Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima

Raíssa Maria Sampaio de Paiva[1,4], Lucilia Dias Pacobahyba[2], Flávia Antunes[3] & Fabiana Granja[2]

1. Universidade Federal de Roraima. Campus Paricarana – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT), CEP: 69310-000, Boa Vista – RR, Brasil

2. Universidade Federal de Roraima, Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio), Boa Vista – RR, CEP: 69310-000, Boa Vista – RR, Brasil

3. Universidade Estadual de Roraima, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Boa Vista – RR, CEP: 69306-530, Boa Vista – RR, Brasil

4. Autor para contato: raissalagreca@hotmail.com

Recebido em: 01/09/2014 Aceito em: 10/12/2014 Publicado online em PDF: 22/12/2014.

RESUMO

Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima O objetivo desse trabalho foi obter melhores resultados na extração do DNA de espécies amazônicas de macrófitas aquáticas a partir de adaptações no protocolo do CTAB. Foram coletadas folhas jovens de cinco diferentes gêneros de macrófitas aquáticas pertencentes às famílias Araceae, Menyanthaceae, Nymphaeaceae, Pontederiaceae e Salviniaceae, transportadas no gelo e armazenadas em freezer -80ºC até a realização dos procedimentos de extração, sendo utilizado como controle uma extração com o Kit Nucleon Phytopure. As principais modificações no protocolo foram a utilização de RNAse e proteinase K, e para o procedimento de maceração utilizamos além da folha, o almofariz e o pistilo também congelados, melhorando assim o resultado final do material obtido, que está diretamente relacionado com a qualidade dos processos aos quais são submetidos. Concluímos que o método CTAB, após algumas modificações, mostrou-se bastante eficiente para obtenção de DNA genômico em boa quantidade e qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: CTAB; DNA; Extração

ABSTRACT

Technical note on changes in extraction methodology to obtain genetic material aquatic macrophytes grids PPBio of Roraima. This study seeks to obtain better results in total DNA aliquots extracted from Amazonian species of aquatic macrophytes by using an adapted CTAB protocol. Young leaves of five different genera of aquatic weeds belonging to the Araceae, Menyanthaceae, Nymphaeaceae, Pontederiaceae and Salviniaceae, transported on ice and kept as cold as minus 80 degrees Celsius until DNA was extracted from young leaf material with the Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kit. The main amendments to extraction protocol were inclusion of RNase and proteinase K, and maceration of frozen leaves with a mortar and pestle that were also kept in ice cold conditions. These amendments improved the final result of the material obtained, which is directly linked to the quality of the processes it undergoes. In sum, the modified CTAB method gave best results for extracting both high-quality and -quantity DNA.

KEYWORDS: CTAB; DNA; Extraction.

INTRODUÇÃO

A evolução das técnicas moleculares e biotecnológicas tem proporcionado ferramentas para a obtenção de melhores resultados a partir de estudos baseados em segmentos do genoma das espécies, que atualmente, vem completando e somando informações junto à sistemática vegetal para a obtenção de melhores respostas quanto a identificação (Torres 2003).

O Programa de Pesquisa em Biodiversidade – PPBio, criado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e implementado nas regiões do Nordeste e da Amazônia, tem como principal objetivo a criação de um sistema integrado de

informação sobre a biodiversidade, facilitando a gestão do patrimônio natural dessas áreas e fortalecendo ações de pesquisas para o desenvolvimento sustentável do bioma (PPBIO 2013). Para que todos os projetos sejam desenvolvidos de forma uniforme e homogênea foram criadas grades, áreas de 25 km2 constituídas por 30 parcelas que seguem as curvas de nível do relevo e possuem um número variável de parcelas aquáticas permanentes a montante dos pontos em que as trilhas atravessem os riachos ou outros corpos d'água (Brasil 2005). Dentre as linhas de estudo deste programa, encontram-se também, estudos voltados para a conservação dos recursos genéticos vegetais.

Para o desenvolvimento de trabalhos nesta área um dos primeiros passos é a obtenção de material genético de boa qualidade que pode ser utilizado em estudos evolutivos, comparativos, taxonômicos e ecológicos, Para as espécies vegetais, há uma diversidade de protocolos existentes, em consequência da grande variabilidade da composição bioquímica que pode ser encontrada em diferentes plantas e tecidos (Romano 1998). Assim, encontramos diversas publicações descrevendo diferentes metodologias de coleta, tratamento e conservação de amostras de plantas para estudos moleculares (Mazza & Bittencourt 2000; Silva et al. 2003; Feres et al. 2005 e Roso & Vidal 2010).

