



Eficiência do método PCI (Phenol: Chloroform: Isoamilic alcohol) no isolamento e purificação de DNA em abelhas-sem-ferrão*

Aline Barbosa Negreiros¹; Geice Ribeiro da Silva²; Vanessa Gomes de Moura³; Fábria de Mello Pereira⁴; Bruno Almeida de Souza⁴; Fábio Mendonça Diniz⁵

¹Doutoranda em Biotecnologia pelo RENORBIO/UFPI, estagiária da Embrapa Meio-Norte, alineb_negreiros@yahoo.com.br ²Doutorando pelo programa Ciência Animal/UFPI, estagiário da Embrapa Meio-Norte. ³Estudante de Ciências Biológicas/IFPI, estagiária da Embrapa Meio-Norte. ⁴Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, fabia.pereira@embrapa.br ⁵Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos.

No Brasil, muitos estudos genéticos têm sido direcionados às abelhas nativas, os quais auxiliam na elaboração de estratégias de manejo e conservação dessas espécies. Para a implementação desses estudos, é necessário que o material genético seja extraído com quantidade e qualidade suficientes para que os procedimentos posteriores não sejam comprometidos. Com isso, objetivou-se testar a eficiência no isolamento e purificação de DNA do protocolo PCI (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico, 25:24:1), com tampão de lise ajustado a insetos (tampão de lise 30 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA e 1% SDS adicionado de proteinase K), no intuito de obter DNA genômico de boa qualidade para estudos genéticos com abelhas nativas. Para isso, o protocolo PCI foi comparado ao protocolo Chelex 10% e a um kit comercial que utiliza membrana de sílica para o isolamento e purificação, de forma a avaliar o desempenho da extração a partir do uso de diferentes partes anatômicas de abelhas *Melipona subnitida* [cabeça (1/2), tórax (1/4), abdômen (1/4) e patas (2)]. Para avaliar a concentração e a qualidade, o material extraído foi visualizado em gel de agarose (1%) e submetido à espectrofotometria de DNA (NanoDrop 2000). Posteriormente, o material extraído foi submetido à reação de digestão com uso de enzimas de restrição (*DraI* e *RsaI*) e amplificação por PCR dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e microssatélites. Entre os procedimentos testados, os protocolos Chelex e PCI renderam os maiores valores para a quantidade de DNA, com média geral de $467,33 \pm 150,33$ e $125,80 \pm 109,44$ ng/ μ L, respectivamente. Os protocolos PCI e o Kit comercial demonstraram a presença de DNA genômico, íntegro e de alto peso molecular em todas as partes da abelha, ao contrário do Chelex que apresentou um perfil de degradação em todas as amostras analisadas. Porém, dos três procedimentos, o PCI foi o único que apresentou a razão 260/280 acima de 1,8, para todas as amostras, o que indica maior grau de pureza. Pelo teste de Tukey (programa Past v.3), para a comparação de médias, não houve diferença significativa entre as amostras extraídas das diferentes partes da abelha dentro de cada protocolo, com exceção do Kit comercial que apresentou maior concentração de DNA nas partes referentes à cabeça $23,7 \pm 7,39$ e abdômen $42,03 \pm 17,71$. Todos os protocolos demonstraram eficiência na amplificação de DNA e na digestão enzimática. O protocolo PCI demonstra ser o mais adequado para a extração de DNA das diferentes secções de abelhas-sem-ferrão, com eficiência tanto para o processo de digestão quanto para a amplificação de DNA via PCR.

Palavras-chave: DNA genômico, extração de DNA, *Melipona subnitida*.

Agradecimentos: Embrapa Meio-Norte, Embrapa Caprinos e Ovinos, Universidade Federal do Piauí (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) e Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO.