



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**PRISCILLA NASCIMENTO MOREDJO**

**ANATOMIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
GENÔMICO DE MADEIRA DE *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.**

Prof. Dr. HEBER DOS SANTOS ABREU

Orientador

SEROPÉDICA, RJ  
JUNHO – 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**PRISCILLA NASCIMENTO MOREDJO**

**ANATOMIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
GENÔMICO DE MADEIRA DE *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. HEBER DOS SANTOS ABREU  
Orientador

SEROPÉDICA, RJ  
JUNHO – 2015

**ANATOMIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
GENÔMICO DE MADEIRA DE *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.**

**PRISCILLA NASCIMENTO MOREDJO**

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu – UFRRJ  
Orientador

---

Msc. Kelly Carla Almeida de Souza Borges - UFRRJ  
Membro

---

Prof. Dra. Evânia Galvão Mendonça – UFRRJ  
Membro

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus  
e a toda minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre me iluminou e me deu forças para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus pais, Erwin Soetrisman Moredjo e Wilcilene Nascimento Moredjo por todo amor que sempre me deram, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu avô Wilson Nascimento Silva e a minha avó Elsi Moura Nascimento (*in memoriam*) por toda a paciência, amor e carinho que sempre tiveram comigo.

Ao meu irmão Erwin Soetrisman Moredjo Junior pelo apoio e carinho.

Ao meu amor Diogo Vianna por todo o incentivo, apoio, compreensão e pelo companheirismo incondicional.

As minhas amigas do laboratório de Biotecnologia, Kelly Carla Almeida de Souza Borges por todo aprendizado, paciência e amizade; e Suely de Melo Dias pelas risadas nos momentos de folga durante as análises e por toda a ajuda durante a condução do experimento.

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes e Profa. Sonia Regina de Souza por cederem um espaço no laboratório de Nutrição Mineral de Plantas para a realização das análises.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas pela ajuda, paciência e pelos ensinamentos de laboratório.

Ao prof. Dr. Heber dos Santos Abreu pela orientação e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

A Prof. Dra. Evânia Galvão Mendonça pela ajuda e ensinamentos no laboratório.

As minhas amigas floresteiros Letícia Souza Martins, Thamires Fernandes de Ávila Neto Gutteres e Nayra Gomes Nicolau dos Santos por todos os momentos compartilhados durante a graduação. E aos amigos da turma 2010-2.

As minhas amigas Fernanda Leal e Ingrid Baião, por fazerem parte da minha vida.

A CNPq pela concessão de bolsas.

A todos, enfim, o meu muito obrigada!

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo testar três diferentes tipos de protocolos de extração de DNA genômico de madeira seca da espécie *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers. (Piquiarana), observando também as características anatômicas desta madeira, através de lupa (aumento 10x) e microscopia eletrônica de varredura. O primeiro protocolo utilizado foi uma adaptação de Doyle e Doyle (1990), em que foi utilizado um tampão de extração na seguinte concentração, 2% p/v de CTAB, 2,5% de PVP, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8,0) e 40 $\mu$ L de  $\beta$  – Mercaptoetanol. O segundo protocolo testado foi o Kit DNeasy Plant Mini. E o terceiro protocolo testado foi uma adaptação de Swetha et al. (2014), onde o tampão de extração utilizado possui a concentração, 100mM Tris base, 20mM EDTA, 3M NaCl, 5% CTAB, 1% PVP e 3 $\mu$ L de  $\beta$  – Mercaptoetanol. Foi verificado que os protocolos 1 e 2 possibilitaram a extração do DNA da madeira de *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers. (Piquiarana) em quantidades consideráveis, sendo o mais adequado para extrair DNA genômico de espécies nativas tropicais, o protocolo 2, por apresentar um grau de pureza acima de 1,8.

**Palavras-chave:** piquiarana, madeira, DNA.

## ABSTRACT

The current study aims to test three different types of protocols for genomic DNA extraction of dry wood of the species *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers. (piquiarana), by observing also the anatomical features of this wood, with the aid of a magnifying glass (10x enlargement) and a scanning electron microscope. The first protocol used was an adaptation of Doyle and Doyle (1990), where an extraction buffer was used with the following concentration, 2% p/v of CTAB, 2,5% of PVP, 2 M NaCl, 100mM Tris HCl (pH 8,0) and 40 $\mu$ L of  $\beta$  – Mercaptoetanol. The second protocol tested was the Kit DNeasy Plant Mini. And the third protocol tested was an adaptation of Swetha et al. (2014), where the extraction buffer contains a concentration of 100mM Tris base, 20mM EDTA, 3M NaCl, 5% CTAB, 1% PVP and 3  $\mu$ L of  $\beta$  – Mercaptoetanol. It was verified that protocols 1 and 2 allowed the extraction of the DNA of the wood of *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers. (piquiarana) in considerable quantities, have been to more adequate to extract genomic DNA from native tropical species of which protocol 2 being more suitable, for presenting a purity of more than 1,8.

**Keywords:** piquiarana, DNA, *Caryocar glabrum*.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	1
2.1 <i>Caryocar glabrum</i> .....	1
2.2 DNA de madeira .....	2
2.3 Extração de DNA .....	3
2.4 Métodos de extração de DNA.....	5
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	7
3.1 Origem das amostras de madeira .....	7
3.2 Anatomia da madeira .....	7
3.3 Extração de DNA .....	7
3.3.1 Método CTAB adaptado de DOYLE; DOYLE, 1990 .....	8
3.3.2 Kit DNeasy Plant Mini (Quiagen).....	9
3.3.3 Método CTAB adaptado de SWETHA et al., 2014 .....	9
3.4 Quantificação do DNA extraído .....	10
3.5 Análise estatística .....	10
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	10
4.1 Anatomia da madeira .....	10
4.2 Extração de DNA .....	11
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	14
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais substâncias utilizadas na extração de DNA e suas respectivas funções (ROMANO; BRASILEIRO, 1998; OLIVEIRA, et al., 2007) .....	4
<b>Tabela 2:</b> Relação entre os protocolos utilizados e a concentração de DNA extraído .....	6
<b>Tabela 3:</b> Protocolos testados na extração de DNA de madeira de <i>Caryocar glabrum</i> .....	12
<b>Tabela 4:</b> Protocolos testados para a avaliação da pureza do DNA extraído da madeira de <i>Caryocar glabrum</i> .....	13

