

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

ESTABELECIMENTO DE CURVA DE MELTING PARA *Elaeis guineenses* Jacq. e *Elaeis oleífera* (Kunth) Cortés

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

OBJETIVO

A temperatura de *melting* é definida como a temperatura na qual a metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada e a outra metade na forma de dupla fita (Fixman & Freire, 1977). A determinação da temperatura de *melting* (Tm) é um importante passo no estudo da cinética de reassociação, que permite o isolamento de sequências de DNA não repetitivas. Este estudo objetivou a determinação da Tm do DNA de um acesso de *Elaeis guineensis* Jacq. (Tenera) e de três acessos de *Elaeis oleífera* (Kunth) Cortés (BR 174, Coari e Manicoré), visando a obtenção de DNA de cópia única a serem usados como sondas em estudos citogenéticos de GISH (*Genomic in situ hybridization*).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (LGBM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), situada no Parque Estação Biológica em Brasília - DF.

O material utilizado para extração de DNA consistiu em tecido de folha jovem "flecha" de dendezeiro (*Elaeis guineenses*) e caiaué (*Elaeis oleífera*) 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 4 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 realizada 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 confirmação da qualidade e integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com marcador de tamanho molecular (1kb *ladder*). 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.

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

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

Para a determinação da temperatura de *melting* (T_m), utilizou-se a metodologia relatada por Peterson et al., 1998. Aliquotou-se 1 ml da solução contendo o DNA de cada acesso em cubetas de 2ml e 10/2 mm de espessura (Eppendorf®). As amostras foram submetidas a um aumento gradual de 5 °C em sua temperatura, partindo de 25 °C (ambiente) até 80 °C. A partir desta temperatura, o aumento gradual passou a ser de 1 °C, até a temperatura final de 110 °C. Para isto, foi utilizado um banho seco (Boekel® *Digital Dry Bath Incubator* 11602). A cada aumento de temperatura, aguardou-se 1 minuto para que a temperatura da amostra se tornasse homogênea e, então, procedeu-se a leitura da absorbância (260 nm) em espectrofotômetro (Eppendorf *BioPhotometer*®). Todos dados foram, posteriormente, armazenados em planilha digital para análise dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de leitura de absorbância obtidos em cada repetição técnica e biológica foram anotados em forma de tabela no software Excel®. A partir destes dados foram criados gráficos contendo a absorbância (ng/μl) no eixo das ordenadas e a temperatura (°C), no eixo das abscissas. Neste gráfico realizou-se uma regressão linear, formando uma reta em torno da qual os valores se situam (observados os respectivos desvios-padrão).

