

Análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha* spp.

Qualitative and quantitative analysis of DNA extraction in *Jatropha* spp.

Aretha Arcenio Pimentel CORRÊA¹; Sandra Helena UNÊDA-TREVISOLI²;
Mariana Silva Rosa PAZETO³; Viviane Formice VIANNA⁴; Antônio Orlando DI MAURO⁵

¹ Autor para correspondência. Tecnóloga em Biocombustíveis. Pós-graduanda do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, UNESP/FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Jaboticabal – SP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900; aretiss@yahoo.com.br

² Eng. Agr. Pós-Dr^a. Professora do Departamento de Produção Vegetal, UNESP/FCAV, 14884-900, Jaboticabal, SP; strevisoli@fcav.unesp.br

³ Eng^a. Agr^a., Dr^a. em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas; mariana_silvarosa@yahoo.com

⁴ Bióloga, Dr^a. em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior; vfvi@ig.com.br

⁵ Eng. Agr. Dr. Professor do Departamento de Produção Vegetal, UNESP/FCAV, 14884-900, Jaboticabal, SP; orlando@fcav.unesp.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho consiste na indicação de uma metodologia eficiente para extração de DNA de três espécies oleaginosas: *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypifolia* e *Jatropha pohliana*, para fins de utilização das mesmas em estudos moleculares. Para tanto, verificou-se a eficiência de métodos de extração de DNA, baseados no tampão CTAB para avaliação da concentração e pureza do DNA obtido, e também se estes seriam passíveis de amplificação via PCR. As metodologias utilizadas foram: DOYLE & DOYLE (1990), DAiT - *Diversity Arrays Technology* (DAiT, 2012), ZHANG & STEWART (2000) e ELIAS et al. (2004) com lise das folhas em três temperaturas (30, 35 e 60 °C). Os dados de quantificação foram analisados pelo teste de Tukey (5%), onde foram observados diferentes resultados entre as espécies. As melhores metodologias foram DAiT (2012) para *J. curcas*; ZHANG & STEWART (2000) para *J. gossypifolia* e ELIAS et al. (2004) com lise a 30 °C para *J. pohliana*, evidenciando a necessidade de uma metodologia adequada para cada uma das espécies estudadas. Para estes três métodos foi possível obter amplificação do DNA obtido.

Palavras-chave adicionais: *Jatropha curcas*; *Jatropha gossypifolia*; *Jatropha pohliana*; metodologias CTAB.

Abstract

The objective of the present work consists on the indication of an efficient methodology for DNA extraction of three oilseeds species: *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha pohliana*, for purposes of utilization of these species in molecular studies. For this, the efficiency of DNA extraction methods was verified, based on CTAB, for the evaluation of concentration and purity of the obtained DNA, and also, if it would be able to amplify by PCR. The used methodologies were: DOYLE & DOYLE (1990), DAiT (2012), ZHANG & STEWART (2000) and ELIAS et al. (2004), with lysis of the leaves in three temperatures (30, 35 and 60 °C). The data of quantification were analyzed by Tukey (5%) test, where was observed different results between the species. The best methodologies were DAiT (2012) for *J. curcas*, ZHANG & STEWART (2000) for *J. gossypifolia* and ELIAS et al. (2004), with lysis at 30 °C for *J. pohliana*, evidencing the necessity of an adequate methodology for each one of these studied species. For these three methods, was possible to obtain the amplification of the DNA.

Additional keywords: *Jatropha curcas*; *Jatropha gossypifolia*; *Jatropha pohliana*; CTAB methodologies.

Introdução

O gênero *Jatropha*, pertencente à família Euphorbiaceae, possui cerca de 170 espécies distribuídas nas regiões semi-áridas tropicais da África e das Américas. Dentre as espécies do gênero *Jatropha*, encontram-se o pinhão-mansô

(*Jatropha curcas* L.), o pinhão-roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) e o pinhão-bravo (*Jatropha pohliana* Muell). Essas espécies têm sido estudadas devido ao alto teor de óleo encontrado em suas sementes, representando importante fonte para a produção de biodiesel. Sementes de pinhão-mansô e de pinhão-bravo apresentam,

em média, 34 e 24% de óleo, respectivamente (TEIXEIRA, 1987), e de pinhão-roxo, aproximadamente 23% (OLIVEIRA et al., 2006).

O fato de seus frutos serem tóxicos, ou seja, não serem próprios para consumo, abre grande vantagem para a produção de biodiesel, comparado a outras culturas oleaginosas, como soja e amendoim, que apresentam expressiva importância alimentar (FRIGO et al., 2008). BARBOSA et al. (2008), em experimento realizado com o óleo extraído de pinhão-mansão em mistura com o diesel de petróleo mostraram que a potência do motor com o uso de biodiesel em 100% ou, em misturas com diesel, foi pouco inferior à potência apresentada com o óleo diesel comercial. Além disso, os valores de eficiência térmica ao se utilizar 100% de biodiesel foram, em média, 4% maiores do que quando se utilizou diesel mineral, e o consumo energético obtido foi diminuindo seus valores nas misturas de combustíveis utilizadas à medida que se aumentava a quantidade de biodiesel misturada ao diesel. VITÓRIA et al. (2012) também relataram que o óleo de pinhão-mansão é alternativa viável para ser utilizado nas misturas de óleo diesel para acionamento de motores.

