

Otimização da extração e amplificação de DNA de dendezeiro: folhas em diferentes fases de desenvolvimento

Extraction optimization and amplification of oil palm DNA: leaves at different phases of development

João Pedro de Andrade Bomfim^I, Laiana Pinheiro de Lima^{II},
Cláudio Antônio Ferreirade Melo^{III}, Ronan Xavier Corrêa^{IV},
Fernanda Amato Gaiotto^V, Antônia Marlene Magalhães Barbosa^{VI}

Resumo

O objetivo deste estudo foi otimizar e estabelecer um protocolo visando elevar a qualidade e quantidade do ácido desoxirribonucleico (DNA) extraído de folhas, em diferentes estágios de desenvolvimento e conservação, coletadas em plantas adultas e plantas jovens. Além disso, almejou-se padronizar a amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR) e selecionar os marcadores de inter sequência simples repetida (ISSR) de *Elaeis guineensis* (dendezeiro). O protocolo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) modificado, devido à suplementação com betamercapto etanol (0,3%) e polivinilpirrolidone (PVP) (3%) no tampão de extração e CTAB 10% com 1,4 M de NaCl a 20 min de incubação, a 65°C, resultou em melhorias qualitativas e quantitativas na extração do DNA, mas com variações entre amostras, provavelmente, devido às variações na degradação e estágio de desenvolvimento das folhas. Foram utilizados dois protocolos de PCR (I e II) para a amplificação do DNA, os quais diferiram principalmente com relação à presença de albumina de soro bovino (BSA) e concentração de *primer*. Não foi realizada a correlação entre amplificação via PCR e qualidade de DNA, obtidos de folhas danificadas ou sadias, mas se observou que a adição de BSA (0,075 mg/mL) e o aumento na concentração de *primer* (0,5 pmol) (protocolo II) resultou em bandas mais intensas e distinguíveis, porém se ressalta que a qualidade do DNA foi essencial para uma boa amplificação, considerando-se todas as amostras. A amplificação do DNA com o protocolo II possibilitou a seleção de cinco *primers*: UBC 807, 810, 812, 834 e 848; os quais foram utilizados para a amplificação de 13 famílias, compostas de uma planta parental e oito progênies cada.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*; PCR; ISSR

Abstract

The objective of this study was to optimize and establish a protocol to enhance the quality and quantity of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from leaves under different development stages and conservation conditions collected from mature plants and seedlings. Furthermore, we aimed to standardize the polymerase chain reaction (PCR) and select an inter simple sequence repeat (ISSR) marker for *Elaeis guineensis* (oil palm). The modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol, which used β -mercaptoethanol (0.3%) and polyvinylpyrrolidone (PVP 3%) supplementation in the extraction buffer and 10 % CTAB with 1.4 M NaCl for a 20-min incubation at 65°C, resulted in improved DNA quality and quantity. However, this protocol presented variable results among samples, probably due to variations in leaf degradation levels and development stages. The two PCR protocols (I and II) for amplifying the DNA, differed mainly in the presence or absence of bovine serum albumin (BSA) and primer concentration. Although, a correlation between PCR amplification and the quality of the DNA extracted from leaves was not established, the addition of BSA (0.075 mg/mL) and the highest primer concentration (0.5 pmol) (protocol II) resulted in more intense and distinguishable bands on gel electrophoresis. DNA quality was essential for a satisfying amplification, considering all the samples. The use of protocol II allowed the selection of five primers: UBC 807, 810, 812, 834, and 848; these were used in the amplification of the DNA extracted from 13 families consisting of one parental plant and eight progenies each.

Keywords: *Elaeis guineensis*; PCR; ISSR

^I Engenheiro Agrônomo, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Proteção de Plantas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Av. Universitária, 3780, Bairro Altos do Paraíso, CEP 18610-034, Botucatu (SP), Brasil. pedroab261@hotmail.com (ORCID: 0000-0001-6292-2439)

^{II} Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus (BA), Brasil. lanna.pinheiro@hotmail.com (ORCID: 0000-0001-7281-0967)

^{III} Biólogo, Dr., Bolsista Pós-Doutorando na Universidade Estadual de Santa Cruz, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus (BA), Brasil. clausiomelo@gmail.com (ORCID: 0000-0001-9007-1731)

^{IV} Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor da Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus (BA), Brasil. ronanxc@uesc.br (ORCID: 0000-0002-4010-1565)

^V Bióloga, Dra., Professora da Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus (BA), Brasil. gaiotto@uesc.br (ORCID: 0000-0002-7140-565X)

^{VI} Engenheira Agrônoma, Dra., Professora da Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus (BA), Brasil. ammbarbosa@uesc.br (ORCID: 0000-0001-9540-4494)



Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma palmeira de origem africana que se dispersou por várias partes do mundo devido à sua elevada capacidade adaptativa e ao interesse na exploração comercial de óleo, que pode ser extraído do mesocarpo (óleo da polpa) e da amêndoa (óleo de palmiste) do fruto. A importância econômica dessa cultura se deve, em grande parte, à produção de óleo extraído do mesocarpo, que pode ser empregado, por exemplo, na indústria alimentícia e como biocombustível. Apesar de ocupar apenas 5% da área total mundial, a cultura é responsável por 33% do óleo vegetal e 45% do óleo comestível em todo o mundo (SINGER *et al.*, 2013).

