10º FEPEG FÓRUM ENSINO · PESQUISA EXTENSÃO · GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA
Realização: Unimontes, Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Minas Gerais
Apoio: FAPEMIG, FADENOR
ISSN 1806-549 X

Autor(es): KENIA PRISCILA DE SOUZA VERÍSSIMO, VANESSA DE ANDRADE ROYO, ELYTANIA VEIGAMENEZES, MURILO MALVEIRA BRANDÃO, HELBERT FAGUNDES SOARES, AFRÂNIO FARIAS DE MELO JUNIOR, DARIO ALVES DE OLIVEIRA

# Protocolo de Extração de DNA de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.

## Introdução

A espécie *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. pertence à família Arecaceae, subfamília Cocosoideae e é conhecida como guariroba. É uma palmeira nativa com centro de origem na região leste e no Brasil Central, mais frequentemente encontrado nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Minas Gerais e no Distrito Federal [1,2].

A denominação ‘guariroba’é um termo de origem indígena tupi gwarai-rob, que significa "o indivíduo amargo"[3]. O palmito extraído da espécie possui sabor amargo e adstringente, devido à presença de fenóis e pH em torno de 5,7 tradicionalmente utilizado como iguaria regional nos estados de Goiás e Minas Gerais[4].

A guariroba possui caule solitário (estipe) com altura de 5 a 20 metros e diâmetro entre 15 a 30 cm. O fruto é uma drupa constituída por: epicarpo (casca verde amarelada); mesocarpo (carnoso, amarelado, fibroso); endocarpo (espesso, lignificado, celulósico, muito duro, de formato ovóide, impermeável, de cor marrom, com três poros tendo somente um funcional, com diâmetro variando entre 0,5 a 2,0 mm, que é utilizado para trocas gasosas, entrada de água e saída do embrião) [5]. A semente (coquinho ou amêndoa) da guariroba está inserida dentro do fruto que apresenta um tegumento amarronzado, com endosperma oleoso. A propagação é realizada por sementes que devem ser colhidas maduras, durante os meses de agosto a fevereiro. As sementes da espécie normalmente possuem melhor viabilidade entre os meses de setembro a outubro [6].

Os estudos sobre a variabilidade genética de *Syagrus oleracea* são escassos. Conhecer a diversidade genética natural das espécies é um passo crucial para programas de melhoramento genético assistida por marcadores moleculares. Um dos pontos fundamentais para manipulação genética da espécie é o sucesso no isolamento e na purificação de quantidades adequadas de DNA de qualidade, preferencialmente íntegro e livre de impurezas, para realização da análise com marcadores moleculares [8]. Neste trabalho, foram realizados testes com utilização com os protocolos de extração de DNA de Mogg e Bond [9] e Doyle e Doyle [10] para a espécie *S. olerace*, com o objetivo de obter amostras concentradas para posterior utilização em estudos de diversidade genética em populações naturais e em trabalhos de melhoramento da espécie.

## Material e Métodos

### *A. Coleta do material vegetal*

Para a avaliação dos métodos de extração de DNA, amostras foliares de *Syagrus oleracea* foram coletadas em duas localidades no Norte do Estado de Minas Gerais: 05 indivíduos em Mirabela (16°15,4'S;44°09,2'O) e 05 indivíduos em Rio Pardo (15°31,0'S; 42°32,4’O). As amostras foram acondicionadas, separadamente, e identificadas em sacos plásticos e armazenadas em caixa de isopor com a presença de gelo para refrigeração. Posteriormente, o material foi colocado em freezer -30°C, no Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) até o momento da extração do DNA.

### *B. Extração do DNA: Protocolo Doyle e Doyle [10]*

Para o teste de extração do DNA, pelo protocolo Doyle e Doyle [10], aproximadamente 200mg das amostras foliares da *S. oleracea* foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, pistilo e almofariz. Em seguida foram adicionados 700µl do tampão de extração previamente aquecido em banho-maria a 65°C. O tampão de extração foi preparado nas concentrações apresentadas na Tabela 1. As folhas maceradas com o tampão foram acondicionadas em tubos tipo *Eppendorf* de 2,0mL. Os tubos foram levados ao banho-maria aquecido a 65°C por uma hora e agitados de 10 em 10 minutos com auxílio de vortex. As amostras foram retiradas do banho-maria, esfriadas à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 600 µl de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA 24:1), e realizada agitação cuidadosa dos tubos por cinco minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante dez minutos, à temperatura ambiente. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5mL, devidamente identificados. Aos sobrenadantes foram adicionados 400µl de isopropanol gelado, com agitação cuidadosa. Os tubos foram acondicionados em freezer por um período de uma hora. Decorrido esse período, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Observou-se a formação do *pellet* do concentrado de DNA extraído. Em seguida os sobrenadantes foram descartados, em cada tubo adicionado 300 µl de etanol 70%. Cada tudo foi agitado até o desprendimento do *pellet* da parede. Prosseguiu-se nova centrifugação a 12.000 rpm por dez minutos a 4°C. Repetiu-se a lavagem com etanol 100% e nova centrifugação. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi deixado sobre a bancada, coberto por papel toalha, pelo período de 4 horas, para

ISSN 1806-549 X

evaporação do etanol. Adicionou-se 100 µl de solução de TE (Tris HCl 10mM, ph 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0) para solubilização do *pellet*. Em seguida, o DNA extraído foi preservado em freezer.

