

PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS E BIOLOGIA MOLECULAR*

H. Trindade

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

CONCEITO DE MARCADOR: MORFOLÓGICO VS MOLECULAR

Desde sempre a observação directa de caracteres morfológicos em diferentes indivíduos de uma população tem contribuído para o conhecimento da variação natural, classificação e agrupamento de indivíduos, selecção de variedades, entre outros. Estes estudos baseiam-se em **marcadores morfológicos**, nos quais a hereditariedade pode ser observada directamente sem o recurso a técnicas bioquímicas ou moleculares especializadas. As características morfológicas que são controladas por um único *locus* podem ser usadas como marcadores genéticos desde que a sua expressão seja reprodutível em diferentes ambientes. No entanto, a expressão destes marcadores é influenciada pelo ambiente e vem também alterada por interacções epistáticas (interacções génicas) e peliotrópicas (múltiplos efeitos resultantes de um único gene).

Existe uma outra classe de marcadores, designados de **marcadores moleculares**, que revelam a variação existente no material genético, não sendo influenciáveis pela acção do ambiente. Os marcadores moleculares que revelam polimorfismos ao nível das proteínas são designados de **marcadores bioquímicos**, enquanto que outros constituem os **marcadores de DNA** e revelam polimorfismos na sequência de DNA. Estes marcadores existem em maior número relativamente aos marcadores morfológicos e, tratando-se de marcadores associados ao DNA, estão presentes em qualquer célula, em qualquer órgão e em qualquer idade. Outra vantagem importante é que têm um efeito epistático ou pleiotrópico mínimo e não apresentam em geral efeito sobre o fenótipo.

APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para aplicações bem diversas, entre as quais se destacam as seguintes (*in* Kumar, 1999):

Construção de mapas genéticos de *linkage*

Os marcadores de DNA em plantas têm sido usados no desenvolvimento de mapas de *linkage* detalhados. O conceito de *linkage* é a base do mapeamento genético. Trata-se da associação na hereditariedade de determinadas características, resultante da localização física de genes no mesmo cromossoma, de tal modo que há uma distorção na taxa de segregação Mendeliana: as combinações dos gâmetas parentais são mais frequentes do que os gâmetas recombinantes.

Para se conseguir utilizar os inúmeros polimorfismos (revelados pelos marcadores) de modo eficiente como marcadores genéticos, é necessário conhecer a sua localização genómica individual. Assim, um mapa genético de *linkage* representa graficamente, ao longo do cromossoma, o arranjo dos inúmeros *loci*, resultantes da informação de marcadores morfológicos, isoenzimas e de DNA. A distância entre estes *loci* é expressa em centimorgans (cM), que representa as taxas de recombinação entre os diferentes *loci* (1cM=1% de recombinação). Não há uma relação específica entre a distância de recombinação e a distância física (expressa em pares de bases), uma vez que a taxa de recombinação varia ao longo do cromossoma.

* *In*: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 96-105, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

Análise de mapeamento comparativo

Uma das aplicações mais úteis dos mapas genéticos de *linkage* tem sido a comparação de genomas de grupos taxonômicos distantes ou de cruzamento incompatível. Nesta estratégia de comparação de mapas, a informação mapeada de um grupo é utilizada para prever a relação de *linkage* entre grupos aparentados ou distantes fazendo recurso a um conjunto de sondas de hibridização de DNA comuns e a informação assim obtida é muito útil para prever a organização do genoma e a evolução de espécie em estudo. Os marcadores de DNA tornaram esta comparação possível, que não teria sido possível fazer de outra forma, sobretudo para espécies incompatíveis.