O dendezeiro encontra-se no estado nativo, seminativo e/ou cultivado na África e na Ásia (CORLEY; TINKER, 2015). No Brasil, os plantios comerciais estão principalmente nas regiões Norte e Nordeste (SATO *et al.*, 2017); a Bahia, em particular, possui uma área considerável de dendezeiros subspontâneos situados no continente e no litoral. A exploração comercial da cultura apresenta alguns entraves, relacionados a características da planta, que dificultam ou atrasam a obtenção de genótipos promissores a serem utilizados para vários fins. O dendezeiro é uma planta perene com um longo ciclo reprodutivo e requer uma grande demanda de terra para testes de campo e com genótipos obtidos via seminal, pois, segundo Singer *et al.* (2013), as alterações epigenéticas restringem o uso comercial de clones.

A variabilidade restrita da cultura e a necessidade da busca de novos germoplasmas e/ou caracterização de populações naturais e subspontâneas requerem tempo, principalmente se forem baseadas apenas em medidas morfoagronômicas. A biotecnologia, e em particular o uso de marcadores moleculares, é imprescindível para alavancar as pesquisas em dendezeiro. Vários marcadores e protocolos de extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) têm sido utilizados e adaptados para a maior eficiência no uso da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), que é dependente da qualidade e amplificação do DNA e da seleção de iniciadores (*primers*) que discriminem os genótipos. Protocolos foram desenvolvidos e modificados para a extração de DNA de dendezeiros visando redução de custo, tempo e qualidade do DNA (SUZANA *et al.*, 2015; LHASE *et al.*, 2016), porém o protocolo do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) está sendo utilizado para a obtenção de DNA de dendezeiro, para uso com os mais variados tipos de marcadores moleculares (SUZANA *et al.*, 2015; GOMES, 2016). Marcadores de Inter Sequência Simples Repetida (ISSR) estão sendo utilizados com eficiência no gênero *Elaeis* para a avaliação da diversidade genética e caracterização de germoplasma de dendezeiro (CHAGAS *et al.*, 2015), mapeamento de híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*) (NORDIANA *et al.*, 2014) e avaliação molecular de dendezeiros regenerados por embriogênese somática (GOMES, 2016). O marcador molecular ISSR é baseado em PCR e amplifica fragmentos de DNA entre duas regiões idênticas e repetidas de microssatélites (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Os marcadores ISSR têm vantagens em sua utilização, em relação a outros marcadores de DNA, por não requererem conhecimento prévio da sequência do DNA a ser amplificada, por produzirem fragmentos multilocos com alto polimorfismo e com grande reprodutibilidade, semelhante ao marcador de Sequência Simples Repetida (SSR), devido ao longo comprimento do *primer* e por serem de fácil e rápido manuseio, como o marcador de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (BORNET; BRANCHARD, 2001). Em muitas espécies de plantas, modificações no protocolo de reação ISSR e programa de amplificação do DNA se fazem necessárias visando à otimização na geração de dados. A influência de diversos parâmetros na reprodutibilidade e polimorfismos de DNA de diferentes espécies foi observada na amplificação com o marcador ISSR (BORNET; BRANCHARD, 2001).

A partir disso, o objetivo deste trabalho foi otimizar e estabelecer um protocolo de extração de DNA de dendezeiro pelo método CTAB, assim como otimizar a obtenção de marcadores moleculares ISSR úteis na caracterização genética da cultura.

Material e métodos

Material foliar e extração de DNA

As amostras de folhas maduras de dendezeiros adultos (variedade pisífera e tenera) foram retiradas da Coleção de Germoplasma da Estação Experimental Lemos Maia (ESMAI), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em UNA, Bahia, Brasil. As amostras de folhas jovens foram coletadas em plantas adultas, da variedade dura, em uma população subespontânea e do lançamento foliar de suas progênies de meios-irmãos com aproximadamente um ano de idade. As extrações foram realizadas com o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1990). Inicialmente, mantendo as concentrações dos reagentes do tampão de extração do protocolo original. Depois, com modificações na concentração de alguns reagentes do tampão de extração e suplementação com uma solução de CTAB 10%, 1,4 M de cloreto de sódio (NaCl) a 65°C. As modificações no tampão de extração foram feitas combinando diferentes concentrações de polivinilpirrolidone (PVP) (1%, 2% e 3%) com betamercaptoetanol (0%, 0,2%, 0,3% e 0,4%). O tampão de extração com o pó foliar permaneceu, sob agitação, a 65°C, por 40 min, e a 20 min da incubação foi adicionado à solução de CTAB 10% com 1,4 M de NaCl na proporção 1:10 (v/v). Após 40 min de incubação, foi resfriado à temperatura ambiente por 5 min, centrifugado a 13.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *ependorf*. O clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v:v), homogeneizado por 5 min e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. Essa etapa foi repetida duas vezes consecutivas. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e adicionado isopropanol gelado na proporção 1:1 (v:v), homogeneizado e incubado por 20°C por 12-15 h. Após a incubação, o homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 13000 rpm, e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e 95%, respectivamente, seco à temperatura ambiente, ressuscitado com 50 µL da solução de TE (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol.L⁻¹ EDTA pH 8,0), contendo ribonuclease A (RNase A) na concentração de 10 µg/mL, incubado a 37°C por 30 min e depois estocado a -20°C. A eletroforese para a certificação da quantidade e qualidade do DNA foi realizada no gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR®safe (5 µL/100 mL) (Invitrogen), tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, por 35 min e 120 mA, e fotodocumentado sob incidência de luz ultravioleta. A quantificação do DNA foi estimada em comparação com o DNA padrão, fago lambda, nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/µL. A quantificação e a qualidade do DNA também foram estimadas no espectrofotômetro (razão de λ260/230 e 260/280).