Por estas razões, é importante que se desenvolva um programa de melhoramento genético para essas espécies, visando identificar e selecionar genótipos superiores para o lançamento de cultivares que possam ser registradas e ter seu plantio regulamentado. Portanto, para os estudos genéticos, é fundamental o estabelecimento de métodos adequados de extração de DNA para cada uma dessas espécies, dadas as particularidades morfológicas e fisiológicas inerentes a cada uma delas. De um modo geral, plantas de *J. curcas* apresentam folhas jovens glabras, com coloração arroxeada e nervuras bastante proeminentes, qualquer ferimento faz correr o látex em abundância que circula em seu floema. Plantas de *J. pohliana*, por sua vez, possuem folhas jovens pilosas, com coloração verde clara e nervuras também protuberantes, porém muito maleáveis. Trata-se de uma folha muito rica em água e com abundante produção de látex. Folhas jovens de *J. gossypifolia* são bastante delicadas, glabras e com forte coloração roxa, suas nervuras são imperceptíveis durante a maceração, no entanto exsuda, como as duas outras espécies estudadas, grande quantidade de látex ao serem removidas do caule. Tais características dificultam a obtenção de um DNA em quantidade e qualidade desejáveis e justificam a necessidade de se otimizar protocolos específicos para cada uma delas.

Um importante fator para a análise genética de populações de plantas, por meio de DNA, é que o material obtido esteja íntegro, sem impurezas, passível de amplificação e em boa quanti-

dade (MILACH, 1998). Independentemente do tipo de análise molecular, o preparo de DNA deve gerar amostras suficientemente puras para que não iniba os tratamentos enzimáticos ou interfira nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Contaminantes liberados durante a lise celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, o que inibe a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação através da Reação da Polimerase em Cadeia - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (COUCH & FRITZ, 1990). Quando a célula se rompe, ocorre a liberação de polissacarídeos, que são de difícil separação do DNA e inibem diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (LODHI et al., 1994). Recomenda-se, portanto, a utilização somente de folhas jovens para este tipo de estudo, uma vez que compostos fenólicos, muitas vezes presentes em tecidos maduros e que podem interferir nos procedimentos de extração, frequentemente, estão ausentes ou encontram-se em baixas concentrações em folhas jovens (MITTON et al., 1979).

O método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente CTAB - *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (DOYLE & DOYLE 1990; VASCONCELOS, 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; ROMANO & BRASILEIRO, 1999; MERCADO et al., 1999), com variações de acordo com a espécie e o tecido utilizado. Modificações pela adição de antioxidantes, agentes desproteinizantes e outros, podem melhorar a eficiência na obtenção do DNA (MAZZA & BITTENCOURT, 2000).

Foram realizados estudos para isolamento de RNA de alta qualidade em *J. curcas*, que apresentam semelhanças com os protocolos testados no presente trabalho para extração de DNA, como a utilização de nitrogênio líquido para maceração das folhas e o uso de PVP no tampão de extração, bem como clorofórmio e etanol nas etapas de purificação, obtendo bons resultados (KUMAR et al., 2011).

Também com o objetivo de isolar RNA de membros da família Euphorbiaceae, XU et al., 2010, testaram um protocolo bastante semelhante com algumas das metodologias utilizadas neste estudo, no que diz respeito ao uso de Tris HCl, EDTA, NaCl, CTAB, PVP, β -mercapto-etanol, clorofórmio, isopropanol e etanol, e também às etapas do protocolo em si, apresentando resultados satisfatórios.

A literatura relacionada a estudos moleculares em *Jatropha* spp. é bastante escassa. Quanto à extração de DNA, ainda se busca estabelecer um método eficiente quanto à quantidade e qualidade do material genético obtido. O método baseado em Brometo de Cetiltrimetil-

mônio - CTAB (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*) proposto por DOYLE & DOYLE (1990) tem sido frequentemente utilizado em pinhão-mansão, com ou sem modificações, para análises utilizando marcadores moleculares (BASHA & SUJATHA, 2007; BASHA & SUJATHA, 2009; PAMIDIAMARRI, 2008a; PAMIDIAMARRI, 2008b; PAMIDIAMARRI, 2009; SANTOS et al., 2010), no entanto nenhum trabalho, até o momento comparou as informações obtidas entre diferentes metodologias, não existindo portanto informações conclusivas a este respeito que foram publicadas. O tampão CTAB apresenta a vantagem de ser economicamente viável, por isso é facilmente encontrado em laboratórios de biologia molecular. Caracteriza-se pela eficiência na extração a partir de amostras pequenas de tecido (30 mg) ou mesmo em larga escala. Pode ser utilizado para qualquer tipo de tecido animal e vegetal, incluindo raízes, folhas, pólen, sementes, embriões, endosperma e cultura de células em suspensão.

ELIAS et al., (2004) propuseram um método de extração de DNA para populações de mandioca, outra espécie euforbiácea, utilizando tampão de extração CTAB (DELLAPORTA et al., 1983), com modificações, no qual as folhas de mandioca passavam por uma etapa de secagem em estufa a 50 °C por 24 horas e para popula-

ções originárias da Guiana, secagem em estufa a 35 °C por 48 horas, neste caso utilizando tampão baseado em Brometo de Alquiltrimetilamônio - MATAB (*Mixed Alkyltrimethylammonium Bromide*) (COLOMBO et al., 2000).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a detecção de metodologias eficientes de extração de DNA genômico para três espécies de oleaginosas (pinhão-mansão, pinhão-bravo e pinhão-roxo), através da comparação dos métodos estudados com relação à quantificação e análise da qualidade do material adquirido, além de verificar a capacidade de amplificação em reações de PCR. Ressaltamos que a importância deste trabalho consiste na indicação de uma metodologia eficiente para extração de DNA das três espécies mencionadas, para fins de utilização em estudos moleculares, tendo em vista que não existe publicação até o presente momento, que forneça estas informações.