O método para extração mais utilizado com sucesso para diferentes espécies é baseado no uso do detergente Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (CTAB) (Doyle & Doyle 1987). Esse detergente solubiliza as membranas celulares, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (Weising et al. 1995). Porém, grande parte dos protocolos descritos na literatura apresentam modificações no protocolo CTAB padrão, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo resultantes principalmente do co-isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários (Romano & Brasileiro 1999), sendo acrescentados reagentes como Dodecil sulfato de sódio (SDS), Polivinilpirrolidona (PVP), Proteinase K e RNAse, a fim de evitar possíveis contaminações.

Entretanto, não encontramos trabalhos que solucionassem os problemas detectados durante a extração de DNA de macrófitas aquáticas. Segundo o *International Biology Programme* (IBP), macrófita aquática é a denominação mais adequada para caracterizar plantas que habitam desde brejos até ambientes verdadeiramente aquáticos (Esteves 1998).

O objetivo deste trabalho foi adequar um protocolo para extração de DNA de macrófitas aquáticas provenientes de diferentes corpos de água das grades do PPBio e áreas adjacentes presentes no estado de Roraima, relatando os problemas e as soluções encontradas durante os procedimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e obtenção das amostras

Realizamos as coletas em diferentes ambientes aquáticos nas quatro áreas de estudo do PPBio localizadas no estado de Roraima, sendo: dois em áreas de savana, Campus do Caumé/UFRR e Campo Experimental do Água Boa/Embrapa; um em área de floresta em contato com as savanas, Estação Ecológica de Maracá e outro em floresta de contato com as campinas/campinaranas, Parque Nacional do Viruá (PPBIO 2013).

Para avaliação das diferentes metodologias de extração foram selecionadas macrófitas que haviam sido previamente identificadas sistematicamente, sendo coletadas folhas de *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth (Pontederiaceae), *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae), *Nymphaea rudgeana* G. Mey. (Nymphaeaceae), *Nymphoides indica* (L.) Kuntze (Menyanthaceae) e *Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae) nos diferentes ambientes, conforme mostra a Tabela 1.

As amostras foram lavadas três vezes em água destilada ainda em campo, e armazenadas em sacos plásticos individuais com fecho hermético, sendo as mesmas transportadas em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) do Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio-UFRR) onde foram separadas nas quantidades exatas para a realização da extração e mantidas a -80ºC até o momento da sua utilização.

Extração de DNA

As extrações foram primeiramente realizadas seguindo o protocolo CTAB (Romano & Brasileiro 1999, adaptado de Doyle & Doyle 1987) e para obtermos uma melhor

qualidade do DNA extraído adicionou-se Proteinase K (50 µg/ml). Para compararmos se a extração apresentaria melhores resultados também utilizamos o *Kit Nucleon Phytopure* (Amersham/Life Science), que possui uma resina capaz de assegurar a obtenção de um DNA de boa qualidade impedindo uma possível contaminação com polissacarídeos. Destacamos que no estado de Roraima não possuímos nitrogênio líquido e a compra do mesmo de outro estado torna-se inviável pela dificuldade de transporte. Para o procedimento de maceração utilizamos além da folha congelada em freezer -80ºC, o almofariz e o pistilo também previamente congelados, facilitando assim a quebra do tecido em fragmentos menores, tornando a extração mais viável.

Tabela 1. Espécies utilizadas no estudo com a metodologia de extração e seu local de origem nas quatro áreas de estudo do PPBio localizadas no estado de Roraima, Brasil.

Espécies	Local da coleta				Metodologia	
	Cauamé	Água Boa	Maracá	Viruá	CTAB	"Kit" Nucleon Phytopure
Nymphaea rudgeana	X	X	X	X	X	X
Montrichardia linifera		X			X	
Eichhornia azurea	X				X	
Nymphoides indica	X				X	
Salvinia auriculata			X		X	

De acordo com o protocolo CTAB utilizou-se aproximadamente 0,3 g de tecido foliar congelado. Posteriormente macerou-se em um almofariz, até obter um pó fino onde foi adicionado 3 ml do tampão CTAB acrescido de β-mercaptoetanol (0,2%) pré-aquecido a 65ºC, até a homogeneização por completo. Despejou-se o homogeneizado em microtubos e incubou-se a 65ºC durante 30 minutos, agitando levemente por inversão a cada 10 minutos. Buscando uma melhor qualidade do DNA extraído, adicionou-se de 2,5 µl de Proteinase K (50 µg/ml) e incubou-se a 55ºC *overnight.* Em seguida, adicionou-se 1 volume de clorofórmio: álcoolisoamílico (24:1) e agitou-se o tubo por inversão suave por 10 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 5000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde adicionou-se 100 µg/ml de RNAse e incubou-se por 30 minutos em banho-maria a 37ºC. Para a precipitação utilizou-se 0,6 volume de isopropanol gelado, misturando suavemente por inversão, onde foi observada a formação de um precipitado. Centrifugou-se a amostra por 20 minutos a 10000 g e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com aproximadamente 1 ml de etanol 70% gelado. Centrifugou-se por 3 minutos a 10000 g. O precipitado foi mantido em tubo invertido sobre o papel toalha até a secagem do mesmo. Diluiu-se o precipitado em 50 µl de água deionizada e autoclavada e foi armazenado a -80ºC.