Amplificação do DNA

Para avaliar a viabilidade do DNA extraído e selecionar iniciadores (*primers*) ISSR, foram utilizados dois protocolos de PCR (I e II) e um programa de amplificação para cada PCR. Foram testados 17 *primers* ISSR da Universidade de British Columbia (UBC) e SPAR 9. Para a otimização do protocolo (I), foram testadas diferentes concentrações de DNA (0,5, 1, 1,5 e 2,5 ng/µl); cloreto de magnésio (MgCl₂) (0,93 mmol.L⁻¹, 1,875 mmol.L⁻¹ e 3,75 mmol.L⁻¹); desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (0,25 mmol.L⁻¹, 0,50 mmol.L⁻¹ e 1,0 mmol.L⁻¹) e *primer* (1,0 µM e 1,5 µM). O programa de PCR utilizado foi: um ciclo inicial a 94°C por 4 min, para desnaturação de toda a fita dupla de DNA, e 35 ciclos subsequentes com desnaturação a 94°C por 1 min; temperatura de anelamento (variando com o *primer* utilizado) por 1 min; e extensão a 72°C por 1 min, para a síntese da cadeia complementar; e após o término dos 35 ciclos, seguiu-se com a temperatura, a 72°C por 10 min, de extensão final. Inicialmente os 17 *primers* foram testados nas seguintes condições: tampão da amostra 0,75X, MgCl₂ (0,93 mmol.L⁻¹), dNTP (1,0 mmol.L⁻¹), *primer* (1 µM), Taq polimerase (1,5 U/µL) e DNA (0,5 ng/µL), à temperatura de anelamento de 65°C. Dos 17, foram selecionados e testados três *primers* (UBC 844, UBC 87 e SPAR 9) em diferentes temperaturas de

anelamento — 57°C, 55°C, 53°C e 49°C — e DNA (1 ng/μL). O *primer* UBC 844 foi utilizado para testar a amplificação do DNA em diferentes concentrações de DNA (1, 1,5 e 2,5 ng/μl) (dados não apresentados), duas concentrações de MgCl₂ (1,875 mmol.L⁻¹ e 3,75 mmol.L⁻¹) e temperatura de anelamento a 50°C.

No segundo protocolo (II), foram mantidas as concentrações otimizadas de alguns reagentes do protocolo (I): DNA (1 ng/μL); MgCl₂ (1,875 mmol.L⁻¹); dNTP (1,0 mmol.L⁻¹); 1,5 UN de Taq polimerase e água upp (ultrapura). E modificações foram feitas em alguns reagentes nas seguintes concentrações: *primer* (0,5 pcomol); tampão da amostra 1X (com KCl 1,25 mL, sem MgCl₂); e adição da albumina de soro bovino (BSA) (0,075 mg/mL). O programa de PCR foi o utilizado na amplificação de dendezeiro com marcadores ISSR por Chagas *et al.* (2015): desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguido de 37 ciclos de 94°C por 15 s (desnaturação), 47°C por 15 s (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão), finalizando com 72°C por 7 min (extensão final). As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR®safe (5 μL /100mL) (Invitrogen), tampão TBE 1X a 100 volts at e atingir 3/4 do gel. As amostras foram preparadas com o tampão de carregamento xileno-cianol (3 μL de tampão em 20 μL de DNA amplificado). O marcador *ladder* (3μL) com 100 pares de bases foi incluído nos ge s para a eletroforese.

Análise estatística

As análises foram realizadas com 16 indivíduos (parental materno e suas 15 progênies). Uma matriz binária foi construída a partir da ausência (0) e presença (1) de fragmentos (locos) amplificados com cada marcador ISSR utilizado na amplifica o do DNA. A partir desses dados, foi contabilizado o número de locos totais em cada marcador e o número de locos polimórficos. A porcentagem de polimorfismo foi calculada pela rela o entre o número de locos polimórficos e o número de locos totais em cada *primer*. Para determinar a eficiência dos marcadores em detectar polimorfismo, foi calculado o conteúdo de informa o polimórfica (PIC) (ROLDAN-RUIZ *et al.*, 2000):

$$PIC_i = 2 f_i (1 - f_i)$$

Em que:

PIC_i = conteúdo de informa o polimórfica do *primer* i;

f_i = frequência de fragmentos amplificados nas amostras com o *primer* i;

1 - f_i = frequência de fragmentos não amplificados nas amostras com o *primer* i.