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exemplar de <i>Caryocar glabrum</i> . .....	2
<b>Figura 2:</b> Representação da casca e tronco da árvore de <i>Caryocar glabrum</i> . .....	2
<b>Figura 3:</b> Alburno e cerne (Klock, 2005). .....	3
<b>Figura 4:</b> Amostras da madeira secas cedida pelo Laboratório de Pesquisa Floresta. ....	7
<b>Figura 5:</b> A) Amostras da madeira de <i>Caryocar glabrum</i> transformadas em lascas para a utilização nas análises e B) maceração da amostra com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. ....	8
<b>Figura 6:</b> Nanodrop - equipamento utilizado para a verificação da qualidade e quantidade do DNA extraído. ....	10
<b>Figura 7:</b> Anatomia da madeira de <i>Caryocar glabrum</i> : “A”, imagem macroscópica transversal (aumento 10x). De “B” a “D”, imagem microscópica (MEV). B) plano transversal; C) plano tangencial; D) plano radial. ....	11
<b>Figura 8:</b> Relação entre os protocolos testados e as respectivas quantidades de DNA obtidos. ....	12
<b>Figura 9:</b> Relação entre os protocolos testados e os respectivos grau de pureza obtidos das amostras. ....	13

## 1. INTRODUÇÃO

A extração de DNA de materiais frescos, como folhas, é uma técnica comum na biologia molecular. No entanto, as madeiras são comercializadas sem folhas, muitas das vezes já secas e processadas o que impede a rápida identificação do material, por isso é que se faz necessária a extração do DNA de madeira seca. Contudo, a extração de DNA de madeira processada é uma técnica complexa porque nessa situação boa parte do DNA encontra-se degradado (JIAO et al, 2012). Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos nessa linha de pesquisa, mas no Brasil o estudo ainda é incipiente, principalmente quando se trata de madeiras nativas tropicais.

A extração pode ser dificultada por problemas relacionados à contaminação do DNA por fenóis, polissacarídeos e proteínas (CHIARI et al, 2009). Entretanto, os protocolos utilizados são adaptados para que ocorra uma melhor eficiência na extração do DNA da madeira minimizando ou inibindo as dificuldades encontradas. A diferença entre os protocolos se dá pela composição do tampão de extração que geralmente é composto por um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8, um sal para dissociar as proteínas do DNA, um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas e um inibidor de DNases para proteger o DNA (BERED, 1998 citado por CHIARI et al, 2009).

A espécie em estudo é a *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers., vulgarmente conhecida como piquiarana. Esta árvore é amplamente utilizada na construção civil, podendo substituir a maçaranduba (IPT, 2013), que é uma espécie ameaçada de extinção de acordo com a Instrução Normativa nº 06 do MMA, de 23 de setembro de 2008, IN 06/2008 (MMA, 2008).

O objetivo deste trabalho foi comparar a quantidade e qualidade do DNA isolado através de três diferentes tipos de protocolos de extração de DNA genômico para a madeira de *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers., que resultem em um DNA mais puro e com uma quantidade considerável para a execução de outras técnicas moleculares, como a amplificação, clonagem e sequenciamento.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Caryocar glabrum*

A *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers., vulgarmente conhecida como piquiarana é uma árvore pertencente à família Caryocaraceae, e está distribuída por toda região Amazônia desde o Mato Grosso até Peru, Bolívia, Colômbia e Guianas. É uma árvore de grande porte, podendo atingir até 50 m de altura, possuindo uma galharia pesada (Figura 1). Possui o tronco cilíndrico e erecto; folhas compostas, opostas, pecioladas, 2-estipuladas com 3 folíolos peciolulados com ou sem estipelas; folíolos elípticos de ápice curtamente acuminado, base obtusa ou arredondada; margem denteada, raramente inteira, glabros ou com pequenos tufo de pelos nas axilas das nervuras secundárias; inflorescência terminal com flores amarelas; estames numerosos, vermelhos ou avermelhados; fruto globoso ou elipsoidal, facilmente destacável, quando maduro; mesocarpo escasso amarelado, gorduroso, não aproveitável; endocarpo duro, recoberto por longos espinhos (Madereira Nicola, 2015).

A madeira da *Caryocar glabrum* é considerada uma madeira pesada, possuindo densidade entre 0,75 a 0,90 g/cm<sup>3</sup>; o albúrnio apresenta pouca diferença do cerne de cor bege

amarelada e possui a grã irregular, do tipo reversa e textura grossa (IPT, 1983). É uma madeira difícil de ser trabalhada em consequência da grã reversa (IPT, 1989).

Considerada uma madeira pesada, a piquiarana pode ser utilizada em diversos segmentos, como: construção civil, em dormentes ferroviários, cruzetas, postes, defensas, estacas, mourões, vigas e caibros. Também tem sido utilizada em embarcações (quilhas, convés, costados e cavernas), tanoaria e embalagens (IPT, 2015) (Figura 2).



**Figura 1:** Exemplar de *Caryocar glabrum*.



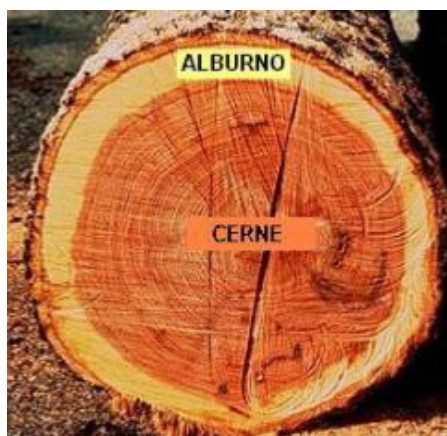
**Figura 2:** Representação da casca e tronco da árvore de *Caryocar glabrum*. Fonte: (LPF, 2015).

