

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

Edjair da Silva Oliveira

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA MICROEXTRAÇÃO
DE DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO**

Cuité

2013

Edjair da Silva Oliveira

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA MICROEXTRAÇÃO
DE DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO.**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos

Cuité

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

O48e Oliveira, Edjair da Silva.

Estabelecimento de protocolos para microextração de DNA de plantas do semiárido. / Edjair da Silva Oliveira. – Cuité: CES, 2013.

40 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2013.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Caatinga. 2. CTAB. 3. Xerófilas. 4. *Caesalpinia pyramidalis*. I. Título.

CDU 597

Edjair da Silva Oliveira

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA MICROEXTRAÇÃO
DE DNA DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Prof^ª. Dra. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora) – UFCG/CES

Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan – UFCG/CDSA

Prof. Dr. Luiz Sodré Neto – UFCG/CES

Cuité, 26 de abril de 2013.

*Aos meus pais, Ednaldo e Iraneide por toda
educação, honestidade e demais princípios
morais a mim ensinados, sem vocês cada etapa se
tornaria ainda mais difícil.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve do meu lado dando sabedoria e força de vontade para nunca desistir e sempre alcançar minhas metas.

Aos meus pais, Ednaldo e Iraneide, por educação que me deram, por me estimularem a seguir em frente mesmos nos momentos mais difíceis e me apoiarem em minhas decisões.

Aos meus irmãos, Edjael e Edjaclécio, pelo apoio incentivo e sugestões dadas durante todo o curso.

A minha orientadora, Magnólia de Araújo Campos, pelos ensinamentos, a excelente orientação, conselhos, paciência e por acreditar na minha capacidade em desenvolver as atividades acadêmicas a mim atribuídas.

À Gláucia, pela disponibilidade e boa vontade ajudando-me nas atividades do laboratório.

À Arly, pela disponibilidade, conselhos, paciência, dicas e por toda a contribuição durante o trabalho.

A todos os integrantes do LBiotec, pela amizade, experiências compartilhadas e também pelos momentos de descontração que passamos juntos, pois foi uma honra trabalhar ao lado de todos.

Às técnicas de laboratório Jaqueline e Danila, pelo auxílio e ensinamentos repassados.

Aos professores do curso de Graduação em Ciências Biológicas, por todos os conhecimentos científicos mediados durante essa jornada.

Enfim aos meus amigos, por todas as brincadeiras, conselhos e por me incentivarem a não desistir, estando comigo nos momentos que precisei durante o curso.

RESUMO

O Bioma Caatinga localiza-se na região de clima semiárido do Nordeste brasileiro e é constituída de vegetais xerófilos, como é o caso das cactáceas (mandacaru e xique-xique). Na última década se observa o crescente interesse de explorar os recursos genéticos de plantas da região semiárida visando compreender mecanismos de resistência à seca, bem como a busca por biomoléculas envolvidas na resistência a doenças causadas por patógenos e pragas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para a extração do DNA de folhas de plantas nativas ou introduzidas na Caatinga, de acordo com as características fisiológicas das espécies. Para tanto, três protocolos para extração de DNA genômico de plantas da Caatinga foram elaborados, testados e comparados em 10 espécies vegetais nativas ou introduzidos na Caatinga. A coleta de material vegetal ocorreu no do Horto Florestal Olho d'Água da Bica, Centro de Educação e Saúde (CES) /UFCG, localizado em de Cuité-PB e no Sítio Linha dos Pereiras, em Jaçanã RN. Como resultado, foi possível isolar os DNAs genômicos das 10 espécies vegetais selecionadas pelos três métodos comparados, embora apresentando diferenças significativas na eficiência quanto à quantidade e qualidade do DNA isolado, de acordo com a estimativa realizada em espectrofotômetro Nanodrop. De modo geral, os Protocolos I e III produziram as mais elevadas quantidades de DNAs isolados para igual número de espécies estudadas. Entretanto, o Protocolo I produziu maior quantidade de DNA de três das quatro espécies que possuem folhas tenras, enquanto que o Protocolo III produziu maior quantidade de DNAs em quatro das seis espécies de difícil maceração.

Palavras-chave: Caatinga, CTAB, Xerófilas, *Caesalpinia pyramidalis*.

ABSTRACT

The Caatinga biome is located in semiarid climate region of Northeast Brazil and consists of vegetables xerophilos, as is the case of cacti (mandacaru and xique-xique). In the last decade has seen a growing interest in exploring the genetic resources of plants from semiarid region in order to understand mechanisms of resistance to drought, as well as the search for biomolecules involved in resistance to diseases caused by pathogens and pests. The objective from this work was to establish protocols for extraction of genomic DNA from Caatinga plant leaves. Then, three protocols were for extraction of genomic DNA from Caatinga plants were elaborated, tested and compared in 10 plant species native or introduced Caatinga, according to physiological characteristics of the species. Plant materials were collected in the Horto Florestal Olho D'Água da Bica, Health and Education Center CES/UFCG, located in the Cuité-PB and Line of Pear Site in Jacana-RN. As a result, it was possible to isolate genomic DNA from 10 plant species selected by the three methods compared, albeit with significant differences in efficiency on the quantity and quality of DNA isolated according to the estimation made in Nanodrop spectrophotometer. In general, the Protocols I and II produced the highest amounts of isolated DNAs for an equal number of species. However, Protocol I produced a larger amount of DNA of three of the four species that have tender leaves, whereas Protocol III produced a larger amount of DNA in four of the six maceration difficult species.

Keywords: Caatinga, CTAB, Xerófilas, *Caesalpinia pyramidalis*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática de etapas de extração de DNA	17
FIGURA 2	Imagens ilustrativas dos locais de coletas de espécies vegetais em áreas de Caatinga da região do Semiárido nordestino	21
FIGURA 3	Imagem ilustrativa de coleta da espécie palma forrageira	22
FIGURA 4	Etapas básicas da extração de DNA de plantas, indicando os pontos de modificações nos protocolos deste trabalho	23
FIGURA 5	Procedimentos durante extrações de DNA	26
FIGURA 6.	Preparativos para eletroforese de DNA	27
FIGURA 7.	Espécies nativas e introduzidas no semiárido selecionadas e agrupadas como de folhas de difícil maceração	29
FIGURA 8	Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% comparando três protocolos de extração e através dos DNAs obtido pelos mesmos	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais problemas encontrados no decorrer do isolamento de DNA de plantas, apresentando as possíveis causas e soluções	18
TABELA 2	Identificação dos protocolos testados	24
TABELA 3	Espécies selecionadas no Bioma Caatinga para extração do DNA genômico	28
TABELA 4	Quantidades de DNAs das espécies selecionadas estimadas por espectrofotômetro Nanodrop	31
TABELA 5	Sequência para aplicação do DNA em gel de agarose 0,8%	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soroalbumina bovina
CES	Centro de Educação e Saúde
CIA	Clorofórmio: álcool isoamílico
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Acido desoxirribonucleico
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
NaCl	Cloreto de sódio
PB	Paraíba
PVP	Polivinilpirrolidona
RN	Rio Grande do Norte
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Objetivos	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Características da Caatinga	14
2.2 O Processo de Extração de DNA Genômico de Plantas	15
2.3 Principal método para extração de DNA genômico em espécies vegetais distintas	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Coleta e Seleção de Espécies Vegetais de Caatinga	20
3.2 Extração de DNA de Espécies Seleccionadas	22
3.3 Estimativa da quantidade e qualidade dos DNAs por espectrofotômetro e eletroforese	26
4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	28
4.1 Seleção e coleta de espécies vegetais no Bioma Caatinga, Semiárido do Nordeste	28
4.2 Determinação da eficiência de três protocolos de extração de DNA sobre a qualidade e quantidade do DNA isolado das espécies vegetais seleccionadas	30
4.3 Comparar os três protocolos e identificar protocolo(s) adequado(s) as características fisiológicas das espécies	35
5. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O Bioma Caatinga localiza-se na região de clima semiárido do Nordeste brasileiro e é constituído de vegetais xerófilos, como é o caso das cactáceas (mandacaru e xique-xique). Este Bioma representa o principal ecossistema da região Nordeste, com área de aproximadamente 800.000 km² (PRADO, 2005), cujas riquezas genético-biológicas ainda são pouco exploradas cientificamente.

Na última década se observa um crescente interesse de explorar os recursos genéticos de plantas da região semiárida visando compreender mecanismos de resistência a seca, bem como a busca por biomoléculas envolvidas na resistência a doenças causadas por patógenos e pragas. Neste contexto, pesquisas que estão sendo desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia do CES buscam novos genes que codificam proteínas antimicrobianas e que ocorrem naturalmente em plantas, especialmente as proteínas do tipo PR-5, como as osmotinas (CAMPOS et al, 2007; VAN LOON et al, 2006).

Visando estudar esses genes, é necessário extrair o ácido desoxirribonucleico (DNA), de espécies vegetais nativas ou introduzidas, na região. A obtenção de procedimentos moleculares adequados são relevantes para o isolamento de DNA a partir de tecidos vegetais com texturas diferentes e bom rendimento.