Resultados e discussão

A sele o do tecido foliar apropriado, em plantas adultas e plantas jovens de dendezeiros,   muito importante no processo de isolamento e purifica o do DNA, devido   natureza fibrosa e   presença de compostos secundários nas folhas em diferentes fases de desenvolvimento. Nem sempre   possível a retirada das folhas jovens em expansão, nas plantas adultas de dendezeiro, que podem atingir até 30 metros de altura, nem a manuten o de uma boa conserva o na coleta e transporte do material foliar em experimentos e em popula es naturais de longas distâncias. Como os protocolos utilizados em dendezeiro nem sempre são reproduzidos nas mais diversas situa es, apresenta-se neste estudo uma modifica o de um protocolo para a extra o de DNA e para a amplifica o via PCR em folhas maduras e jovens, retiradas de plantas adultas e plantas jovens, com varia o no estado de conserva o.

Extração do DNA

Na extração de DNA de folha de dendezeiro adulto, o *pellet* (DNA) ficou escuro e de difícil ressuspensão na solução de TE + RNase, porém o aumento na proporção de betamercaptoetanol e PVP melhorou a qualidade do DNA. O precipitado de DNA de coloração escura foi observado na ausência ou em baixas porcentagens de PVP (1%, 2%) e de betamercaptoetanol (0%, 0,1% e 0,2%) adicionadas no tampão de extração. O precipitado escuro é causado pela oxidação do DNA, devido à presença de polifenóis nas amostras foliares, os quais se ligam covalentemente ao DNA, dificultando seu uso em estudos moleculares, mas a oxidação pode ser evitada pela utilização de PVP e betamercaptoetanol (SAHU; TGHANGARAJ; KATHIRESAN, 2012), porém essas substâncias reduzem o rendimento de DNA (POREBSKI; BAILEY; BAUM, 1997).

O protocolo CTAB desenvolvido para extração rápida de DNA em *Phoenix dactylifera* mostrou-se eficiente para extração de DNA de dendezeiro, em folhas jovens, quando foi modificado com a adição de PVP e betamercaptoetanol (SUZANA *et al.*, 2015). Ying e Zaman (2006) obtiveram DNA extraídos de folhas maduras de dendezeiros, com boa qualidade e rendimento, utilizando um método CTAB modificado com extração em baixas temperaturas e modificações nos tampões padrões utilizados no protocolo. Os principais constituintes das folhas jovens de dendezeiros são ácidos fenólicos, tanino, flavonoide e carboidratos, mas possuem também proteínas, alcaloides, saponina, coumarins, terpenoides e esteroides em quantidades menos expressivas (YIN; ABDULLAH; PHIN, 2013). Folhas maduras contêm maiores quantidades de polifenóis, taninos e polissacarídeos (POREBSKI; BAILEY; BAUM, 1997).

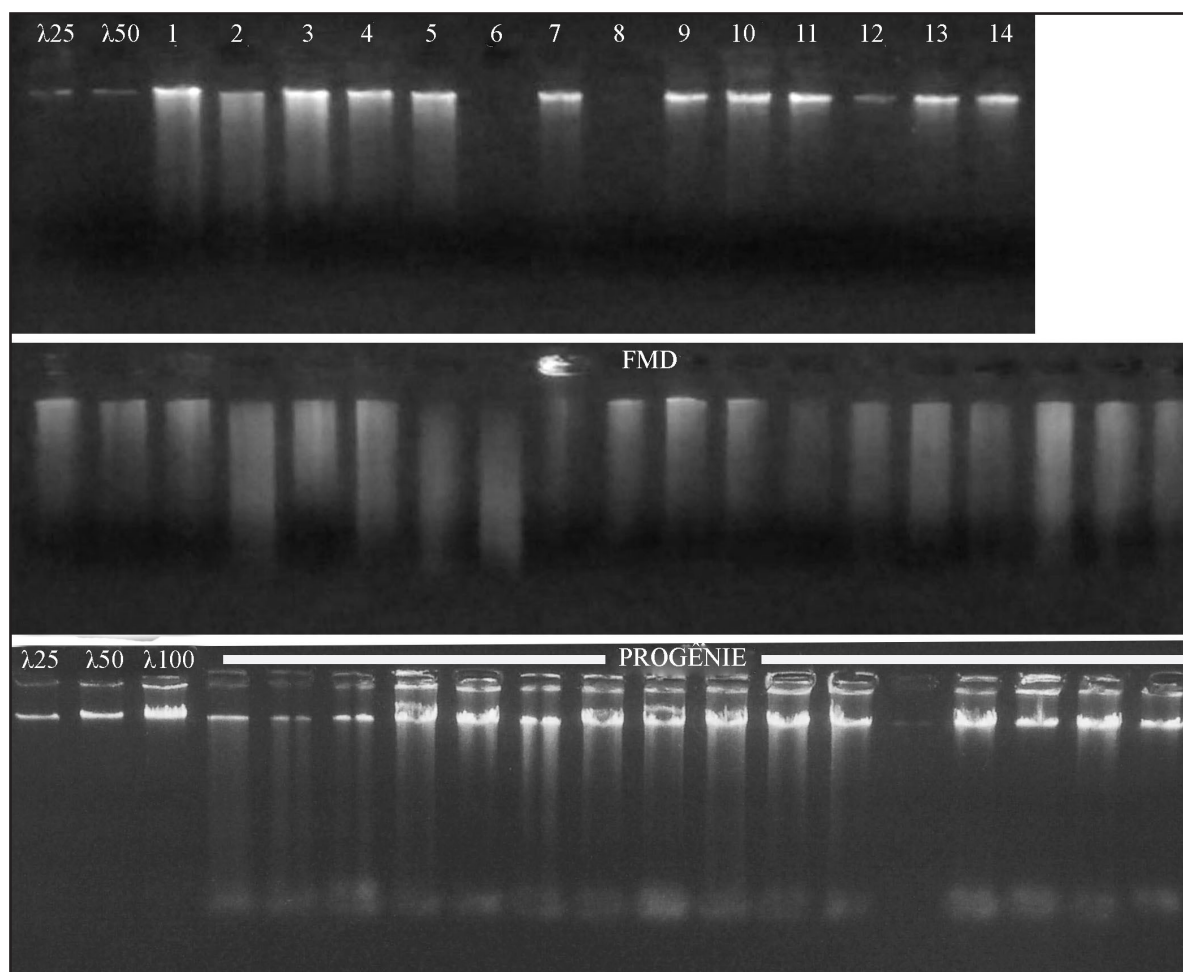
A combinação de 3% de PVP e 0,3% de betamercaptoetanol no tampão de extração e a adição da solução de CTAB 10% com 1,4M de NaCl, aproximadamente aos 20 min da incubação a 65°C, deixou o *pellet* mais claro e mais fácil de ressuspensão em TE + RNase, e não teve impacto na quantidade de DNA extraído, exceto no DNA extraído de folhas degradadas (55 a 100 ng/ μ L) (Figura 1A e 1B). Entretanto, relatos da literatura citam que o aumento na concentração de betamercaptoetanol no tampão de extração aumenta a pureza de DNA, mas reduz o rendimento de DNA extraído, conforme observado por Borges *et al.* (2009).