Material e métodos

Os acessos de *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. pohliana* utilizados neste estudo (Tabela 1) são originários de sementes coletadas em quatro estados brasileiros: São Paulo, Tocantins, Pernambuco e Paraíba.

Tabela 1. Lista dos acessos utilizados de *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. pohliana* e suas procedências. *List of accessions used of J. curcas, J. gossypifolia and J. pohliana and their origins.*

Acesso	Nome comum	Espécie	Procedência
1	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Tocantinópolis-TO
2	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Garanhuns-PE
3	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Mundo Novo-PE
4	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Mundo Novo-PE
5	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Alagoinha-PB
6	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Tocantinópolis-TO
7	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Marizópolis-PB
8	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Ituverava – SP
9	Pinhão-mansão	<i>J. curcas</i>	Campina Grande – PB
10	Pinhão-bravo	<i>J. pohliana</i>	Galante – PB
11	Pinhão-bravo	<i>J. pohliana</i>	Galante – PB
12	Pinhão-bravo	<i>J. pohliana</i>	Galante – PB
13	Pinhão-bravo	<i>J. pohliana</i>	Galante – PB
14	Pinhão-bravo	<i>J. pohliana</i>	Riachão do Bacamarte - PB
15	Pinhão-roxo	<i>J. gossypifolia</i>	Galante – PB
16	Pinhão-roxo	<i>J. gossypifolia</i>	Ituverava – SP
17	Pinhão-roxo	<i>J. gossypifolia</i>	Miguelópolis – SP
18	Pinhão-roxo	<i>J. gossypifolia</i>	Guará – SP

Vários métodos de obtenção de DNA baseados em diferentes tampões de extração foram testados anteriormente (dados não publi-

cados), sendo que os que utilizam tampão CTAB apresentaram resultados mais satisfatórios que os demais. Quatro métodos foram testados, to-

dos com modificações de suas metodologias originais: DOYLE & DOYLE (1990), DArT - *Diversity Arrays Technology* (DArT, 2012), ZHANG & STEWART (2000) e ELIAS et al., (2004). Foram coletadas de cinco a sete folhas jovens de cada acesso de *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. pohliana* para a realização dos procedimentos de cada método. Após a maceração das folhas, foi transferido para tubos de

1,5 mL o equivalente a 0,5 g \pm 0,1 g do material obtido para as três espécies.

De modo geral, existem diferenças marcantes entre as três espécies estudadas, e que para fins de exemplificação podem ser facilmente observadas em suas folhas jovens (Figura 1), justificando a necessidade de se identificar o melhor método para cada uma delas.



Figura 1. Da esquerda para direita: folhas de pinhão-manso, pinhão-bravo e pinhão-roxo, faces superior e inferior das folhas, representando a diferença morfológica entre as espécies. *From left to right: leaves of J. curcas, J. pohliana and J. gossypifolia, upper and lower surfaces of the leaves, representing the difference between the species.*

As extrações foram realizadas seguindo as metodologias listadas a seguir:

Metodologia proposta por DOYLE & DOYLE (1990) modificada

As folhas jovens coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, 0,5 g \pm 0,1 g do produto obtido foi disposto em microtubos de 1,5 mL contendo 800 μ L de tampão de extração CTAB a 2% com modificações (2% de CTAB, EDTA 20 mM, 2% de PVP, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 1% de β -mercaptoetanol); os microtubos foram homogeneizados por inversão durante 10 segundos e incubados a 65 °C por 1 hora, sendo a solução homogeneizada a cada 15 minutos. A solução foi centrifugada a 8000 x g por 5 minu-

tos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, tratado com 4 μ L de RNase e incubado a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, que foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 8000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Esta etapa foi repetida. Isopropanol gelado (-20 °C) foi adicionado ao sobrenadante (70% do volume total do sobrenadante coletado), as amostras foram misturadas e centrifugadas a 8000 x g por 5 minutos. O *pellet* de DNA aderido ao tubo foi visualizado. A fase líquida foi removida e o DNA lavado duas vezes com 1 mL de etanol a 70%. A secagem do *pellet* ocorreu por 12 horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensado em 100 μ L de tampão TE e armazenado a -20 °C.

Metodologia desenvolvida por DArT – Diversity Arrays Technology (DArT, 2012) modificada, baseada no tampão de extração CTAB, proposto por LEMÕES et al. (2008)

O equivalente a 0,5 g \pm 0,1 g do fino pó obtido da maceração das folhas foi disposto em microtubos de 1,5 mL contendo 750 μ L de tampão de extração (4,16% de CTAB, EDTA 11 mM, 2% de PVP, NaCl 800 mM, Tris-HCl 600 mM pH 8,0, 0,83% de Sarcosil e Sorbitol 145 mM), os quais foram homogeneizados por inversão durante 5 minutos e incubados a 65 °C por 45 minutos. A solução foi homogeneizada por inversão a cada 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 10000 x g por 3 minutos e 400 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo. Posteriormente, se adicionou clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, que foi homogeneizada durante 5 minutos e centrifugada a 8000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado isopropanol gelado à -20 °C (70% do volume total do sobrenadante coletado). As amostras foram misturadas por inversão e armazenadas a -20 °C durante a noite. Depois, foram centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos. Desse modo, o *pellet* de DNA pôde ser visualizado. A fase líquida foi removida e o DNA lavado com 1 mL de etanol a 70%, homogeneizado por inversão e centrifugado por 10000 x g por 5 minutos. Repetiu-se essa operação com 1 mL de etanol absoluto. A secagem do *pellet* ocorreu em temperatura ambiente e depois foi ressuscitado em 50 μ L de solução TE e 6 μ L de RNase por 45 minutos em banho-maria a 37 °C e armazenado a -20 °C.