De acordo com Romano (1998) estudos moleculares dependem diretamente da qualidade do DNA extraído. Por isso é importante encontrar um método que tenha eficiência e obtenha material de boa qualidade, nem sempre o método de extração de DNA para uma espécie funciona em espécies diferentes (CSAIKL et al., 1998). Devido a isso a maior parte dos protocolos são ajustados para uma única espécie.

Dentre a diversidade de protocolos descritos aqueles muito simples que extrai o DNA com rapidez e baixo custo, como descrito por Cheung; Hubert e Landry (1993) podem parecer boa opção para utilização, porém na maioria das vezes não produzem DNA de boa qualidade e assim compromete estudos posteriores a essa etapa.

Pode-se dizer que o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade são considerados passo chave para bons resultados em estudos posteriores (KIDWELL; OSBORN, 1992). O DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas assim pode ser amplificado (MILACH, 1998). Os problemas no isolamento do DNA vegetal são geralmente, relacionados ao co-isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários (VIDAL; COUTINHO; HOFMAN, 2006; ROMANO, 1998). Com

base nesses relatos para realizar extrações se utiliza folhas jovens. Segundo Mazza e Bittencourt (2000), tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbívora, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Em folhas jovens tais compostos encontram-se ausentes ou em baixas concentrações (MITTOTN et al., 1979).

Buscando solucionar os problemas encontrados durante a extração, ocorrem ajustes nos protocolos de extração de DNA genômico vegetal, os mesmos são adequados de acordo com as características de uma espécie vegetal. Na literatura encontram-se vários métodos para extração de DNA, o isolamento do DNA vegetal é fundamental para análise da estrutura e organização do genoma de plantas. De acordo com Romano (1998) a maior parte dos protocolos de extrações é uma variação do protocolo de Doyle; Doyle e Hortorium (1987) e o descrito por Dellaporta; Wood e Hicks (1983), que para Molinari e Crochemore (2001) é considerado um dos melhores devido realização de várias etapas de purificação, durante o processo de extração do DNA genômico.

Neste sentido, o protocolo que amplificar maior parte dos DNAs extraídos será utilizado como protocolo padrão para posteriores estudos genômico no laboratório de biotecnologia do Centro de Educação e Saúde CES/UFCG.

1.1 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estabelecer protocolos para a extração do DNA de folhas de plantas nativas ou introduzidas na Caatinga, de acordo com as características fisiológicas e morfológicas das espécies.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar 10 espécies vegetais nativas ou introduzidas na Caatinga, com características de interesse para prospecção gênica;
- Verificar a eficiência de três protocolos de extração de DNA sobre a qualidade e quantidade do DNA isolado das espécies vegetais selecionadas;
- Comparar os três protocolos e identificar protocolo(s) adequado(s) as características fisiológicas e morfológicas das espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da Caatinga

O Bioma Caatinga corresponde a cerca de 10% do território nacional e aproximadamente 70% da região nordeste (GONÇALVES, 2011). O bioma estende-se pelos estados de Sergipe, Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, parte do Maranhão e Região norte de Minas Gerais (BERNADES, 1999). Para Abílio (2010), a Caatinga apresenta duas estações durante o ano sendo a estação chuvosa e a estação seca, sendo que durante a estação de seca quase toda a sua vegetação entra em período de dormência.

Entre os biomas existentes no Brasil, a Caatinga foi muito desvalorizada com vegetação pouco estudada, essa situação ocorre devido a uma crença não mais aceita que sua vegetação resulta de outra sem espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2002). Para Velloso et al. (2002), a Caatinga é um dos mais negligenciados biomas brasileiros, nos mais diversos aspectos, e também sempre foi um dos mais ameaçados.

A flora da Caatinga apresenta 1.512 espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2002). A vegetação da região apresenta características xerofílicas entre as quais se destacam folhas que de modo geral são finas, inexistentes ou modificadas em espinhos para evitar a predação ou diminuir a transpiração (ABÍLIO, 2010)

De acordo com Sampaio et al. (2006) pode-se dizer que a vegetação da região encontra-se dividida em oito grupos, que são: plantas produtoras de cera, forrageiras, frutíferas, apícolas, ornamentais, produtoras de fibras, medicinais e madeireiras. Segundo Ramos, Queiroz e Pereira (2007), dos grupos descritos são poucas as espécies que estão sendo estudadas dentro de enfoque de recursos genéticos. Entretanto, os recursos genéticos de plantas da região possibilitam ações que permitam integrar o elenco de atividades que possam promover o desenvolvimento da região Semiárida.

Para Sampaio et al. (2006), pouca importância foi dada para estudos moleculares em plantas da Caatinga, levando em consideração que a maior parte dos trabalhos realizados na região foram feitos com espécies exóticas. Neste sentido, as espécies vegetais dessa região podem possuir cura para diversas doenças, assim como serem utilizadas para melhoramento genético, entre outros, visto que ainda poucas foram exploradas.

As plantas da região apresentam genes do tipo PR-5 que possuem capacidade de codificar proteínas antimicrobianas e antifúngicas tornando plantas resistentes a patógenos (CAMPOS et al, 2007; VAN LOON et al, 2006).

Com intuito de aprimorar os conhecimentos a respeito das espécies vegetais regionais, por meio de estudos moleculares sobre o patrimônio genético, o primeiro passo consiste em extrair o DNA genômico de espécies presentes na região de Caatinga.

2.2 O Processo de Extração de DNA Genômico de Plantas

O processo de extração de DNA genômico em plantas pode ser denominado por macroextração sendo os mesmos realizados através de tubo falcon de 50 mL e pode ser denominado de microextração quando é utilizado para o mesmo microtubos menor que 2 mL.

A análise genética de uma população de plantas, por meio de DNA, deverá ocorrer em razão do isolamento e purificação de quantidades tidas como suficientes de DNA, devendo ser de boa qualidade (KIDWELL; OSBOM, 1992). Portanto, o DNA deverá ser íntegro, totalmente livre de impurezas podendo ser amplificado (MILACH, 1998).

O isolamento e purificação de DNA vegetal geralmente apresentam problemas, pois com relação a este processo Couch e Fritz (1990) afirmam que: no decorrer da extração são liberados compostos polifenólicos e terpenóides, principalmente de tecidos de folhas maduras, que acabam por aderir-se ao DNA, de forma a inibir a digestão por meio de endonucleases.

Deste modo, verifica-se que o rompimento da célula acaba por liberar os polissacarídeos, sendo estes de difícil separação do DNA, inibindo as diferentes DNAs polimerases e também as enzimas de restrição (LODHI; WEEDEN; REISCH, 1994), assim impedindo bons resultados em estudos posteriores a etapa.

Visando obter bons resultados é necessário utilizar folhas jovens para as extrações, pois nessas estão ausentes ou em concentrações baixas, compostos como fenólicos (MITTON et al., 1979). As folhas maduras são utilizadas para extrair o DNA somente na ausência de folhas jovens tendo em vista que a extração de DNA considerada como de boa qualidade é considerado como um passo necessário para obtenção de bons resultados.

O isolamento como também a purificação de ácidos nucleicos é imprescindível à separação dos outros constituintes celulares. Em relação aos ácidos nucleicos, é indispensável se manter a integridade de todas as moléculas, devendo estas permanecerem inalteradas no decorrer do processo de extração. Nesse sentido é necessário adicionar-se alguns componentes ao tampão de extração, já que na maioria dos métodos utilizado para o mesmo o passo inicial é o rompimento da parede celular e das membranas celulares, liberando a molécula de DNA, para isso utilizam-se detergentes, CTAB ou SDS (sulfato de sódio dodecil).

O rompimento da parede celular bem como das membranas celulares poderá ocorrer por meio da maceração de forma direta macerando as folhas no tampão de extração, utilizando cadinho e pistilo. Assim, após a maceração para que o DNA seja realmente considerado como de boa qualidade, é necessário eliminar moléculas presentes e para isso se utiliza enzimas como proteinase K e ribonuclease A (RNase A). No intuito de se evitar a desnaturação de proteínas, bem como a eliminação de polifenóis oxidantes do DNA são adicionados de β -mercaptoetanol e polivinilpirrolidona (PVP) ou soroalbumina bovina (BSA), (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Outro problema encontrado durante a extração é a presença de lipídios, para eliminá-los é necessário adicionar aos DNAs uma solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (CIA) esse processo ocorre após serem retirados do banho maria, a quantidade certa de CIA adicionado é compatível ao volume dos DNAs, após se adicionar precisa-se misturá-los, esse procedimento acontece no vortex, com tempo aproximadamente 5 minutos. O passo seguinte é centrifugar, nessa etapa há uma separação em duas fases divididas em superior e inferior, devendo o DNA permanecer sempre na fase aquosa superior.