*C. Extração do DNA: Protocolo Mogg e Bond [9]*

Foram utilizados amostra foliar de aproximadamente 1 $cm^2$ de tecido foliar da *S. oleracea* para o teste de extração do DNA por meio do protocolo Mogg e Bond [9]. A amostra do tecido foi macerada com nitrogênio líquido em pistilo e almofariz. Ao material pulverizado, foram adicionados 500 µl de tampão de extração, à temperatura ambiente, preparado com as concentrações apresentadas na Tabela 2.

Cada amostra macerada com o tampão foi acondicionada em microtubo de 2,0 mL. Os microtubos foram colocados em banho-maria à 37°C por 12 horas (*overnight*). Foram adicionados aos tubos 320 µl de NaCl 5M, homogeneizados em vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 12.000 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, pipetou-se o sobrenadante, cuidadosamente, para novos microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados 800µl de isopropanol gelado e colocados em freezer por 3 horas para precipitação. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por dez minutos para formação do *pellet* de DNA. Cuidadosamente, retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 500 µl de etanol 70%. Com agitação cuidadosa, o *pellet* foi desprendido da parede do tubo e seguiu-se nova centrifugação à 12.000 rpm por cinco minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se a lavagem com etanol 100% e centrifugação. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi deixado sobre a bancada, coberto por papel toalha, pelo período de 4 horas, para evaporação do etanol. Adicionou-se 100 µl de solução de TE (Tris HCl 10mM, ph 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0) para solubilização do *pellet*. Em seguida, o DNA extraído foi preservado em freezer.

*D. Eletroforese: teste de eficiência da extração do DNA*

O DNA extraído foi analisado a partir de eletroforeses em gel de agarose 1,0%, acrescido de tampão TBE 1x. Depois de aquecido em equipamento microondas, foi adicionado brometo de etídeo em concentração final de 2 µg/mlno gel.

Após a polimerização do gel, foram aplicadas amostras contendo 4µl do DNA extraído acrescido de 4 µl de tampão de corrida (Loading). Após a eletroforese por 40 minutos a 80 V, os géis foram visualizados e fotodocumentados em um transluminador sob luz ultravioleta, com o sistema de captura de imagem. A partir da imagem capturada foram avaliadas as concentrados do DNA extraído e a presença de material degradado.

## Resultados e Discussão

A avaliação das imagens obtidas dos géis de agarose, sob a luz ultravioleta, revelou diferenças significativas nos perfis das bandas de DNA obtidas com os diferentes protocolos (Figura 1).

Ambos os protocolos utilizados apresentaram resultado positivo para extração do DNA genômico da espécie *S. oleracea*. Entretanto, o protocolo Doyle e Doyle (Figura 1A) apresentou maior eficiência, sendo que todas as amostras foram positivas para a extração. Por outro lado, o protocolo Mogg e Bond (Figura 1 B) apresentou falha no processo de extração em algumas amostras, sendo que duas amostras não foram extraídas (amostras 08 e 09).

O protocolo Mogg e Bond apresentou menor arraste durante a eletroforese (Figura 1B), indicando menor quantidade de DNA degradado durante o processo de extração. Além disso, revelou baixa concentração de polissacarídeos ou proteínas, em comparação ao protocolo Doyle e Doyle, principalmente pela ação da proteinase K presente no tampão de extração. Os subprodutos gerados com a degradação do DNA podem afetar a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a corrida no gel para separação dos fragmentos amplificados.

O protocolo que utiliza clorofórmio (Doyle e Doyle) apresentou maior arraste e maior presença de subprodutos. Todavia, a concentração do DNA extraído foi maior, em comparação ao protocolo Mogg e Bond. O protocolo de Mogg e Bond apresentou menor concentração do DNA extraído, possivelmente devido à pequena amostra do tecido foliar exigida no procedimento. É possível que o aumento da quantidade de tecido para a extração eleve a concentração do DNA extraído, entretanto, acarretaria elevação nos custos de extração do DNA por amostra coletada, uma vez que também seria necessário o aumento da quantidade de tampão de extração. É importante ressaltar que a concentração de DNA necessária para uma reação de PCR é baixa (5 a 10 ng/µl). Portanto, devem-se considerar os custos para a obtenção do DNA genômico das amostras e o tempo utilizado para o processo de extração.

## Conclusão

O Protocolo Doyle e Doyle apresentou-se mais eficiente em relação à obtenção de maior concentração de DNA. Entretanto, o protocolo Mogg e Bond apresentou DNA mais íntegro, o que exigirá menor diluição do DNA no momento do preparo da PCR. O protocolo Mogg e Bond após alguns ajustes na quantidade de amostra de tecido foliar utilizada, é recomendado para extração do DNA genômico da espécie *Syagrus oleracea*. Reações de PCR serão conduzidas com amostras obtidas de ambos os protocolos para comparação de eficiência na amplificação.

ISSN 1806-549 X

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (PIBIC/FAPEMIG) pela bolsa de iniciação científica concedida.

## Referências Bibliográficas

[1] LORENZI, H. [et al.]. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas.** – Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, ISBN 85-86714-20-8. 2004.

[2] NASCENTE, A.S. 2003. **Caracterização morfológica de progênies nativas de guariroba (SyagrusoleraceaBecc.) no Estado de Goiás**. Pesquisa Agropecuária Tropical, 33: 113-115. (Comunicação científica).

[3] FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 875p.

[4] CARNEIRO CEA, Holim HVM, Fernandes KF. **Procedimento eficiente na inibição do escurecimento de guariroba (Syagrusoleracea, Becc) durante processamento e armazenamento.** Acta Sci Agron. 2003; 25(2):253-8.

[5] MELO, B. de. **Cultivo de embrião in vitro da Guarirobeira [Syagrusoleracea (Mart.)] Tese de Doutorado).** Lavras; UFLA. 117p. 2000.

[6] BOVI, M. L. A. **Cultivo da palmeira real australiana visando à produção de palmito**. (Boletim técnico, 172), Campinas, Instituto Agronômico, 26p. 1998.

[8] KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. **Plant genomes**: methods for genetic and physical mapping. London: KluwerAcademicPubl., 1992. p.1-13.

[9] MOGG, R. J.; BOND, J. M. **A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants**.Molecular Ecology Notes, v. 3, n. 4, p. 666-668, 2003.

[10] DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **Isolatin of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12(1): 13-15, 1987.

**Tabela 1**: Reagentes utilizados no preparo do tampão de extração, segundo protocolo Doyle e Doyle (1987).

| REAGENTES | VOLUME | [ ] FINAL |
|---|---|---|
| TRIS 1 M /PH 8,0 | 0,1 ml | 0,1 M |
| EDTA 0,25 M | 0,08 ml | 0,02 M |
| NaCl 5 M | 0,26 ml | 1,3 M |
| CTAB 5% | 0,56 ml | 2,8% |
| H2O | 0,04 ml | - |
| PVP | 0,01 g | 1% |
| ß MERCAPTOETANOL | 2,2 µl | 0,22% |

**Tabela 2**: Reagentes utilizados no preparo do tampão de extração, segundo protocolo Mogg e Bond (2003).

| REAGENTES | VOLUME | [ ] FINAL |
|---|---|---|
| TRIS 1 M /PH 8,0 | 0,1 ml | 100 mM |
| EDTA 0,5 M/ PH 8,0 | 0,08 ml | 50 mM |
| NaCl 5 M | 0,26 ml | 500 mM |
| SDS 7% | 0,56 ml | 0,7% |
| H2O d | 0,04 ml | - |
| Proteinase K(10mg/ml) | 0,01 g | 50 µl/ml |

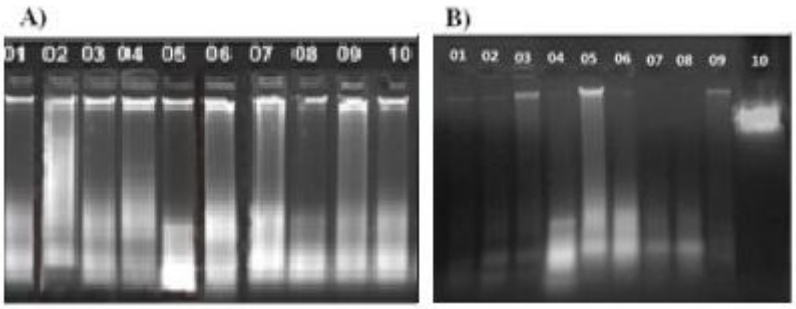


**Figura 1**: Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA genômico extraídos de 10 indivíduos de *Syagrusoleracea*. A) Protocolo Doyle e Doyle (1987); B) Protocolo Mogg e Bond (2003).