## 2.2 DNA de madeira

A extração de DNA de madeira é uma técnica mais complexa em relação à extração de DNA de folhas, comumente citadas na literatura. Segundo Rachmayanti (2009), tal dificuldade pode estar relacionado a problemas físicos, químicos, biológicos e fisiológicos.

Os físicos constituem os tratamentos mecânicos aplicados para romper o tecido duro da madeira, como o superaquecimento que pode causar a degradação irreversível do DNA. Os químicos estão relacionados aos agentes e substâncias da madeira, que podem inibir a extração de DNA ou resultar em um DNA de baixa qualidade, não sendo adequado para a amplificação por PCR. Os biológicos são referentes a decomposição da madeira por fungos e microrganismos, devido a longos períodos de armazenamento, podendo resultar na degradação do DNA. E os fisiológicos estão relacionados à idade da árvore, pois a degradação do DNA irá ocorrer após a morte de uma célula vegetal.

De acordo com Colpaert et al. (2005), amostras do câmbio de espécies arbóreas tropicais resultaram em uma boa qualidade do DNA extraído, podendo ser comparado com a extração de DNA de folhas. Entretanto as extrações a partir de madeiras secas resultaram em complicações, especialmente se retiradas do alburno e mais ainda do cerne, devido à presença de inibidores como carboidratos (celulose) e fenóis (lignina) (LOWE, 2008). Ou também pelo fato do cerne apresentar células mortas e mais antigas e o alburno células novas (KLOCK, et. al., 2005) (Figura 3).



**Figura 3:** Alburno e cerne (Klock, 2005).

Segundo estudos realizados por Jiao et. al. (2013), grandes quantidades de DNA foram extraídas de alburno fresco e folhas, enquanto que a quantidade de DNA extraído a partir de do cerne fresco era muito inferior não sendo possível a sua visualização em gel de eletroforese a 1% de agarose. Essa diferença na quantidade de DNA extraído a partir das diferentes posições radiais pode ser explicada pelo fato de que a maioria das células do parênquima permanece viva no alburno, sendo o DNA gradualmente degradado durante o processo de morte celular durante à formação do cerne.

### 2.3 Extração de DNA

A extração do DNA é a primeira etapa a ser realizada para o uso do DNA em posteriores técnicas moleculares, como a amplificação por PCR (Reação Polimerase em Cadeia), sequenciamento e conhecimento de genes relacionados a diversas funções, mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades. Para estas finalidades, é fundamental que se obtenha um DNA com uma boa qualidade e integridade. Existem muitos protocolos distintos de extração de DNA que podem variar em função da espécie e do tecido a serem analisados (COSTA; MOURA, 2001). Um dos protocolos amplamente utilizado devido a sua rapidez e facilidade é o que utiliza o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Esse

detergente libera o DNA celular e se complexa a ele, em seguida o DNA é separado por meio do tratamento com isopropanol e etanol. Este protocolo pode ser adaptado de várias maneiras, dependendo do tipo de tecido a ser extraído e a quantidade de amostra disponível (OLIVEIRA et al., 2007).

Os reagentes utilizados na etapa de extração são muito variados, e na tabela abaixo foram descritas as principais funções dos compostos mais utilizados na extração de DNA de material vegetal (Tabela 1).

**Tabela 1:** Principais substâncias utilizadas na extração de DNA e suas respectivas funções (ROMANO; BRASILEIRO, 1998; OLIVEIRA, et al., 2007)

Material utilizado	Função
Nitrogênio líquido e quebra mecânica	Romper a parede celular
Detergente CTAB ou SDS (dodecil sulfato de sódio)	Romper a membrana celular
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético = agente quelante) e soluções com pH= 8	Evitar ação de DNAses que degradam o DNA e o pH 8 ou acima permite que o DNA fique na fase aquosa. O pH em faixas mais baixas que 8 desloca o DNA para a interface entre fase aquosa e fase orgânica. O pH abaixo de 7, o DNA é desnaturado e migra para a fase orgânica
Fenol e clorofórmio	Separar DNA de proteínas
Agentes antioxidantes (PVP – polivinilpirrolidona ou β-mercaptoetanol)	Proteger o DNA de substâncias fenólicas que oxidam-o
CTAB ou CsCl (cloreto de céσιο)	Separar DNA de polissacarídeos que interferem na migração do DNA em corridas de eletroforese
Álcool isoamílico	Adicionado junto com o clorofórmio para evitar formação de espuma, permitindo a melhor separação da fase aquosa e da fase orgânica
RNAse	Remoção de RNA
Etanol absoluto	Concentra o DNA e ajuda na remoção de resíduos de fenol e clorofórmio na amostra
Etanol 70%	Remover resíduos de sais
Cloreto de sódio, acetato de sódio e o acetato de amônio	Ajudam na precipitação de DNA
Isopropanol	Precipitação do DNA

## 2.4 Métodos de extração de DNA

O método que utiliza o detergente CTAB é o mais utilizado para diversas espécies vegetais, ocorrendo variações específicas para cada uma. Porém, existem outros métodos que podem ser utilizados para extrair DNA de madeira, como: isolamento de DNA total com Isotiocianato de Guanidina (COX, 1968; BOWTELL, 1987), utilizado como um desnaturante na purificação e extração de mRNA e ácidos nucléicos, agindo como um potente inibidor de RNase, protegendo os transcritos da degradação durante a extração (PROLAB, 2015); Isolamento de DNA utilizando a proteinase K, que inativa rapidamente as nucleases que degradam o DNA e RNA (LIEDKE, 2013); Kit de extração Núcleos de plantas II (Marcherey – Nagel), Kit de purificação de DNA genômico (Fermentas), Kit innuPREP plant DNA (Analytikjena) etc.; Isolamento de DNA utilizando o SDS, entre outros métodos existentes na literatura.

