



ADEQUAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *DIPTERYX ALATA* VOG

THALIA DOS REIS AZEVEDO; MARIANA LAURA SOUZA DE ALMEIDA;
IZABELLY SIQUEIRA DE ALMEIDA; LUCIANA COELHO DE MOURA; PAULO
CESAR FLÔRES JÚNIOR

RESUMO

Introdução: *Dipteryx alata* Vog. é uma importante espécie nativa de ampla ocorrência ao longo do Cerrado brasileiro e elevado potencial econômico. A forte pressão das ações antrópicas sob o ecossistema em que está inserida e intensa atividade extrativista, ameaçam a diversidade da espécie. Além disso, a ausência de genótipos selecionados com características de interesse comercial, e de protocolos para a sua multiplicação são alguns dos principais obstáculos para a domesticação da espécie e o estabelecimento de cultivos comerciais. Desta forma se faz necessária a realização de pesquisas que venham de encontro com a conservação e identificação de genótipos promissores. **Objetivo:** Avaliar e adequar diferentes protocolos de extração de DNA a partir de folhas jovens e frescas de baru via seminal. **Materiais e métodos:** Tendo como base o protocolo padrão de Doyle e Doyle, foram realizadas modificações com diferentes momentos de suspensão em Thermo Shaker e testados diferentes quantidades de material genético para extração de DNA. **Resultados:** Com a utilização do Thermo Shaker não foi possível obter uma amostra homogênea para prosseguir o processo de extração. Demonstrando que o vórtex foi mais efetivo. **Conclusão:** Até o momento, o protocolo 1 apresentou resultados promissores na formação do *pellet* em quantidade satisfatória com modificação em momentos e aparelho de suspensão. O protocolo 1 produziu uma concentração média de DNA nas concentrações de 400 mg, o que é uma quantidade suficiente para a maioria das aplicações moleculares. E a utilização de material seminal, tempos e equipamentos está já adequada para estudos genéticos com essa espécie.

Palavras-chave: Baru.; Cerrado; Método CTAB;

1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado é composto por um mosaico de formações vegetais que se alternam desde densas formações florestais a áreas campestres, ocupando cerca de 25% do território brasileiro (DURIGAN; RATTER, 2016). Abrigando uma grande variabilidade de espécies, das quais muitas são endêmicas, é considerado um dos *hotspots* mundiais de diversidade, e um dos ecossistemas que mais tem sofrido modificação antrópica no Brasil (FERNANDES E PESSÔA, 2018). Segundo Klink (2013), mais da metade do bioma já foi desmatado cedendo lugar para pastagem e áreas de cultivo. Muitas espécies vegetais do Cerrado possuem elevado potencial para aproveitamento econômico (ALMEIDA et al. 1998), servindo como fonte de renda para famílias regionais através de diferentes segmentos, dentre eles uso medicinal, madeireiro e alimentício (SOUSA et al., 2018). Portanto, é imprescindível a criação de estratégias que auxiliem na conservação da biodiversidade remanescente do Cerrado.

Dipteryx alata Vog., pertencente à família Fabaceae, conhecida por diversos nomes como cumbarú, baru ou cumaru, é uma espécie perenifólia a levemente caducifólia, com copas

densas e arredondadas podendo atingir mais de 25 metros de altura (MOTA, 2013). Apesar de nativo, o baru não é endêmico do Brasil, ocorrendo também em países como Paraguai, Peru e Bolívia. Ainda assim, possui uma ampla ocorrência ao longo do Cerrado brasileiro compreendendo várias regiões do país como o Centro-Oeste, Nordeste, Norte e Sudeste. O tronco é liso com casca de cor cinza-claro, as folhas são alternas, pecioladas sem estípulas, com número de folíolos variando de 7 a 12. O fruto é do tipo drupa, ovoides e levemente achatado de coloração marrom, o endocarpo lenhoso contendo uma única semente por fruto (VIEIRA et al., 2010). Sua madeira possui alta densidade, durabilidade, compacta e resistente ao ataque de fungos e cupins (SANO, 2016). A maturação de seus frutos ocorre no período da seca, entre os meses de julho a outubro, sendo bastante consumidos *in natura*, utilizados na culinária e cosméticos, servindo ainda como fonte de alimento para animais silvestres e bovinos (GARCIA, 2020). Essa espécie desempenha um importante papel socioeconômico na geração de renda de diversas famílias extrativistas devido à multiplicidade de seus usos. Embora haja um interesse crescente na domesticação e cultivo do baru, o extrativismo ainda é uma prática comum que pode gerar desafios à sustentabilidade da espécie. Consequentemente, torna-se crucial estudos acerca da diversidade genética que auxiliem na criação de estratégias e ferramentas para conservação e uso sustentável da mesma (PIRES, 2012).

