis* (Tenera) e três *Elaeis oleífera* (Manicoré, BR 174 e Coari). Procedeu-se a maceração com auxílio de cadinho e pistilo imersos em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Imediatamente em seguida, o material foi armazenado em tubos de plástico polipropileno de 50 ml e mantidos à -80 °C.

Para a extração do DNA das folhas anteriormente maceradas, utilizou-se o protocolo de extração pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1990), com modificações. Após a extração, todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*NanoDrop® ND-1000*) apresentando sempre uma razão 260/280 nm \geq 1,8 indicando boa qualidade do DNA extraído.

Para a realização da clivagem do DNA genômico, todo DNA extraído foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5 ml, sendo então, identificados por: acesso, tratamento (autoclavagem ou sonicação) e tempo. Desta forma, foram devidamente identificados e armazenados 64 tubos contendo 1 ml de DNA em concentração de 150 ng/ μ l, previamente extraído e quantificado.

Para fragmentação física do DNA genômico via ultrassom, utilizou-se um sonicador (Branson® – 1210), com rádio frequência de 47 KHz \pm 6% onde foram acondicionados os 32 tubos de polipropileno em um flutuador. Com o auxílio de um

^I Engº Agrônomo, Bolsista CNPq DTI nível 3 Embrapa Agroenergia, zealotrs@gmail.com; ^{II} MSc., Analista A, Embrapa Agroenergia; ^{III} Mestrando, Universidade Federal de Lavras; ^{IV} DSc, Pesquisador A, Embrapa Agroenergia.

cronômetro os tubos foram retirados do aparelho assim que atingiu-se o tempo desejado para cada amostra (5',10',15',20',25',30',35' e 40'). Ao final do processo de sonicação todas amostras foram armazenadas à -20 °C.

Também foi realizada a fragmentação física por calor úmido sob pressão, via autoclavagem, a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1,2 atm. As amostras foram acondicionadas na autoclave em um suporte para tubos. À medida que atingiu-se o tempo desejado para cada amostra (5',10',15',20',25',30',35' e 40'), as mesmas eram retiradas e armazenadas à -20 °C.

Com o objetivo de avaliar a eficiência de fragmentação do DNA genômico das metodologias testadas, as amostras, juntamente com marcador de tamanho molecular (1kb *ladder*), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Ajustou-se a voltagem em 80 V durante uma hora. Após a migração das amostras até o pólo positivo, o gel foi levado a um fotodocumentador ultravioleta para visualização das amostras de DNA submetidas ao processo de sonicação e autoclavagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fragmentação dos DNAs de um acesso de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e três acessos de Caiuá (*Elaeis oleifera*) via sonicador mostrou-se ineficiente na maioria dos tratamentos. Houve uma fragmentação gradual do primeiro (5') ao último (40') tratamento, porém muito discreta. A exceção foi o acesso BR174 (caiuá), que apresentou uma fragmentação mais acentuada que os demais nos 3 últimos tratamentos (30', 35' e 40'); mas, ainda assim, insuficiente (figura 1).