Após todo o procedimento feito é necessário a recuperação dos ácidos nucleicos totais por meio da precipitação em isopropanol ou etanol, para o DNA desidratar sua molécula, pois permitem a incidência de sua precipitação no final do processo (ROMANO; BRASILEIRO,1999).

2.3 Principal método para extração de DNA genômico em espécies vegetais distintas

O método mais utilizado, como já mencionado, é o baseado na utilização do detergente CTAB, presente no tampão de lise que tende a solubilizar as membranas possibilitando a formação com o DNA de um complexo que acaba por facilitar uma precipitação posterior (WEISING et al., 1995). Na Figura 1 é possível verificar as principais etapas de extração de DNA de plantas por CTAB.

FIGURA 1 – Representação esquemática as etapas de extração de DNA.



Fonte: DADOS DA PESQUISA.

O método CTAB é mais utilizado atualmente para extrações em diferentes tipos de espécies vegetais, sendo capaz de obter eficiência em um número muito amplo de espécies. Como qualquer método esse protocolo também apresenta problemas, porém na maioria dos casos são fáceis de serem solucionados. Na Tabela 1 é possível verificar os principais problemas encontrados no decorrer do isolamento de DNA vegetal.

TABELA 1 – Principais problemas encontrados no decorrer do isolamento de DNA de plantas, apresentando as possíveis causas e soluções.

PROBLEMA ENCONTRADO	CAUSA	SOLUÇÃO
Amostra de DNA marrom ou muito escura	Contaminação por polifenóis	Adição de PVP-40 e/ou BSA no tampão de extração, a concentração de 1 a 2%. Aumento da concentração de β - mercaptoetanol para até 5%.
Amostra de DNA com aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso.	Contaminação por polissacarídeos	Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio.
O DNA antes da digestão com enzimas de restrição, apresenta arraste vertical no gel.	DNA degradado por contaminação por DNAses ou quebra mecânica durante extração com clorofórmio.	Extrato de DNA via núcleos celulares. Verificar o pH do tampão de extração. Este deve estar por volta de 8,0. Se o pH estiver por volta de 7,0 facilitará a ação de DNAses durante a extração, mistura das fases aquosa e de clorofórmio menos vigorosamente.
O DNA apresenta forma cônica no gel, em direção ao pólo positivo.	Excesso de DNA aplicado no gel. Contaminação por polissacarídeos.	Aplicar menos DNA no gel. Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio.
Após a corrida, muito DNA retido no poço do gel.	Contaminação por polissacarídeos.	Extração de DNA via núcleos celulares. Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio. Extração de DNA via núcleos celulares.
Após digestão com enzima de restrição, a amostra apresenta uma corrida com muito DNA nas laterais e pouco DNA no centro.	Contaminação por polissacarídeos. Excesso de DNA aplicado no gel.	Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio. Extração de DNA via núcleos celulares. Aplicação de menos DNA no gel.
O DNA no gel apresenta contaminação com RNA.	Contaminação por RNA	Adicionar RNase, a uma concentração final de 100 μ g/ml e incubar a 37° C por 20 minutos.

Fonte: ROMANO E BRASILEIRO (1999).

Existem outros protocolos que são utilizados para as variações apresentadas (DELLAPORTA; WOOD; HICKS, 1983). Um método alternativo tem por fundamento a precipitação simultânea de proteínas e também polissacarídeos por meio da presença de SDS e das altas concentrações de acetato de potássio (ROMANO; BRASILEIRO, 1999), no entanto não é tão eficiente quanto o CTAB.

Por meio de modificações em algumas das etapas citadas na Figura 1, as maiorias dos protocolos presentes na literatura tendem a ajustar o protocolo CTAB para resolver os problemas específicos da espécie ou tecido em questão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Seleção de Espécies Vegetais de Caatinga

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da Universidade Federal de Campina Grande, Cuité PB.

Durante o período de outubro á dezembro de 2012, espécies vegetais nativas ou introduzidas na Caatinga foram selecionadas ao acaso com base nos critérios de plantas de Caatinga com folhas de difícil de maceração e folhas de fácil maceração, além de características de interesse tais como resistência à seca ou a patógenos.

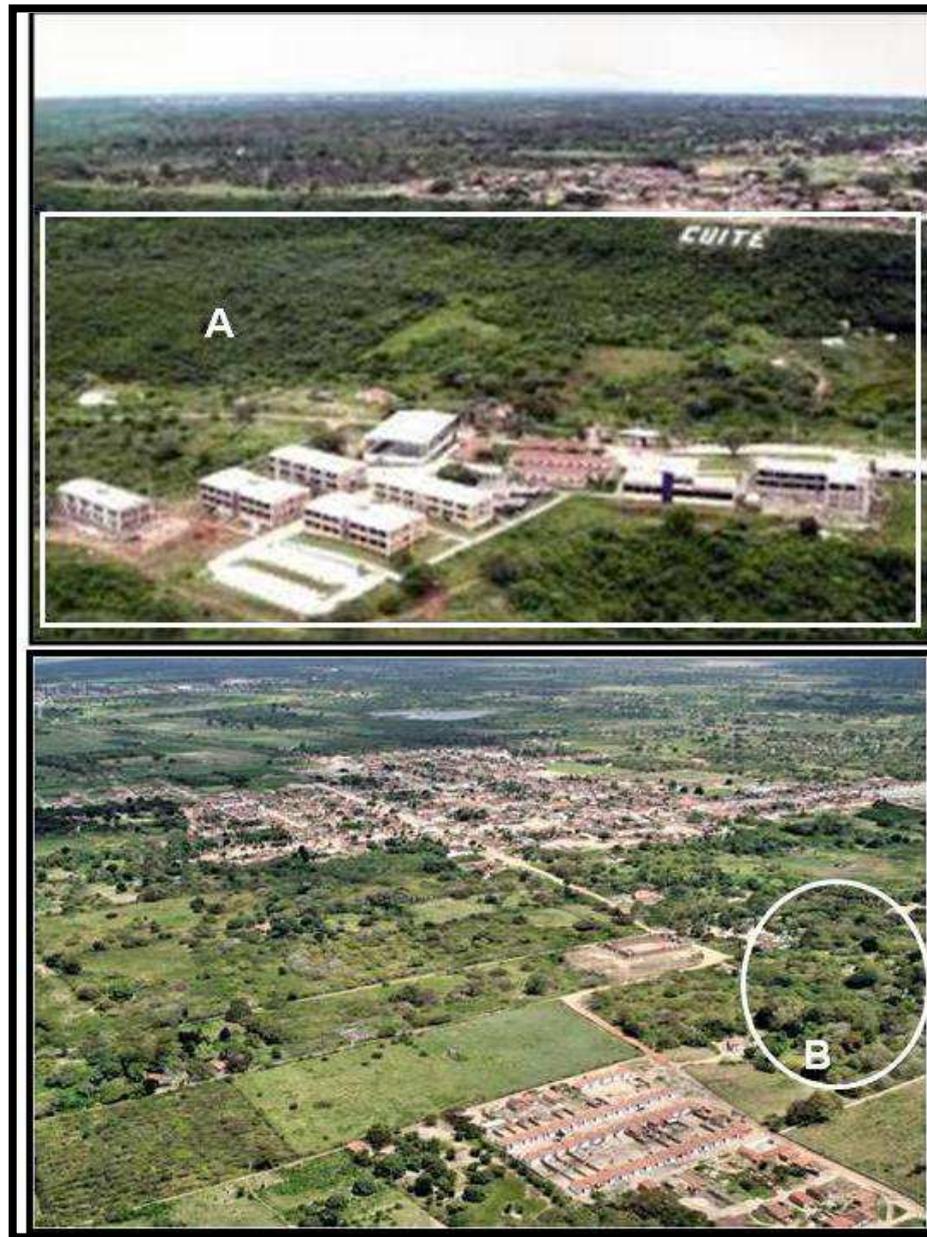
A estratégia envolveu a seleção e caracterização de 10 espécies vegetais, depois de localizadas foram mapeadas e fotografadas para identificação, estas foram selecionadas com base no interesse de estuda-las e pela disponibilidade ocorrida devido à época e seca na região encontram-se poucas plantas que ainda possuam folhas jovens, então se subentende que todas as espécies presentes são plantas resistentes à seca.

As coletas de materiais vegetais foram realizadas em duas áreas de estudo, no Horto Florestal Olho D'água da Bica localizado no Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da Universidade Federal de Campina Grande, município de Cuité - PB e Sítio Linha dos Pereiras, localizado no município de Jaçanã – RN (Figura 2).

Cuité está localizada de acordo com Teixeira (2003) na mesorregião do Agreste paraibano microrregião do Curimataú Ocidental ($6^{\circ}29'06''S/36^{\circ}9'24''O$), com altitude de 667 metros acima do nível do mar e uma área total de $758,6\text{km}^2$ (Figura 1). Enquanto que Jaçanã está localizado na mesorregião Agreste Potiguar e microrregião Borborema Potiguar ($6^{\circ}25'33''S/36^{\circ}12'7''O$) com altitude de 664 metros acima do nível do mar com área de $54,558\text{km}^2$.