O estudo da variabilidade genética através dos marcadores moleculares requer a obtenção de DNA puro e em quantidades reproduzíveis para o sequenciamento e amplificação por meio de PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (YAMAMOTO et al., 2013). A grande presença de metabólitos secundários, polissacarídeos, fenóis e taninos na maior parte das espécies vegetais do Cerrado, compreendem a principal dificuldade na extração e purificação do DNA vegetal, uma vez que esses contaminantes interferem na atividade da enzima Taq DNA polimerase (OLIVEIRA et al., 2010).

São vários os protocolos de extração de DNA vegetal descritos na literatura. Comumente, os métodos mais tradicionais são baseados no protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), pelo uso do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), responsável pela lise da membrana celular e precipitação do material genético, trazendo adaptações para diferentes espécies. Portanto, é fundamental a aprimoração de protocolos de extração de DNA com vistas ao desenvolvimento de métodos eficazes, rápidos, econômicos e seguros em estudos envolvendo espécies vegetais do Cerrado (ZANETTI et al., 2019).

Diante do exposto, este trabalho visa testar diferentes protocolos de extração de DNA vegetal baseados no método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com adaptações do protocolo padrão utilizado e com isso buscando avaliar e melhorar a eficiência na extração do DNA vegetal de *Dipteryx alata* Vog.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho tem sido desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), campus Cuiabá. Neste trabalho, estão sendo avaliadas três diferentes populações, para as quais objetiva-se compreender a diversidade genética e estimar parâmetros a partir de ferramentas biométricas que permitem a quantificação de caracteres morfológicos, e por meio de marcadores moleculares após extração de DNA genômico. A primeira população é constituída por um lote de sementes de 31 matrizes georreferenciadas no município de Cáceres – MT. A segunda população é formada por 8 matrizes das quais foram realizadas coletas dos frutos na área da Fazenda Experimental UFMT, localizada no município de Santo Antônio do Leverger a 35 Km de Cuiabá. Por fim, a terceira população possui 27 matrizes localizadas no campus da universidade.

Após a coleta dos frutos deu-se início ao beneficiamento para obtenção da castanha, concomitantemente, foram realizadas medições biométricas em fruto, endocarpo e semente para posteriores análises. Os frutos foram mantidos imersos em água durante 24 horas para

facilitar o despolpamento por meio de facas e canivetes até o surgimento do endocarpo duro e lenhoso. Seguida remoção da polpa, os endocarpos foram dispostos sobre a bancada garantindo assim o dessecamento e facilitando seu rompimento pelo uso de morsa mecânica. Logo, as sementes foram identificadas e acondicionadas em refrigerador.

Para obtenção de folhas jovens e frescas, foram conduzidas a germinação da população Cáceres em BOD com fotoperíodo de 12 horas. Selecionou-se 20 sementes por matriz, separadas em duas caixas gerbox. Para superação de dormência utilizou-se escarificação mecânica do lado oposto do eixo embrionário com lixa de grão 100. A desinfestação foi feita utilizando solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 5 minutos, e o substrato empregue foi “entre” vermiculita, formando duas camadas de modo que as sementes ficassem no meio. Após 7 dias, pode-se observar sucesso parcial na germinação e ao final de duas semanas atingiu sua completude.

Sequencialmente, preparou-se as seguintes soluções necessárias para extração de DNA baseadas no protocolo padrão CTAB descrito por Ferreira e Gratapaglia (1995): CTAB 2x, CIA (24:1), EDTA 0,5 M pH 8,0 e TRIS HCl 1 M pH 8,0.

Para obtenção de quantidade satisfatória de *pellet*, testou-se três diferentes quantidades de material genético: 200 mg, 300 mg e 400mg, dos quais foram realizadas 9 repetições para cada matriz.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura descreve vários protocolos de extração de DNA para tecido fresco e também com tecido armazenado. Primeiramente, foram realizados protocolos que utilizam tecidos frescos para o processo de extração de DNA genômico. Na primeira etapa da pesquisa, seguiu-se o protocolo padrão descrito por Doyle e Doyle (1987). É importante ressaltar que não foi efetivo na primeira avaliação laboratorial devido à formação apenas de duas fases líquidas, sendo assim, sem a formação do *pellet* de DNA. Após essa primeira avaliação, foi necessário testar cada tempo do processo de extração de DNA de *D. alata* para verificar a especificidade que a técnica deve ter para esta espécie.

Figura 1: Formação de duas fases líquidas, sem *pellet* de DNA.



Fonte: Autoral.