Metodologia proposta por ZHANG & STEWART (2000) modificada

Folhas jovens foram também maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, 0,5 g \pm 0,1 g deste produto foi colocado em microtubos de 1,5 mL contendo 600 μ L de tampão de extração CTAB a 2%, com modificações (2% de CTAB, EDTA 20 mM, 2% de PVP, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 10% de β -mercaptoetanol, adicionado apenas antes do uso). Houve um acréscimo na concentração de β -mercaptoetanol de 0,2% para 10% no tampão de extração, visando uma maior desnaturação de proteínas. Os microtubos foram misturados por inversão durante 5 minutos e incubados a 65 °C por 45 minutos. A solução foi homogeneizada a cada 10 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) à solução, a qual foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e centrifugada a 7000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi

transferido para um novo tubo. Isopropanol gelado (-20 °C) foi adicionado ao sobrenadante (70% do volume total do sobrenadante coletado). As amostras foram misturadas por inversão e armazenadas durante a noite a -20 °C, sendo então centrifugadas a 7000 x g por 5 minutos. O *pellet* de DNA pôde então ser observado aderido ao fundo do microtubo. A fase líquida foi removida e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado por 10000 x g por 5 minutos. Repetiu-se essa operação com 1 mL de etanol absoluto. A secagem do *pellet* ocorreu por cerca de 12 horas em temperatura ambiente, sendo então ressuscitado em 100 μ L de tampão TE e 6 μ L de RNase por 45 minutos em banho-maria a 37 °C e armazenado a -20 °C.

Metodologia proposta por ELIAS et al. (2004) modificada

Folhas jovens foram desidratadas em estufa a 30 e 35 °C por 48 horas. A temperatura de 60 °C por 72 horas foi utilizada somente para as folhas de pinhão-bravo e pinhão-roxo. Optou-se pela alteração da temperatura e período de lise das folhas propostos no método original de ELIAS et al. (2004), 24 horas a 50 °C, a fim de se facilitar a maceração das folhas. As folhas foram então maceradas até a obtenção de um fino pó e 0,5 g \pm 0,1 g do material obtido foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 800 μ L de tampão CTAB a 3% (3% de CTAB, EDTA 30 mM, 2% de PVP, NaCl 1,2 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e 1% de β -mercaptoetanol). Os tubos foram incubados a 65 °C por 1 hora, sendo agitados a cada 15 minutos. Foram adicionados 500 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), misturando por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo com um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e 200 μ L do tampão de extração. Outra modificação realizada no método original foi a adição de tampão de extração na fase de purificação do DNA com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), buscando-se aumentar a eficiência da extração. Esta solução foi agitada e centrifugada novamente a 8000 x g por 10 minutos e 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Foram adicionados 350 μ L de isopropanol gelado (-20 °C), e as amostras foram agitadas por inversão. A solução foi centrifugada a 8000 x g por 10 minutos e o *pellet* resultante foi deixado para secar por aproximadamente 12 horas em temperatura ambiente, depois foi ressuscitado adicionando-se 100 μ L de TE e 4 μ L de RNase. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e então armazenados a -20 °C.

Posteriormente, as amostras de cada método foram submetidas à eletroforese em gel

de agarose a 1% (m/v), para verificação da qualidade do DNA obtido. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1 X [100 mL de TBE 10 X (Tris base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 20 mM pH 8,0) e 900 mL de água ultrapura, a 80 V, 2,66 V/cm e 400 mA por aproximadamente 2 horas. A visualização foi feita em transiluminador Gel Doc 2000 da Bio Rad e visualizada pelo software Quantity One. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 da marca ThermoScientific, para se avaliar a pureza por meio da razão 260/280 e concentração do material obtido em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. A razão entre 260/280 nm é utilizada para estimar a pureza das amostras de DNA, sabendo-se que os valores desta razão devem se encontrar entre 1,8-2,0. Valores fora deste intervalo podem significar excesso de proteínas, fenol ou outros contaminantes que são fortemente absorvidos em 280 nm (NELSON & COX, 2004).

Reação da Polimerase em Cadeia

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com as amostras de cada acesso e método de extração, utilizando-se o iniciador de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) 812 de sequência 5'GAGAGAGAGAGAAA 3' pertencente à coleção de *primers* nº 9, desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da *University of British Columbia* (UBC), Canadá, a fim de verificar se o material genético obtido seria passível de amplificação. A PCR foi conduzida a um volume final de 25 μL contendo 0,12 μL de enzima *Taq* polimerase (5 unidades μL^{-1}), 2,5 μL de Tampão de amplificação 10 X (sem Mg^{++}), 2,0 μL de MgCl_2 (25 mM), 1,0 μL de Iniciador (10 μM), 0,5 μL de dNTPs (2,5mM cada), 17,63 μL de água ultrapura e 1,25 μL de DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). A reação foi conduzida em termociclador da Bio Rad, seguindo os seguintes passos: 4 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 92 °C, 1 minuto para a temperatura de anelamento do iniciador (50 °C), 2 minutos a 72 °C; e 7 minutos a 72 °C para extensão final. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1000 (Invitrogen) a 3% (m/v), corado com brometo de etídio, a 80 V, 2,66 V/cm, 400 mA por aproximadamente 3 horas. A visualização foi feita em transiluminador Gel Doc 2000 da Bio Rad e visualizada pelo software Quantity One.

Os resultados foram interpretados, utilizando-se o Programa ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas), por meio de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (BANZATTO & KRONKA, 1995) para cada espécie separadamente, considerando-se os acessos como repetições. Para todos os procedimentos estatísticos também

foram observadas as recomendações de SNEDECOR & COCHRAN (1989).