Ambas as cidades estão presente na região de caatinga nordestina apresentando mesma vegetação. Na figura 2 está representada abaixo uma vista aérea parcial das mesmas.

FIGURA 2 – Imagens ilustrativas dos locais de coletas de espécies vegetais em áreas de Caatinga da região do Semiárido nordestino.



A- Vista aérea parcial do Florestal Olho D'água da Bica, CES/UFCG, município de Cuité-PB. B- Vista aérea do Sítio Linha dos Pereiras, município de Jaçanã – RN.

Fonte: GOOGLE IMAGENS. Acessado em 02 de fevereiro de 2013.

O procedimento de coleta a retirada de folhas jovens, uma espécie por vez. Após a coleta, as folhas foram embrulhadas com papel alumínio, identificadas e colocadas em caixa isotérmicas contendo gelo para se evitar a oxidação das mesmas (Figura 3). Logo em seguida as folhas foram transportadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CES/UFMG e imediatamente submetidas à extração.

FIGURA 3: Imagem ilustrativa de coleta da espécie palma forrageira.

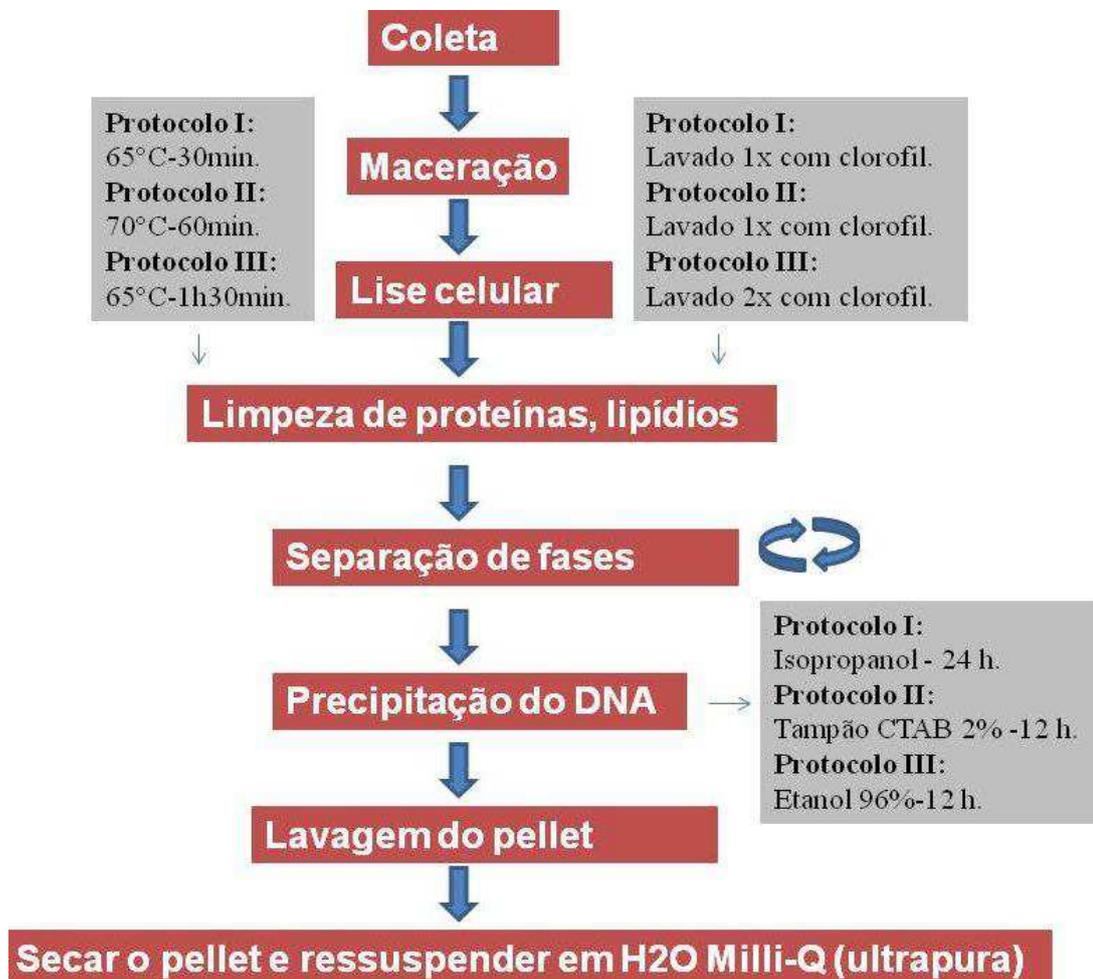


Fonte: DADOS DA PESQUISA.

3.2 Extração de DNA de Espécies Seleccionadas

Os protocolos utilizados foram elaborados com base em trabalhos que descreveram a eficiência dos mesmos, com modificações. Três protocolos diferentes foram elaborados usando o agente catiônico CTAB, seguindo etapas básicas de protocolos de extração com modificações em relação aos trabalhos originais (Figura 4).

FIGURA 4 – Etapas básicas da extração de DNA de plantas, indicando os pontos de modificações nos protocolos deste trabalho.



Os protocolos foram denominados Protocolos I, II e III (Tabela 2) e os trabalhos foram ajustados utilizado o mesmo tampão de extração (2% CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), NaCl 2M, 200mM Tris-HCl-pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% PVP (polivinilpirrolidona), 100 mg/mL de RNaseA, 100 mg/mL de proteinase K), nas mesmas quantidade de proteinase K, de RNase A, β -mercaptoetanol (2 μ L), clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), mistura no vortex e tempo que estiveram em microcentrífuga na primeira etapa, o que os diferencia é o tempo em foram submetidos a banho Maria.

Os reagentes que foram utilizados para precipitação assim como o tempo que todos os DNAs permaneceram em temperatura -20° C foram distintos, a precipitação diferenciou-se em todos os protocolos no Protocolo I foi utilizado com 600 μ L de isopropanol gelado á -20° C e mantido por 24 horas nesta temperatura. No Protocolo II, os DNAs foram precipitados

adicionam-se ao sobrenadante 600 μL de tampão de precipitação CTAB 2%, após essa etapa os tubos foram mantidos a -20°C por 2 horas. No Protocolo III a precipitação, ocorreu com adição de 2,5 volumes de etanol (96%) gelado -20°C , permanecendo por 12 horas nesta mesma temperatura. Após essa etapa todos os protocolos tiveram o mesmo procedimento.

TABELA 2. Identificação dos protocolos testados.

Identificação do Protocolo Testado	Baseado em Trabalho Descrito por
Protocolo I	Romano e Brasileiro (1999)
Protocolo II	Faleiro et al. (2003)
Protocolo III	Danner et al. (2011)

Protocolo I

Utilizou-se o protocolo modificado, descrito por Romano e Brasileiro (1999), obedecendo aos seguintes passos:

Pesou-se 500 miligramas de folhas jovens, adicionando tampão de extração CTAB macerou-se utilizando cadinho e pistilo autoclavados até obter um líquido que foi transferido para um eppendorf de 2 mL, adicionando aproximadamente 800 μL em cada eppendorf. Em seguida foi adicionado 2 μL de β -mercaptoetanol 10 μL de RNase A e 10 μL de proteinase K e colocado no banho Maria por 30 minutos a 65°C (mexendo em vez enquanto). Após retirar do banho Maria foi adicionado 800 μL de clorofórmio: álcool isoamílico, misturando no vortex por 5 minutos e Centrifugado por 12.000 rotações por minuto durante 10 minutos. Em seguida foi transferida a fase aquosa para um novo tubo onde, foi adicionado 600 μL de isopropanol gelado á -20°C , e submetido por 24 horas a temperatura -20°C . Após essa etapa ocorreu novamente a centrifugação por 12.000 rotações por minuto, durante 10 minutos a 20°C . O sobrenadante obtido dessa etapa foi descartado e adicionado ao precipitado 500 μL de etanol 70 % gelado, centrifugado 12.000 rotações por minuto, durante 5 minutos. Por fim foi novamente descartado o sobrenadante e secado o pellet, ressuspensando o pellet seco em 100 μL de água milli-Q.

Protocolo II

Utilizou-se o protocolo modificado, descrito por Faleiro et al. (2003), obedecendo aos seguintes passos:

Pesou-se 500 miligramas de folhas jovens, adicionando tampão de extração CTAB onde foi macerado utilizando um cadinho e pistilo autoclavados, até obter um líquido, que foi transferido para um eppendorf de 2 mL, adicionando aproximadamente 800 μ L em cada eppendorf. Após essa etapa foi adicionado 2 μ L de β -mercaptoetanol 10 μ L de RNase A e 10 μ L de proteinase K, colocando em banho Maria a 70° Celsius durante 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após sair do banho Maria ficou temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foi adicionado 800 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico e misturado no vortex por 5 minutos. Após essa etapa ocorreu a centrifugação durante 10 minutos a 12.000 rotações por minuto, em temperatura ambiente o sobrenadante obtido foi transferido para tubos de 2 mL. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante 600 μ L de tampão CTAB 2%. Os tubos foram mantidos a -20° C por 2 horas a seguir, centrifugados a 12.000 rotações por minuto durante 10 minutos. Após essa etapa o sobrenadante foi descartado e adicionado ao pellet 500 μ L de etanol 70 % gelado, posteriormente centrifugado a 12.000 rotações por minuto, durante 5 minutos, onde foi novamente descartado o etanol 70 %. O pellet ficou exposto a temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos até a ressuspensão em 100 μ L de água Milli-Q.