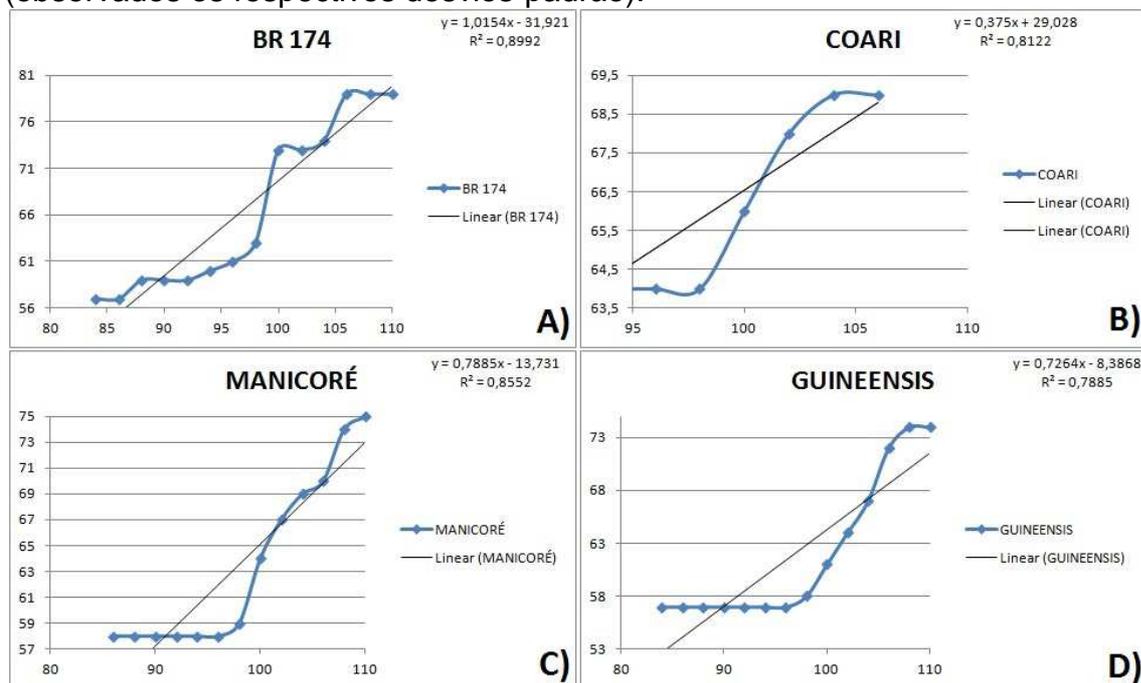


Figura 1: Nos gráficos acima, os eixos das abscissas (X) são formados por valores de temperatura, em °C, enquanto os eixos das ordenadas (Y) são formados por valores de absorbância, em ng/μl. Todos gráficos foram gerados com os valores de cada leitura de absorbância em temperaturas crescentes (aumentos graduais de 2 em 2°C). A reta preta representa a regressão linear dos pontos analisados. Os acessos de

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

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP
caiaué são ilustrados nos quadros A), B) e C); já o acesso de dendê encontra-se
ilustrado no quadro D).

Analisando a mediana da reta formada pela regressão, foi possível identificar a temperatura de *melting* (T_m), ou seja, a temperatura na qual metade das fitas duplas de DNA encontram-se íntegras e metade dissociadas.

Observou-se diferentes valores de T_m nas diferentes espécies e acessos utilizados neste experimento. O valor de T_m encontrado para o único acesso testado de *Elaeis guineensis* foi 81 °C, enquanto para os acessos de *Elaeis oleifera*, os valores de T_m foram: 75 °C, para Manicoré, 84 °C para Coari e 72,5 °C para BR174. Importante ressaltar que valores de T_m de quaisquer culturas podem ser estimados através de complexas fórmulas, porém a determinação destes valores através da curva de dissociação apresenta-se de forma mais consistente e confiável.

Subtraindo-se 25°C dos valores de T_m encontrados, determina-se a temperatura de reassociação (T_{re}), imprescindível na análise de curva de Cot, que é o objetivo final do trabalho em andamento.

Os valores encontrados em cada uma das 3 repetições técnicas e 2 repetições biológicas apresentaram pouca variação (no máximo 5°C). Porém em duas situações (uma repetição técnica de Manicoré e uma de Tenera) os valores foram bastante discrepantes, o que resultou no descarte dos mesmos.

Dados referentes à temperatura de *melting* são raros na literatura. No entanto, os valores de T_m encontrados neste trabalho para os acessos de *E. guineensis* e *E. oleifera* se aproximam muito dos valores relatados para tomate (Peterson *et al*, 1998) e bacilovírus (Mohan & Gopinathan, 1991), por exemplo.

CONCLUSÃO

Através deste trabalho pode-se determinar as temperaturas de *melting* para 1 acesso de dendeeiro (Tenera) e 3 acessos de caiaué (BR174, Coari e Manicoré). Os valores encontrados foram 81°C, 72,5°C, 84°C e 75°C, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fixman M, Freire J.J. Theory of DNA melting curves. **Biopolymers** 1977;16:2693–704.

Mohan K.S and Gopinathan K .P. Physical mapping of the genomic DNA of the *Oryctes rhinoceros* baculovirus, KI. **Gene**, 1991, 107 343–344

Peterson, D.G.; Pearson, W.R.; Stack, S.M. Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. **Genome**, 1998, 41:346-356 p.

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