



<http://dx.doi.org/10.12702/VIII.SimposFloresta.2014.133-593-1>

Qualidade do DNA extraído de *Hancornia speciosa* (Gomes) a partir de folha e caule

Daniel F. Costa¹, Fábio A. Vieira¹, Kyvia P. T. das Chagas¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte (danielcosta86@gmail.com; vieirafa@ufrnet.br; kyviapontes@gmail.com)

Resumo: A qualidade do DNA é de fundamental importância quando se objetiva avaliar a diversidade genética em espécies arbóreas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Impurezas presentes no DNA podem influenciar negativamente as sensíveis reações da PCR. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do DNA extraído a partir de folha e caule de *Hancornia speciosa*. O DNA foi extraído do tecido caulinar e foliar de cinco indivíduos. A quantificação foi realizada por meio de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. O material genético obtido a partir do caule apresentou pureza semelhante ao extraído da folha, obtendo valores para a razão entre as absorvâncias (A_{260}/A_{280}) de 1,46 para o caule e de 1,42 para a folha, ficando, ambos, um pouco abaixo do valor considerado ótimo que é entre 1,5 e 2,5. O tecido caulinar apresentou um DNA de qualidade semelhante ao da folha, sendo sua utilização viável para estudos moleculares em *H. speciosa*.

Palavras-chave: Eletroforese; Espectrofotometria; Quantificação.

1. Introdução

A análise molecular é bastante empregada em estudos de diversidade genética que visam o melhoramento e a conservação de espécies florestais (REDDY et al., 2002) Com isso, a qualidade do DNA extraído é de fundamental importância para o bom funcionamento da PCR. Pesquisas recentes, com enfoque genético, realizadas para a *H. speciosa*, mostraram que o DNA extraído a partir tecido foliar apresentou boa qualidade, resultando em ampliações via PCR e posterior visualização de padrões de bandas após a eletroforese (COSTA; et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

Atualmente a extração de DNA a partir do tecido do caule vem sendo empregada com o intuito de facilitar a extração e aumentar a pureza do DNA extraído (NOVAES; RODRIGUES; LOVATO, 2009). O tecido foliar, por ser mais susceptível à herbívoros e a infecções, (COLEY; BARONE, 1996) geralmente produz metabólitos secundários como alcaloides, cianeto, polifenóis e terpenos (TURNER, 2001), que acabam por interferir na pureza do DNA dificultando as sensíveis reações que ocorrem durante a PCR. Sendo assim o tecido caulinar uma alternativa para a extração do DNA.

Um dos métodos empregados para se estimar a qualidade do DNA é a espectrofotometria. Nessa técnica o grau de pureza é obtido pela razão entre as absorvâncias a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}), onde a absorvância do comprimento de onda de 260nm indica presença de DNA e a de 280nm significa presença de proteína. Valores para essa razão entre 1,5 e 2,5 são considerados ideais (COLPAERT et al., 2005).

Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade do DNA de *Hancornia speciosa* extraído a partir dos tecidos foliar e de caulinar.

2. Material e Métodos

As amostras de folha e de caule de cinco indivíduos foram coletadas e acondicionadas em tubos plásticos de 2 ml, contendo CTAB 2x, identificados e transportados ao Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal – UFRN, Macaíba/RN. Em seguida foram armazenadas em freezer a -20°C , até o momento da extração do DNA.

Aproximadamente 250 mg de material foliar e de caule foram utilizados para a extração do DNA pelo método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Foram utilizados 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol pré-aquecido a 65°C em banho-maria. O DNA foi então armazenado em freezer até sua utilização.

Após sua extração, a concentração total de DNA foi mensurada utilizando o espectrofotômetro EpochTM assim como por meio de eletroforese em gel de agarose onde foi utilizado o GelRedTM como corante. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal, com gel de agarose 1% (p/v) e tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA), com a voltagem de 80 v, por quarenta minutos. Como referência foi utilizado o marcador molecular (Ladder) de 1.000 pares de base. Já o espectrofotômetro forneceu os dados referentes às absorvâncias dos

comprimentos de onda 260nm e 280nm. Onde a razão entre elas (A_{260}/A_{280}) foi utilizada para estimar a pureza do DNA.