Protocolo III

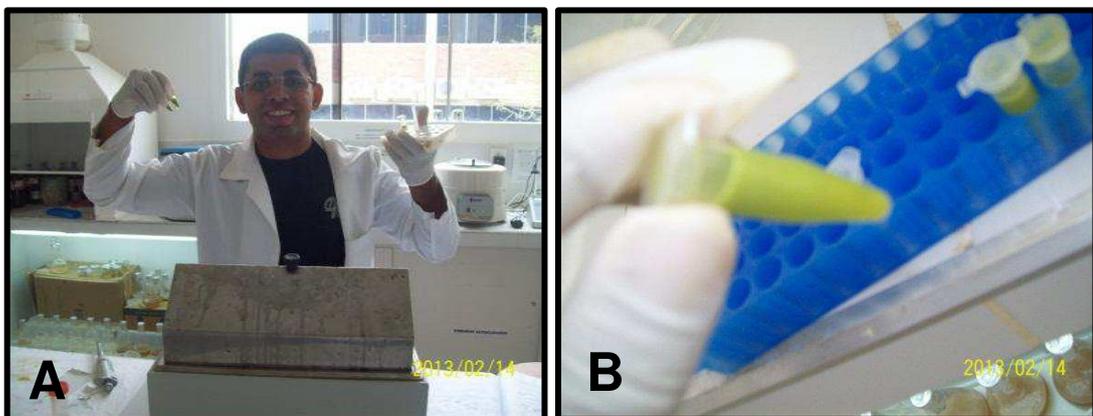
Utilizou-se o protocolo modificado, descrito por Danner et al. (2011), obedecendo aos seguintes passos:

Pesou-se 500 miligramas de folhas jovens, adicionando o tampão de extração CTAB macerar utilizando um cadinho e pistilo autoclavados, até obter um líquido, que foi transferido para eppendorf de 2 mL, adicionando aproximadamente 800 μ L em cada eppendorf. Em seguida foi adicionado 2 μ L de β -mercaptoetanol 10 μ L de RNase A e 10 μ L de proteinase K, colocado no banho Maria por 1 hora e 30 minutos a 65 ° C (mexendo em vez enquanto). Após retirar do banho Maria foi submetido a temperatura ambiente por 5 minutos e

adicionado de 800 μL de clorofórmio: álcool isoamílico, misturando no vortex por 5 minutos. Após essa etapa foi centrifugado durante 10 minutos a 12.000 rotações por minuto, em temperatura ambiente, onde a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionado novamente 800 μL de clorofórmio: álcool isoamílico, misturando em vortex por 5 minutos e centrifugado a 12.000 rotações por minutos a 10 minutos. Após essa etapa foi coletado o sobrenadante e transferido para novo microtubo, onde foi adicionado 2,5 volumes de etanol (96%) gelado e submetido por 12 horas á -20°C . Em seguida foi centrifugação a 12.000 rotações por minuto durante 10 minutos, eliminou-se o sobrenadante e recuperou o pellet, após essa etapa o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL de etanol 70 % gelado ao pellet, foi centrifugado 12.000 rotações por minuto, durante 5 minutos, onde foi descartou o etanol 70 %, deixando o pellet em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos, após secar o pellet foi ressuspendido em 100 μL de água Milli-Q.

Todas as espécies tiveram seus DNAs genômicos extraídos pelos três protocolos, a partir do isolamento de folhas jovens (Figura 5).

FIGURA 5 – Procedimentos durante extrações de DNA.



A- Misturando DNAs para serem colocados em banho Maria. B - DNAs após adição de clorofórmio: álcool isoamílico e mistura no vortex.

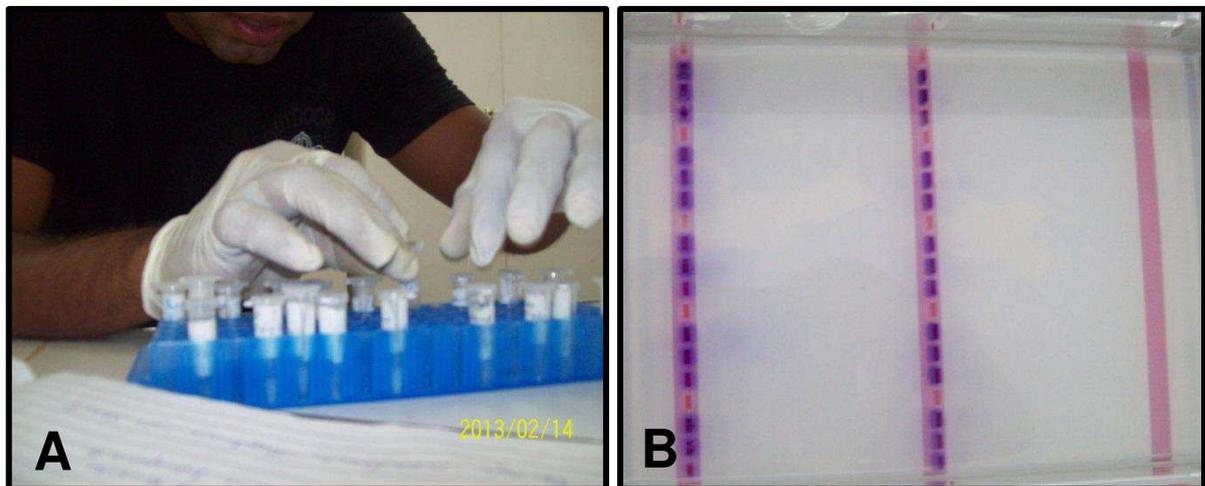
Fonte: Edjair Oliveira

3.3 Estimativa da quantidade e qualidade dos DNAs por espectrofotômetro e eletroforese

A estimativa da quantidade e da qualidade dos DNAs isolados foi feita através do espectrofotômetro Nanodrop, utilizando 2 μL de amostra. Por meio do aparelho obteve-se o resultado correspondente a quantidade do mesmo que foi feito em $\text{ng}/\mu\text{l}$,

Para visualizar o resultado das extrações, os DNAs foram descongelados, organizados e aplicados em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de Etídeo (Figura 6). Os DNAs foram aplicados 1 por poço contendo 1 μl de tampão de amostra 8X, com quantidade aproximada de 100 ng/cada amostra de DNA. O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 0.8% em tampão de corrida T.A.E. (100 mM de Tris HCl pH 8.0- 57,1 mL de Ácido acético glacial e 500mM de EDTA pH 7.5), corado com brometo de etídeo. A migração do DNA no gel foi realizada a 100 V por 30 minutos e depois foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

FIGURA 6 – Preparativos para eletroforese de DNA.



A- Organização de DNAs para aplicação em gel de agarose. B - DNAs aplicados em gel de agarose 0,8 %.
Fonte: EDJAIR OLIVEIRA

