

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

Jailson de Araújo Santos (Bolsista, ICV), Camila Campêlo de Sousa (Colaboradora, UFPI),
Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente (Orientador, Departamento de Biologia, CCN-UFPI)

1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas medicinais, principalmente das produtoras de alcalóides e óleos essenciais, apesar de estar em sua fase embrionária; tem conseguido avanços significativos (AMARAL e SILVA, 2003). O gênero *Cymbopogon* sp., conhecido popularmente como citronela, pertence à família Poaceae e é utilizado tanto em hortas caseiras quanto para fins industriais, onde 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 de acordo com Nascimento et al. (2003), 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; PEREIRA, 2006). A espécie *Cymbopogon winterianus* possui uma grande importância regional uma vez proporciona um maior efeito no controle da bactéria *Erwinia carotovora*, responsável por uma série de doenças na Região Nordeste do Brasil. No entanto, o óleo da citronela ainda não conseguiu alcançar um bom valor no mercado internacional. Esse entrave poderá ser contornado com a melhoria da tecnologia de extração do óleo e de seu uso como matéria-prima (CASSEL e VARGAS, 2006; COSTA et al., 2008; SARDINHA et al., 2006).

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo de extração de DNA desta espécie, que permita obter 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.

2 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. Enquanto, 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, realizam-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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em relação à qualidade e quantidade do DNA (Tabela 1) mostraram-se satisfatórios, principalmente em relação ao protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987); que proporcionou um DNA pouco contaminado e em grande quantidade (Figura 1).

Observou-se uma variação considerável entre as metodologias em relação à quantidade 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. Qualidade semelhante também foi encontrada por meio de método descrito por Clark et al. (1989).

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, o que provavelmente ocorreu em virtude do alto grau de oleaginosidade encontrado após as extrações com esses protocolos.

Tabela 1. Análise das quantidades e qualidades do DNA de *Cymbopogon winterianus* resultante de extração com quatro diferentes protocolos de extração.

PROTOCOLOS	Qualidade e quantidade de DNA insatisfatórias	Qualidade de DNA boa, mas pouca quantidade	Quantidade boa, mas DNA não puro	Qualidade e Quantidade de DNA adequadas
Romano e Brasileiro (1998)	Amostras 1, 2, 4 e 5	_____	_____	Amostra 3
Clark et al. (1989)	_____	Amostra 3	_____	Amostras 1, 2, 4 e 5
Ferreira e Grattapaglia (1995)	Amostras 2 e 5	_____	Amostra 1	Amostras 3 e 4
Doyle e Doyle (1987)	_____	_____	_____	Todas as Amostras

CD1 CD2 CD3 CD4 CD5

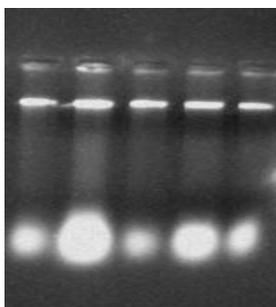


Figura 1. Fragmentos de DNA obtidos a partir do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Teresina, Piauí, 2011.

4 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 evolutivos e de diversidade genética.

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 boa quantidade, mostrando-se uma boa alternativa em substituição ao protocolo de Doyle e Doyle (1987).

REFERÊNCIAS

AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. **Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais**. Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. n. 30, jan-jun, 2003

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. **Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation**. Sociedad Química de México. v. 50, n. 3, p. 126-129, 2006.

CLARK, B. C.; MORAN, L. B.; APPELS, R. **DNA analyses in wheat breeding**. Genome, v. 32, p 334-339, 1989.

COSTA, C. M. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA P. F. M.; FARIAS M. A. DE A. **Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora***. Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v. 2, n. 2, p. 11-14, jun, 2008.

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** Horticultura Brasileira, v. 21, n. 2, 2002. Suplemento 1

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.

NASCIMENTO, I. B do., INNECCO, R., MARCO, C. A., MATTOS, S. H. E.; NAGAO, E. O. **Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo**. Revista Ciência Agronômica, v. 34, n.2, p.169 – 172, 2003.

PEREIRA, R. M. M. **Importância Alimentar das Vitaminas**. 2006. Disponível em: < http://www.ornicare.com/documentos/Importancia_alimentar_vitaminas.pdf>. Acesso em: 01.08.11

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.

SARDINHA, D. H. S.; MACIEL, A. A. S.; MACHADO, K. K. G.; LEMOS, R. N. S.; GUISTEM, J. M.; GOMES, J. J. A. **Diferentes concentrações de nim e citronela no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão-caupi**. São Luis, MA. 2006.

PALAVRAS-CHAVE: Extração de DNA. *Cymbopogon winterianus*. Protocolos de extração.