Conhecimento da variação natural

O conhecimento e gestão da variação natural presente entre as cultivares domesticadas e os indivíduos selvagens de uma determinada espécie é muito importante no estabelecimento de um programa de melhoramento eficiente. O explorar a variação natural é muito importante por várias razões: a uniformidade genética é indesejável uma vez que pode ocorrer vulnerabilidade a epidemias e desastres ambientais conduzindo a perdas nas colheitas. Muitos indivíduos selvagens contêm genes que podem conferir resistência a *stresses* bióticos (pestes e doenças) e tolerância a *stresses* abióticos (seca, frio e salinidade, p. ex.).

Os marcadores de DNA têm sido usados para quantificar a diversidade genética e para determinar as relações fenéticas em diferentes espécies vegetais. A análise de grupos (análise de cluster) é útil para estudar as relações entre indivíduos aparentados, enquanto que a análise de componentes principais permite uma representação mais completa entre grupos maiores.

A diversidade genética usando os marcadores moleculares também tem sido aplicada em estudos de biodiversidade, identificação de variedades e análise filogenética, em estudos de ecologia vegetal e na análise de populações de patógenos.

Identificação de genes economicamente importantes

Uma aplicação directa dos mapas genéticos de *linkage* é na procura de genes de importância económica com os marcadores moleculares. Em termos gerais, a probabilidade de identificar um marcador em ligação com um gene de interesse é inversamente proporcional à distância entre o marcador e o gene.

Muitas características com interesse agronómico tais como produção, qualidade, maturação e resistência a diferentes *stresses* bióticos e abióticos são controladas por um número relativamente grande de loci, cada um dos quais tem uma pequena contribuição, positiva ou negativa, para o valor fenotípico final da característica. Estes loci são designados "quantitative trait loci", QTLs e as características que apresentam uma variação contínua no fenótipo são designadas "características poligénicas" uma vez que a expressão fenotípica final é determinada pela variação genética num número grande de loci, modificado pelos efeitos ambientais.

Seleccção assistida por marcadores

A seleccção assistida por marcadores (MAS - *marker assisted selection*) baseia-se no conceito de que é possível inferir a presença de um gene pela presença de um marcador que esteja intimamente ligado a esse gene. Se o marcador e o gene estiverem distantes, então a possibilidade de serem transmitidos juntos para a descendência será reduzida devido à existência de *crossing over* e recombinação. Assim, um pré-requisito para a utilização destes marcadores na seleccção é que eles estejam intimamente ligados ao gene de interesse.

CLASSIFICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

De uma forma resumida, existem várias classes de marcadores moleculares, entre os quais se salientam três classes: as isoenzimas, polimorfismos baseados em hibridização ou polimorfismos

baseados no PCR.

Isoenzimas

São diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, resultantes da existência de mais que um gene codificando para essa enzima. A detecção de isoenzimas envolve a extração de proteínas dos tecidos, a separação das proteínas em gel de electroforese e a coloração histoquímica do gel.

As isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na sequência de aminoácidos que possuem, o que poderá influenciar a natureza da estrutura proteica secundária, terciária e quaternária da enzima. A expressão das isoenzimas é co-dominante, sendo que num indivíduo diplóide ambos os alelos de um *locus* são expressos e visualizados.

Polimorfismos baseados em hibridização

Os **RFPLs** (*restriction fragment length polymorphisms*) resultam de polimorfismos no comprimento dos fragmentos obtidos por corte da cadeia dupla de DNA com enzimas de restrição. A diferente localização de zonas de corte enzimático na cadeia de DNA vai gerar fragmentos de diferentes tamanhos. A comparação de fragmentos de DNA é baseada na homologia de sequência após hibridização de uma sequência clonada (sonda) com fragmentos de sequência homóloga distribuídos ao longo do genoma (autoradiografia). Os RFLPs existem devido a mutações pontuais, inversões, deleções ou translocações.

Os polimorfismos, no caso dos loci VNTR (*variable number tandem repeats*), são devidos a uma diferença no número de repetições.