Resultados e discussão

Os resultados observados para concentração de DNA indicaram que as metodologias mais eficazes para os acessos de *J. curcas* foram ZHANG & STEWART (2000), DArT (2012) e ELIAS et al. (2004), esta última utilizando temperatura de 30 °C para secagem das folhas em estufa, com médias de concentrações de 4.035, 3.274 e 2.703 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente, que foram semelhantes estatisticamente de acordo com o resultado do teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 2A).

Ao analisarmos as médias dos valores de pureza (Figura 2B), notamos que os três métodos de extração que geraram maiores quantidades de material genético, novamente forneceram bons resultados, com razões (260/280) dentro da faixa de pureza considerada ótima. Porém, no momento da extração, observou-se um aspecto negativo para o método descrito por ZHANG & STEWART (2000) em relação aos demais. O *pellet* obtido após a finalização da extração apresentou aparência degradada, o que dificultou manuseá-lo sem que se perdesse ou se degradasse completamente. Possivelmente, essa degradação excessiva, se deve à elevada concentração de β -mercaptoetanol (10% do volume do tampão de extração) adicionado no momento da incubação em banho-maria. O β -mercaptoetanol é um composto químico, amplamente utilizado em métodos de isolamento de DNA ou RNA, que age na desnaturação de proteínas por meio de sua habilidade em separar pontes dissulfeto (NELSON & COX, 2004). Algumas proteínas podem ser desnaturadas pelo β -mercaptoetanol, por meio da sua capacidade em clivar pontes de dissulfeto. Ao quebrar as ligações S-S, tanto a estrutura terciária e quaternária da estrutura de algumas proteínas podem ser rompidas (2-Mercaptoethanol, 2013). Além disso, evita o efeito oxidativo dos polifenóis (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal (LEMÕES et al., 2008; ROMANO & BRASILEIRO, 1999; KIDWELL & OSBORN, 1992), os quais são resultantes, principalmente, do coisolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários.

Na Figura 3, podemos observar que dentre as três metodologias que apresentaram os maiores valores de quantificação, DArT (2012) foi a que apresentou um padrão de bandas mais homogêneo. Também nessa figura, podemos observar o aspecto das bandas, que indica o coisolamento de compostos indesejáveis pela metodologia proposta por ZHANG & STEWART (2000).