Para a extração com o *kit*, selecionamos a *Nymphaea rudgeana*, sendo feita a maceração conforme descrita previamente e seguimos o protocolo segundo o fabricante.

Após as extrações, uma alíquota de 6 µl de cada amostra foram visualizados em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed™ 10000X (Biotium) e utilizamos o marcador de peso molecular de 100pb (NEW ENGLAND-BioLabs®). As amostras foram observadas com excitação por luz ultravioleta e o registro fotográfico realizado através do equipamento MiniBIS Pro 16 (Uniscience).

RESULTADOS

Nossos resultados revelaram que algumas amostras apresentaram problemas na extração de DNA pelo método CTAB original descrito por Doyle & Doyle (1987) e modificado por Romano & Brasileiro (1999). A Figura 1 mostra os resultados da extração de DNA através deste método. A letra L indica o marcador molecular de 100pb (NEW ENGLAND- BioLabs®) usado como padrão

para comparação das bandas de DNA visualizadas.

Para obtermos melhores qualidades dos extraídos resolvemos então utilizar RNAse (100 µg/ml), considerado um procedimento alternativo no protocolo original. O emprego de RNAse, somada à utilização de proteinase K (50 µg/ml), aumentou o tempo de realização do protocolo em até 6 horas.

A quantidade de DNA extraído das amostras (observado na Fig. 1) mostrou-se equivalente na análise dos géis de agarose quando comparada com a intensidade das bandas do marcador de peso molecular, conforme dados do fabricante (NEW ENGLAND - BioLabs®). Podemos observar que entre os diferentes gêneros ocorre um padrão diferente de corrida eletroforética no gel de agarose das amostras, provavelmente, devido às diferenças em suas composições químicas e, até mesmo, na quantidade de água dentro das células. No momento de realização das extrações encontramos dificuldades como: formação de um precipitado viscoso; precipitados de cores escuras (entre verde e marrom claro); assim como amostras com ambos os problemas. Essas dificuldades iniciais parecem ter sido amenizadas com as adaptações do protocolo.

Podemos observar que as amostras extraídas com o *Kit Nucleon Phytopure* apresentaram no gel de agarose uma melhor quantidade e qualidade, porém quando comparado com as amostras após a adição da proteinase K o método CTAB se mostrou eficaz na obtenção de um material gênico de qualidade para estudos posteriores, conforme apresentado na Figura 2.