Nos **RFLPs** e nos loci **VNTR** sondas tais como clones genómicos aleatórios, cDNAs (cadeia de DNA complementar produzida por transcrição reversa a partir de um mRNA) e sondas para sequências de microsátélites ou minisátélites são utilizadas na hibridização com filtros contendo DNA digerido com enzimas de restrição.

Polimorfismos baseados no PCR

A reacção de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), originalmente descrita por Saiki *et al.* (1985) envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA (molde ou *template*) na presença de uma enzima, a Taq polimerase (DNA polimerase termoestável). Esta multiplicação específica é devida à presença de *primers*, que são polinucleótidos de cadeia simples que reconhecem e se ligam às sequências de DNA complementares no DNA molde.

O processo de amplificação, Fig.1, começa com a **desnaturação** da dupla cadeia molde de DNA numa cadeia simples, a temperatura elevada (geralmente 90-95°C), seguido da **ligação** específica do *primer* ao molde de cadeia simples de DNA (*annealing*), a uma temperatura mais baixa. Ocorre então a **extensão** enzimática da cadeia, pela acção da Taq polimerase. A repetição do ciclo de **desnaturação-ligação do primer-extensão** leva a uma acumulação exponencial dos fragmentos de DNA da sequência definida, que têm geralmente 2-3Kbp. De facto, para haver amplificação, a distância entre dois locais de hibridização adjacentes deve ser de cerca de 2Kb, o tamanho limite de um fragmento de PCR em condições normais. Em cada novo ciclo a quantidade de DNA é duplicada, Fig.2, resultando num aumento exponencial do DNA alvo que pode ser então directamente visualizado num gel (p.ex de agarose).

Os polimorfismos baseados no PCR podem ser **aleatórios** ou **específicos**, dependendo do tipo de *primer* usado, as condições da reacção de PCR e o método de separação e detecção dos fragmentos.

Os **RAPDs** (random amplified polymorphic DNA), por exemplo, geram marcadores de PCR **aleatórios**. Na reacção de RAPD utilizam-se vários oligonucleótidos de sequência arbitrária como *primers* alvo de sites específicos mas desconhecidos no genoma. Os *primers* têm 10 nucleótidos (10-mers) e os produtos de amplificação são detectados em géis de agarose e visualizados após coloração com brometo de etídio sob luz UV. Estes géis estão limitados à detecção apenas dos produtos de reacção principais. Cada *primer* pode levar à amplificação de várias bandas,

correspondentes a vários loci. Uma vez que o número de *primers* que pode ser usado é praticamente ilimitado, estes marcadores cobrem potencialmente todo o genoma.

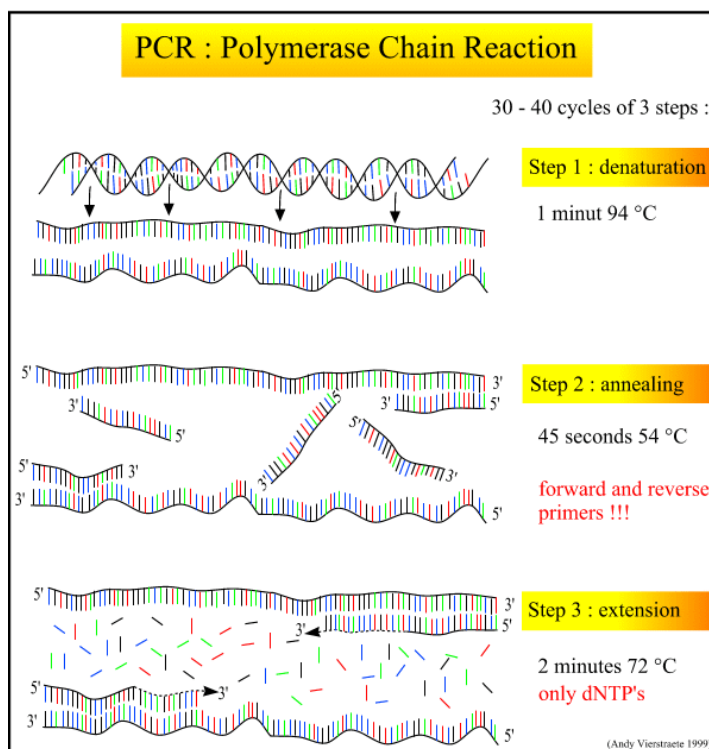


Fig. 1. Esquema exemplificativo da reacção de PCR, com os 3 passos principais: desnaturação, ligação e extensão (adaptado de Vierstraete 1999).