A tabela 2 evidencia outros trabalhos realizados para a extração de DNA de madeira, utilizando modificações do método CTAB e o kit Dneasy Plant Mini. Os resultados encontrados variam em função da concentração do tampão de extração e do tipo de tecido a ser analisado.

**Tabela 2:** Relação entre os protocolos utilizados e a concentração de DNA extraído

Espécie	Material	Método	DNA	Con. DNA	Tris HCl	EDTA	NaCl	CTAB	PVP	$\beta$ mercaptoethanol	Proteinase K	SDS	Autor
<i>Populus euphratica</i>	Madeira seca (30 anos)	Kit Dneasy Plant Mini	Boa quantidade de DNA	15.09 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Jiao et. al., 2015
<i>Cinnamomum</i> spp.	Casca	CTAB	Boa qualidade e quantidade	5 – 8.1 $\mu$ g/g	100m M	20mM	3mM	5%	1%	0.3%	-	-	Swetha et. al., 2014
<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg	Madeira (alburno) fresca	Kit Dneasy Plant Mini	Boa quantidade de DNA	8.01 ng/mg	-	-	-	-	-	-	-	-	Jiao et. al., 2013
Leguminosas	Casca	CTAB / SDS	Qualidade satisfatória e elevada quantidade de DNA	99.6 - 1666.6 $\mu$ g/uL	100m M	20mM	1.4mM	2%	2%	2%	35uL	35 uL	Novaes et. al., 2009
<i>Gonystylus bancanus</i>	Madeira processada	CTAB	Baixa qualidade e baixa quantidade	< 15 ng/ $\mu$ L	100m M	20mM	1.4mM	3%	1%	0.2%	-	-	Asif e Cannon, 2005
Pinus australiano	Casca	CTAB	Boa qualidade e quantidade	10 - 35 $\mu$ g/g	100m M	20mM	1.5mM	2%	2%	2%	-	-	Cheng et. al., 1997



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem das amostras de madeira

As amostras de madeira utilizadas nesse experimento foram originadas do cerne e doadas pelo Laboratório de Produtos Florestais (LPF do Serviço Florestal Brasileiro - (MA)) (Figura 4). As madeiras doadas foram todas secas naturalmente. Estas amostras foram armazenadas em freezer -80°C na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Seropédica).



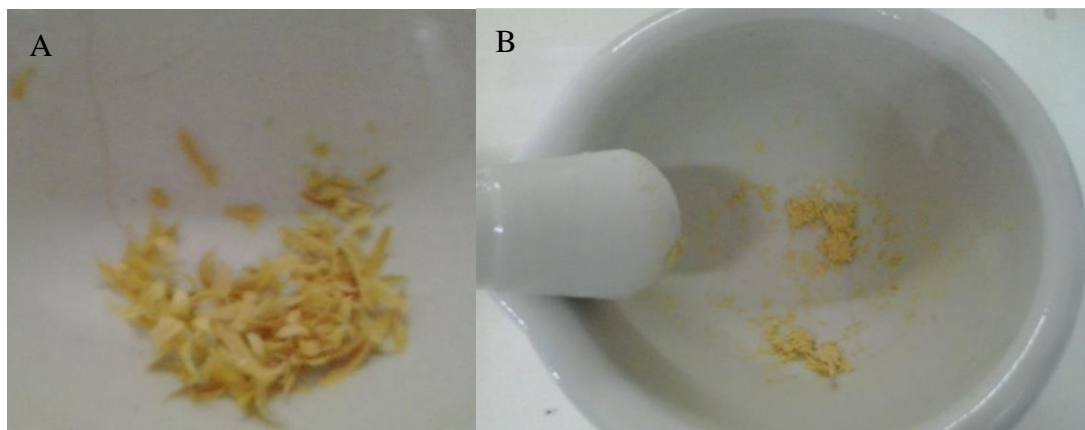
**Figura 4:** Amostras da madeira secas cedida pelo Laboratório de Pesquisa Floresta.

#### 3.2 Anatomia da madeira

Para a análise da estrutura macroscópica da madeira foi utilizada uma lupa com objetiva 10x de aumento da marca DiagTech. Antes da avaliação na lupa e no microscópio eletrônico, foi realizado o polimento da superfície da peça de madeira com uma lixa de nº 400, a fim de realçar as suas características anatômicas. Foram avaliados os planos transversal, tangencial e radial. A amostra de madeira foi examinada sob microscópio eletrônico de varredura para descrição da ultraestrutura microscópica (Hitachi, do tipo Tabletop Microscope TM3000).

#### 3.3 Extração de DNA

Inicialmente a amostra de madeira de *Caryocar glabrum* foi cortada em pequenas lascas e a quantidade utilizada foi de acordo com o estabelecido por cada protocolo testado neste trabalho (Figura 5).



**Figura 5:** A) Amostras da madeira de *Caryocar glabrum* transformadas em lascas para a utilização nas análises e B) maceração da amostra com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana.

Para a realização da extração do DNA da amostra foram utilizados 3 protocolos, com 3 repetições para cada amostra. A primeira etapa da extração, maceração com nitrogênio líquido, foi a mesma para os 3 protocolos testados.

### 3.3.1 Método CTAB adaptado de DOYLE; DOYLE, 1990

O protocolo (1) utilizado na extração foi baseado no método CTAB modificado por Doyle e Doyle, 1990. As amostras de madeira foram maceradas em um cadinho de porcelana, com auxílio de nitrogênio líquido e foram adicionados 2 mL do tampão (2% p/v de CTAB, 2,5% de PVP, 2M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8,0)) previamente aquecido a 65°C. A solução formada foi transferida para tubos eppendorfs de 2mL e foram adicionados 40 µL de β – Mercaptoetanol. Em seguida as amostras foram aquecidas a 65°C por 40 minutos, com agitações ( $\pm$  800 rpm) a cada 10 minutos, no Termomixer, ao final desse tempo foram submetidas ao choque térmico (gelo a 5°C) e centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa ( $\pm$ 600µL) foi coletada e transferida para um novo tubo de 2mL, no qual foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico) 24:1, por homogeneização durante 30 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação, foi coletada a fase aquosa ( $\pm$ 400µL), transferida para um novo tubo de 1,5mL onde foi adicionado 4µL de Rnase A na concentração estoque de 100µg/mL. Depois as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em um Termomixer.

