



Avaliação de protocolos de extração de DNA de subamostras populacionais de *Pachira quinata* ((Jacq.) W.S Alverson)

MENEZES, Emely Trajano^{1*}; PESSONI, Luiz Alberto¹; XAVIER, Matheus V. A.¹; PEDROZO, Cássia Ângela²

¹Centro de Estudos da Biodiversidade, Universidade Federal de Roraima; ²Embrapa-Roraima). etm_emely@hotmail.com

Palavras Chave: *Cedro doce, recursos genéticos, biologia molecular, silvicultura*

INTRODUÇÃO

P. quinata destaca-se com uma das espécies produtoras de madeira de maior preferência em países da América Central e do norte da América do Sul. No Brasil, ela é conhecida popularmente como cedro-doce, com registro de ocorrência e importância econômica apenas para Roraima. Por outro lado, a atividade extrativista e o avanço do desmatamento impuseram forte pressão sobre suas populações naturais nas últimas décadas, fazendo com que ela fosse incluída na lista de espécies florestais ameaçadas de extinção. Entretanto, o cultivo e domesticação apresentam-se como uma alternativa viável para a continuidade de utilização desse recurso florestal. Nesse trabalho, foram avaliados diferentes métodos, visando aperfeiçoar um protocolo de extração de DNA genômico, para avaliar variabilidade genética entre e dentro de sub amostras de populações roraimenses de *P. quinata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos com indivíduos de *P. quinata*, originados de sementes de diferentes procedências (municípios de Alto Alegre, Bonfim, Mucajaí e Normandia), plantados em um campo experimental da Embrapa Roraima. Brotos, folhas jovens com diferentes níveis de expansão foram coletadas de indivíduos de diferentes procedências. As amostras foram congeladas em ultrafreezer a 70°C negativos e, posteriormente, liofilizadas, pulverizadas e armazenadas em microtubos em freezer comum. O tecido foliar dessa espécie apresenta elevada viscosidade quando em suspensão. Por isso, foram avaliados variâncias de protocolo que utiliza o detergente CTAB no tampão de extração e também foram testados quatro tipos de kits comerciais, específicos para isolamento e purificação de DNA de plantas. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, na concentração de 0,8% (m/v), corado com Gel Red® e visualizado em por meio de um sistema de fotodocumentação e captura de imagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material liofilizado apresentou-se menos viscoso em suspensão em todos os tampões de lise testados, independentemente do tipo de tecido foliar utilizado. Por outro lado, a utilização de material não liofilizado, macerado após congelamento em nitrogênio líquido, mostrou-se inadequada em todos os casos. Visto que a grande quantidade de mucilagem impediu a separação adequada das fases orgânicas e aquosa, nos protocolos com o uso de solventes. Como consequências, a quantidade de DNA recuperado a partir de amostras liofilizadas foi maior e relativamente menos contaminada, quando comparada

com o DNA obtido a partir de amostras não liofilizadas. Entretanto, as tentativas de purificação posterior do DNA extraído, baseada na ressuspensão do DNA em solução com alta concentração de cloreto de sódio ou utilizando acetato de amônio, não resultaram em melhoria de qualidade das amostras.

Por outro lado, apenas um dos quatro Kits comerciais testados produziu resultados positivos, ainda que a quantidade de DNA recuperada por extração tenha sido muito baixa e que muitas extrações (de muitas plantas diferentes) tenham sido mal sucedidas. Mesmo assim, esses foram os únicos casos em que o DNA extraído se mostrou apropriado para utilização posterior em reações de amplificação via PCR.

CONCLUSÕES

- O cedro doce apresenta metabólitos secundários que dificultam sobremaneira a obtenção de DNA purificado de seus tecidos para uso posterior em estudos moleculares;
- Dentre os vários protocolos testados baseados em solventes, o padrão descrito por Doyle e Doyle (1987), mostrou-se mais adequado, desde que se consiga um processo de purificação posterior do DNA;
- Dentre os quatro kits comerciais de extração e purificação testados, apenas o da marca Stratec apresentou resultados positivos, ainda que a taxa de insucesso e custo unitário sejam bastante elevados.

AGRADECIMENTOS

CNPq Universal (Processo 457834/2014-5); Embrapa Roraima.