OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DE DUAS ESPÉCIES DE INGAZEIRO

Fabiano Silva Soares¹, Fabio Tomaz de Oliveira¹, Nayara Magagnin Borges¹, Bruna Mezzalira da Silva¹, Ana Aparecida Bandini Rossi²

1. Mestres em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres-MT, Brasil. E-mail: soares_fabiano@hotmail.com
2. Doutora em Genética e Melhoramento. Professora do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Agrárias e Biológicas, PGMP, PPGBioAgro, PPGBioNorte, Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta-MT, Brasil.

Recebido em: 03/10/2016 – Aprovado em: 21/11/2016 – Publicado em: 05/12/2016
DOI: 10.18677/EnciBio_2016B_074

RESUMO

A determinação de um protocolo de extração de DNA genômico de boa qualidade e quantidade é condição chave para a realização de estudos moleculares em plantas. Como o DNA isolado deve estar livre de contaminantes, ajustes de protocolo são necessários, especialmente para espécies em que estudos desse tipo são poucos. Assim, o presente estudo teve por objetivo otimizar um protocolo de extração de DNA para as espécies *Inga edulis* e *I. laurina*, visando futuros estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares. Os testes de extração partiram do protocolo padrão de CTAB. Foram testadas duas concentrações do detergente CTAB (2 e 5%) e três concentrações de β -mercaptoetanol (0, 1 e 2%), além da adição de Proteinase K (20 mg.mL^{-1}) no tampão de extração, cujo procedimento foi aplicado em folhas maduras maceradas em nitrogênio líquido. Os resultados demonstraram que o tampão com a concentração de 5% de CTAB foi mais eficiente no isolamento de amostras de DNA das duas espécies de ingazeiro. Quanto ao β -mercaptoetanol, nenhuma das três concentrações utilizadas no tampão de extração interferiram na quantidade e qualidade do DNA obtido. Assim, o método com CTAB 5% no tampão de extração pode ser utilizado para isolamento de DNA visando estudos de caracterização genética com marcadores moleculares.

PALAVRAS-CHAVE: *Inga edulis*; *Inga laurina*; isolamento de DNA

OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR DNA EXTRACTION FROM LEAF TISSUE OF TWO SPECIES OF THE GENUS INGA

ABSTRACT

The determination of a genomic DNA extraction protocol of good quality and quantity is key precondition for carrying out molecular studies in plants. As the isolated DNA should be free of contaminants, protocol adjustments are necessary, especially for species where have a small number of studies. This study aimed optimize a protocol of DNA extraction suitable for specimens *I. edulis* and *I. laurina*, aiming future studies of diversity genetic using molecular markers. Extraction tests departed from the standard CTAB protocol. Were tested two cationic detergent CTAB concentrations (2

and 5%) and three concentrations of β -mercaptoethanol (0, 1 and 2%), plus the addition of Proteinase K (20 mg.mL⁻¹) in extraction buffer. The procedure was applied on mature leaves macerated in liquid nitrogen. The results demonstrated that the buffer in the concentration of CTAB 5% was more effective in isolation of DNA samples the two species of the genus *Inga*. About the β -mercaptoethanol, none of the three concentrations used in the extraction buffer interfered in quantity and quality of the DNA extracted. Thus, the method with CTAB 5% extraction buffer could be used for DNA isolation aiming genetic characterization studies with molecular markers.

KEYWORDS: *Inga edulis*; *Inga laurina*; DNA isolation.

INTRODUÇÃO

Inga Mill. pertence à família Leguminosae-Mimosoideae, tribo Ingeae e possui cerca de 300 espécies (LEWIS et al., 2005). Destas, 131 são referidas para o Brasil, com 96 na região fitogeográfica da Amazônia (FLORA DO BRASIL, 2016). O nome do gênero é derivado do Tupi-Guarani, vernacularmente conhecido como ingá (LEWIS et al., 2005).

Trata-se de um gênero com distribuição exclusivamente neotropical, com sete principais áreas de distribuição, das quais o litoral, o interior do Brasil, o sudeste da América Central e o oeste da América do Sul, constituem os principais centros de diversidade do gênero (PENNINGTON, 1997).

As espécies do gênero *Inga* são caracterizadas por apresentarem porte arbóreo, folhas pinadas, nectário na raque foliar, localizado entre cada par de folíolos e legume, com sementes envolvidas por sarcotesta de coloração branca, carnosa e adocicada (PENNINGTON, 1997). Destacam-se por sua importância no reflorestamento de matas ciliares e áreas degradadas, uso agroflorestal, fitoterapia, fonte de energia e alimento (BILIA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2012; FERNANDES et al., 2015), podendo-se citar as espécies *I. edulis* (Martius), ou ingá-cipó, e *I. laurina* (Sw. [Willd]), ou ingá-mirim.

Apesar de ser um grupo bastante representado no Brasil, ainda são poucos os estudos sobre a sua diversidade genética (CRUZ NETO et al., 2014; ROLLO et al., 2016). Levando em consideração que o avanço da fronteira agrícola na região norte do país, principalmente no estado de Mato Grosso (PICHININ, 2007), coloca em risco áreas consideráveis de ocorrência natural de populações de ingazeiro, o conhecimento da diversidade genética é necessário para auxiliar nas orientações sobre a sua conservação e uso racional (ROLLO et al., 2016). Somado a isso, está o crescente interesse pelos recursos genéticos vegetais da biodiversidade brasileira, como fonte de novos bioprodutos (ASTOLFI FILHO et al., 2014).

A maioria dos estudos de diversidade genética utilizam ferramentas moleculares, que são baseados principalmente na reação em cadeia da polimerase (PCR) que requer DNA de boa qualidade para obter resultados satisfatórios. No entanto, relatos sobre dificuldades em isolar DNA em plantas são comuns, devido ao fato de que diversos contaminantes podem ser encontrados no tecido vegetal (SILVA, 2010; AGBAGWA et al., 2012; CORRÊA et al., 2013). Muitas espécies vegetais possuem níveis variados de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários, substâncias que se ligam firmemente ao ácido nucleico durante o isolamento do DNA e interferem direta ou indiretamente nas reações enzimáticas (SILVA, 2010).

Embora exista publicação de vários protocolos para isolamento de DNA de planta, o mais utilizado é o que emprega o detergente CTAB (brometo de

cetiltrimetilamônio) proposto por DOYLE & DOYLE (1987), com algumas modificações de acordo com as características da espécie em estudo (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Essas modificações podem ser aplicadas na maneira como o tecido foliar é macerado, na presença ou não de nitrogênio líquido, e/ou na quantidade dos reagentes químicos utilizados no tampão de extração. De modo geral, um bom procedimento de extração de DNA deve ser rápido, barato e simples, produzindo uma boa quantidade de DNA de alta qualidade (AGBAGWA et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o de otimizar um protocolo de extração de DNA empregando folhas maduras de duas espécies de ingazeiro, visando futuros estudos genéticos por meio de marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas amostras de folhas maduras de duas espécies de ingazeiro, *I. edulis* e *I. laurina*, coletadas na área arborizada da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), no município de Alta Floresta - MT. As folhas foram higienizadas em água corrente, e em seguida, submetidas aos procedimentos laboratoriais para extração, quantificação e análise da integridade do DNA no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular.

Extração do DNA genômico

Os testes de extração do DNA genômico foram realizados por meio do protocolo padrão de CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987), com modificações nas concentrações de CTAB, β -mercaptoetanol e adição de proteinase K no tampão de extração. Para tanto, as folhas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, sendo retirada duas amostras (repetições) de 150 mg e transferidas para microtubos de 2 mL. Em cada microtubo foram adicionados 800 μ L do tampão de extração (CTAB nas concentrações 2 e 5%; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; PVP 1%; β -mercaptoetanol 0, 1 e 2%; e proteinase K 20 mg.mL⁻¹).

Para solubilização das membranas celulares, os microtubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, com suaves inversões a cada 10 minutos. Posteriormente, foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos a velocidade de 12.000 rpm em centrífuga não refrigerada. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi coletado e transferido para um novo microtubo de 2 mL contendo 700 μ L do solvente orgânico clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e, depois, centrifugadas por 10 minutos a velocidade de 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL e, desta vez, para precipitação do DNA foram adicionados 500 μ L de isopropanol gelado, misturando-se as amostras suavemente por inversão dos microtubos, várias vezes. As amostras foram mantidas em repouso no freezer por 3 horas, a -20 °C, para formação do precipitado.

Logo após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm e o isopropanol foi descartado. Para a remoção dos sais, o precipitado foi lavado duas vezes em 1 mL de álcool etílico 70% e uma vez em 1 mL de álcool etílico 95%, sendo que a cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000 rpm. Após o descarte do álcool etílico, o precipitado foi seco pela inversão dos microtubos sobre folhas de papel-toalha em bancada de laboratório até a completa evaporação do álcool.

Os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 40 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) com RNase (10 mg.mL⁻¹) e colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA contaminante. As duas repetições foram reunidas e incubadas a 7 °C por 24 horas, e posteriormente, armazenadas a -20 °C.

Análise da integridade do DNA extraído

O produto das extrações foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg.mL⁻¹) em tampão TBE (Tris-borato 89 mM e EDTA 2 mM). Em cada poço do gel foram adicionados 3 µL da solução de extração, 2 µL de água destilada autoclavada e 1 µL de corante (tipo IV), para um volume final de 6 µL. Após 2 horas de corrida eletroforética (80 V), o gel foi exposto à luz ultravioleta e fotodocumentado por câmera digital Sony®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As modificações no protocolo de extração produziram DNA de boa qualidade para as duas espécies avaliadas, não havendo contaminação e degradação (Figura 1), o que segundo ROMANO & BRASILEIRO (1999) é caracterizado pela ausência de DNA retido no poço e de arraste vertical no gel, respectivamente. A liberação de DNA também foi favorecida pela maceração das folhas em nitrogênio líquido, que ao congelar rapidamente o tecido foliar evitou a degradação do DNA das amostras.

FIGURA 1. DNA genômico extraído de duas espécies de ingazeiro (A – *Inga laurina*; B – *Inga edulis*), com duas concentrações de CTAB (2% e 5%) e três de β-mercaptoetanol no tampão de extração. Os números 0, 1 e 2 significam 0%, 1% e 2% de β-mercaptoetanol, respectivamente.

O aumento da concentração de CTAB no tampão afetou a quantidade e qualidade do DNA extraído (Figura 1). Para *Inga edulis* proporcionou amostras (bandas) mais intensas e definidas, indicando que o uso desse detergente na concentração de 5% foi mais eficiente para a obtenção de maiores quantidades de DNA. Para *Inga laurina* observa-se uma maior integridade das amostras de DNA obtidas em função da maior concentração de CTAB.

Nos protocolos de extração de DNA em plantas o CTAB é empregado com a finalidade de promover a separação dos ácidos nucleicos dos polissacarídeos, já que os polissacarídeos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Logo, é possível inferir que o nível de polissacarídeos contido no tecido foliar das duas espécies estudadas não foi suficiente para impedir o isolamento do DNA.

Na literatura, alguns estudos mostraram que a qualidade do DNA extraído difere para espécies do mesmo gênero, como em *Cajanus* spp. (AGBAGWA et al., 2012) e *Jatropha* spp. (CORRÊA et al., 2013), assim como para espécies que não pertencem ao mesmo grupo botânico, como *Anacardium humilis*, *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliensis*, *Eugenia dysenterica* e *Hancornia speciosa* (SILVA, 2010), por exemplo. De uma forma ou de outra, esses autores concordam que devido às características específicas de cada espécie, tal como a presença de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários, que oferecem proteção natural as plantas podem ser um problema no processo de isolamento de DNA.

SOUZA et al. (2012), ao proporem um protocolo para extração de DNA de alta qualidade para *Dimorphandra mollis* (Leguminosae-Caesalpinioideae), sugeriram que as amostras devem estar livres de substâncias gelatinosas, como polissacarídeos e compostos fenólicos que podem co-precipitar com o DNA e dificultar o seu manuseio. A presença destes compostos geralmente aumenta a viscosidade das amostras de DNA extraídas, causando interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). Tomando como base essas considerações, o método CTAB provou ser adequado para as espécies em estudo, pois com este método o DNA foi extraído livre de uma matriz gelatinosa e viscosa.

SCHMITT et al. (2014) testaram duas concentrações de CTAB (2% e 5%) na extração do DNA de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) e verificaram que apenas na concentração de 5% houve isolamento de DNA. Os autores mencionaram que as folhas da espécie possivelmente eram ricas em polissacarídeos, e que por isso, a menor concentração de CTAB utilizada não foi capaz de eliminá-los das amostras de DNA, inviabilizando o seu uso. SILVA et al. (2014) também verificaram que o emprego de CTAB a 5% foi mais eficiente na extração do DNA a partir das folhas de *Anacardium giganteum* (Anacardiaceae). Para as duas espécies avaliadas, o emprego do CTAB independente da concentração utilizada mostrou ser eficaz no isolamento de DNA.

Outro fator a ser considerado durante a extração de DNA é a oxidação das amostras, que tendem a apresentar coloração marrom devido os compostos fenólicos oxidados ligarem-se a proteína e aos ácidos nucleicos, tornando o DNA contaminado. Para evitar o efeito oxidativo, o β -mercaptoetanol é o antioxidante mais utilizado (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). No entanto, para as duas espécies de ingazeiro avaliadas a concentração de β -mercaptoetanol não interferiu na quantidade e qualidade do DNA extraído (Figura 1), concordando com os resultados obtidos por SCHMITT et al. (2014) e SILVA et al. (2014).

O efeito positivo do uso do β -mercaptoetanol no isolamento de DNA limpo foi relatado por SILVA (2010), que ao avaliar cinco espécies nativas do Cerrado sugeriu que a utilização desse antioxidante em altas concentrações (1%, 2,5% e 5%) no tampão de extração permite a obtenção de um melhor padrão de qualidade e quantidade de DNA. A autora observou, ainda, que para todas as espécies estudadas, a redução da concentração de β -mercaptoetanol provocou a diminuição da pureza do DNA extraído, inviabilizando seu uso nos estudos que envolveram técnicas moleculares. DALBOSCO et al. (2015) também verificaram que concentrações mais elevadas de β -mercaptoetanol permitiram a obtenção de DNA em *Epidendrum viviparum* (Orchidaceae). Contrariando os resultados apresentados acima, para as duas espécies de ingazeiro avaliadas foram obtidas amostras de DNA de coloração clara nas concentrações de 0 a 2% de β -mercaptoetanol no

tampão de extração e, portanto, livres da degradação formada pela oxidação dos polifenóis durante a lise celular.

O fato de o método modificado que não utilizou o β -mercaptoetanol ter proporcionado amostras claras e limpas pode ser atribuído ao PVP (polivinilpirrolidona). Segundo MALIYAKAL (1992), esse antioxidante protege a cadeia de DNA contra danos por formar complexas ligações de hidrogênio com os compostos fenólicos, que quando centrifugado na presença de clorofórmio acumulam-se na interface entre as fases orgânica e aquosa, permitindo que sejam facilmente removidos da amostra antes de oxidar irreversivelmente as moléculas de DNA. Contudo, cabe ressaltar que o β -mercaptoetanol assume importância crucial no isolamento de DNA em diversas espécies de plantas (ROMANO & BRASILEIRO, 1999), devendo ser utilizado nos protocolos de extração afim de reduzir a contaminação provocada pelos polifenóis.

