

Fotos: Marcos Emanuel da Costa Veloso



Extração de DNA de folhas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)

*Haritanna Lustosa da Silva*¹
*Jadson Emanuel Lopes Antunes*²
*Eugênio Celso Emerito Araújo*³
*Fábio Mendonça Diniz*³
*Valdomiro Aurélio B. de Souza*³
*Paulo Sarmanho da Costa Lima*³

Introdução

A vigência da lei 11.097 de 13/01/2005, que dispõe sobre a adição de biodiesel ao óleo diesel a partir do ano de 2008 tem provocado a busca de fontes para este combustível renovável. Entre as alternativas, destaca-se o pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pelas potencialidades de seu cultivo sob condições de estresses bióticos e abióticos, por apresentar longo ciclo produtivo o que contribui para a conservação do solo e para a redução do custo de produção que é importante para a sua viabilidade econômica, especialmente na agricultura familiar, pelo alto teor de óleo que atinge até 67 % quando extraído por combinação dos métodos enzimático e ultra-sônico e por ser considerado de baixa viscosidade (SHAH; SHARMA; GUPTA, 2005).

No Brasil, o pinhão-mansão ocorre praticamente em todas as regiões, sobretudo nos estados da Região Nordeste e em Goiás e Minas Gerais, sendo encontrado sempre de forma dispersa adaptando-se às condições edafoclimáticas das mais variáveis (SATURNINO et al., 2005).

Apesar das inúmeras ferramentas que a Biologia Molecular proporciona e que podem ser utilizadas para aprofundar os conhecimentos sobre o pinhão-mansão e viabilizar o seu cultivo racional de forma a aproveitar todo seu potencial como fornecedor de matéria prima para ser adicionada ao biodiesel, pesquisas nessa área do conhecimento com pinhão-mansão são incipientes. Sabe-se que para o desenvolvimento de trabalhos na área da biologia molecular é essencial a disponibilidade de DNA de boa qualidade e em concentração adequada. Portanto, é necessário pleno domínio quanto aos procedimentos de extração para que se possa disponibilizar DNA para atender às demandas provenientes de projetos a serem executados. Este trabalho teve como objetivo avaliar a extração de DNA por meio de um kit comercial "Puregene DNA Isolation" a partir de folhas cujas colorações definiam o estágio de crescimento no final do período de repouso vegetativo do pinhão-mansão.

¹Estudante da Universidade do Piauí-UESPI, estagiária do laboratório de Biotecnologia-Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

²Estudante da Universidade Federal do Piauí-UFPI, estagiário do laboratório de Biotecnologia-Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

³Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

Metodologia

Foram coletadas folhas em quatro diferentes estádios de desenvolvimento (folha vermelho-vinho, folha verde-clara, folha verde-brilhante e folha verde) de plantas em final de repouso vegetativo (Fig. 1). As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. A extração foi realizada conforme recomendações do manual do Kit "Puregene DNA Isolation", partindo de amostras de folhas frescas maceradas em nitrogênio líquido, pesando 30 mg cada uma das amostras, que foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A este material foi adicionado 300 μ L da solução de lise celular e incubou-se a 65 °C em banho-maria por uma hora. Foi adicionado 1,5 μ L RNase, na concentração de 10 mg/mL incubando-se por uma hora e, em seguida, deixando-se em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos. Depois foram adicionados 100 μ L de solução de precipitação de proteínas, homogeneizando-se, centrifugou-se por 3 minutos a 17350 x g e o sobrenadante foi transferido para novos tubos aos quais foram adicionados 300 μ L de isopropanol a 100% (2-propanol). Centrifugou-se novamente por 90 segundos a 17350 x g, descartou-se o sobrenadante e lavou-se com 300 μ L de etanol 70% gelado. Centrifugou-se novamente por 1 minuto a 17350 x g, descartando o sobrenadante e em seguida os tubos foram invertidos em papel absorvente por 15 minutos. Adicionou-se 50 μ L de solução de hidratação de DNA e, após incubação a 65 °C por uma hora, centrifugou-se a 17350 x g por 10 minutos, transferindo o sobrenadante para um tubo novo. O DNA foi estocado a -20 °C.