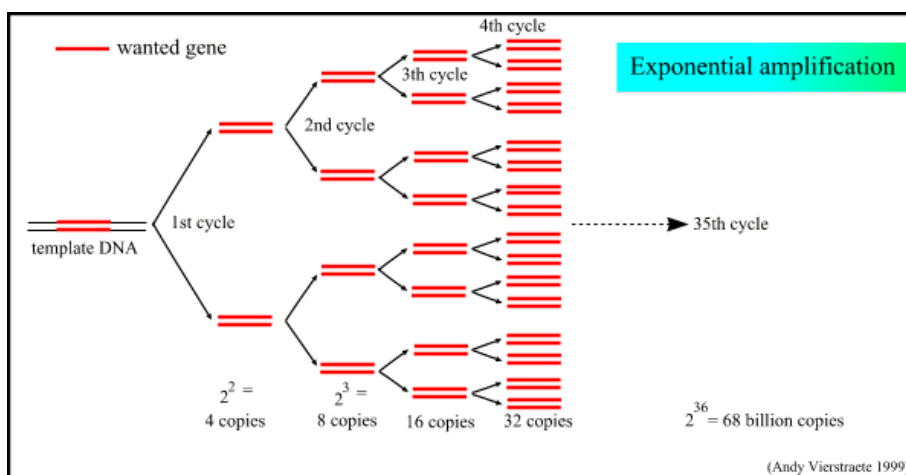


Fig. 2. Os primeiros 4 ciclos do PCR vistos em detalhe (adaptado de Vierstraete 1999).

Uma desvantagem destes marcadores é que eles são dominantes (isto é, presença/ausência da banda), resultando na incapacidade de distinção entre os indivíduos heterozigóticos e os homozigóticos dominantes. Por outro lado, os RAPDs têm revelado dificuldades na reprodutibilidade (ver Jones *et al.* 1997), mesmo assegurando que se mantêm as condições para a reacção de amplificação ocorrer.

Uma vantagem destes marcadores é a facilidade de execução técnica e a não exigência do

conhecimento prévio do genoma. Várias empresas comercializam kits de RAPDs (p.ex. Operon), tornando-o assim um método de *fingerprinting* bastante conveniente, Fig.3.

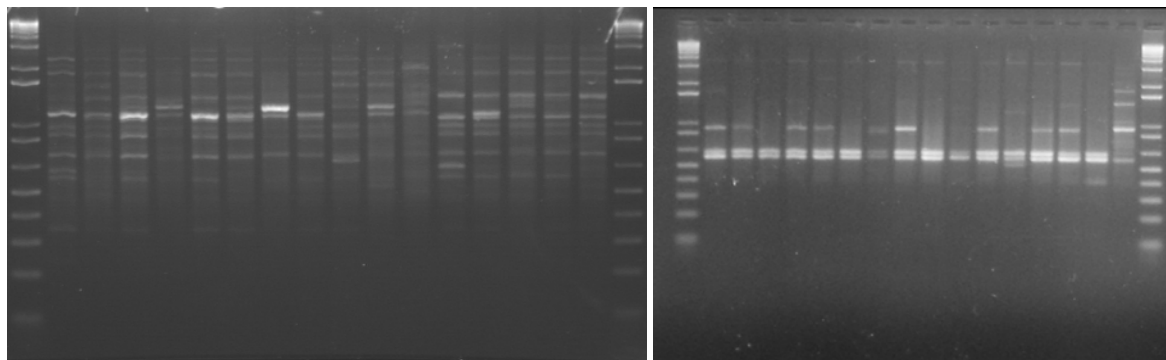


Fig. 3. Géis com produtos de reacção de RAPDs, evidenciando a amplificação com os primers D03 e B08 em *Th. caespitiosus*. Em cada gel, os poços da esquerda e da direita foram carregados com o marcador e os restantes poços correspondem a diferentes plantas.