Primeiramente, avaliou-se as quantidades de DNA necessárias para melhor otimização

de utilização do DNA. Utilizou-se três quantidades diferentes de material fresco a fim de encontrarmos, já na primeira fase do protocolo, a quantidade ideal.

Outro aspecto importante no procedimento de extração foi a fase de homogeneização da amostra com agitação. Utilizou-se os agitadores vórtex e Thermo Shaker. Os microtubos foram suspensos em Thermo Shaker sob três diferentes tempos: 5', 10' e 1 hora com velocidade de 14000 rpm. Em vórtex, os microtubos foram suspensos durante 5' conforme protocolo descrito por Ferreira e Gratapaglia (1995). Com a utilização do Thermo Shaker não foi possível obter uma amostra homogênea para prosseguirmos o processo de extração. Demonstrando que o vórtex foi mais efetivo.

Foi possível a visualização de DNA em todas as quantidades de material genético testados no protocolo 1. Porém, as amostras com 200 e 300 mg não apresentaram uma mínima quantidade de DNA para ser reproduzível quando comparada à de 400 mg.

Através da utilização de uma amostra de 400 mg de tecido vegetal fresco e com utilização de vórtex foi possível obter amostra de DNA formada em um *pellet* depositada ao fundo do microtubo.

Figura 2: Formação do *pellet* de DNA genômico de *D. alata* Vog. ao fundo do microtubo.



Fonte: Autor.

A pesquisa para adequação de protocolo encontra-se ainda em andamento e demonstra resultados satisfatórios para essa proposição inicial. Os próximos passos serão avaliar amostras de material vegetal congelado por 60 dias e adaptações em relação as concentrações dos componentes do protocolo para material seminal e material de indivíduos adultos.

4 CONCLUSÃO

O nosso protocolo produziu uma concentração média de DNA nas concentrações de 400 mg, o que é uma quantidade suficiente para a maioria das aplicações moleculares. E a utilização de material seminal, tempos e equipamentos está já adequada para estudos genéticos com essa espécie.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro ao Projeto 421539/2023-2.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1. ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p. ISBN 85-86764-02-7.

DURIGAN, G.; A. RATTER, J. The need for a consistent fire policy for Cerrado conservation. **Journal of Applied Ecology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 11-15, 2016.

FERNANDES, P. A.; PESSÔA, V. L. S. O cerrado e suas atividades impactantes: uma leitura sobre o garimpo, a mineração e a agricultura mecanizada. **Observatorium: Revista Eletrônica de Geografia**, [S. l.], v. 3, n. 7, 2018.

GARCIA, DCF; CUNHA, JUGF; BRANDÃO, M.M.; JÚNIOR, A. B. C. Análise da Diversidade Genética do Barú utilizando Marcadores Moleculares ISSR. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 48949–48960, 2020.

KLINK, C.A. Policy intervention in the Cerrado savannas of Brazil: changes in land use and effects on conservation. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. (Eds.). **Ecology and conservation of the maned wolf: multidisciplinary perspectives**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, p. 293-308, 2013.

MOTA, E. E. S. **Caracterização fenotípica e variação genética quantitativa em *Dipteryx alata* vog. (barueiro) do Cerrado**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas.) - Curso de Agronomia, Universidade Federal De Goiás, Goiânia, 2013.

OLIVEIRA, L. V. R. *et al.* Genetic Analysis of Species in the Genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba – PR, v.53, n. 2, p.375 – 387, mar. 2010.

PIRES, M. V. V. **Diversidade genética de coleções de trabalho de fruteiras nativas do cerrado com base em características morfológicas e análises do DNA**. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SANO, S. M.; BRITO, A. M.; RIBEIRO, J. F. Alimentícias: *Dipteryx alata* - Barú. Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste. In: VIEIRA, F. R.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**. Brasília – DF, (MMA), 2016. cap. 5, p. 203-215.

SOUSA, F. F. *et al.* Exigências Nutricionais de Mudanças de *Dipteryx alata* sob Limitação Nutricional. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 102-114, jan. 2018. ISSN: 1980-5098.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. cap. 5, 76-99 p. ISBN: 978-85-7383-482-6.

YAMAMOTO, E. L. M.; *et al.* Otimização de Protocolo para Extração de DNA em Umbu-Cajazeira. *In: CONGRESSO NACIONAL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS*, 2., 2013, Recife. **Resumo expandido** [...]. Recife: Nupeea Livraria e Editora, 2013.

ZANETTI, G.T. *et al.* Protocolo para Extração de DNA Genômico de *Ochroma pyramidale*. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 8, n. 1, p. 73-84, 2019. ISSN: 2316-1809.