

# OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE MADEIRA DE *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.

Priscilla Nascimento Moredjo <sup>1</sup>; Kelly Carla Almeida de Souza Borges <sup>2</sup>; Evânia Galvão Mendonça <sup>3</sup> & Heber dos Santos Abreu <sup>4</sup>

1. Discente do Curso de Engenharia Florestal, IF/UFRRJ; 2. Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Florestais - UFRRJ; 3. Professora do DS/IF/UFRRJ; 4. Professor do DPF/IF/UFRRJ.

Palavras-chave: extração DNA; madeira; *Caryocar glabrum*

## Introdução

A extração de DNA é a primeira etapa a ser realizada para o uso do DNA em posteriores técnicas moleculares (amplificação, sequenciamento, etc). E a extração pode ser dificultada por problemas relacionados à contaminação do DNA por fenóis, polissacarídeos e proteínas (CHIARI et al, 2009). Entretanto, os protocolos utilizados são adaptados para que ocorra uma melhor eficiência na extração do DNA da madeira minimizando ou inibindo as dificuldades encontradas. A diferença entre os protocolos se dá pela composição do tampão de extração que geralmente é composto por um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8, um sal para dissociar as proteínas do DNA, um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas e um inibidor de DNases para proteger o DNA (BERED, 1998 citado por CHIARI et al, 2009). A espécie em estudo é a *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers., vulgarmente conhecida como piquiarana. E o objetivo deste trabalho foi comparar a quantidade e qualidade do DNA isolado através de três diferentes tipos de protocolos de extração de DNA genômico para a madeira de *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.

## Metodologia

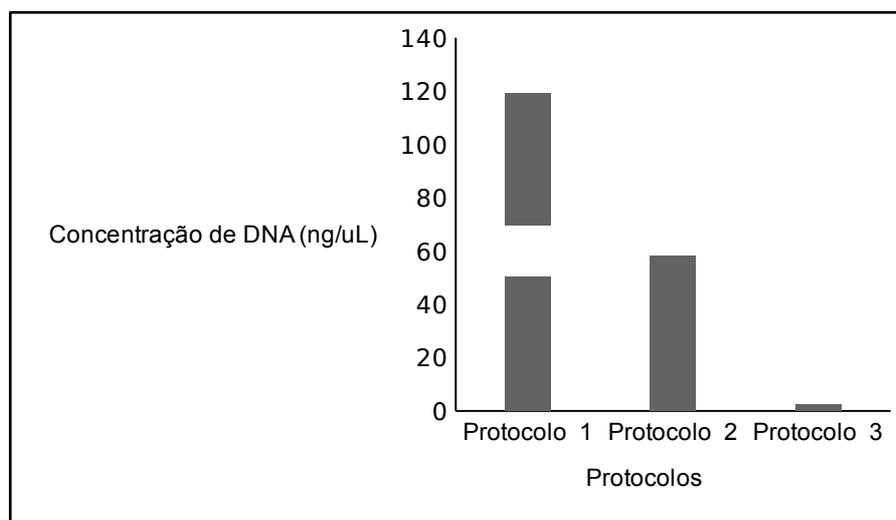
Foram testados 3 tipos de protocolos para a extração de DNA da madeira seca de *Caryocar glabrum*. O primeiro protocolo utilizado foi uma adaptação de Doyle e Doyle (1990), em que foi utilizado um tampão de extração na seguinte concentração, 2% p/v de CTAB, 2,5% de PVP, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 40µL de β – Mercaptoetanol e 20mM EDTA. O segundo protocolo testado foi o Kit DNeasy Plant Mini. E o terceiro protocolo testado foi uma adaptação de Swetha et al. (2014), onde o tampão de extração utilizado possui a concentração, 5% CTAB, 1% PVP, 3M NaCl, 100mM Tris base, 3µL de β – Mercaptoetanol e 20mM EDTA. Após a extração do DNA foi realizado a quantificação deste em espectrofotômetro Nanodrop para avaliar a qualidade e quantidade do DNA extraído.

## Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos, os protocolos testados tiveram uma diferença significativa entre si. O protocolo 1 apresentou uma maior quantidade de DNA extraído seguido do protocolo 2 e ambas as concentrações obtidas foram acima de 50 ng/µL (Figura 1). Visto que o rendimento do DNA a partir de madeira seca é relatado por Asif e Cannon (2005), como ótimo para quantidades iguais ou superiores a 50 ng/µL.

O protocolo 3, que resultou em menor concentração, pode ter apresentado um resultado inferior aos demais tratamentos devido à pequena quantidade utilizada de β – Mercaptoetanol (apenas 3 µL) e do PVP (1,0%), quando comparado com o protocolo 1, 40 µL e 2,5%, respectivamente. Ambos os reagentes são substâncias antioxidantes que permitem neutralizar a ação dos contaminantes como polifenóis (SILVA, 2010). Essas substâncias estão presentes na madeira juntamente com os polissacarídeos, proteínas, lignina, tanino e pigmentos. A atuação dessas substâncias concomitantemente com a concentração inadequada dos agentes oxidantes são fatores que podem ter contribuído para que o protocolo 3 não fosse eficiente na extração de DNA.

Já no que diz a respeito à pureza das amostras, o protocolo 2 (Kit DNeasy Plant Mini) foi o que resultou em melhor grau de pureza quando comparado com os demais protocolos testados (Tabela 1).



**Figura 1:** Relação entre o protocolo testado e a quantidade de DNA extraído.

**Tabela 1:** Protocolos testados para a avaliação da pureza do DNA extraído da madeira de *Caryocar glabrum*

Protocolos	Pureza (260/280 nm)
1	1,405 b
2	1,945 a
3	0,810 c

## Conclusão

Os estudos realizados indicaram que o protocolo mais adequado para extrair DNA genômico de espécies nativas tropicais, especialmente *Caryocar glabrum*, é o protocolo 2, por apresentar resultados mais satisfatórios. Tais resultados abrem uma perspectiva favorável ao uso das amostras de DNA obtidas para a realização de técnicas moleculares, como a amplificação, clonagem e sequenciamento.

## Referências Bibliográficas

ASIF, M.J., CANNON, C.H. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonostylus bancanus*). **Plant Molecular Biology Report**, 23:185 – 192, 2005.

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 141 p.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Concórdia: Embrapa Gado de Corte, 2009. (Embrapa Gado de Corte. Circular Técnica, 36).

DOYLE, J.J.T. E DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12, p.13-15, 1990.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.6, p.973-978, 2010.

SWETHA, V. P. et al. Isolation and amplification of genomic DNA from barks of Cinnamomun spp. **Turkish Journal of Biology**. 38: 151-155, 2014.