Os polimorfismos **ISSR** (*inter-simple sequence repeat*) derivam dos **SSR** (microsatélites) por ancoragem terminal de um *primer*, havendo amplificação de dois SSR do mesmo tipo. O polimorfismo ocorre quando no genoma há falta de um dos SSR ou ocorreu uma deleção ou inserção que modifica a distância entre as repetições.

Os marcadores de **SSR** ou microsatélites são sequências repetidas de 1-4 nucleótidos (p. ex. $(AC)_n$), intercaladas no genoma e que podem ser amplificadas usando *primers* que ladeiam essas regiões. Estes marcadores também podem ser designados de SLP (*single sequence length polymorphism*) ou STMS (*sequence-tagged microsatellite sites*). Numa mistura de DNA desnaturado, os SSR reassociam-se rapidamente, dada a sua baixa complexidade na composição em nucleótidos. Utilizando pares de *primers* (20-30 bp) complementares às sequências únicas que flanqueiam os microsatélites, é possível amplificar as regiões que contêm as sequências repetidas. Os microsatélites podem ser usados para identificação de diferentes estirpes ou raças de organismos e para avaliar a proximidade genética em populações. Estimativas apontam para a existência de 5×10^3 - 3×10^5 microsatélites por genoma vegetal (Condit e Hubbell 1991).

Os *primers* para a análise de SSR podem ser construídos após consulta no GENE BANK para loci de SSR em espécies semelhantes ou pela procura em bibliotecas genéticas. A pesquisa de informação existente em bases de dados constitui assim uma forma rápida de desenvolver uma sonda para o fingerprinting de DNA sem ser necessário o conhecimento prévio da sequência.

Os **AFLPs** (*amplified fragments length polymorphisms*) são essencialmente uma combinação dos RFPLs com técnicas de PCR. O DNA genómico é digerido previamente com uma enzima de restrição apropriada. Como resultado, uma série de fragmentos representando vários loci são ligados a adaptadores sintéticos e amplificados com *primers* específicos que são complementares à sequência selectiva nos adaptadores. Várias centenas de fragmentos podem ser gerados desta forma. A separação subsequente dos fragmentos resultantes é realizada num gel de sequenciação com elevado poder de resolução e visualizados por autoradiografia. O gel de poliácridamida pode detectar diferenças tão pequenas quanto um par de bases. Em alternativa pode não usar-se nucleótidos radioactivos no passo envolvendo o PCR, utilizando-se técnicas de coloração de prata ou fluorescência para visualização dos produtos de amplificação.

A análise por AFLPs é semelhante aos RAPDs na medida em que em nenhuma das técnicas é necessário o conhecimento prévio das sequências; no entanto, os AFLPs detectam um número de *loci* muito superior aos detectados com os RAPDs. A complexidade dos perfis de AFLPs é dependente dos *primers* e das enzimas de restrição escolhidas, bem como pela composição do DNA genómico. Os *primers* de AFLP podem ser facilmente distribuídos entre laboratórios pela publicação das sequências dos *primers*.

CARACTERÍSTICAS DE UM MARCADOR MOLECULAR

Um marcador molecular deve possuir algumas características entre as quais se destacam o **polimorfismo**, isto é, existir em alguns indivíduos mas não noutros, terem uma **ocorrência aleatória** e apresentarem **herança co-dominante** (permitindo a discriminação entre os indivíduos homo e heterozigóticos). A reprodutibilidade é também um factor importante, bem como a facilidade de execução técnica e os custos associados. É difícil encontrar um único marcador que tenha todas estas características, Tabela 1.