Foram adicionados 240 µL de álcool isopropílico gelado, homogeneizando vagarosamente e as amostras foram incubadas a -20°C por 2 horas. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 minutos. Logo após foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 400µL de etanol absoluto. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 3 minutos, o etanol foi retirado e o precipitado foi seco a vácuo por 5 minutos a 30°C no Concentrator Plus Eppendorf. Esse precipitado foi ressuspensão em 20µL de água MiliQ autoclavada e armazenado no freezer - 80°C.

### 3.3.2 Kit DNeasy Plant Mini (Quiagen)

O protocolo (2) para a extração de DNA de madeira, foi realizado utilizando o Kit DNeasy Plant Mini (Quiagen), não sendo realizada nenhuma modificação.

Foram macerados 100mg de amostra da madeira em um cadinho de porcelana, com auxílio de nitrogênio líquido. Depois, foram adicionados 400  $\mu$ L do tampão AP1 e 4  $\mu$ L de RNase. O tubo contendo a amostra foi levado ao vortex e em seguida foi incubado a 65°C por 10 minutos.

Depois foram adicionados 130  $\mu$ L do tampão P3, misturado e incubado no gelo por 5 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado no tubo “QIAShredder 2mL” e centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos. Depois o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 1,5 do volume do tampão AW1. Então transferiu-se 650  $\mu$ L da amostra para a coluna “DNeasy spin column 2mL”, centrifugou-se por 1 minuto a 8000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Após esse procedimento a coluna foi colocada em um novo tubo de 2mL, adicionou-se 500 $\mu$ L do tampão AW2, centrifugou-se por 1 minuto a 8000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 500  $\mu$ L do tampão AW2 e centrifugou-se por 2 minutos a 1400 rpm.

Em seguida a coluna do tubo foi retirada com cuidado, para que não houvesse contato com o sobrenadante, e foi transferida para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se 100  $\mu$ L de tampão AE e foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C). Em seguida, centrifugou-se por 1 minuto a 800 rpm. Ao término da centrifugação, foram adicionados 100  $\mu$ L de tampão AE, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C) e centrifugado por 1 minuto a 800 rpm. O precipitado foi seco a vácuo por 5 minutos a 30°C no Concentrator Plus Eppendorf. E o precipitado foi ressuspensão em 20 $\mu$ L de água MiliQ autoclavada e armazenado no freezer -80°C

### 3.3.3 Método CTAB adaptado de SWETHA et al., 2014

O protocolo (3) foi uma adaptação de Swetha et al. (2014). As amostras de madeira foram maceradas em um cadinho de porcelana, com auxílio de nitrogênio líquido e foram adicionados 2 mL do tampão (100mM Tris base, 20mM EDTA, 3M NaCl, 5% CTAB, 1% PVP) previamente aquecido a 65°C. A solução formada foi transferida para tubos eppendorfs de 2mL e foram adicionados 3  $\mu$ L de  $\beta$  – Mercaptoetanol. Depois, as amostras foram aquecidas a 65°C por 2 horas, com agitações ( $\pm$  200 rpm) no Termomixer. Após o aquecimento, foi dado um choque térmico nas amostras (gelo a 5°C) e foi adicionado um volume igual de CIA (24:1), centrifugou-se a 1.118 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi coletada a fase aquosa ( $\pm$ 600 $\mu$ L) e transferida para um novo tubo de 2mL. Em seguida, foi adicionado 1/3 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5.2) e 2/3 do volume de CIA (24:1). Os tubos foram centrifugados a 1.118 rpm por 15 minutos.

Após a centrifugação, foi coletada a fase aquosa ( $\pm$ 400 $\mu$ L), transferida para um novo tubo e adicionado um volume igual de isopropanol gelado. Os tubos foram incubados a -40°C em ausência de luz por uma noite (overnight).

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 4.472 rpm por 20 minutos. Depois foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 400 $\mu$ L de etanol 70%. Em seguida a amostra foi centrifugada a 4.472 rpm por 10 minutos, foi retirado o etanol e o precipitado foi seco a vácuo por 5 minutos a 30°C no Concentrator Plus Eppendorf. E o

precipitado foi ressuspenso em 20 $\mu$ L de água MiliQ autoclavada. Em seguida, foi armazenado no freezer -80°C.

### 3.4 Quantificação do DNA extraído

O DNA extraído foi quantificado por medição da absorbância da amostra a 260nm em NanoDrop Espectrofotômetro da marca Thermo Scientific (Figura 6). Este instrumento é altamente sensível e pode medir pequenas quantidades de DNA da amostra, cerca de 2 ng/mL (ASIF; CANNON, 2005). Foram utilizados 2 $\mu$ L da amostra de DNA para verificar a qualidade e quantidade de DNA presente em cada amostra.