4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

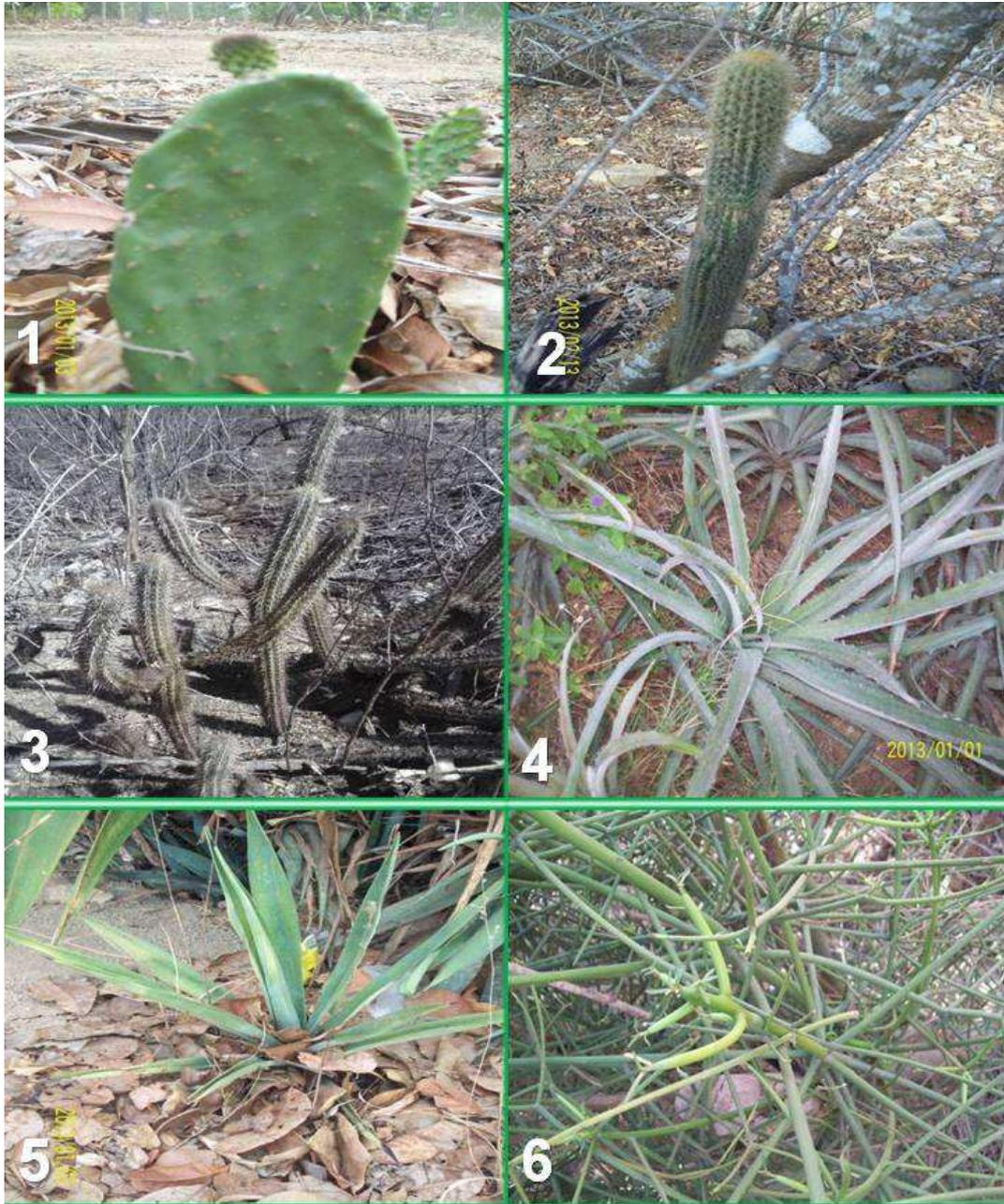
4.1 Seleção e coleta de espécies vegetais no Bioma Caatinga, Semiárido do Nordeste

Utilizando os critérios de características fisiológicas de espécies vegetais típicas ou introduzidas no Semiárido nordestino, foram selecionadas dez espécies para o estudo comparativo três protocolos de extração de DNA sobre a eficiência na qualidade e quantidade do DNA isolado. Como consequência da seca intensa que afetou a região do Curimataú Paraibano e entorno na época do trabalho, durante o período de outubro de 2012 a abril de 2013, a dificuldade de encontrar material vegetal disponível para pesquisa em uma única área conduziu as coletas para duas áreas de estudo, o Horto Florestal Olho D'água da Bica, localizado na Universidade Federal de Campina Grande/CES em Cuité - PB e Sítio Linha dos Pereiras localizado em Jaçanã - RN. As plantas selecionadas estão indicadas pelo nome popular, espécie e local de coleta na Tabela 3. As espécies coletadas foram agrupadas de acordo com a textura do tecido foliar de difícil (Figura 7) ou fácil (Figura 8) maceração.

TABELA 3. Espécies selecionadas no Bioma Caatinga para extração do DNA genômico.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	LOCAL DA COLETA
1. Palma	<i>Opuntia ficus-indica (L.) Mill</i>	Jaçanã-RN
2. Facheiro	<i>Pilosocereus piauhiensis</i>	Cuité-PB
3. Xique-Xique	<i>Pilosocereus gounellei</i>	Jaçanã-RN
4. Macambira	<i>Bromelia laciniosa Mart. Ex schult. f.</i>	Cuité-PB
5. Agave	<i>Agave sisalana</i>	Jaçanã-RN
6. Aveloz	<i>Euphorbia tirucalli Lineu</i>	Jaçanã-RN
7. Catingueira	<i>Caesalpinia pyramidalis Tul.</i>	Cuité-PB
8. Jurema Preta	<i>Mimosa hostilis Benth</i>	Cuité-PB
9. Juazeiro	<i>Ziziphus cotinifolia Reiss</i>	Cuité-PB
10. Aroeira	<i>Myracrodruon urundeuva allemão</i>	Jaçanã-RN

FIGURA 7 - Espécies nativas e introduzidas no semiárido selecionadas e agrupadas como de folhas de difícil maceração.



Imagens do local de coleta. Numeração de 1-6 indica o nome de cada planta conforme Tabela 3.

Fonte: DADOS DA PESQUISA.

FIGURA 7 - Espécies nativas e introduzidas no semiárido selecionadas e agrupadas como de folhas tenras para maceração.



Imagens do local de coleta. Numeração de 7-10 indica o nome de cada planta conforme Tabela 3.

Fonte: DADOS DA PESQUISA.

4. 2 Determinação da eficiência de três protocolos de extração de DNA sobre a qualidade e quantidade do DNA isolado das espécies vegetais selecionadas

Como resultado, foi possível isolar os DNAs genômicos das 10 espécies vegetais selecionadas pelos três métodos comparados, embora apresentando diferenças significativas na eficiência quanto à quantidade e qualidade do DNA isolado, de acordo com a estimativa realizada em espectrofotômetro Nanodrop (Tabela 4). De modo geral, os Protocolos I e III produziram as mais elevadas quantidades de DNAs isolados para igual número de espécies estudadas. Entretanto, O Protocolo I produziu maior quantidade de DNA de três das quatro espécies que possuem folhas tenras, enquanto que o Protocolo III produziu maior quantidade de DNAs em quatro das 06 seis espécies de difícil maceração.

TABELA 4 - Quantidades de DNAs das espécies selecionadas estimadas por espectrofotômetro Nanodrop.

Quantidades de DNAs						
AMOSTRAS	Protocolo I		Protocolo II		Protocolo III	
	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280
1. Palma	527,6	1,11	55,9	1,29	7,0	-0,30
2. Facheiro	7,7	1,70	8,2	1,47	106,1	1,84
3. Xique-Xique	880,5	2,04	69	0,87	1802,9	2,00
4. Macambira	497,3	2,01	13,3	0,22	684,5	2,01
5. Agave	1033,1	1,81	117,2	1,89	764,8	2,07
6. Aveloz	22,51	1,24	174,1	0,61	359,2	1,19
7. Catingueira	4960,1	1,83	118,5	0,83	255	1,09
8. Jurema Preta	54,2	1,49	10,8	0,37	1064,8	1,96
9. Juazeiro	2952,5	2,03	116,6	1,31	422,9	2,38
10. Aroeira	1685,1	2,10	81,1	0,57	891,3	0,94

A quantidade média de DNA obtida pela extração utilizando o Protocolo I variou de 7,7 a 4.960,1 ng/μl em que a razão 260/280 para a maioria foi próxima do indicativo de pureza, de 1,8 a 2,1, sendo estes os melhores valores de pureza do DNA obtidos entre os três protocolos. Uma vez que o protocolo II a precipitação ocorreu por meio de tampão de precipitação CTAB, especula-se que esta etapa não tenha sido eficiente. Outra etapa que não poderia ser eliminada ou substituída é a adição de RNase A, proteinase K e β-mercaptoetanol para os três métodos uma vez que esses são eficientes para desnaturação de proteínas, RNA e agem também como antioxidantes portanto considerável essencial para resultados significativos nas amostras.

A diferença básica entre os Protocolos I e III está no tempo e na temperatura em que foi submetido o mesmo tampão de lise, sendo 65° C/30min para o Protocolo I e 1h30min para o protocolo III, a existência de uma segunda extração em Clorofil para o Protocolo III, e a precipitação, que ocorreu em no Protocolo I com o reagente Isopropanol, no Protocolo II com tampo CTAB 2% e no Protocolo III etanol absoluto a 2,5 volumes.

De acordo Brasileiro e Carneiro (1998) a adição do solvente orgânico clorofórmio: álcool isoamílico tem função homogeneizar e facilitar a desproteíntização ajudando a separar os ácidos nucleicos da fase aquosa para posteriormente facilitar sua separação na centrifugação. Segundo Romano e Brasileiro (1999) essa etapa pode ser utilizada uma ou duas vezes levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém com maiores perdas de DNA.

Com base em relatos dos autores citados as modificações foram feitas em etapas que possuem seus componentes considerados não essenciais e que poderiam ser substituídos por outros, portanto as diferenças entre os protocolos obtiveram resultados significativos, como dito anteriormente os principais fatores que contribuíram para obtenção dos mesmos foram o tempo em banho Maria, no qual o método de Romano e Brasileiro (1999) foi submetido por 30 minutos, Faleiro et al. (2003) foi submetido por 1 hora, enquanto Danner (2011) foi submetido ao procedimento por 01h30 minutos.