Tabela 1. Comparação das características dos marcadores moleculares de DNA mais importantes.

Característica	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
Quantidade DNA necessária (µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Qualidade do DNA	elevada	elevada	moderada	moderada	elevada
Baseada em PCR	não	sim	sim	sim	sim
Nº <i>loci</i> polimórficos analisados	1-3	1.5-5	20-100	1-3	1
Facilidade de execução	difícil	fácil	fácil	fácil	fácil
Possibilidade de automatização	pequena	moderada	moderada	grande	grande
Reprodutibilidade	elevada	não fiável	elevada	elevada	elevada
Custo desenvolvimento	baixo	baixo	médio	elevado	elevado
Custo por análise	elevado	baixo	médio	baixo	baixo

IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS MARCADORES

Em cada genoma, o número de marcadores morfológicos e isoenzimas é sempre limitado quando comparado com os marcadores baseados no DNA, que são ubíquos e numerosos. Outra grande vantagem reside no facto de os marcadores de DNA não terem efeito no fenótipo uma vez que são reflexos da variação natural presente na sequência de DNA. Os marcadores de DNA estão livres de efeitos pleiotrópicos, permitindo que um grande número de marcadores possa ser monitorizado numa única população. A análise de DNA pode ainda ser realizada em qualquer estágio do ciclo de vida e um organismo e a partir de praticamente todos os tecidos, incluindo material de herbário e tecidos mumificados. Os marcadores baseados em PCR necessitam de apenas alguns nanogramas para a análise.

Os marcadores morfológicos e bioquímicos, por seu lado, dependem da expressão de certos genes que por sua vez são controlados pelas condições ambientais, especificidade do tecido e estágio de desenvolvimento.

PAM E BIOLOGIA MOLECULAR

A análise sistemática e filogenética das plantas aromáticas foi tradicionalmente baseada em características morfológicas, quer macroscópicas quer microscópicas. Uma vez que os metabolitos secundários são muitas vezes semelhantes entre membros de um mesmo agrupamento, a sua ocorrência ou ausência poderia ser tomada como indicação de uma descendência comum e como tal maior proximidade. O valor potencial da contribuição dos metabolitos secundários para a taxonomia foi reconhecida há cerca de 200 anos, no entanto apenas nos últimos 40 anos é que a quimiotaxonomia tem tido um impacto considerável na sistemática vegetal e novos sistemas de classificação foram desenvolvidos considerando a distribuição desses metabolitos (*in* Wink, 2003). Mais recentemente, a análise de sequências de DNA (cloroplastidial e nuclear) tem contribuído grandemente para a reconstrução da filogenia em várias espécies.

A utilização da análise genética conjuntamente com a análise de perfis dos metabolitos secundários permite examinar e discutir as semelhanças e diferenças na informação gerada pelos

duas abordagens. A este respeito, e como bem discutido em Adams *et al.* (2003), cada conjunto de dados obtido pelas diferentes abordagens constitui apenas uma “pequena janela” no grande genoma de um indivíduo.

As estimativas actuais sugerem que os genomas vegetais contenham entre 20000-30000 genes, dos quais apenas alguns são expressos (exões). Por exemplo, o projecto de mapeamento do genoma humano (Venter *et al.* 2001) revelou que apenas 1.1-1.4% do genoma humano é expresso. Em *Arabidopsis*, que tem um dos menores genomas conhecidos em plantas, foram referidos cerca de 25498 genes (The Arabidopsis Genome Project, 2000), e neste caso os exões representam cerca de 28,8% do DNA total.

As micromoléculas estão geralmente sob controlo genético simples. Irving e Adams (1973) usando uma aproximação biométrica estimaram o número de genes que controlam os monoterpénos em *Hedeoma sp.*. Eles referem cerca de 20 monoterpénóides controlados por um mínimo de 39 genes (1.95 genes/característica).