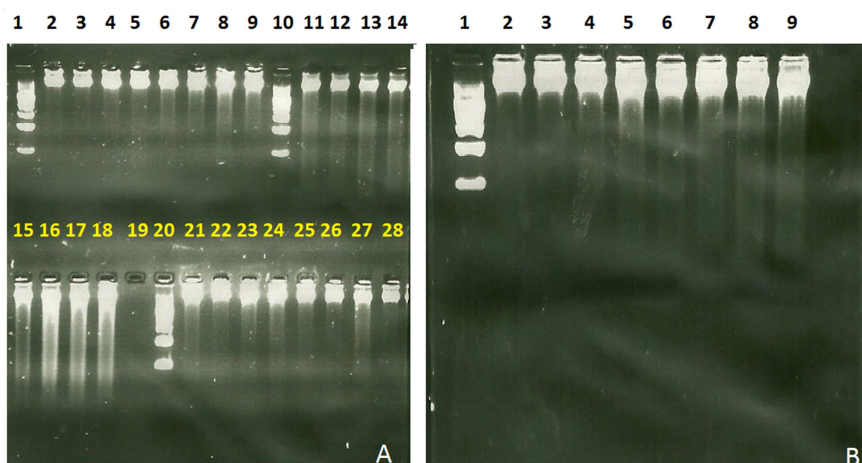


Figura 1: Géis de agarose fotografados sob luz UV, contendo DNA de dendê e caiuá fragmentado via sonicador. A) Canaletas 1, 10 e 20: marcador molecular 1kb *ladder*; Canaletas 2 à 9: tempos de sonicação crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para o acesso Manicoré, de caiuá; Canaletas 11 à 18: tempos de sonicação crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para o acesso BR 174, de caiuá; Canaletas 21 à 28: tempos de sonicação crescentes, de 5 à 40 minutos, para o acesso Coari, de caiuá. B) Canaleta 1: marcador molecular 1kb *ladder*; Canaletas 2 à 9: tempos de sonicação crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para acesso Tenera, de dendê.

Já a quebra física do DNA realizada através de autoclave, mostrou-se mais eficiente e uniforme. Os DNAs do único acesso de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e dos três acessos de Caiuá (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés) apresentaram

uma fragmentação gradual do primeiro ao último tratamento. É notável a diferença de fragmentação dos tratamentos de 5 a 20 minutos para aqueles fragmentados de 25 a 40 minutos. Estes últimos geraram fragmentos com menos de 1kb, enquanto que os primeiros geraram fragmentos de todos tamanhos, principalmente com mais de 1kb (figura 2).

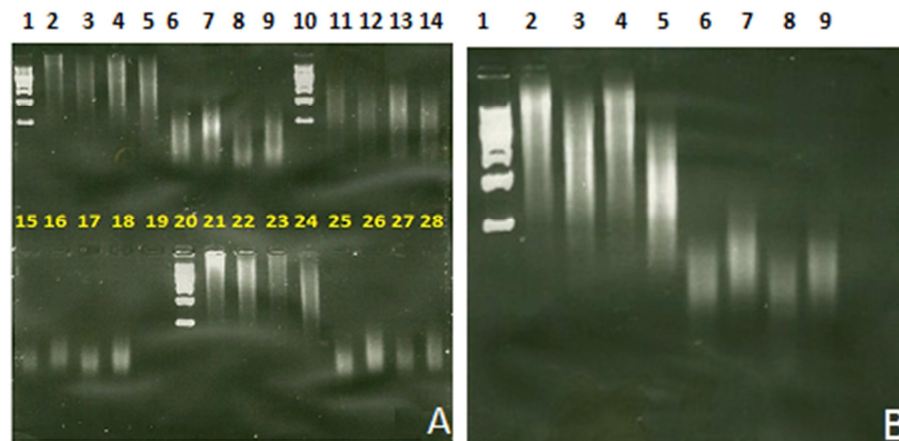


Figura 2: Géis de agarose fotografados sob luz UV, contendo DNA de dendê e caiaué fragmentado via autoclave. A) Canaletas 1, 10 e 20: marcador molecular 1kb *ladder*; Canaletas 2 à 9: tempos de autoclavagem crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para o acesso Manicoré, de caiaué; Canaletas 11 à 19: tempos de autoclavagem crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para o acesso BR 174, de caiaué; Canaletas 21 à 29: tempos de autoclavagem crescentes, de 5 à 40 minutos, para o acesso Coari, de caiaué. B) Canaleta 1: marcador molecular 1kb *ladder*; Canaletas 2 à 9: tempos de autoclavagem crescentes, de 5 à 40 minutos (de 5' em 5'), para o acesso Tenera, de dendê.

CONCLUSÃO

Este experimento possibilitou a identificação do melhor método e tempo de fragmentação de DNA para diferentes acessos de caiaué e dendê. Assim, fica evidente que a autoclavagem por períodos de 25 à 40 minutos permite a obtenção de fragmentos menores e mais homogêneos de DNA. Enquanto que o uso do sonicador mostrou-se ineficiente em todos tratamentos testados, levando a uma fragmentação considerável apenas do acesso BR174 (caiaué). É possível que um sonicador com ajuste de frequência permita uma melhor quebra do DNA, mas isso ainda será alvo de estudo.

BIBLIOGRAFIA

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1990, 12: 13-15.

Guillaumet, J. ; Rodrigues, M. R. L. ; Miranda, I.P.A . A Estação Experimental do Dendê do Rio Urubu - EERU - Embrapa Amazônia Ocidental. **Ecossistemas florestais em áreas manejadas na amazônia**. 1 ed. Manaus: INPA/PPG-7, 2003, v. 1, p. 30-65.