As modificações ocorridas nos três protocolos foram impares para obtenção de bons resultados nos mesmos e conforme Pereira et al. (2010), pode-se afirmar que o aumento no tempo em banho Maria promove o rompimento das membranas e desnatura proteínas e enzimas, como as histonas, que enovelam e empacotam o DNA, e as DNAses que o degradam. A adição de cloroformio: álcool isoamílico é fundamental para separar as proteínas, DNase e outros constituintes na centrifugação durante a primeira etapa (antes de ir para temperatura -20° C).

Mais uma etapa importante na extração de DNA genômico é a precipitação, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1995), ocasionalmente está na maioria dos métodos CTAB ocorre na presença de etanol ou isopropanol, resultando em uma massa gelatinosa de composição química exata desconhecida, possivelmente rica em polissacarídeos. A precipitação varia em um tempo entre 2 a 24 horas. Visando obtenção de melhores resultados o componente de precipitação foi diferente em cada protocolo, permanecendo o isopropanol no Protocolo I, de acordo com Romano e Brasileiro (1999), porém com horário modificado para 24 horas. No Protocolo II, baseado em Faleiro et al. (2003), o isopropanol foi substituído por tampão de precipitação CTAB 2% por 2 horas, e no Protocolo III, baseado em Danner et al. (2011), os DNAs foram precipitados com etanol 96%, como modificações apenas no tempo que foi alterado de 20 minutos para 12 horas, todos em temperatura -20°C.

Apesar dos protocolos fornecerem bons resultados na maior parte dos DNAs extraídos observou que não existiu um protocolo padrão, entre os três comparados, que tenha sido eficiente para todas as espécies em questão, porém o Protocolo II apresentou DNA em menor quantidade em todas as amostras, com exceção do aveloz que alcançou maior quantidade no que no protocolo I, isto pode ter acontecido devido o mesmo ser submetido por 2 horas a temperatura -20 °C sendo utilizado com tampão de precipitação CTAB 2%, para precipitá-lo.

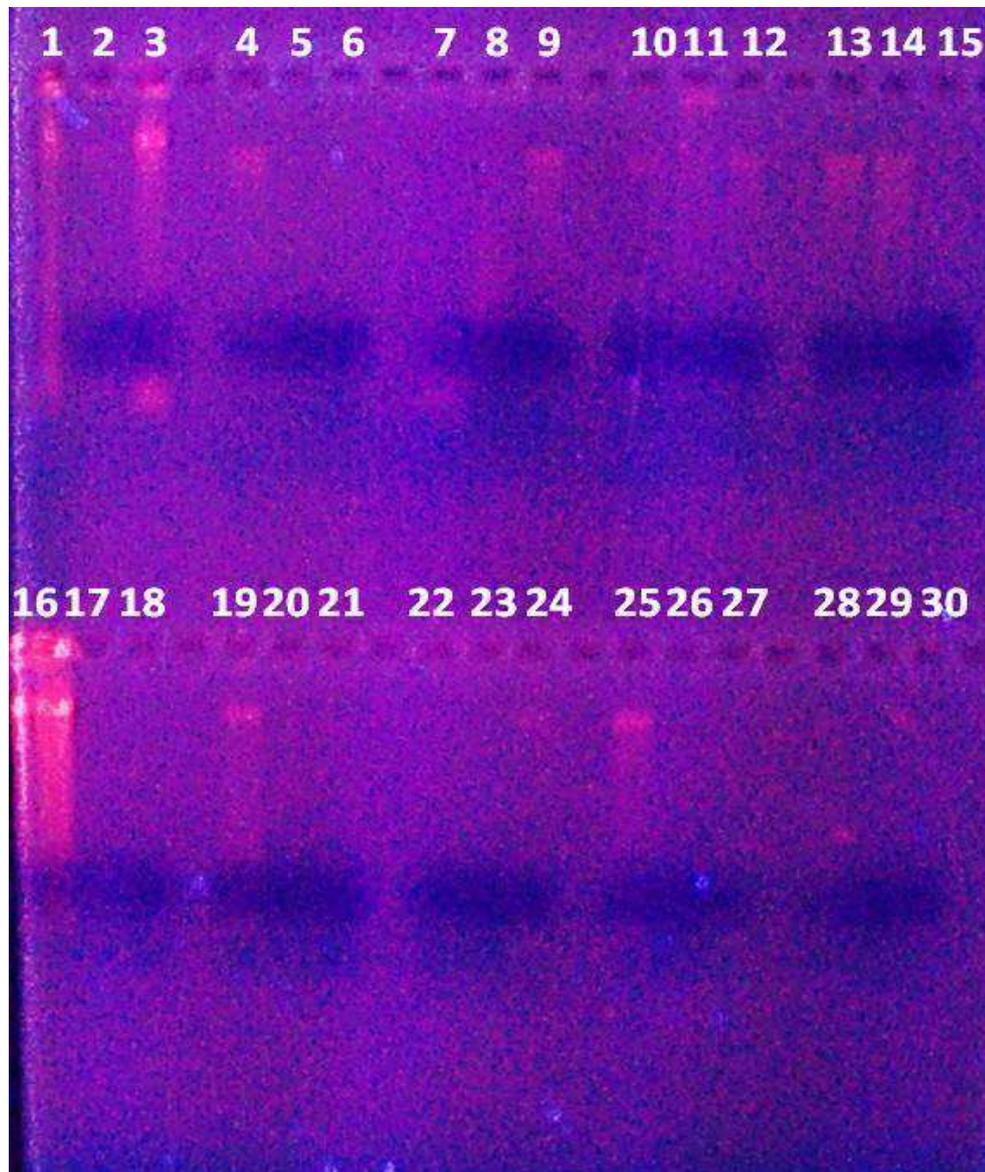
Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995) o CTAB forma um complexo precipitável com DNA quando a concentração de NaCl for menor de 0,7 molar, os rendimentos em geral são bem inferiores. Com base nesse relato pode-se afirmar que esse foi o fator que levou ao protocolo não obter eficiência nas extrações de todas as espécies selecionadas em relação aos demais métodos utilizados.

A pureza do DNA foi satisfatória, o fator fundamental para a obtenção do resultado foi o tempo que permaneceu em banho Maria, como também o tempo na temperatura -20 ° C e a maneira que este foi precipitado resultando em um DNA livre de impurezas e da contaminação com polifenóis. Pode-se verificar a qualidade visual dos DNAs em gel de agarose 0,8 %, aplicados na ordem descrita na Tabela 5, visando comparar os 3 protocolos para cada espécie (Figura 8).

TABELA 5- Sequência para aplicação do DNA em gel de agarose 0,8%.

Espécies	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III
	Poço	Poço	Poço
1. <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	1	2	3
2. <i>Pilosocereus piauhiensis</i>	6	5	4
3. <i>Pilosocereus gounellei</i>	7	8	9
4. <i>Bromelia laciniosa</i> Mart. Ex schult. f.	10	11	12
5. <i>Agave sisalana</i>	13	14	15
6. <i>Euphorbia tirucalli</i> Lineu	18	17	16
7. <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	19	20	21
8. <i>Mimosa hostilis</i> Benth	22	23	24
9. <i>Ziziphus cotinifolia</i> Reiss	25	26	27
10. <i>Myracrodruon urundeuva</i> allemão	28	29	30

FIGURA 8: Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% comparando três protocolos de extração e através dos DNAs obtido pelos mesmos.



Fonte: DADOS DA PESQUISA.

O nível de pureza dos DNAs obtidos neste protocolo por Nanodrop também é melhor para espécies de difícil extração. Des acordo com Mazza e Bittencourt (2000) um DNA puro deve está com um valor de absorbância entre 1,8 e 2,0. Visto que os DNAs no Protocolo III apresentam-se em um padrão estabelecido para o grau de pureza pela razão 260/280, pode-se afirmar que o mesmo é o mais puro dos três descritos, para as espécies de extração mais difícil apresentando DNA de mais alta qualidade.

Em relação aos outros dois protocolos foram eficientes para extrações em diferentes espécies, o Protocolo I apresenta eficiência para as espécies cujas folhas foram de fácil maceração e não oxidaram facilmente. Enquanto o Protocolo III apresentou eficiência nas espécies de mais difícil extração aquelas em que as folhas oxidaram rapidamente, são rígidas ou não se apresentam em formas favoráveis a extração sendo necessário extrair o DNA de outro tecido vegetal.

4.3 Comparação os três protocolos e identificação protocolo(s) adequado(s) as características fisiológicas das espécies.

Na espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill a extração foi realizada a partir dos seus espinhos, sabendo que são folhas modificadas a mesma não apresentou dificuldades na extração tornando rápido e aparentemente livre de impurezas. A espécie *Agave sisalana* apresenta as folhas fibrosas após a maceração porém o resultado da mesma é um material aparentemente limpo e livre de impurezas não oxidando em nenhum protocolo.