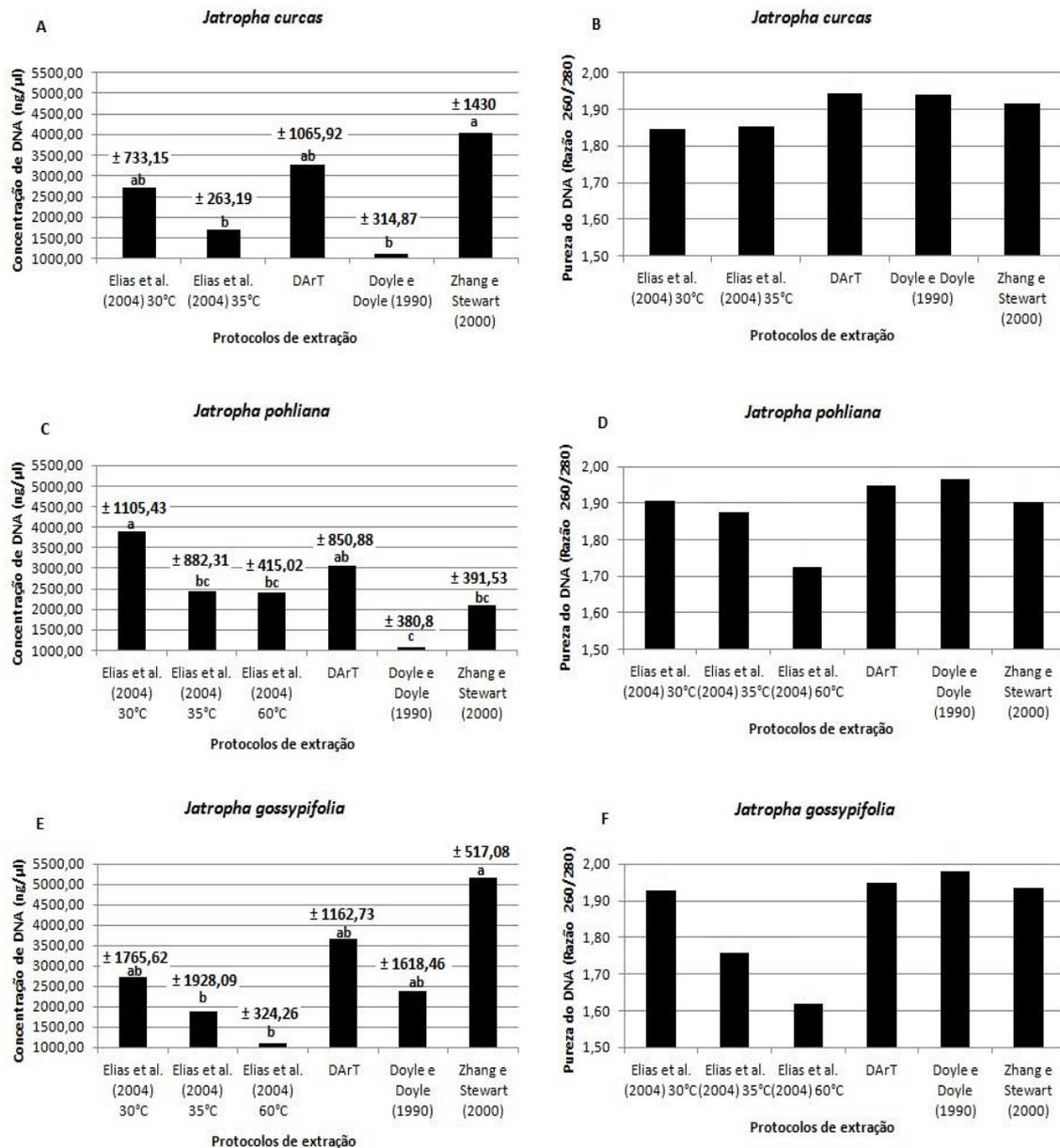


Figura 2. Gráficos de concentração de DNA ($\eta\ \mu\text{L}^{-1}$), juntamente com seus respectivos desvios-padrões e da pureza do DNA (razão 260/280) para as espécies *J. curcas* (A e B), *J. pohliana* (C e D) e *J. gossypifolia* (E e F) respectivamente. *Graphs of concentration of DNA ($\eta\ \mu\text{L}^{-1}$), along with their standard deviations and DNA purity (ratio 260/280) for species *J. curcas* (A and B), *J. pohliana* (C and D) and *J. gossypifolia* (E and F) respectively.*

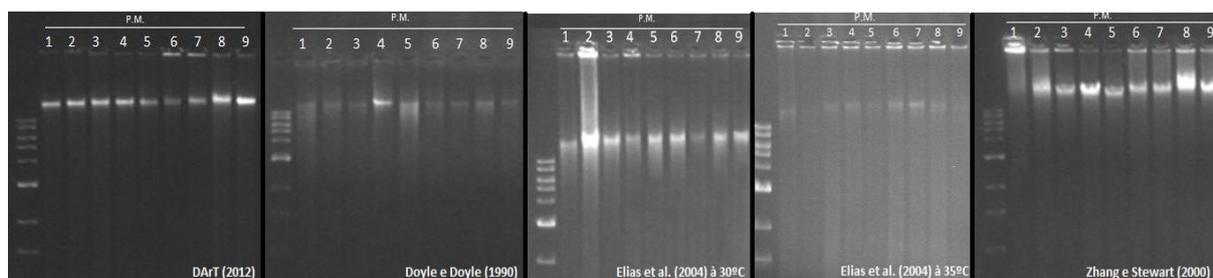


Figura 3 -. Análise eletroforética da extração de DNA em *J. curcas*. *Electrophoretic analysis of the DNA extraction in *J. curcas*.*

LEMÕES et al. (2008) testando diferentes métodos de extração de DNA para *J. curcas* concluíram que o que apresentou melhor resultado foi a metodologia descrita em DArT.

As médias das concentrações de DNA dos acessos de *J. pohliana*, indicam que o método descrito por ELIAS et al. (2004), quando se utilizou temperatura de lise das folhas a 30 °C, foi o que apresentou o maior valor de concentração de DNA (3898 ng μL^{-1}), diferenciando-se

significativamente dos demais métodos testados (Figura 2C). A qualidade do DNA extraído por esse método pode ser visualizada na Figura 2D, cuja média dos acessos manteve-se entre valores de 1,80 e 2,00, indicando um bom índice de pureza das amostras (SAMBROOK et al., 1989). Também se pode confirmar visualmente que esse protocolo foi o que apresentou melhores resultados ao se analisar os géis das extrações na Figura 4.

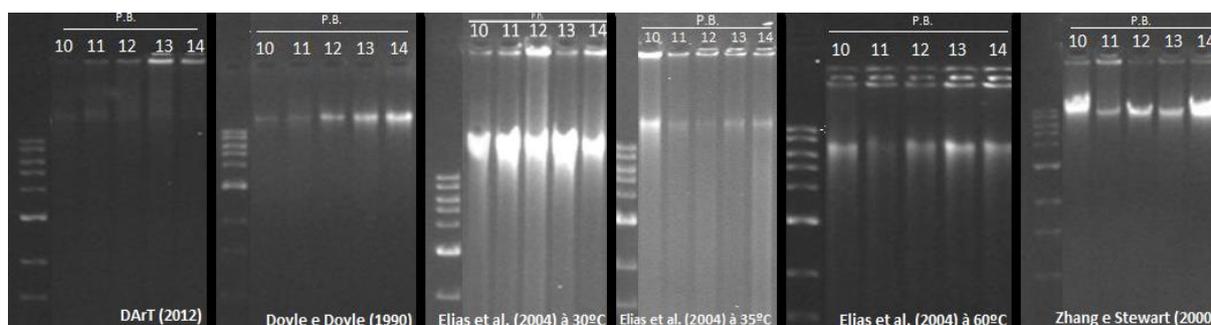


Figura 4. Análise eletroforética da extração de DNA em *J. pohliana*. *Electrophoretic analysis of the DNA extraction in J. pohliana.*

O método descrito por ZHANG & STEWART (2000) forneceu a maior concentração média para os acessos de *J. gossypifolia* (5148 ng μL^{-1}), diferindo estatisticamente dos demais métodos (Figura 2E). O valor de pureza

observado para essa metodologia (entre 1,80 e 2,00) (Figura 2F), bem como a eletroforese das extrações (Figura 5), confirmam a qualidade do método para a espécie pinhão-roxo.