As folhas jovens ou maduras do dendezeiro adulto são fibrosas e dificultam tanto a formação do pó foliar quanto a extração do DNA, porém, quando suplementadas com a solução de CTAB 10%, 1,4 M de NaCl, na fase em que a mistura do pó foliar com tampão de extração está a 20 min de aquecimento a 65°C, ocorre a solubilização das membranas celulares e a redução da contaminação com polissacarídeos. A adição de NaCl em concentrações superiores a 0,5 M, juntamente com o CTAB, é conhecida por remover polissacarídeos durante a extração de DNA (SAHU; TGHANGARAJ; KATHIRESAN, 2012). A maioria das amostras extraídas de folhas de plantas adultas apresentou ausência de contaminação por proteínas e fenóis (valores de absorbância na razão de λ 260/280 variaram de 1,22 a 2,07), mas as folhas com degradação resultaram em DNA degradados, fato atribuído ao acondicionamento inapropriado durante sua coleta e transporte. A absorbância razão de λ 260/230 variou de 0,88 a 2,09, sendo a maioria em torno de 1,7. A relação A260/A230 em torno de 1,7 indica que a maioria das preparações não continha polissacarídeo e fenol.

Nas extrações de DNA de folhas de plantas jovens, o aumento crescente nas concentrações de PVP no tampão de extração não alterou a qualidade do DNA obtido, porém a adição de 0,3% de betamercaptoetanol no tampão de extração e a solução de CTAB 10% com 1,4 M de NaCl, ao macerado foliar com tampão, melhorou a qualidade e quantidade do DNA (Figura 1C). Os valores de absorbância na razão de λ 260/280 variaram de 0,97 a 1,94, as concentrações variaram de 53,1 a 600 ng/ μ L, e a razão de λ 260/230 variou de 0,64 a 2,18.

Figura 1 – A – Eletroforese, em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X, mostrando o DNA (1 a 14) extraído de folhas maduras não degradadas (FM) de *Elaeis guineensis* (dendezeiro) (variedade pisífera e tenera) e DNA padrão lambda (25 e 50 ng); B - Eletroforese de DNA (1 a 19) extraído de amostras de folhas maduras degradadas (FMD) de *Elaeis guineensis* (dendezeiro) (variedade pisífera e tenera); C – Eletroforese de DNA extraído de folhas jovens, bem conservadas, de progênie de *Elaeis guineensis* (dendezeiros), variedade dura, com um ano de idade e DNA padrão lambda (25, 50 e 100 ng)

Figure 1 – The eletroforese, made in gel (1,5% of agarose diluted in a buffer TBE 1X), of the DNA (1 a 14) extracted from mature and not degraded leaves (ML) of *Elaeis guineensis* (oil palm), (pisifera and tenera variety), and of the lambda standard DNA (25 and 50 ng); B - The eletroforese of a DNA (1 a 19) extracted from mature and degraded leaves (MDL) of *Elaeis guineensis* (oil palm) (pisifera and tenera variety); C -The eletroforese of the DNA extracted from young and well-conserved leaves, from progenies of the variety dura of an *Elaeis guineensis* (oil palm) at one year of age and of the lambda standard DNA (25, 50 and 100 ng)



Fonte: Autores (2019)

