



# TESTE DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *QUALEA GRANDIFLORA* (VOCHYSIACEAE) PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA NO CERRADO.

Lia Maris Orth Ritter

Renata Gabriela V. de Castro e Souza; Paulo Yoshio Kageyama

Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. lmr Ritter@esalq.usp.br

## INTRODUÇÃO

A perda de grandes áreas de cerrado no Brasil (estima-se que 55% das áreas de cerrado no país já sofreram ação antrópica segundo Machado *et al.*, 2004) tem gerado consequências ecológicas importantes, dentre elas a fragmentação de habitats, que é responsável pela diminuição da biodiversidade e extinção de espécies, de forma que esta questão tem recebido especial atenção por parte da comunidade científica.

Surgem então novas perspectivas para a pesquisa em ecologia e conservação de espécies, permitindo que atualmente estes estudos sejam realizados com ferramentas genéticas, fornecendo resultados que contribuem para a redução dos impactos da fragmentação. A genômica tem sido de grande importância nos programas de conservação da biota. Permite que a biodiversidade seja estudada por meio da diversidade molecular existente nas populações naturais de diversas espécies sob impacto antropogênico direto ou indireto, fornecendo subsídios para programas de preservação (Torres, 2003). As iniciativas relativas à genômica da conservação, tão criticadas pelos conservacionistas no fim da década de 80 por restringirem-se às estimativas de heteroziguidade em populações, evoluíram de maneira a contemplar potencialmente a condução de programas internacionais de conservação.

No entanto, quando se realizam trabalhos desta natureza, alguns procedimentos precisam ser considerados com bastante atenção, pois são imprescindíveis para se obter resultados de qualidade.

Uma das considerações mais importantes em qualquer procedimento que se utilize da extração de DNA de plantas é a maneira utilizada para coletar e preservar o tecido vegetal. A qualidade do DNA em geral é afetada significativamente pela condição do tecido antes da extração. Isso é particularmente importante para espécies que produzem grandes quantidades de metabólitos secundários que em geral interferem com uma extração bem sucedida de DNA (Ferreira e Gratapaglia, 1996).

Sabe-se que algumas espécies do cerrado possuem elevada quantidade de polifenóis e mucilagens foliares (Couch

e Fritz, 1990) que tornam o processo de extração e amplificação mais complexo necessitando de otimizações (Faleiro *et al.*, 2003).

## OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo testar 3 diferentes tipos de protocolo de extração de DNA, a fim de estabelecer qual o melhor método a ser empregado para *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) a fim de conduzir estudos de diversidade genética para esta espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas folhas de *Qualea grandiflora* em 3 estágios diferentes: jovem, intermediário e adulto. Imediatamente após a coleta, armazenou-se as folhas em sacos plásticos vedados, preservados em gelo e posteriormente conservados em geladeira à temperatura de aproximadamente 5 graus.

A extração foi realizada em até 24 horas após a coleta, pois as folhas oxidam facilmente e diversas tentativas de extração demonstraram que após este tempo não se obtêm resultados satisfatórios. Também foi testada a conservação de folhas desidratadas em sílica gel (Chase e Hills, 1991) para posterior extração.

Testou-se três diferentes métodos de extração de DNA: Faleiro *et al.*, 2003; Tai e Tanksley 1991, modificado por Molinari e Crochemore 2001, além do método CTAB conforme Ferreira e Gratapaglia (1996).

A diferença básica dos 3 métodos está no tipo de detergente utilizado: Faleiro *et al.*, (2003) e Ferreira e Gratapaglia (1996), utilizam CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), enquanto Tai e Tanksley (1991) usam o SDS (dodecil sulfato de sódio). Os detergentes tem por função romper as membranas celulares para que ocorra a liberação do DNA, além de inativar algumas enzimas (Bered, 1998).

Além disso, existe algumas diferenças na composição do tampão de extração dos métodos, que basicamente integra:

um agente tamponante estabilizador do pH em torno de 8,0; um sal para dissociar as proteínas do DNA e um inibidor de DNAses para proteger o DNA. (Bered, 1998).

## RESULTADOS

Os resultados foram insatisfatórios para o método de Faleiro *et al.*, (2003), e Tai e Tanksley 1991 (modificado), pois obteve - se o DNA apenas quando utilizadas as amostras de folhas jovens e intermediárias. Importante ressaltar que o primeiro método havia sido testado anteriormente com sucesso por Faleiro *et al.*, (2003) para dez espécies nativas do cerrado com alto nível de polifenóis e mucilagens foliares (o que torna a extração mais complexa).

Para o método CTAB, obtiveram - se amostras de qualidade em todos os estágios de maturação das folhas (jovem, intermediário e adulto). No entanto, este mesmo método não se mostrou eficiente para as amostras conservadas em sílica gel. Feres *et al.*, (2005) encontrou as mesmas dificuldades ao usar a conservação em sílica gel para extração de DNA de espécies do cerrado.

Como os estudos de diversidade genética serão conduzidos com amostragem em diversos locais, em diferentes épocas do ano, não se pode garantir a coleta de folhas apenas no estágio jovem, sendo preciso considerar o uso de um método que responda bem às diversas situações encontradas em campo.

## CONCLUSÃO

Sugere - se que os trabalhos de diversidade genética de *Qualea grandiflora* sejam conduzidos utilizando - se extração de DNA genômico com base no protocolo CTAB (Ferreira e Gratapaglia, 1996), utilizando - se de amostras

frescas, visto que foi o único método que ofereceu resultados satisfatórios para as folhas em 3 estágios de maturação.

Estes resultados são importantes para que se obtenham amostras de qualidade otimizando o tempo e os gastos de reagentes, bem como o uso de equipamentos.

## REFERÊNCIAS

- Bered, F. Extração de DNA-considerações e prática. In: Milach, S. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998, 141 p.
- Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R., Karia, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6p. (Comunicado Técnico, 92)
- Feres, F. Souza, A. P.; Amaral, M.C.E. e Bittrich, V. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Rev. bras. Bot.** vol.28, n.2, pp. 277 - 283. 2005
- Ferreira, M. E. e Gratapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2<sup>o</sup> ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 220 p., 1996
- Machado, R.B., *et al.*, **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservation International do Brasil, Brasília, 2004.
- Molinari, H. Crochemore, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. Para análises PCR - RAPD. **Rev. Bras. Frutic.** v. 23, n. 2, pp. 447 - 450, 2001.
- TAI, T.H., Tanksley, S.D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant tissue**. Plant Molecular Biology Report, v. 8, p.297 - 303, 1991.
- Torres, R. Novas fronteiras da biologia da conservação: a era da genômica. **Natureza e Conservação**. vol 1 . n2 pp. 16 - 18, 2003.