3. Resultados e Discussão

O DNA foi obtido com sucesso a partir dos dois tecidos. Os dados obtidos por meio da análise do espectrofotômetro indicaram concentrações significativas de DNA útil (Tabela 1). A concentração média de DNA extraído a partir da folha foi duas vezes maior do que para o caule.

TABELA 1 - Concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e qualidade de DNA extraído da folha (F) e de caule (C), realizada em espectrofotômetro.

Folha	DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	Razão (A_{260}/A_{280})	Caule	DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	Razão (A_{260}/A_{280})
F1	935,376	1,19	C1	286,801	1,15
F2	1392,571	1,41	C2	443,03	0,92
F4	1131,098	1,58	C3	117,708	1,44
F5	983,048	1,50	C4	892,679	1,76
			C5	1007,648	2,04
Média	1110,523	1,42		549,57	1,46

Em relação à qualidade do DNA obtido, a razão encontrada entre os comprimentos de onda absorvidos (A_{260}/A_{280}) foi semelhante para os dois tecidos, onde atingiu um valor médio de 1,42 para as amostras de folha e de 1,46 para as de caule. Um valor entre 1,5 e 2,5 indica um DNA de boa qualidade e com pouca impureza (COLPAERT et al., 2005). Mesmo os valores encontrados estarem um pouco abaixo do valor esperado, as amostras podem ser consideradas úteis para uso. Os resultados da eletroforese confirmaram a presença de DNA nas amostras (Figura 1), porém não mostram correlação com os valores encontrados no espectrofotômetro.

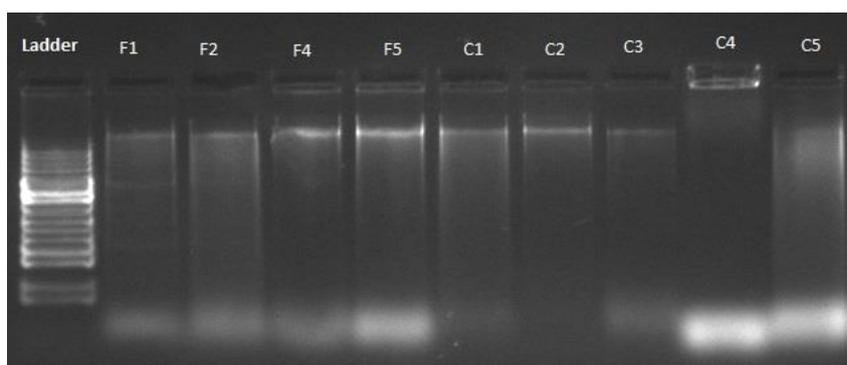


Figura 1 - Quantificação do DNA extraído de folha (F) e caule (C) por meio de eletroforese. Ladder com mil pares de bases.

4. Conclusão

A extração de DNA a partir do caule apresentou qualidade semelhante ao da folha, porém em menor quantidade. Sua utilização se mostra promissora para estudos moleculares baseados em PCR.

5. Referências

COLEY, P. D.; BARONE; J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 305–335. 1996. <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.305>>.

COLPAERT, N. et al. Sampling Tissue for DNA Analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. **Silvae Genetica**, v. 54, n.6, p.265-269, 2005.

COSTA, T. S. et al. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 46, n. 5, p.499-508, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000500007>>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15. 1987.

MARTINS, J. V. et al. Diversity and genetic structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *Speciosa* gomes in northeastern brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 4, p. 1143-1153, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000400023>>.

NOVAES, R.M.L.; RODRIGUES J.G.; LOVATO M.B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.1, p. 86-96, 2009. <<http://dx.doi.org/10.4238/vol8-1gmr542>>.

REDDY, M. P; SARLA, N; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding **Euphytica**, v.128, n.1, p. 9-17, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1020691618797>>.

TURNER, I. M.: **The ecology of trees in the tropical rain forest Cambridge**. Cambridge: University Press, 2001. 298p.