Amplificação do DNA e seleção de *primers*

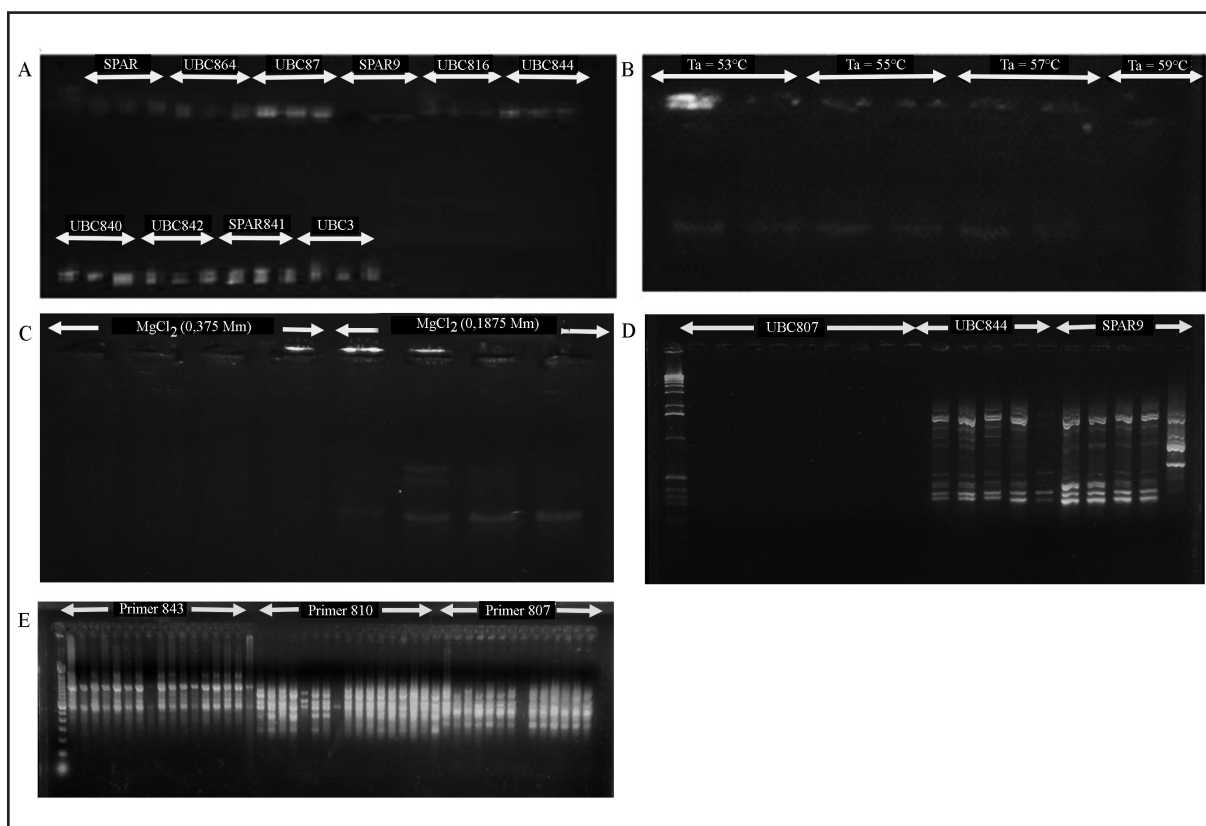
As amostras de DNA mostraram-se estáveis, mesmo após armazenamento a -20°C , a longo prazo, pois foram submetidas à amplificação logo que extraídas e três anos após sua extração. As amostras de DNA foram viáveis para a amplificação e seleção de iniciadores ISSR com os dois protocolos (I e II), com restrições às amostras obtidas de folhas muito degradadas e notoriamente com o uso do protocolo I. Inicialmente, as amplificações apresentaram bandas com baixa intensidade e ilegíveis com quase todos os 17 *primers* testados (Figura 2A). As temperaturas de anelamento que foram testadas com três *primers* (UBC844, UBC 87 e SPAR9) e DNA na concentração de $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ resultaram em sutis diferenças na qualidade das bandas, como pode ser observado com o *primer* 844 na Figura 2B. O melhor resultado obtido na amplificação via PCR foi com a concentração de DNA na concentração de $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ e $0,1875\text{ mmol.L}^{-1}$ de MgCl_2 (Figura 2C).

Com a otimização de reagentes e diferentes temperaturas de anelamento, foi possível a seleção de *primers* (Figura 2D), mas as amplificações com o DNA de todos os indivíduos apresentaram diferentes intensidades e visibilidades de bandas. Então, foram mantidas as concentrações do dNTP ($1,0\text{ mmol.L}^{-1}$), DNA ($1\text{ ng}/\mu\text{L}$) e MgCl_2 ($0,1875\text{ mmol.L}^{-1}$), e foi testada a adição de BSA e concentração mais elevada do *primer*, com tampão da amostra 1X e menor temperatura de anelamento no programa de amplificação (protocolo II). Concentrações de *primers* variando de 10 a 500 pmol/reação foram testadas em várias espécies para a otimização de marcadores ISSR (BORNET; BRANCHARD, 2001). A adição de BSA, aliada à maior concentração de *primer* ($0,5\text{ pmol}$), melhorou a intensidade e distinguibilidade das bandas amplificadas a partir do DNA de folhas adultas e de plantas jovens de dendezeiros, exceto em amostras muito degradadas. As diferenças principais entre as duas reações de amplificação foram a concentração do *primer* e a utilização de BSA. A BSA tem sido utilizada como um aditivo em várias aplicações, incluindo amplificação por PCR, que contém potenciais inibidores, como os compostos fenólicos (FARELL; ALEXANDRE, 2012). Também, tem sido utilizada com eficiência em amplificações de DNA com marcadores moleculares ISSR em dendezeiros (CHAGAS *et al.*, 2015; GOMES, 2016).