Segundo AGBAGWA et al. (2012), um bom procedimento de extração de DNA genômico deve ser rápido, barato e simples, produzindo uma boa quantidade de DNA intacto de pureza razoável usando pequenas quantidades de tecido e reagentes químicos de extração. A ausência de DNA de boa qualidade é um fator limitativo para o sucesso da reação em cadeia da polimerase (PCR) que utiliza diversos marcadores moleculares, tais como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), sequências simples repetidas (SSR), polimorfismo de sequências relacionadas amplificadas (SRAP) e polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (AGBAGWA et al., 2012).

CONCLUSÃO

O protocolo CTAB é adequado para extração de DNA genômico a partir de tecido foliar maduro para as duas espécies de ingazeiro. A utilização de CTAB na concentração de 5% foi mais eficiente no isolamento de DNA para *I. edulis* e *I. laurina*. A concentração de β -mercaptoetanol não interfere na quantidade e qualidade do DNA extraído. Assim, o método com CTAB 5% no tampão de extração pode ser utilizado para isolamento de DNA visando estudos de caracterização genética com marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

- AGBAGWA, I. O.; DATTA, S.; PATIL, P. G.; NADARAJAN, N. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4632 - 4639, 2012.
- ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N.; BIGI, M. F. M. A. Biodiversidade e Biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v. 19, n. 28, p. 45 - 80, 2014.
- BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 13, n. 1-2, p. 26 - 30, 2003.
- CORRÊA, A. A. P.; UNEDA-TREVISOLI, S. H.; PAZETO, M. S. R.; VIANNA, V. F.; DI MAURO, A. O. Análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha* spp. **Cientifica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 235 - 245, 2013.

CRUZ NETO, O.; AGUIAR, A. V.; TWYFORD, A. D.; NEAVES, L. E.; PENNINGTON, R. T.; LOPES, A. V. Genetic and ecological outcomes of *Inga vera* subsp. *affinis* (Leguminosae) tree plantations in a fragment tropical landscape. **Plos one**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1 - 8, 2014.

DALBOSCO, E. Z.; SILVA, C. G.; MELHORANÇA, E. A. L.; MIRANDA, A. F.; SILVA, C. A. Otimização do protocolo para extração de DNA genômico de *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 3236-3243, 2015.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation DNA procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11 - 15, 1987.

FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P.; SIQUEIRA, L. C.; MAROTTA, C. P. B.; CARDOSO, I. M. Leguminosae em sistemas agroflorestais cafeeiros em Araponga, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 75 - 86, 2015.

FLORA DO BRASIL. ***Inga* in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/florado-brasil/FB22803>>. Acesso em: 29 de Setembro 2016.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577p.

MALIYAKAL, E. J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, Seattle, v. 20, n. 9, p. 2381, 1992.

NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. M.; MARTINS, C. A. S.; BERNARDES, C. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 2121 - 2131, 2012.

PENNINGTON, T. D. **The genus Inga: botany**. London: The Royal Botanic Gardens, Kew, 1997. 844p.

PICHININ, E. S. O contexto do avanço da fronteira Agrícola na Amazônia: algumas reflexões sobre o desenvolvimento regional no norte de Mato Grosso/MT. **Revista Formação**, Presidente Prudente, v. 2, n. 14, p. 70 - 79, 2007.

ROLLO, A.; LOJKA, B.; HONY, D.; MANDÁK, B.; WONG, J. A. C.; SANTOS, C.; COSTA, R.; QUINTELA-SABARÍS, C.; RIBEIRO, M. M. Genetic diversity and hybridization in the two species *Inga ingoides* and *Inga edulis*; potential application for agroforestry in the Peruvian Amazon. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 73, n. 2, p. 425 - 435, 2016.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40 - 43, 1999.

SCHMITT, K. F. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; SANDER, N.; SILVA, C. J. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa* (L.). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1560 - 1568, 2014.

SILVA, B. M.; DALBOSCO, E. Z.; BOTINI, N.; FARIA, R. B.; ROSSI, A. A. B. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock Ex. Engl. (Anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 19, p. 2401 - 2407, 2014.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 973 - 978, 2010.

SOUZA, H. A. V.; MULLER, L. A. C.; BRANDÃO, R. L.; LOVATO, M. B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 756 - 764, 2012.