

[Trabalho 129]



Clique para abrir o Artigo Completo/Click to open the paper

VEGETAL

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL EM CYMBOPOGON WINTERIANUS.

JAILSON DE ARAÚJO SANTOS¹; LILIANE ALCÂNTARA ARAÚJO²; CAMILA CAMPÊLO DE SOUSA³; FATIANNE DA CRUZ DUARTE DE LIMA⁴; ERLANE DE SOUSA ARAÚJO⁵; SULIMARY OLIVEIRA GOMES⁶; JOÃO PAULO GOMES VIANA⁷; PAULO SARMANHO DA COSTA LIMA⁸; SÉRGIO EMÍLIO DOS SANTOS VALENTE⁹;
1,2,3,4,5,6,7,9.UFPI, TERESINA, PI, BRASIL; 8.EMBRAPA, TERESINA, PI, BRASIL;
jailson.play@hotmail.com

Resumo:

Realizou-se extrações de DNA em *Cymbopogon winterianus*, onde avaliou-se os protocolos descritos por Doyle e Doyle (1987), Clark et al. (1989), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998), todos baseados no detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), com modificações relativas à quantidade de tecido foliar, onde padronizou-se para a quantidade de 40 mg por amostra. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de DNA para *C. winterianus*, possibilitando a obtenção de um DNA de alta qualidade, em boa quantidade, de forma rápida, eficiente e menos onerosa. Os resultados mais eficientes foram obtidos por meio do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987); porém, o método de Clark et al. (1989) pode ser uma boa alternativa em substituição ao protocolo de Doyle e Doyle (1987).

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL EM *Cymbopogon winterianus*

Resumo: Realizou-se extrações de DNA em *Cymbopogon winterianus*, onde avaliou-se os protocolos descritos por Doyle e Doyle (1987), Clark et al. (1989), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998), todos baseados no detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), com modificações relativas à quantidade de tecido foliar, onde padronizou-se para a quantidade de 40 mg por amostra. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de DNA para *C. winterianus*, possibilitando a obtenção de um DNA de alta qualidade, em boa quantidade, de forma rápida, eficiente e menos onerosa. Os resultados mais eficientes foram obtidos por meio do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987); porém, o método de Clark et al. (1989) pode ser uma boa alternativa em substituição ao protocolo de Doyle e Doyle (1987).

Palavras-chave: *Cymbopogon winterianus*, DNA, Extração, Protocolos

Introdução

A extração de DNA de boa qualidade de qualquer amostra de tecido vegetal é o primeiro passo para que se possam fazer estudos moleculares com a espécie, além de ser uma ferramenta crucial para o desenvolvimento de técnicas para análise do material genético da planta. *Cymbopogon winterianus*, conhecida popularmente como citronela, pertence à família Poaceae e é utilizada tanto em hortas caseiras quanto para fins industriais, as folhas são usadas na fabricação de chás, enquanto o óleo essencial extraído é aproveitado na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (FIGUEIRA et al., 2002).

A citronela contém aproximadamente 0,5% de óleo essencial, tendo como compostos majoritários o citral e mirceno; que são utilizados pela indústria para síntese de ianonas, as quais possuem ação calmante e espasmolítica. O óleo também é comercializado como aromatizante de ambientes e na forma de substrato para a síntese de vitamina A (LERIN et al., 2007).

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo de extração de DNA em *C. winterianus*, que permita a obtenção de um DNA de alta qualidade, em boa quantidade, de forma rápida, eficiente e menos onerosa para ser utilizado em experimentos futuros na Área da Biologia Molecular.

Material e Métodos

A coleta do tecido foliar da citronela ocorreu no Departamento de Fitotecnia no Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

A extração de DNA foi feita no Laboratório de Micologia, localizado no Departamento de Biologia no Centro de Ciências da Natureza (CCN) da UFPI. A quantificação das amostras foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte.

Os protocolos testados foram os descritos por Doyle e Doyle (1987), Clark et al. (1989), Ferreira e Grattapaglia (1995) e Romano e Brasileiro (1998), todos baseados no método fundamentado na utilização do detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), com modificações relativas à quantidade de tecido foliar, onde padronizou-se para a quantidade de 40 mg por amostra. Em seguida, realizou-se as devidas alterações proporcionais dos reagentes, de acordo com a quantidade de tecido foliar previamente estabelecida. Para cada protocolo foram realizadas cinco repetições, totalizando vinte amostras de DNA.