As diferenças nas programações das PCR dos dois protocolos, I e II, utilizados na amplificação do DNA foram: redução no tempo de desnaturação inicial, ligação dos iniciadores e extensão final, número de ciclos da PCR (37) e temperatura de anelamento constante de 47°C para todos os *primers* testados. Com o protocolo II, foi testado o *primer* UBC 844 e mais seis *primers*. Entre todos, foram selecionados cinco que apresentaram bandas intensas e legíveis (Figura 2E). O perfil das bandas apresentou uma variação de 350 a 1400 pb dependendo do *primer* utilizado na amplificação do DNA. Considerando-se o parental materno de dendezeiro subespontâneo e suas 15 progênes, observa-se que os cinco *primers* amplificaram 23 locos com uma média de 4,6 locos por *primer* (Tabela 1). Foram amplificados de três a seis locos/*primer* com um a quatro polimórficos/*primer*. A porcentagem de polimorfismo variou de 20 a 100%. Os *primers* UBC 834 e UBC 848 apresentaram maior porcentagem de polimorfismo, 100 e 66,6%, e conteúdo de informação polimórfica (PIC), 0,48 e 0,45, respectivamente. Segundo Roldan-Ruiz *et al.* (2000), o valor do PIC varia de zero, para marcadores monomórficos, a 0,5 para marcadores polimórficos quando estão presentes em 50% das plantas. Três dos cinco *primers*, UBC 807, 810 e 812, apresentaram porcentagem de polimorfismo de 20, 20 e 33,3%, respectivamente, e com PIC pouco informativo (0,10; 0,22; 0,04). Em dendezeiro, na variedade dura, deve-se considerar que a base genética é restrita e ocorre alogamia entre parentes, portanto as plantas genitoras e progênes compartilham muitos alelos comuns e, conseqüentemente, terão muitos locos monomórficos. É possível que seja necessário um número maior de *primers*, devido ao baixo polimorfismo, para capturar diferenças na variedade dura. Porém os marcadores UBC 834 e 848 foram eficientes em determinar polimorfismo nas amostras de DNA, sugerindo que existe alta variabilidade genética em certas regiões do genoma dessa variedade.

Figura 2 – Resultado da eletroforese do marcador de peso molecular de 100 pb (L) e DNA de *Elaeis guineensis* (dendzeiro) amplificado por PCR nas seguintes condições: A - DNA (0,5 ng/μL), tampão da amostra 0,75X, MgCl₂ (0,93 mmol.L⁻¹), dNTP (1,0 mmol.L⁻¹), primers ISSR(1 μM), Taq polimerase (1,5 U/μl), com temperatura de anelamento de 65°C; B- Com o primer UBC 844 variando a temperatura de anelamento; C- com o primer UBC 844 à temperatura de anelamento de 50°C, DNA (1 ng/μl) e variando a concentração de MgCl₂; D - Com os primers UBC 87, 844 e SPAR 9 à temperatura de anelamento de 50°C, tampão da amostra 0,75X, MgCl₂ (0,93 mmol.L⁻¹), dNTP (1,0 mmol.L⁻¹), primer (1 μM), Taq polimerase (1,5 U/μL) e DNA (1ng/μL) (Protocolo I); E- Com os primers UBC 843, 810 e 807 utilizando o protocolo II e o DNA de um parental materno (M) e suas progênes

Figure 2 – Result of the electrophoresis of the 100 bp (L) molecular weight marker and amplified *Elaeis guineensis* (palm oil) DNA, under the following conditions: A- DNA (0.5 ng/μL) amplified with 11 ISSR primers with 0.75X sample buffer, MgCl₂ (0.93 mmol.L⁻¹), dNTP (1.0 mmol.L⁻¹), primer (1 μM), Taq polymerase (1.5 U/μl), with annealing temperature of 65°C; B- With the UBC 844 primer varying the annealing temperature; C- with UBC 844 primer at annealing temperature of 50°C, DNA (1 ng/μl) and varying MgCl₂ concentration; D - With primers UBC 87, 844 and SPAR 9 at annealing temperature 50°C, sample buffer 0.75X, MgCl₂ (0.93 mmol.L⁻¹), dNTP (1.0 mmol.L⁻¹), primer (1 μM), Taq polymerase (1.5 U/μL) and DNA (1 ng/μL) (Protocol I); E- With UBC primers 843, 810 and 807 using protocol II and the DNA of a maternal parent (M) and its progenies



Fonte: Autores (2019)

Tabela 1 – Relação dos *primers* ISSR (códigos dos iniciadores) utilizados na amplificação de DNA de *Elaeis guineensis* (dendezeiro), sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento, número total de locos, número de locos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e conteúdo de informação polimórfica

Table 1 – Relationship of ISSR primers (initiator codes) utilized to amplify the *Elaeis guineensis* (oil palm), nucleotide sequence, annealing temperature, total number of loci, number of polymorphic loci, percentage of polymorphism e, polymorphic information content

Código do <i>primer</i>	Sequência (5'-3') ¹	Ta (°C)	Locos/ <i>Primer</i>	Locos Polimórficos	%P	PIC
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	47	5	1	20,00	0,10
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	47	5	1	20,00	0,22
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	47	3	1	33,30	0,04
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGACYT	47	4	4	100,00	0,48
UBC 848	CACACACACACACACARG	47	6	4	66,60	0,45
Total			23	11	47,00	

Fonte: Autores (2019)

Em que: ¹D, Y, V e H = nucleotídeos degenerados; D = (A, G, T); Y = (C, T); V = (A, C, G); R = (A, G); Ta (°C) = temperatura de anelamento; %P = porcentagem de polimorfismo; PIC = conteúdo de informação polimórfica.

Conclusão

O método CTAB modificado melhora a qualidade e quantidade do DNA, porém com variações entre amostras, devido, conseqüentemente, às variações observadas na degradação entre as folhas como resposta do estado de conservação das amostras foliares. A otimização do protocolo da PCR, com o uso de BSA e maior concentração de *primer*, é importante para a maior eficiência e também para atenuar as diferenças observadas na qualidade das bandas amplificadas no DNA das amostras. As otimizações permitem a seleção de cinco *primers*, que foram posteriormente utilizados para a amplificação em 13 famílias de dendezeiro, variedade dura, composta de um parental materno e suas progênes.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela concessão de bolsas de iniciação científica (IC) aos dois primeiros autores; à UESC, pelo financiamento da pesquisa; a Jose Inácio Lacerda Moura, pesquisador da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/ Centro de Pesquisa do Cacau (CEPLAC/ CEPEC), pelo suporte técnico na obtenção e manutenção do material genético; e a Magno C. Souza, proprietário das Fazendas Boa Vista e Bela Sorte.

Referências

- BORGES, A. *et al.* CTAB methods for DNA extraction of sweet potato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 529-534, jul./ago. 2009.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter sequence simple repeated (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, p. 209-215, sept. 2001. DOI: 10.1007/BF02772892.
- CHAGAS, K. P. T. *et al.* Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciência Agrária**, Recife, v. 10, n. 1, p. 147-152, mar. 2015. DOI: 10.5039/agraria.v10i1a5133.
- CORLEY, R. V.; TINKER, P. B. H. **The oilpalm**. Oxford: Wiley-Blackwel, 2015. 674 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 13, p. 39-40, 1990. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000081&pid=S0100-2945201300030001800009&lng=pt. Acesso em: 10 jan. 2019.
- FARELL, E. M.; ALEXANDRE, G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. **BMC Research Notes**, London, v. 5, n. 257, p. 1-8, may 2012. DOI: 10.1186/1756-0500-5-257.
- GOMES, H. T. **Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária**. 2016. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1065516/1/2016HugoTeixeiraGomesParcial.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2019.
- LHASE, L. O. *et al.* Development of a method for DNA extraction from oil palm leaves and the effects of pH and ionic strength on nucleic acid quantification. **Journal of Biological Methods**, San Francisco, v. 3, n. 2, p. 1-6, may 2016. DOI: 10.14440/jbm.2016.80.
- NORDIANA, H. M. N. *et al.* Evaluation of inter simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic mapping of an oil palm interspecific hybrid mapping population. **Journal of oil Palm Research**, Kuala Lumpur, v. 26, n. 3, p. 214-225, sept. 2014. Disponível em: <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-257>. Acesso em: 05 fev. 2019.
- POREBSKI, S.; BAILEY, L. G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 15, n. 1, p. 8-15, Mar. 1997. DOI: 10.1007/BF02772108.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeated (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, nov. 2002.
- ROLDAN-RUIZ, I. *et al.* AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, n. 6, p.125-134, aug. 2000.
- SAHU, S. K.; TGHANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. **ISRN Molecular Biology**, New York, v. 6, n. 4, p. 1-6, oct. 2012. DOI: 10.5402/2012/205049.
- SATO, M. K. *et al.* Least limiting water range for oil palm production in Amazon region, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 74, n. 2, p. 148-156, mar./abr. 2017. DOI: 10.1590/1678-992X-2015-0408.
- SINGER, R. *et al.* Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in old and new worlds. **Nature**, London, v. 500, p. 335-340, aug. 2013. DOI: 10.1038/nature12309.
- SUZANA, M. *et al.* A simple and rapid protocol for isolation of genomic DNA from oil palm leaf

tissue. **Journal of oil Palm Research**, Kuala Lumpur, v. 27, n. 3, p. 282-287, sept. 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282254698>. Acesso em: 15 fev. 2019.

YIN, N. S.; ABDULLAH, S.; PHIN, C.K. Phytochemical constituents from leaves of *Elaeis guineensis* and their antioxidant and antimicrobial activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Sagar, v. 5, suppl. 4, p. 137-140, dec. 2013. Disponível em: <https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol5Suppl4/7743.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2020.

YING, S. T.; ZAMAN, F. Q. DNA extraction from mature oil palm leaves. **Journal of Oil Palm Research**, Kuala Lumpur, v. 18, p. 219-224, Jun. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303328862_DNA_Extraction_from_Mature_Oil_Palm_Leaves. Acesso em: 15 fev. 2019.