**Figura 6:** Nanodrop - equipamento utilizado para a verificação da qualidade e quantidade do DNA extraído.

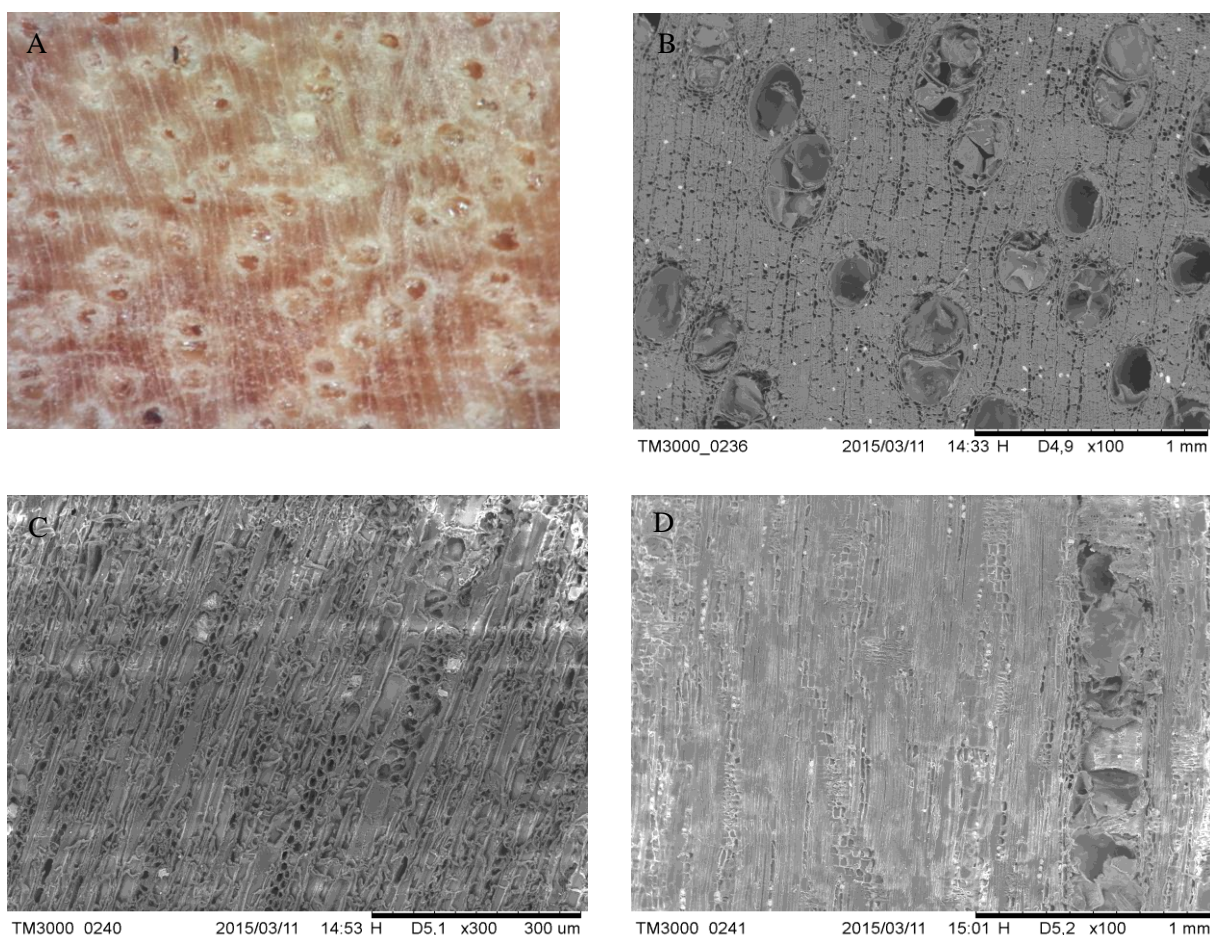
### 3.5 Análise estatística

Os dados obtidos na quantificação do DNA com o Nanodrop foram submetidos à análise estatística sendo as médias contrastadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa “ASSISTAT”.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Anatomia da madeira

A madeira de *Caryocar glabrum* apresenta o parênquima axial visível apenas sob lente e o parênquima apotraqueal difuso e difuso em agregados formando uma trama com os raios, podendo apresentar finas faixas marginais. Os raios são visíveis apenas sob lente, são finos e muito numerosos, sendo poucos visíveis na face tangencial (Figura 7). Os vasos são visíveis a olho nu, apresentam porosidade difusa, podendo possuir tamanhos variando de médios a grandes, solitários e múltiplos; e podendo ser obstruídos por tilos. As camadas de crescimento são marcadas por zonas fibrosas bem regulares e, possivelmente, pelo parênquima marginal (IPT, 1983).



**Figura 7:** Anatomia da madeira de *Caryocar glabrum*: “A”, imagem macroscópica transversal (aumento 10x). De “B” a “D”, imagem microscópica (MEV). B) plano transversal; C) plano tangencial; D) plano radial.

## 4.2 Extração de DNA

Os três protocolos utilizados permitiram extrair DNA da madeira de *Caryocar glabrum*.

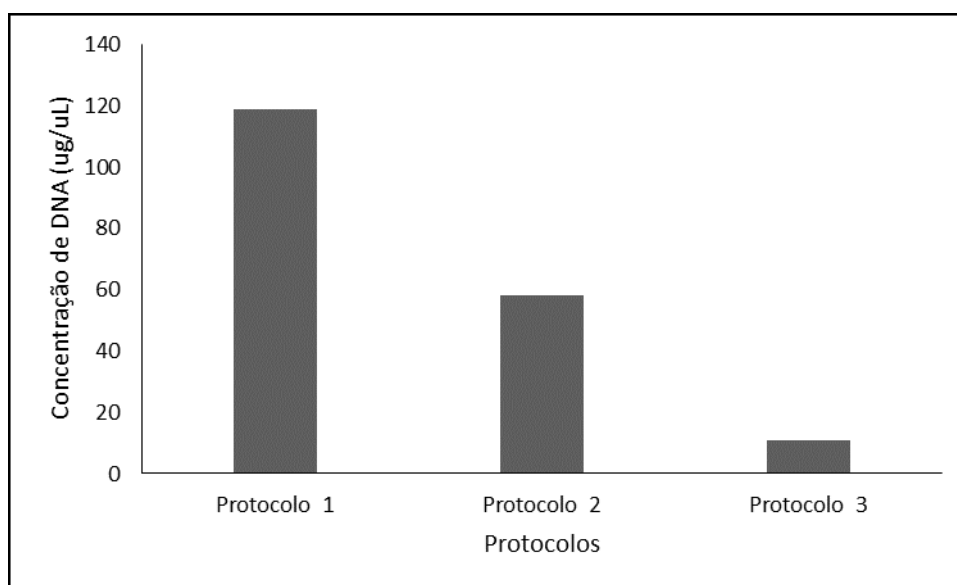
A maceração com nitrogênio líquido da amostra de madeira não apresentou dificuldades ou resistência, visto que em outros estudos com espécies diferentes da estudada, a maceração com nitrogênio líquido apresentou certa resistência, implicando na quantidade de DNA extraído. Essa característica pode estar relacionada ao tipo de grã na madeira, pois a *Caryocar glabrum* apresenta grã irregular do tipo revessa e neste tipo a resistência mecânica não é afetada (NISGOSKI, 1999), podendo ser evidenciado pela facilidade na maceração da madeira, o que pode ter favorecido a extração do DNA.

De acordo com os resultados obtidos, os protocolos testados tiveram uma diferença significativa entre si (Tabela 3). Com o protocolo 1 foi observado a extração de uma maior quantidade de DNA seguido pelo protocolo 2 e ambas as concentrações obtidas foram acima de 50 ng/μL (Figura 8). Visto que o rendimento do DNA a partir de madeira seca é relatado por Asif e Cannon (2005), como ótimo para quantidades iguais ou superiores a 50 ng/μL.

**Tabela 3:** Protocolos testados na extração de DNA de madeira de *Caryocar glabrum*

Protocolos	Concentração (ng/ $\mu$ L)
1	119,00 a
2	58,3 b
3	10,70 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey de médias ao nível de 5% de probabilidade



**Figura 8:** Relação entre os protocolos testados e as respectivas quantidades de DNA obtidos.

O protocolo 3 foi o que proporcionou a extração de menor concentração de DNA. Provavelmente este resultado se deve à pequena quantidade utilizada de  $\beta$  – Mercaptoetanol (apenas 3  $\mu$ L) e PVP (1,0%), quando comparado com o protocolo 1, 40  $\mu$ L e 2,5%, respectivamente. Ambos os reagentes são agentes antioxidantes que permitem neutralizar a ação dos contaminantes como polifenóis (SILVA, 2010). Essas substâncias estão presentes na madeira juntamente com os polissacarídeos, proteínas, lignina, tanino e pigmentos. A atuação dessas substâncias concomitantemente com a concentração inadequada dos agentes antioxidantes são fatores que podem ter contribuído para que o protocolo 3 não fosse eficiente na extração de DNA.

Estudos realizados por Swetha et al. (2014), apontaram que o protocolo 3 foi eficiente para a extração de DNA de madeira de *Cinnamomum spp.*, apresentando um elevado grau de pureza e quantidade de DNA satisfatório, indicando ainda que a etapa de descanso durante a noite (“overnight”) melhorou a quantidade de DNA extraído. Para a espécie em questão a etapa de adição de acetato de sódio juntamente com o clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) possibilitou uma maior remoção das proteínas e dos fenóis, melhorando assim o grau de pureza da amostra. E para a *Caryocar glabrum* a adição destes reagentes não foram suficientes para melhorar o grau de pureza da amostra.

Já no que diz a respeito à pureza das amostras (Tabela 4), o protocolo 2 (Kit DNeasy Plant Mini) foi o que resultou em melhor grau de pureza quando comparado com os demais protocolos testados (Figura 9). A pureza dos ácidos nucleicos, quando detectada por espectrofotômetro, é obtida em função dos dados de absorbâncias. A molécula de DNA

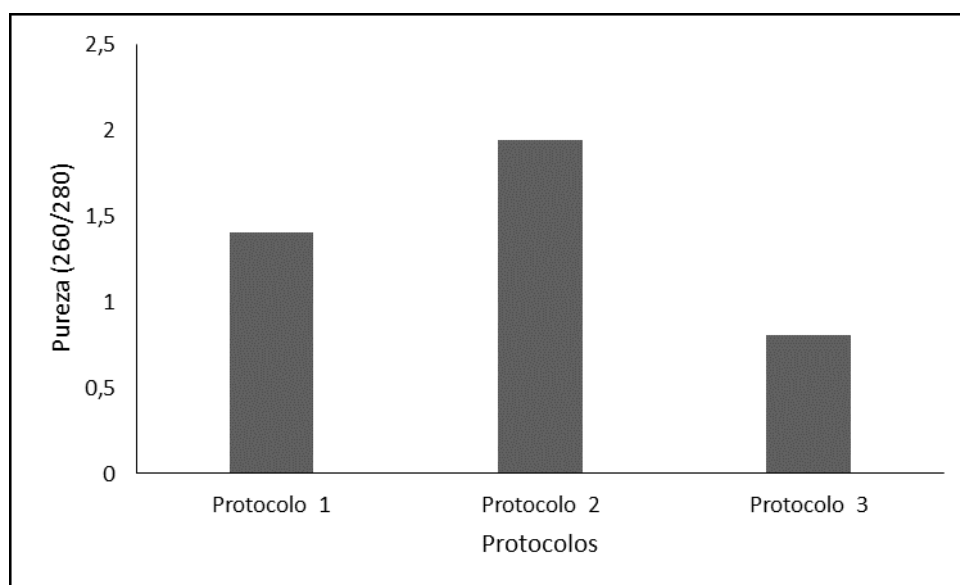
apresenta seu máximo de absorção em 260 nm, logo sua quantificação é feita com base na absorbância nesse comprimento de onda.

