

03.09.00.202.00.00

PL 1130
2010
ex. 1
PL-PP2010.00939

COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)

Izabelle S. de Paulo Matos¹; Edilene Machado Barbosa²; Maria Clideana Cabral Maia³; Andréa Raposo³; Renata Beltrão Teixeira⁴

¹Estudante do curso de Ciências Biológicas Universidade Federal do Acre, e-mail: izabellematos@hotmail.com

²Estudante do curso de Ciências Biológicas UNINORTE, e-mail edilenebac@gmail.com;

³Pesquisadora da Embrapa Acre, clideana@cpafac.embrapa.br, andrea@cpafac.embrapa.br;

⁴Analista da Embrapa Acre, beltrao@cpafac.embrapa.br

Resumo

O cupuaçu é uma espécie nativa na região Amazônica que se encontra em estágio inicial de domesticação, apresentando ampla variabilidade genética para as diversas características. Contudo, poucos são os estudos que envolvem avaliações moleculares nesta espécie. A otimização de um protocolo para extração de DNA é pré-requisito básico para etapas subseqüentes da análise molecular. Com o objetivo realizar amplificação e melhoria da qualidade e quantidade de DNA obtido dessa espécie, o presente trabalho compara protocolos de extração de DNA do cupuaçu. Os protocolos utilizados foram o de Doyle e Doyle (1990), modificado por FIGUEIRA et al. (1997) com a utilização de proteinase K, e o Doyle e Doyle (1990), modificado por FERREIRA GRATTAPAGLIA (1998) estabelecido para várias espécies e já utilizado no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da EMBRAPA-Acre, em ambos os protocolos também foram feitos os testes com *beads* de cerâmica e de tungstênio. Os resultados obtidos na quantificação das amostras mostraram que o emprego da proteinase K produziu um DNA mais limpo. Porém, quando se compara esta metodologia com a que não utilizou a proteinase K, verificou-se uma menor quantidade de DNA extraído. A utilização das *beads* de cerâmica proporcionou um aumento significativo na quantidade de DNA, no entanto, não se obteve boa qualidade, apresentando DNA fragmentado. Em meio a esses resultados pode-se constatar que o uso das *beads* de tungstênio e sem o emprego da proteinase K possibilitaram a extração de um DNA com melhor qualidade e quantidade.

Palavras-Chave: cupuaçuzeiro; metodologia, quantificação.

Abstract

Cupuassu is a native species in the Amazon region that finds in initial stage of domesticated, that has ample genetic variability for the diverse characteristics. However, few studies that involve molecular evaluations in this species. The optimization of a protocol of DNA extraction is basic prerequisite for subsequent steps the molecular analysis. With the objective of realization the amplification and improvement of the quality and amount in DNA of this species, the present work compares two protocols of DNA extraction. The protocols of extraction of DNA that utilized were Doyle and Doyle (1990), modified for FIGUEIRA et al. (1997) with the use of proteinase K, and the Doyle and Doyle (1990), modified for FERRERIA and GRATTAPAGLIA (1998) established for some species and used in the sector of Molecular Biology in the Laboratory of Morphogenesis and Molecular Biology of EMBRAPA-Acre, in both of protocols also were made the tests with ceramics and tungsten beads. The results obtained in quantification of samples had shown that the used of proteinase K produced a cleaner DNA. However, when this methodology is compared with that did not use proteinase K, was verified a few amount of extracted DNA. The use of beads of ceramics

PL 1130

939/2010

SEMINÁRIO ANUAL DE COOPERAÇÃO UFAC-UC, 7., 2010, Rio Branco, AC.



provided a significant increase in the DNA amount, however, did not get good quality, shown DNA fragmented. These results evidenced that the use of tungsten beads and no utilization of proteinase K makes possible the better quality and amount in DNA extration.

Keywords: cupuassu; methodology, quantification.

Introdução

A Amazônia tem sua relevância quanto ao uso econômico da sua biodiversidade. Como um dos produtos dessa biodiversidade, de grande importância no agronegócio, destaca-se a cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng) Schum, cujo diferencial em relação às demais frutíferas nativas são as suas características tecnológicas superiores, como o alto rendimento em polpa e a elevada acidez.

Delinear estratégias de melhoramento genético para espécies perenes, alógamas e auto-incompatíveis não é uma tarefa fácil devido ao tempo, à área e aos recursos requeridos. No cupuaçuzeiro, a complexidade aumenta pela condição de espécie nativa em processo de domesticação, com poucas informações sobre a diversidade genética da espécie e o controle genético dos caracteres de importância econômica e, ainda, a grande demanda para recomendação de cultivares (SOUZA e SOUSA, 2002).