Seguindo as especificidades de cada um dos protocolos testados, ao final de cada extração, obtiveram-se amostras de DNA, as quais foram analisadas por meio de quantificação em gel de agarose.

Resultados e Discussão

Observou-se uma variação considerável entre as metodologias em relação à quantidade e à qualidade do DNA obtida. A menor quantidade de DNA foi observada com a utilização do método de Romano e Brasileiro (1998), enquanto a extração com o método de Doyle e Doyle (1987) forneceu a maior quantidade de DNA com o melhor nível de pureza. O método de Clark et al. (1989) também apresentou resultados satisfatórios em relação à quantidade e à qualidade do DNA obtida (Figura 1).

Esses resultados também indicam que a quantidade do DNA obtido a partir de 40 mg de tecido foliar de *Cymbopogon winterianus* é suficiente para estudos envolvendo técnicas moleculares, enquanto o valor médio para a pureza das amostras aponta que pode haver presença de proteínas e/ou outras substâncias.

Verificou-se que através dos protocolos de Ferreira e Grattapaglia (1995) e de Romano e Brasileiro (1998) não foi possível encontrar um DNA de boa qualidade (Figura 1).

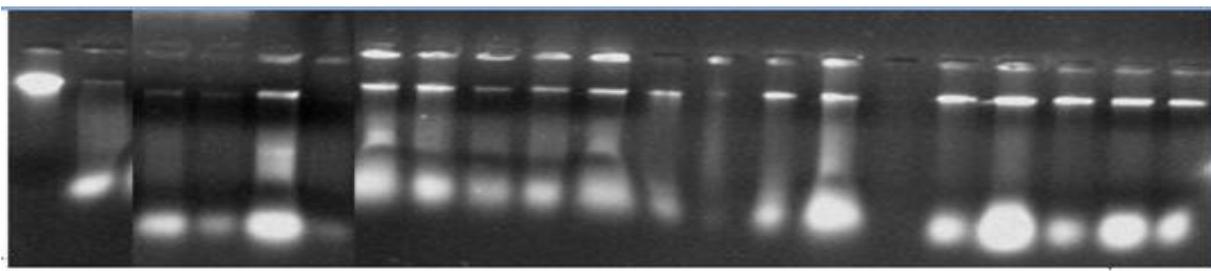


Figura 1. Fragmentos amplificados de DNA de *Cymbopogon winterianus*, obtidos a partir de quatro protocolos de extração de DNA. LAMB = Marcador conhecido de DNA; CR = extração do DNA em citronela utilizando o protocolo de Romano e Brasileiro (1998); CC = extração com o protocolo de Clark et al. (1989); CG = protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995) e CD = protocolo de Doyle e Doyle (1987).

Conclusão

O protocolo que forneceu maiores quantidades de um DNA puro em *Cymbopogon winterianus* foi o descrito por Doyle e Doyle (1987), onde de forma rápida e pouco onerosa, obteve-se nas cinco amostras, material genético em boas condições para a realização de futuros estudos moleculares.

O método descrito por Clark et al. (1989) mostrou-se eficiente para praticamente todas as cinco amostras testadas (amostras 1, 2, 4 e 5), gerando um DNA de boa qualidade e em quantidade razoável, mostrando-se uma boa alternativa em substituição ao protocolo de Doyle e Doyle (1987).

Referências

- CLARK, B. C.; MORAN, L. B.; APPELS, R. **DNA analyses in wheat breeding**. *Genome*, v. 32, p 334-339, 1989.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN, 220p, 1995. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; SILVA, C. A. L. **Efeito da secagem em espécies do gênero *Cymbopogon* na composição do óleo essencial** São Paulo CPQBA/UNICAMP, 2002.
- LERIN, L. A.; CECHET, J. L.; GAIKI, G.; ASTOLFI, V.; BORGES, L. R.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L. **Determinação de variabilidade genética em *Cymbopogon* sp., *Stipa tenacissima* L. e *Andropogon schoenanthus* L. usando Marcadores RAPD**. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 375-377, jul. 2007.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. ed. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa-SPI/Embrapa- CENARGEN. 1998. p.163-177.