A concentração e a qualidade das extrações de DNA foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop de espectro completo (220 a 750 nm). A estimativa da concentração e verificação da integridade das extrações de DNA foram realizadas também por eletroforese com gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídio, utilizando como padrão de análise o DNA- ϕ diluído na concentração de 100 ng/mL.

Para análise dos dados, foi usado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (estádios de desenvolvimento das folhas) e oito repetições na quantificação em espectrofotômetro e quatro repetições para a quantificação em gel. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento para cada variável foram comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

Resultados e Discussão

As concentrações médias de DNA determinadas por espectrofotometria das amostras provenientes dos quatro tratamentos não diferiram significativamente entre si ao nível de 0,01 % de probabilidade (Tabela 1). Em relação às concentrações obtidas por quantificação em gel de agarose (Fig. 2) as extrações provenientes das folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-clara) apresentaram as maiores concentrações de DNA, não diferindo entre si e superaram significativamente as concentrações obtidas a partir das demais amostras de folhas, com tendência de diminuição da concentração de DNA, conforme o avanço do estágio de desenvolvimento das folhas. Observou-se no gel a presença de rastro de manchas "smear" indicando a ocorrência de degradação do DNA atribuída à realização de centrifugações sem refrigeração que não minimizam a ação de DNases.

As diferenças nas concentrações de DNA estimadas pelos dois métodos podem ser atribuídas à subjetividade da quantificação em gel e à inespecificidade da leitura por espectrofotometria que na absorvância de 260 nm não exclui o RNA, além de incluir fragmentos do DNA genômico provenientes do processo de extração.

A pureza do DNA obtida pela razão 260/280 obedeceu também a mesma tendência de redução em função do estágio de desenvolvimento das folhas, observada na concentração quando quantificada em gel de agarose que, segundo Sharma, Lavanya e Anjaiah (2000) ocorre em razão do aumento de polifenóis, taninos e polissacarídeos, conforme o avanço da maturidade das folhas que prejudica a qualidade do DNA e conseqüentemente a sua concentração. Tendência semelhante observa-se quanto a razão 260/230 que é considerada referencial secundário de pureza, indicando a presença de resíduos de componentes orgânicos na extração.

Os tratamentos em que foram utilizadas as folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-clara) para extração, a pureza do DNA diferiu significativamente em relação aos demais tratamentos, apesar de não ter atingido o grau de pureza ideal que situa-se no intervalo de 1,8-2,0. Isso indica que há necessidade de mais um tratamento com a solução de precipitação de proteínas e a lavagem com etanol 70 % com objetivo de remover resíduos de proteína e outras impurezas.

Os resultados obtidos a partir dos métodos de quantificação indicaram que as folhas mais jovens, com coloração vermelho-vinho e verde-claro são as mais indicadas para a realização das extrações, quanto aos

parâmetros da qualidade e de concentração do DNA, possibilitando a realização de coleta de tecidos para extrações mesmo no período de repouso da planta.

Tabela 1. Quantificação e pureza das amostras de DNA genômico de pinhão-manso⁽¹⁾.

Tratamento	Concentração por espectrofotometria (ng/iL)	Concentração em gel de agarose (ng/iL)	Razão 260/280	Razão 260/230
Folha verde-vinho	405,6a	37,5a	1.65a	0.92a
Folha verde-clara	595,7a	34,7a	1.54 b	0.57 b
Folha verde-brilhante	417,6a	12,6 b	1.31 c	0.56 b
Folha verde-escura	397,7a	5,4 b	0.98 d	0.51 b

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan

Foto: Mariana Aparecida Carvalhaes



Fig. 1. Tipos de folhas utilizadas na extração de DNA de pinhão-manso. 1-Folha vermelho-vinho; 2-Folha verde-clara; 3-Folha verde-brilhante; 4-Folha verde-escura.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