Como toda espécie em fase inicial de domesticação, o cupuaçuzeiro apresenta, em condições de cultivo, baixa produtividade de frutos, em torno de 10 a 20 frutos/árvore/ano, elevada desuniformidade intrapopulacional em relação a todos os caracteres produtivos e suscetibilidade à doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (ALVES, 2003).

O uso de material genético de origem desconhecida nos plantios comerciais tem sido um dos motivos dessa baixa produtividade da cultura. Soma-se ainda a alternância de produção, tendo genótipos com safras produtivas seguidas de safras de baixa produção e época de maturação concentrada entre os meses de maior precipitação pluviométrica, o que limita a oferta contínua de matéria-prima para a agroindústria. A concentração da safra chega a 49% somente no mês de março, conforme observado na área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental. Adicionalmente, até recentemente, na maioria dos plantios, os produtores não utilizavam nenhum critério de seleção na escolha dos frutos para extração das sementes, que normalmente eram adquiridos em feiras ou em pequenos cultivos. Este fato contribuiu para a elevada variabilidade dos plantios (SOUZA, 2004).

Existe, portanto, a necessidade de se desenvolver cultivares que apresentem características interessantes para os produtores, consumidores e indústria. Os produtos do melhoramento genético geram tecnologia nacional, sendo que o seu repasse ocorre, geralmente, sem custo adicional para o agricultor.

O cupuaçu é uma frutífera que se desenvolve espontaneamente na Amazônia brasileira, região que apresenta máxima diversidade de tipos e onde se estabeleceu ampla variabilidade genética da espécie, condição ideal para viabilizar processos seletivos de materiais que apresentem características agronômicas de interesse.

A domesticação e a utilização de espécies nativas em sistema de produção muitas vezes são inviabilizadas pela falta de conhecimento prévio sobre a variabilidade genética. Uma vez quantificada, esta variabilidade pode ser útil tanto para o melhoramento genético da espécie quanto em programas de conservação.

A caracterização dos materiais genéticos (coleções), tanto do ponto de vista morfológico como molecular, é um passo fundamental para o embasamento científico do programa, que deverá ser acompanhado pela avaliação e seleção de cultivares (ALVES & FIGUEIRA, 2002). A otimização de um protocolo para extração de DNA é pré-requisito básico para etapas subsequentes da análise molecular. Com o objetivo realizar amplificação e



melhoria da qualidade e quantidade de DNA obtido dessa espécie, o presente trabalho compara protocolos de extração de DNA do cupuaçu.

Material e Métodos

Foram utilizados indivíduos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) da coleção de trabalho do programa de melhoramento genético do cupuaçuzeiro da Embrapa Acre.

Os protocolos utilizados foram o de Doyle e Doyle (1990) modificado por Figueira (1997), para espécies do gênero *Theobroma*, e também com a utilização da proteinase K, e o de Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998), estabelecido para várias espécies e já utilizado no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. Em ambos os protocolos também foram realizados testes com *beads* de cerâmica e de tungstênio (Figura 1).

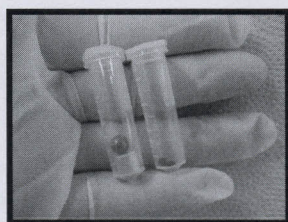


Figura 1 – Microtúbulos contendo *beads* de cerâmica (A) e de tungstênio (B).

Protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado por Figueira et al. (1997)

O DNA foi obtido de folhas jovens e saudáveis de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) secas em sílica gel. Aproximadamente 90 mg de folhas secas foram colocadas em microtúbulos de 2 mL contendo duas *beads* de cerâmica. Adicionou-se 700 μ L de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl) previamente aquecido a 65°C, acrescido de 2% de β -mercaptoetanol e 100 μ L de proteinase K (1 mg/ml) para cada mL de tampão. Os microtubos foram levados para a máquina Tissuelyser, onde ocorreu a maceração, por 60 segundos e, em seguida, foram colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante 60 minutos. Após este tempo foi acrescentado a cada microtubo 650 μ L de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico), que é um solvente orgânico, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Com este procedimento, obteve-se a separação das fases aquosa e orgânica. Então o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo microtubo.

Para a precipitação do DNA, foram adicionados 400 μ L de isopropanol gelado, os microtubos foram mantidos no freezer a -2°C por cerca de 30 minutos e, em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, para formação do precipitado de DNA (*pellet*). O isopropanol foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com adição de 500 μ l de etanol 70%, com agitação vigorosa e centrifugação. Foi feita uma terceira lavagem com adição de 500 μ l de etanol absoluto. Este foi retirado gentilmente e os *pellets* ficaram secando à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foram acrescentados 15 a 30 μ L de solução TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) com RNase (0,5 mg) aos microtubos, com a finalidade de ressuspender o DNA do *pellet*. O material permaneceu em estufa 37°C por uma hora.

Protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998)

O DNA foi obtido de folhas jovens e saudáveis de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) secas em sílica gel. Aproximadamente 90 mg de folhas secas foram colocadas em microtúbulos de 2 mL contendo duas *beads* de tungstênio por amostra. Adicionou-se 700 μ L de tampão de

extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 1% de PVP, 0,1 M de Tris-HCl) previamente aquecido a 65°C, acrescido de 2% de β -mercaptoetanol.

Os microtubos foram levados para a máquina Tissuelyser, onde ocorreu a maceração, por 60 segundos, e em seguida foram colocados em banho-maria à temperatura de 65°C durante 60 minutos. Após este tempo foi acrescentado a cada microtubo 600 μ L de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico), seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Com este procedimento, obteve-se a separação das fases aquosa e orgânica. Então o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo microtubo.

Para a precipitação do DNA, foram adicionados 400 μ L de isopropanol gelado, os microtubos foram mantidos no freezer a -2°C por cerca de 30 minutos e, em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos, para formação do precipitado de DNA *pellet*. O isopropanol foi descartado, e o *pellet* foi lavado duas vezes com adição de 300 μ l de etanol 70%, com agitação vigorosa e centrifugação. Foi feita uma terceira lavagem com adição de 300 μ l de etanol absoluto. Este foi retirado gentilmente e os *pellets* ficaram secando à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, foram acrescentados 15 a 30 μ L de solução TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA) com RNase (0,5 mg) aos microtubos com a finalidade de ressuspender o DNA do *pellet*. O material permaneceu em estufa 37°C por uma hora.

Depois de extraído pelos dois métodos, o DNA genômico foi quantificado por meio da análise comparativa de cada amostra com o DNA fago λ de peso conhecido (50 a 200 ng) em eletroforese em géis de agarose 1% (0,3 g de agarose; 30 ml TBE 1X - 93 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA ; 4,5 μ l de brometo de etídio (1 mg/ml)). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência de suas bandas com as do DNA padrão.

Resultados e Discussão

A extração de DNA de boa qualidade é um imprescindível para a realização de análises genéticas em populações de plantas. Vários trabalhos têm sido realizados para este fim em diversas espécies. Pauli et al. (2006) testaram quatro protocolos de extração em nove variedades de bananeira e verificaram que a utilização do detergente CTAB no tampão de extração e a desproteinização utilizando-se clorofórmio:alcohol isoamílico foi o mais eficiente para extração de DNA de boa qualidade para todas as variedades utilizadas.

Gonçalves et al. (2009) verificaram que a substituição do clorofórmio, que é um reagente tóxico, pelo acetato de potássio na extração de cupuaçu proporcionou ao DNA boa qualidade, que possibilitaram a amplificação de primers de RAPD.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a quantificação das amostras com o emprego da proteinase K produziu um DNA mais limpo (Figura 2). Isso já era esperado, pelo fato da mesma remover nucleases e outras proteínas que ficam associadas ao DNA. Porém, quando se comparou esta metodologia com a que não utilizou a proteinase K (Figura 3), verificou-se uma menor quantidade de DNA extraído. A utilização das *beads* de cerâmica proporcionou um aumento significativo na quantidade de DNA (Figura 4), no entanto, não se obteve boa qualidade, apresentando amostras de DNA fragmentado.



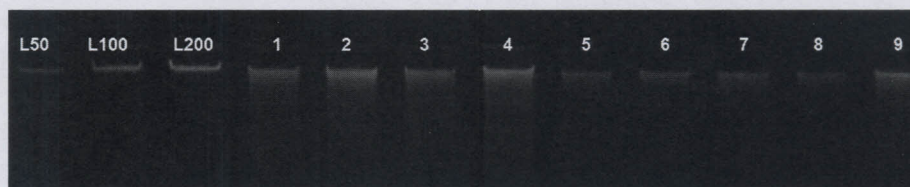


Figura 2 - Extração DNA utilizando *beads* de tungstênio, segundo protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Figueira et al. (1997), que utiliza a proteinase K para digestão de nucleases. (L50 = 50 ng/μL; L100 = 100 ng/μL; L200 = 200 ng/μL; 1 a 9 = extrações de DNA).

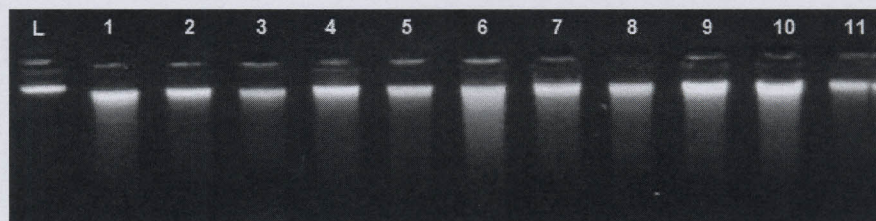


Figura 3 - Extração de DNA utilizando *beads* de tungstênio, segundo protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998), que não utiliza a proteinase K. (L = 100 ng/μL; 1 – 11 = extrações de DNA).