Quando se utiliza a morfologia ou a análise dos óleos essenciais (ou de outros produtos do metabolismo secundário) para fins taxonómicos ou simplesmente para definição de clusters, a “janela” de observação constitui apenas uma pequena quantidade de informação comparada com todo o genoma dos indivíduos estudados. Em *Juniperus sp.* a comparação da análise de diferentes genótipos utilizando ISSR, RAPDs, dados de sequências de ITS e análise de terpenóides voláteis revelou haver uma concordância muito maior entre os dados moleculares do que com os terpenóides (Adams *et al.* 2003), no entanto, e como referido pelos mesmos autores, os terpenóides são úteis ao nível da espécie e não no nível taxonómico em que foram utilizados no trabalho.

Em *Thymus vulgaris*, embora não tenha sido encontrada correlação entre as características anatómicas / morfológicas e a composição química, existe uma correlação entre a composição dos óleos essenciais e os dados genéticos, o que permite considerar a análise de RAPDs como bastante útil na selecção assistida por marcadores (Echeverrigaray *et al.* 2001). De facto, acredita-se que a variação na composição dos óleos essenciais tem uma forte base genética, como por exemplo em *Cunila galioides* (Echeverrigaray *et al.* 2003) e a utilização de RAPDs revelou a existência de agrupamento semelhante aos quimiotipos previamente obtidos (Fracaro *et al.* 2005).

Também em *Salvia fruticosa* os padrões gerados pelos perfis químicos parecem corresponder aos padrões genéticos gerados pelos RAPDs, sugerindo também neste caso a existência de uma base genética (Skoula *et al.* 1999). Ainda um outro exemplo surge em *Ocimum gratissimum*, em que os marcadores de RAPD identificados estão intimamente correlacionados com os produtos secundários analisados, permitindo a distinção entre os três quimiotipos (eugenol, geraniol e timol) nesta espécie (Vieira *et al.* 2001)

BIBLIOGRAFIA

- Adams RP, AE Schwarzbach, RN Pandey (2003) The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochem. System. & Ecol.* 31: 375-387
- Condit R, SP Hubbell (1991) Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34 : 66-71
- Echeverrigaray S, G Agostini, L Atti-Serfini, N Paroul, GF Pauletti, AC Atti dos Santos (2001) Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4220-4223.
- Echeverrigaray S, F Fracaro, AC Atti dos Santos, N Paroul, R Wasum, L Atti-Serfini (2003) Essential oil composition of South Brazilian populations of *C. galioides* Benth and its relation with the geographic distribution. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 467-475
- Fracaro F, J Zacaria, S Echeverrigaray (2005) RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochem. System. Ecol.* 33: 409-417
- Irving RS, RP Adams (1973) Genetic and biosynthetic relationships of monoterpenes. In: *Terpenoids: Structure, biogenesis, and distribution. Recent Advances in Phytochemistry, Series 6*, VC Runeckles, TJ Mabry (Eds), pp. 187–214, Academic Press, New York
- Jones CJ, KJ Edwards, S Castaglione, MO Winfield, F Sala, C van de Wiel, G Bredemeijer, B Vosman, M

- Matthes, A Daly, R Brettschneider, P Bettini, M Buiatti, E Maestri, A Malcevschi, N Marmiroli, R Aert, G Volckaert, J Rueda, R Linacero, A Vazquez, A Karp (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390
- Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechn. Adv.* 17: 143-182
- The Arabidopsis Genome Project (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Saiki RK, S Scharf, FA Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, N Arnheim (1985) Enzymatic amplification of f1-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Skoula M, I El Hilali, AM Makris (1999) Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem. System. Ecol.* 27: 559-568
- Venter JC *et al* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Vieira RF, RJ Grayer, A Paton, JE Simon (2001) Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem. System. Ecol.* 29: 287-304
- Vierstraete A (1999) <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* 64: 3-19
-

ANEXO I

Protocolo de extracção e isolamento de DNA

Foi feita uma modificação do protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1987), consistindo previamente na maceração das folhas mais jovens em almofariz com azoto líquido. A extracção foi realizada em tampão de extracção contendo CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide-brometo de cetil trietilamónio*), a quente.