As espécies *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Ziziphus cotinifolia* Reiss e *Myracrodruon urundeuva* allemão apresentaram folhas de fácil maceração tornando o processo rápido e obtendo DNA aparentemente limpo e sem sofrer oxidação durante todo o processo.

Nas espécies *Pilosocereus piauhiensis* e *Pilosocereus gounellei* como os espinhos se se apresentavam em formas, mais densas não se pode extrair o DNA dos mesmos através da maceração, considerando que são folhas modificadas, neste caso a maceração ocorreu utilizando o caule das plantas para se obter a DNA, a extração foi em um processo demorado e obteve para os três protocolos um líquido viscoso e de difícil manuseio.

A espécie *Bromelia laciniosa* Mart. Ex schult. foi a planta de mais difícil extração sua folha é muito rígida e assim dificultou a maceração, tornando o processo muito demorado e obtendo como resultado um líquido muito fino quase transparente em todos os protocolos.

Em *Euphorbia tirucalli* Lineu devido a presença de látex atrapalhou um pouco a maceração e suas folhas pequenas foram difíceis de serem maceradas, o processo de extração para essa espécie foi demorado e o DNA obtido através do mesmo oxidável e aparentemente

sujo. A *Mimosa hostilis Benth* apresentou folha de bom manejo facilitando a maceração, porém a mesmas oxidaram rapidamente durante a extração.

O Protocolo III apresentou melhor resultado para plantas consideradas mais difícil extração devido a ausência de folhas em *P. piauhiensis* e *P. gounellei*, o latex em *E. tirucalli* Lineu a presença *M. hostilis Benth* compostos polifenóis que favorecem rápida oxidação e a rigidez de *B. laciniosa Mart. Ex schult. f.* Pode-se afirmar que a eficiência do protocolo para essas espécies foi devido a um maior tempo em banho Maria como já mencionado, pois este fator impossibilitou a ação de DNase, a lavagem duas vezes em clorofórmio: álcool isoamílico e também o fato do protocolo ser precipitado com álcool 96% que torna a amostra mais pura.

Com base nas informações descritas pode-se afirmar ao termino desse trabalho que não existe um protocolo padrão entres os três aqui citados que seja eficiente para extração em diferentes espécies vegetais, porém encontra-se aquele mais adequado para um determinado grupo de plantas no caso das de folhas de fácil maceração que não oxidem rapidamente o protocolo mais adequado é o Protocolo I descrito por Romano e Brasileiro (1999). Nas plantas cujo suas folhas sejam impróprias para a extração seja por motivo de inexistência ou por motivos de possuírem compostos polifenóis que comprometam a pureza das amostras, o Protocolo III é o mais adequado devido ser submetido por maior tempo em banho Maria, lavagem duas vezes com adição de clorofórmio: álcool isoamílico, fazendo com que as mesmas se apresentassem mais puras e o fator crucial deve-se a precipitação com utilização de etanol 96% já favorecendo uma possível limpeza nas amostras consideradas.

5. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos da presente pesquisa foi possível constatar que:

- Os protocolos testados não foram eficientes para todas as espécies vegetais, porém pode-se obter aquele mais adequado para plantas de acordo com as características fisiológicas e morfológicas.
- Na ausência de folhas em um determinado vegetal pode-se obter bons resultados substituindo as mesmas por outro tecido desde que o restante das etapas seja o mesmo.
- Protocolo I é eficiente para espécies que apresentam folhas fáceis de macerar e livres de compostos polifenóis em excesso.
- O Protocolo III é melhor para plantas que possuam folhas inexistentes e/ou difícil de macerar ou até possuam compostos que promovem rápida oxidação.
- Assim, a presente pesquisa foi importante para o curso Licenciatura em Ciências Biológica, pois com base no mesmo, professores e alunos interessados a desenvolver pesquisas moleculares em plantas da região terão protocolos para extração de DNA genômico nas mesmas, que poderão utilizar sem conhecimento molecular das espécies de interesse as selecionando com base nas características fisiológicas e morfológicas e obtendo eficiência com maior quantidade e qualidade dos DNAs extraídos, promovendo melhores resultados em etapas posteriores a essa.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, F.J.P. **Bioma Caatinga: ecologia, biodiversidade, educação Ambiental e práticas pedagógicas**. João Pessoa: Editora Universitária, 2010.
- BERNARDES, N. As Caatingas. *Estudos Avançados*, São Paulo, 13 (35), p. 69-78, 1999.
- BOREM A; Milach S. C. K. Melhoramento de plantas: o melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v7, p. 68-72. 1999.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação de plantas**. 1º Brasília: Embrapa- SPI/ Embrapa- CENARGEN: Ana Cristina Miranda Brasileiro, Vera Tavares de, 1998. 309 p.
- COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, p.8-12, 1990.
- CSAIKL, U.M.; BASTIAN, H.; BRETTSCHEIDER, R.; GAUCH, S.; MEIR, A.; SCHAUERTE, M.; SCHOLZ, F.; SPERISEN, C.; VORNAM, B.; ZIEGENHAGEN, B.; Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic Studies. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p. 69-86, 1998.
- CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p.69-70,1993.
- DANNER; M.A.; SASSO, S.A.Z. ; BITTENCOURT, J.V.M., CITADIN; I., SACHET; M.R. Proposta de Protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, abr.-jun., 2011.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v.1, p.19-20, 1983.
- 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.
- FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. Operacionalização da extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. Melhoramento e qualidade de vida: **Anais**. Porto Seguro: SBMP, 2003.
- FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pre-melhoramento, melhoramento e pos-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 184 p.
- FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. **Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal**. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. Savanas:

desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores de RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, 220 p.

GIULIETTI, A.M.; R.M. HARLEY, L.P.; QUEIROZ, M.R.V.; BARBOSA, A.L.; BOCAGE NETA & M.A. FIGUEIREDO. 2002. Plantas endêmicas da caatinga. p.103-115 In: **Vegetação e flora das caatingas** (SAMPAIO, E.V.S.B., A.M. GIULIETTI, J. VIRGÍNIO & C.F.L. GAMARRA-ROJAS, ed.). APNE / CNIP, Recife, PE.

GOMES, A. P. S.; RODAL, M. J. N.; MELO, A. L.; Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifólia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta bot. bras.** 20(1): 37-48. 2006.

GONÇALVES, G. S. **Estratégias de controle de invasão biológica por *Prosopis juliflora*, na Caatinga e ecossistemas associados**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. **Plant genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *-Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p.6-13, 1994.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. 2000. **Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)**. Boletim de Pesquisas Florestais Colombo, 41: 12-17.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K.Millach, 1998. 141p.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L.; Extração De Dna Genômico De *Passiflora spp.* Para Análises Pcr-Rapd. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 447-450, agosto 2001.

PEREIRA, L. B.; CAMPOS, M. A.. **Prospecção de genes em plantas do semiárido paraibano com potencial aplicação em biotecnologia**. IN: Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande, 2011.

PEREIRA, M. S. V., et al.; **Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano**. Agropecuária Científica no Semi-árido, Patos, v.2, n.1, Set – Dez, 2006

PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.;TABARELLI, M.; SILVA,J.M.C(Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 2. ed Recife: Editora Universitária/ UFPE, 2005,p.3-73.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. DE; PEREIRA, T. N. S. (2007). **Recursos genéticos: manejo e uso**. *Magistra*, v. 19, p.265-273, 2007.

RAW, I.; MENNUCCI, L. e KRASILCHIK, M. **A biologia e o homem**. São Paulo: Edusp, 2001.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, C.T.C. (Ed). **Manual de Transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa-spi/ Embrapa-cenagen.1998.p.163-177.

ROMANO, E. BRASILEIRO, A.C. M. **Extração de DNA de plantas**. Disponível em: <http://www.biocologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf>. Acesso em: 07 de mar. 2013

ROSO, A.C.; VIDAL, R.A. **Determinação de protocolo para extração de DNA da espécie daninha *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL)**. Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. Ribeirão Preto – SP,2010.

SAMPAIO, E. V. S. B.; Pareyn, F. G. C.; Figueirôa, J. M.; Santos Junior, A. G. (2006). Espécies do Semiárido baiano com potencial econômico. *Magistra*, v. 18, p. 6-8

TEIXEIRA, L. M. **Informando o trade turístico paraibano**: Cuité, caderno de Turismo, p: 9 – 11, 2003.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S. & PAREYN, F.G.C. 2002. **Ecorregiões propostas para o bioma Caatinga**. Associação Plantas do Nordeste, Instituto de Conservação Ambiental, e The Nature Conservancy do Brasil, Recife.76p.

VIDAL, M. S., COUTINHO, T. C., HOFMAN, L. V. **Comparação entre protocolos de extração de DNA para algodão**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 8p.

OLIVEIRA, M. C. S. et al.; **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

WEISING, K.; NYBOM, H.;WOLF, K.; MEYER,W.**DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322p.