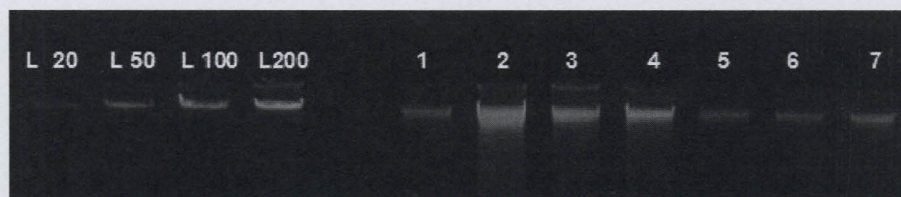


Figura 4 - Extração de DNA, segundo protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998) sem a utilização da proteinase K. Amostras 1 a 4 utilizando *beads* de cerâmica; 5 a 7 utilizando *beads* de tungstênio. Note o DNA ligeiramente fragmentado em 2, 3 e 4.

Portanto, a utilização do protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998) foi o que proporcionou melhor qualidade e quantidade de extração de DNA de cupuaçu. Esta qualidade foi comprovada com a amplificação destes DNAs extraídos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de primers de microssatélite (SSR), proporcionando bandas nítidas (Figura 5).

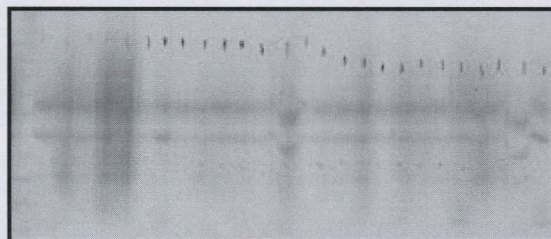


Figura 5 – Genotipagem em gel de poliacrilamida com *primers* SSR em indivíduos de cupuaçu.

Conclusões

Com o presente trabalho foi possível concluir que a utilização das *beads* de tungstênio sem o emprego da proteinase K possibilitou a extração de um DNA com melhor qualidade e quantidade.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa. À Embrapa Acre pela infra-estrutura

Bibliografia

ALVES, R. M., FILGUEIRA, A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) genetic resources and breeding in the Brazilian Amazon. Ingenic Newsletter, v.7, p.25-32. 2002.

ALVES, R. M.; GARCIA, A. A. F.; CRUZ, E. D.; FIGUEIRA, A. Seleção de descritores botânicos-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, n.7, p.807-818. 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.S. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v. 12, p.13-15, 1990.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S.V.; CARPENTER, D.; PIRES, J. L.; CASCARDO, J. C. M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* from Brazil and Malaysia. Tropical Agriculture, v.74, n.2, p.132-139. 1999

FIGUEIRA, A.; LAMBERT, S.V.; CARPENTER, D.; PIRES, J. L.; CASCARDO, J. C. M.; ROMANCZYK, L. The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* from Brazil and Malaysia. Tropical Agriculture, v.74, n.2, p.132-139. 1997.

GONÇALVES, A.C.S.; SILVA, C.S; OLIVIERA, N.P.DE; LEITE, I.N. COSTA, J.R. da. Substituição do clorofórmio por acetato de potássio em extração de DNA de fruteiras nativas da Amazônia. In: XIV Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa (XIV MET) e I Simpósio sobre Metodologias de Laboratório de Pesquisa Agropecuária. Rio de Janeiro, RJ, 2009. Acesso em <<http://www.ctaa.embrapa.br/publicacao/simpósio/MET%20017.pdfmaio>> de 2010.

PAULI, K.S.; BORN.F.; NICOLETTI, M.E.; FERREIRA, A. TCACENCO.F.A. Otimização de protocolos de extração de DNA de bananeira para estudos de diversidade genética de banco de germoplasma. In: Anais da 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - Florianópolis, SC. 2006. acesso <www.sbpcnet.org.br/livro/.../resumo_3252.html>



SOUZA, A. das G. C.; SOUZA, N. R. Banco ativo de germoplasma de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdb. ex Spreng. Schum.)). In: Workshop para curadores de banco de germoplasma de espécies frutíferas, 1., Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, p. 107 – 113.

SOUZA, A. das G. C. de. ALVES, R. M.; SOUZA, N. R.; SOUZA, M. G. de. Domesticação e Melhoramento de Cupuaçuzeiro. IN: BOREM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas. Viçosa, MG. 2002.