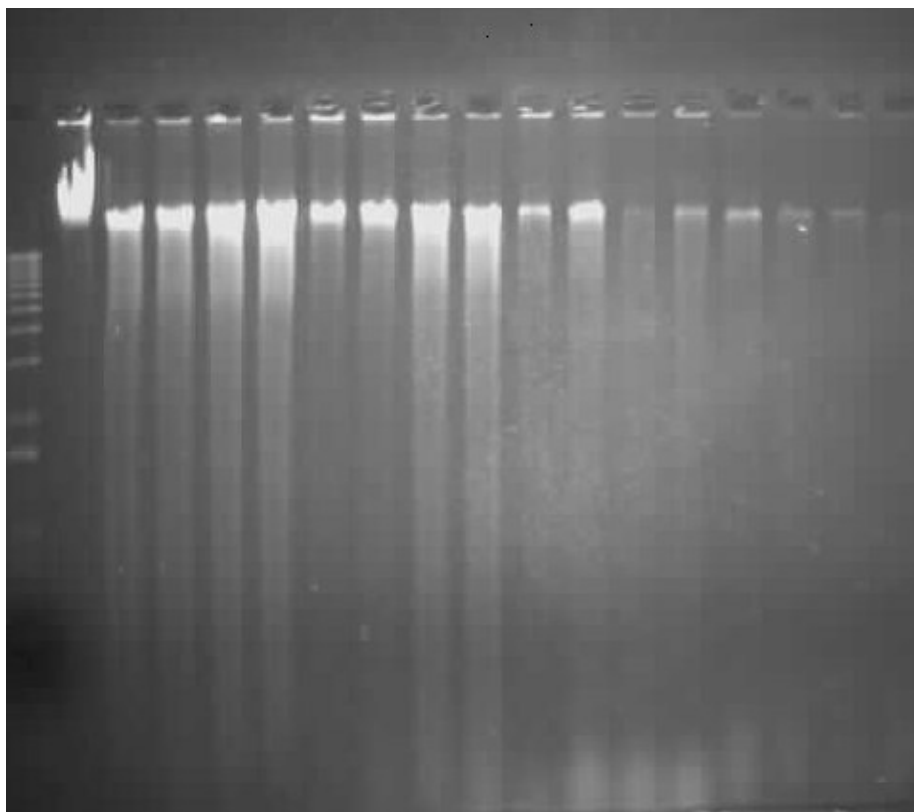


Fig. 2. Eletroforograma das amostras de DNA de pinhão-mansó obtidas de folhas em diferentes estádios de crescimento. Canaleta 1-1Kb; Canaleta 2-DNA I 100 (3mL). Canaletas 3 a 6 DNA extraído de folha verde-vinho; Canaletas 7 a 10 DNA extraído de folha verde-claronaleta 11 a 14 DNA extraído de folha verde-brilhante; Canaletas 15 a 18 DNA extraído de folha verde.

Referências

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra, v. 96, n. 1, p. 121-123, 2005. Disponível em: <http://eprint.iitd.ac.in/dspace/bitstream/2074/1471/1/shahextr2004.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2008.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJIAH, V. A Method for Isolation and Purification of Peanut Genomic DNA Suitable for Analytical Application. **Plant Molecular**

Biology Reporter, v. 18, n. 4, p.393a-393h, Dec. 2000. Disponível em: <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb18/R00-044.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2008.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

Comunicado Técnico, 204

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Meio-Norte
Endereço: Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires, Caixa Postal 01, CEP 64006-220 Teresina, PI.
Fone: (86) 3089-9100
Fax: (86) 3089-9130
E-mail: sac@cpamn.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2008): 120 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Flávio Favaro Blanco,
Secretária Executiva: Luisa Maria Resende Gonçalves
Membros: Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa José Almeida Pereira e Maria Teresa do Rêgo Lopes

Expediente

Supervisor editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira
Revisão de texto: Lígia Maria Rolim Bandeira
Editoração eletrônica: Erlândio Santos de Resende
Normalização bibliográfica: Orlane da Silva Maia