Os compostos presentes na madeira, como as proteínas mostram absorção na região de 280 nm, devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) (ZAIA et al., 1998). Dessa forma, a pureza da amostra de DNA é analisada pela razão 260/280, ou seja, relação entre a quantidade de DNA presente na amostra e a presença de substâncias na madeira (fenóis, proteínas, polissacarídeos, etc). Uma razão 260/280 na proporção de 1,8 é considerada ideal para DNA, e este é classificado como puro (TECHNICAL BULLETIN, 2012). Razões abaixo de 1,8 indicam possíveis contaminações por fenol, proteínas ou algum outro componente da madeira. Quando não se obtém o grau de pureza de 1,8, é necessário fazer ajustes no protocolo ou utilizar kits de purificação de DNA. A purificação do DNA é importante, pois permite obter melhores resultados no processo de amplificação.

**Tabela 4:** Protocolos testados para a avaliação da pureza do DNA extraído da madeira de *Caryocar glabrum*

Protocolos	Pureza (260/280 nm)
1	1,405 b
2	1,945 a
3	0,810 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey de médias ao nível de 5% de probabilidade



**Figura 9:** Relação entre os protocolos testados e os respectivos grau de pureza obtidos das amostras.

O kit DNeasy Plant Mini foi estudado por Rachmayanti (2006) e nesse estudo indicou-se que este protocolo foi eficiente para a extração de DNA de madeira de espécies tropicais da família Dipterocarpaceae, obtendo quantidade e qualidade suficiente para a amplificação por PCR. Aumentando assim as evidências de que o protocolo 2 deve ser mais adequado para espécies de clima tropical.

## 5. CONCLUSÃO

Os estudos realizados indicaram que o protocolo mais adequado para extrair DNA genômico de espécies nativas tropicais, especialmente *Caryocar glabrum*, é o protocolo 2, por apresentar resultados mais satisfatórios. Tais resultados abrem uma perspectiva favorável ao uso das amostras de DNA obtidas para a realização de técnicas moleculares, como a amplificação, clonagem e sequenciamento. Nesse contexto, a utilização de DNA torna-se viável para estudos mais avançados, apesar da dificuldade durante isolamento de madeiras. Motivado por esse resultado, novos estudos serão propostos, de modo que a metodologia adotada nesse trabalho de pesquisa sirva como parâmetro metodológico para as demais madeiras tropicais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, M.J., CANNON, C.H. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonostylus bancanus*). **Plant Molecular Biology Report**, 23:185 – 192, 2005.

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 141 p.

BOWTELL, D. L. Rapid isolation of eukaryotic DNA, Analytical. **Biochemistry** 162: 463 – 468.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Concórdia: Embrapa Gado de Corte, 2009. (Embrapa Gado de Corte. Circular Técnica, 36).

COLPAERT, N., et al. Sampling tissue for DNA analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. **Silvae Genetica** 54: 265-269, 2005.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. **Manual de Extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p.

COX, R. A. In: Grossman L., and Moldave K. (editors). **Methods in enzymology** . Vol 12B: Nucleic Acids. Academic press, New York, p. 156. 1968.

DOYLE, J.J.T. E DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v.12, p.13-15, 1990.

IPT - INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual de identificação das principais madeiras comerciais brasileiras**. São Paulo: IPT, 1983. 241p. (publicação IPT No 1226).



INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT  
**Sistema de Informações de Madeiras Brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989. 291p. (Relatório No 27 078)

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT.  
**Catálogos de Madeira Brasileiras para a Construção Civil**. São Paulo, 2013. (Publicação IPT No 4371).

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT.  
**Pequiarana**. Disponível em: [http://www.ipt.br/informacoes\\_madeiras/61.htm](http://www.ipt.br/informacoes_madeiras/61.htm). Acessado em: Maio/2015.

JIAO, L. et. al. Comparative analysis of two dna extraction protocols from fresh and dried wood of *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae). **IAWA Journal**. 33 (4): 441–456, 2012.

JIAO, L. et. al. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples. **Holzforschung** 68:487 – 494. 2013.

KLOCK, U. et al. **Química da Madeira**. 2005. 3ª edição. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 86p.

LIEDKE, A. **Fundamentos de extração de DNA e RNA**. Laboratório de Protozoologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2013. 39p.

LOWE, A. **Can we use DNA to identify the geographic origin of tropical timber?** Proceeding of the International Workshop “Fingerprinting methods for the identification of timber origins”. Bonn, Germany, 8-9 October 2007, p. 15-19, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Instrução Normativa 06, de 23 de Setembro de 2008**.

NISGOSKI, S. **Identificação e caracterização anatômica macroscópica das principais espécies utilizadas para laminação na região de Curitiba – PR**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, 1999.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. São Carlos, SP. 43p.

**Piquiarana** – Árvores Brasileiras: Madeireira Nicola. Disponível em: [www.madeireiranicolalitoral.com.br/arvores-brasileiras.aspx?arv=piquiarana](http://www.madeireiranicolalitoral.com.br/arvores-brasileiras.aspx?arv=piquiarana). Acessado em: Abril/2015.

**Piquiarana** – Árvores Brasileiras: Madeireira Guimarães. Disponível em: <http://www.madguimaraes.com.br/pequiarana.htm>. Acessado em: Abril/2015.

PROLAB. **Isotiocianato de Guanidina**. Extração a Purificação de Ácidos Nucléicos. 2015. Disponível em: Isotiocianato de Guanidina. Acessado em: Junho/2015.

RACHMAYANTI, Y. **Isolation of DNA from unprocessed and processed wood of Dipterocarpaceae**. Department of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. University of Göttingen, Alemanha. 44p, 2009.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de Plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, 5 (29): 40 - 43, 1998.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado. **Árvore**, Viçosa-MG, 34(6): 973-978, 2010.

SWETHA, V. P. et al. Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomun* spp. **Turkish Journal of Biology**. 38: 151-155, 2014.

TECHNICAL BULLETIN. **Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios**. Thermo Scientific NanoDrop Products, T123– Rev 1/2012.

VERBYLAITE, R. et al.. Comparision of Ten DNA Extraction Protocols from Wood of European Aspen (*Populus tremula* L.). **Baltic Forestry**, 16 (1): 35 – 42, 2010.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6): 787 - 793, 1998.