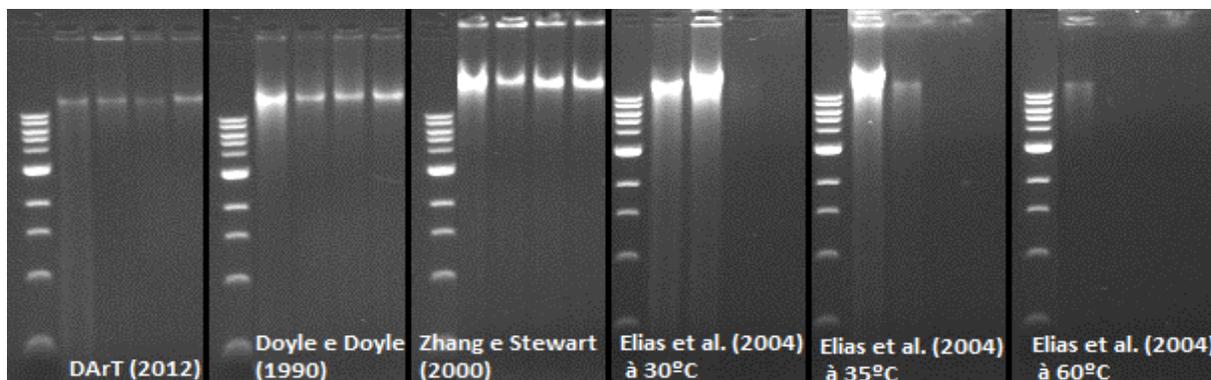


Figura 5. Análise eletroforética da extração de DNA em *J. gossypifolia*. *Electrophoretic analysis of the DNA extraction in J. gossypifolia.*

O método de extração de DOYLE & DOYLE (1990) forneceu amostras com altos índices de pureza para as três espécies estudadas, porém, forneceu menores concentrações de DNA, quando comparado às demais metodologias (Figuras 2A a 2F).

Por sua vez, o método de ELIAS et al. (2004), com temperatura de lise das folhas a 60 °C, não se mostrou eficiente para pinhão-bravo e pinhão-roxo, tanto em quantidade como em qualidade de DNA extraído. O mesmo teste já havia apresentado resultados insatisfatórios anteriormente com pinhão-

-mango (dados não publicados) (Figuras 2C a 2F).

Com relação à amplificação pela PCR, todas as metodologias testadas forneceram material genético suficiente e passível de amplificação (Figura 6), podendo ser utilizados em futuros estudos moleculares destas espécies.

O iniciador ISSR 812 utilizado nas reações e citado anteriormente em trabalhos com pinhão-mango (BASHA & SUJATHA, 2007; SOARES, 2010) e diversas outras culturas, apresentou-se também eficiente para a amplificação do DNA de pinhão-bravo e pinhão-roxo.

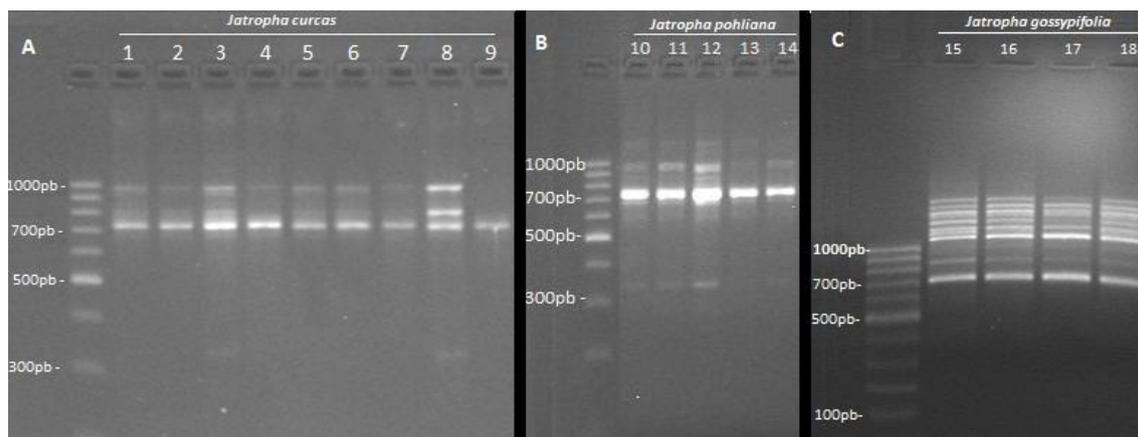


Figura 6. Análise eletroforética da amplificação de DNA produzida usando ISSR (iniciador 812) obtidas para: A- nove acessos de *J. curcas* pelo método de extração de DArT (2012); B- cinco acessos de *J. pohliana* pelo método de extração de ELIAS et al. (2004), utilizando temperatura de 30 °C para secagem das folhas em estufa e C- quatro acessos de *J. gossypifolia* pelo método de ZHANG & STEWART (2000) e Ladder de 100 pb (New England Biolabs® Inc.). *Electrophoretic analysis of DNA amplification produced using ISSR (primer 812) obtained for: A- nine accessions of J. curcas by DArT extraction methodology, B- five accessions of J. pohliana by Elias et al. (2004) extraction methodology, using a temperature of 30 °C for drying leaves under glass and C- four accessions of J. gossypifolia by ZHANG & STEWART (2000) extraction methodology and 100 bp ladder (New England®).*

Não houve variabilidade quanto ao padrão de bandas encontrado entre acessos de uma mesma espécie (Figura 6), contrariando a teoria de que indivíduos geograficamente distantes são mais divergentes entre si. A falta de relação entre o padrão de similaridade encontrada entre acessos de *J. curcas* e a procedência geográfica dos acessos já fora relatada em outros trabalhos (BASHA & SUJATHA, 2007) e também para *J. pohliana* e *J. gossypifolia* (PAZETO, 2013). Nota-se que ocorre variabilidade genética interespecífica, evidenciada pela presença de diferentes marcas visíveis nos géis de agarose, sendo este fato também observado por PAZETO (2013), que, ao analisar acessos de *J. curcas*, *J. pohliana* e *J. gossypifolia* de diferentes regiões geográficas do Brasil relatou maior variabilidade interespecífica em detrimento da intraespecífica. Isto se justifica pelo maior grau de parentesco existente entre acessos de uma mesma espécie e ainda pela estreita base genética das espécies estudadas. Uma possível explicação para os desvios obtidos com relação à concentração do material genético extraído seria a ocorrência de variabilidade intraespecífica, por se tratar de uma espécie alógama, aliado ao fato de que diferentes acessos de uma mesma espécie foram utilizados como repetições, no presente trabalho. Com relação a *J. pohliana* e *J. gossypifolia*, não existem na literatura estudos envolvendo extração de DNA e que possa servir de comparação para os resultados obtidos na presente pesquisa, comprovando

a importância deste trabalho para a padronização de metodologias nestas espécies.