No final o DNA foi resuspenso em Tampão TE (Tris-EDTA) e foi quantificada a sua concentração.

Quantificação do DNA

O DNA pode ser quantificado directamente em gel de agarose (0.8%) por comparação com padrões de concentrações conhecidas de λ DNA (DNA do bacteriófago λ). A corrida pode ser feita a 100v durante 1h. Pode também utilizar-se um espectrofotómetro e medir a absorvância a A260 e A280 fazendo uma diluição prévia do DNA purificado.

Reacção de RAPDs

Para a optimização da reacção de RAPD, há vários factores que têm de ser optimizados:

- Perfil das temperaturas (no PCR)
- Tipo de polimerase utilizado
- Concentração de Mg
- DNA template
- *Primers*
- Outros aditivos (p. ex. BSA)

Exemplo de uma reacção de RAPDs:

Preparação de *master-mix*, sempre em gelo. Utilizam-se luvas.

COMPONENTES	STOCK	MIX μ L	X10
H ₂ O		15,8	158
Tampão de reacção da enzima (R. Mix)	10x	2,5	25
MgCl ₂	50 mM	1,5	15
dNTPs	10 mM	0,5	5
BSA	10 mg/mL	2,5	25
<i>Primer</i>	25 μ M	1,0	10
Taq	5 U/ μ L	0,2	2

Pipetar 24 μ L de *master mix* para cada tubo de PCR e adicionar depois 1 μ L de DNA purificado (e diluído em Tampão TE a uma concentração final de 10 μ g/ μ L). Agitar bem, sem vortexar. Manter no gelo até transferir para o PCR.

Preparação de um gel de agarose

Para separação dos fragmentos resultantes da amplificação em PCR, utiliza-se um gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1x. A agarose tem de ser previamente fervida em microondas para completa dissolução. Após arrefecer, adiciona-se 3 μ L brometo de etídio (para 100 mL de tampão) e verte-se em tabuleiro onde previamente se colocou um pente. Deixa-se solidificar durante 10-15 minutos, e retira-se o pente. O gel está pronto a ser carregado.

Atenção: O brometo de etídio é carcinogénico; é obrigatório a utilização de luvas.

Carregamento do gel de agarose com produtos RAPDs

Em cada poço do pente (que contém 15 ou 20 poços) vai-se carregar uma mistura de *loading buffer* e amostra, preparada antes sobre parafilme, da seguinte forma:

2 μ L LB + 12 μ L produtos de PCR (DNA amplificado)

O poço da esquerda e da direita do pente contém DNA marcador, 3 μ L de 1Kb DNA ladder.

Assegurar-se de que o gel fica imerso em tampão (TAE 1x) e que as amostras ficam mais próximo do pólo negativo. Ligar a fonte de alimentação. Fazer a corrida a 60v durante 3-3,5h. O DNA é uma molécula carregada negativamente, que vai migrar para o ânodo (pólo positivo). No final observar o gel sob luz UV, em transiluminado.

Análise de dados

Inicialmente faz-se uma análise das bandas observadas em gel de agarose. Apenas se consideram as bandas distintas, com tamanhos entre 350bp e 2,5Kb. A presença de uma banda específica de DNA amplificado foi marcada como 1, se presente ou como 0, se ausente, construindo-se matrizes binárias.

Podem utilizar-se 3 coeficientes de similaridade: "Simple Matching", SM, "Jaccard", J e "Dice", D, obtendo-se matrizes de similaridade com as quais se constroem dendrogramas.