Conclusões

Os métodos utilizados apresentam respostas diferenciadas para as três espécies estudadas, evidenciando a necessidade de uma escolha criteriosa do método de extração de DNA mais adequado para a obtenção de material genético em quantidade e qualidade necessárias para cada uma delas.

Recomenda-se para *Jatropha curcas*, a utilização do método DArT 2012 modificado, para *J. pohliana* o método de ELIAS et al. (2004) modificado, utilizando temperatura de lise das folhas a 30 °C, e para *J. gossypifolia* o método de ZHANG & STEWART (2000) modificado.

Para esses três métodos foi possível obter amplificação do DNA obtido.

Referências

2-MERCAPTOETHANOL. Disponível em: <<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finance/2-MERCAPTOETHANOL.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247p.

- BARBOSA, R. L.; SILVA, F. M. da; SALVADOR, N.; VOLPATO, C. E. S. Desempenho comparativo de um motor de ciclo diesel utilizando diesel e misturas de biodiesel. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.5, p.1588-1593, 2008.
- BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *J. curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.156, p.375-386, 2007.
- BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. **Euphytica**, Wageningen, v.168, p.197–214, 2009.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, v.1, p.189-199, 2000.
- COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.8, n.1, p.8-12, 1990.
- DArT- Diversity Arrays Technology. **Plant DNA extraction protocol for DArT**. Disponível em: <http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2012.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J.; HICK, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.1, n.4, p.19–21, 1983.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13–15, 1990.
- ELIAS, M.; MÜHLEN, G. S.; MCKEY, D.; ROA, A. C.; TOHME, J. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, Bronx, v.58, p.242-256, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 1998. 220p.
- FRIGO, M. S.; BUENO, O. de C.; ESPERANCINI, M. S. T.; FRIGO, E. P.; KLAR, A. E. Análise energética do primeiro ano do cultivo do pinhão-manso em sistema irrigado por gotejamento. **Irriga**. Botucatu, v.13, n.2, p.261-271, 2008.
- 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: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.
- KUMAR, G. R. K.; ESWARAN, N.; JOHNSON, T. S. Isolation of high-quality RNA from various tissues of *Jatropha curcas* for downstream applications. **Analytical Biochemistry**, v.413, p.63-65, 2011.
- LEMÕES, J. S.; MOREIRA, L. L.; KNEIB, R. B.; SILVA, S. D. A. E.; CASAGRANDE JUNIOR, J. G.; ÁVILA, T. T. Comparação entre protocolos de extração de DNA de pinhão-manso. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA Clima Temperado, 2008.
- LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.12, n.1, p.6-13, 1994.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (araucariaceae). **Boletim Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.41, p.12-17, 2000.
- MERCADO, J. A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.35, n.2, p.152-153, 1999.
- MILLACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.
- MITTON, J. B.; LINHART, Y. B.; STURGEON, K. B.; HAMRICK, J. L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of *Ponderosa* pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. 4thed. New York: Worth Publishers, 2004.
- OLIVEIRA, J. S.; LEITE, P. M.; SOUZA, L. B.; MELLO, V. M.; SILVA, E. C.; RUBIM, J. C.; MENEGHETTI, S. M. P.; SUAREZ, P. A. Z. Avaliação preliminar de parâmetros físico-químicos do óleo e biodiesel de pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006. Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<https://sec.sbgq.org.br/cd29ra/resumos/T0777-1.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2011.

- PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; MASTAN, S. G.; RAHMAN, H.; REDDY, M. P. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. **Molecular Biology Reports**, Athens, v.37, n.5, p.2249-2257, 2009.
- PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; PANDYA, N.; REDDY, M. P. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. **Molecular Biology Reports**, Athens, v.36, n.5, p.901-907, 2008a.
- PAMIDIAMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, Athens, v.36, n.5, p.1357-1364, 2008b.
- PAZETO, M. S. R. **Estudo da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR**. 2013. 69f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, 2013.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.787.
- SANTOS, C. A. F.; DRUMOND, M. A.; RODRIGUES, M. A.; EVANGELISTA, M. R. V. Genetic similarity of *Jatropha curcas* accessions based on AFLP markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.10, p.364-369, 2010.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989. 503p.
- SOARES, B. O. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba, Minas Gerais, 2010.
- TEIXEIRA, J. P. F. Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp. **Bragantia**, Campinas, v.46, n.1, p.151-157, 1987.
- VASCONCELOS, M. J. V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD**. 1994. 54f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994.
- VITÓRIA, E. L.; OLIVEIRA, P. S.; FERNANDES, H. C.; LONGUI, F. C.; LEITE, D. M. Desempenho comparativo de um motor ciclo diesel alimentado com misturas de óleo diesel e biodiesel de pinhão-manso. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p.1865-1876, 2012.
- ZHANG, J.; STEWART, J. Economical and rapid method for the extracting cotton genomic DNA. **Journal of Cotton Science**, Cordova, v.4, n.3, p.193-201, 2000.