DISCUSSÃO

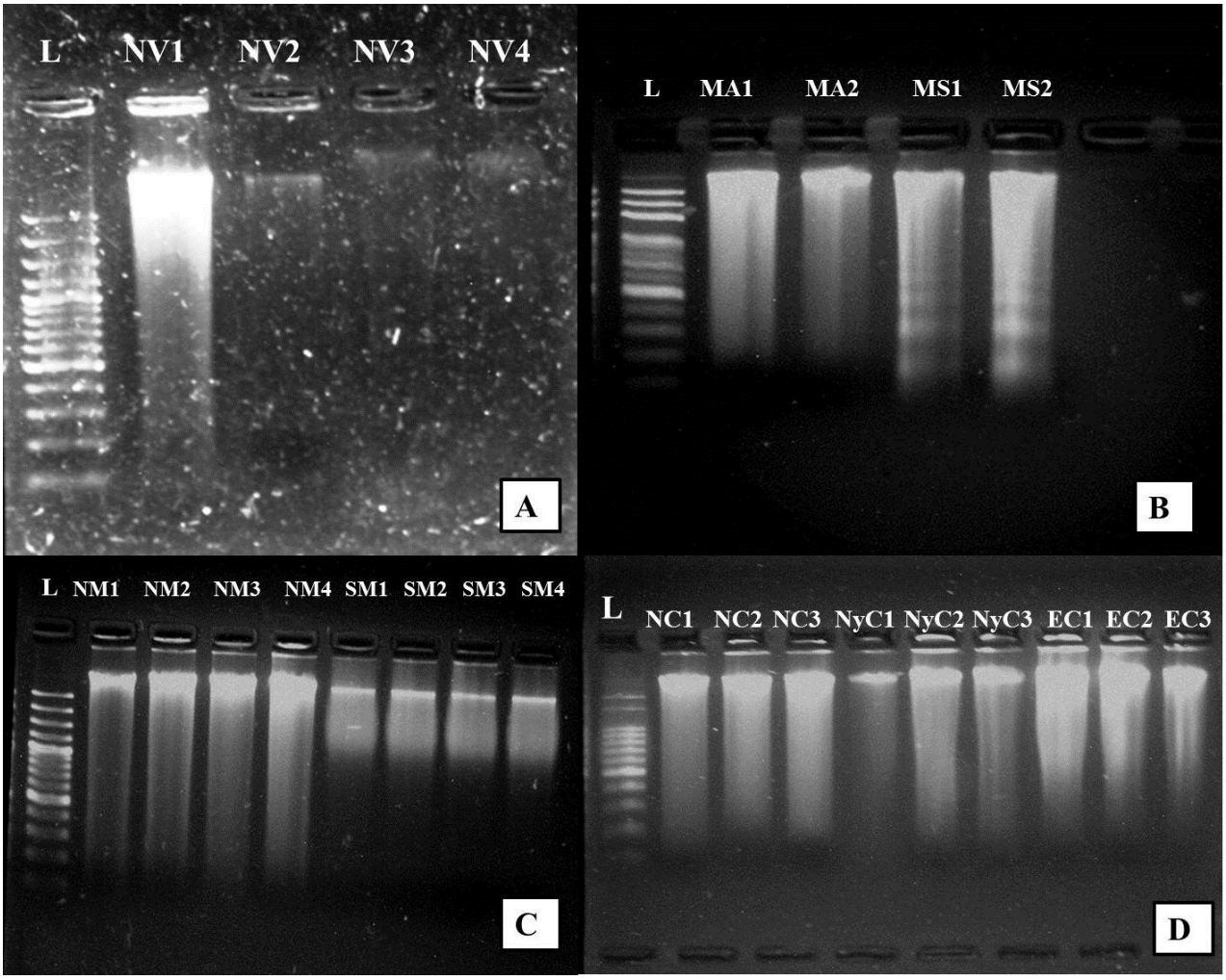

Figura 1: Amostras cujo DNA foi extraído pelo método CTAB. A: Amostras de *Nymphaea rudgeana* do Parque Nacional do Viruá (NV1- NV4). B: Amostras de *Montrichardia linifera* (MA1, MA2, MS1, MS2) do Campo Experimental do Água Boa. C: Amostras de *Nymphaea rudgeana* (NM1- NM4) e de *Salvinia auriculata* (SM1- SM4) da Estação Ecológica de Maracá. D: amostras de *Nymphaea rudgeana* (NC1- NC3), *Nymphoides indica* (NYC1- NYC3) e *Eichhornia azurea* (EC1- EC3) do Campus do Cauamé.

Assim como os nossos dados apresentados acima, vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal de boa qualidade devido à interação com outras moléculas (Rogers & Bendich 1994; Molinari & Crochemore 2001; Stefenon et al. 2004; Danner et al. 2011; Souza et al. 2012).

Nas amostras de *Nymphaea* do PARNA Viruá (Fig. 1A), durante o processo de extração, observamos a formação de um precipitado viscoso. Segundo Romano e Brasileiro (1999), amostras que apresentam precipitado com aspecto gelatinoso estão associadas a polissacarídeos. Desta forma, evidencia-se a importância da coleta de folhas jovens, facilitando a posterior precipitação do DNA pela maior quantidade de células em divisão.

Algumas das amostras apresentaram precipitado de cor escura devido à ligação covalente de polifenóis oxidados ao DNA e podem ser evitados através da adição do β-mercaptoetanol ao tampão de extração (Romano & Brasileiro 1999). As amostras que apresentaram tanto o precipitado viscoso como o de cor escura foram coletadas em locais de difícil acesso, sendo transportadas no gelo e posteriormente armazenadas em freezer -20ºC por mais de 24 horas, o que pode ter contribuído para a degradação do material genético.

A maior parte das amostras apresentou arraste vertical no gel que pode ser explicado pela ação de DNAses que degradaram o DNA. Outra possibilidade foi a ocorrência de quebra mecânica durante a extração com o clorofórmio (Roso & Vidal 2010) ou durante o processo de maceração, que precisou ser adaptado devido à dificuldade de obtenção de nitrogênio líquido na região.

Diante disso, podemos sugerir que as amostras congeladas maceradas e extraídas pelo método CTAB modificado pela adição do tratamento com RNAse e proteinase K resultou na obtenção de amostras com qualidade semelhante às extraídas pelo *Kit Nucleon Phytopure*, sendo eficaz para a obtenção de material genético para estudos posteriores.

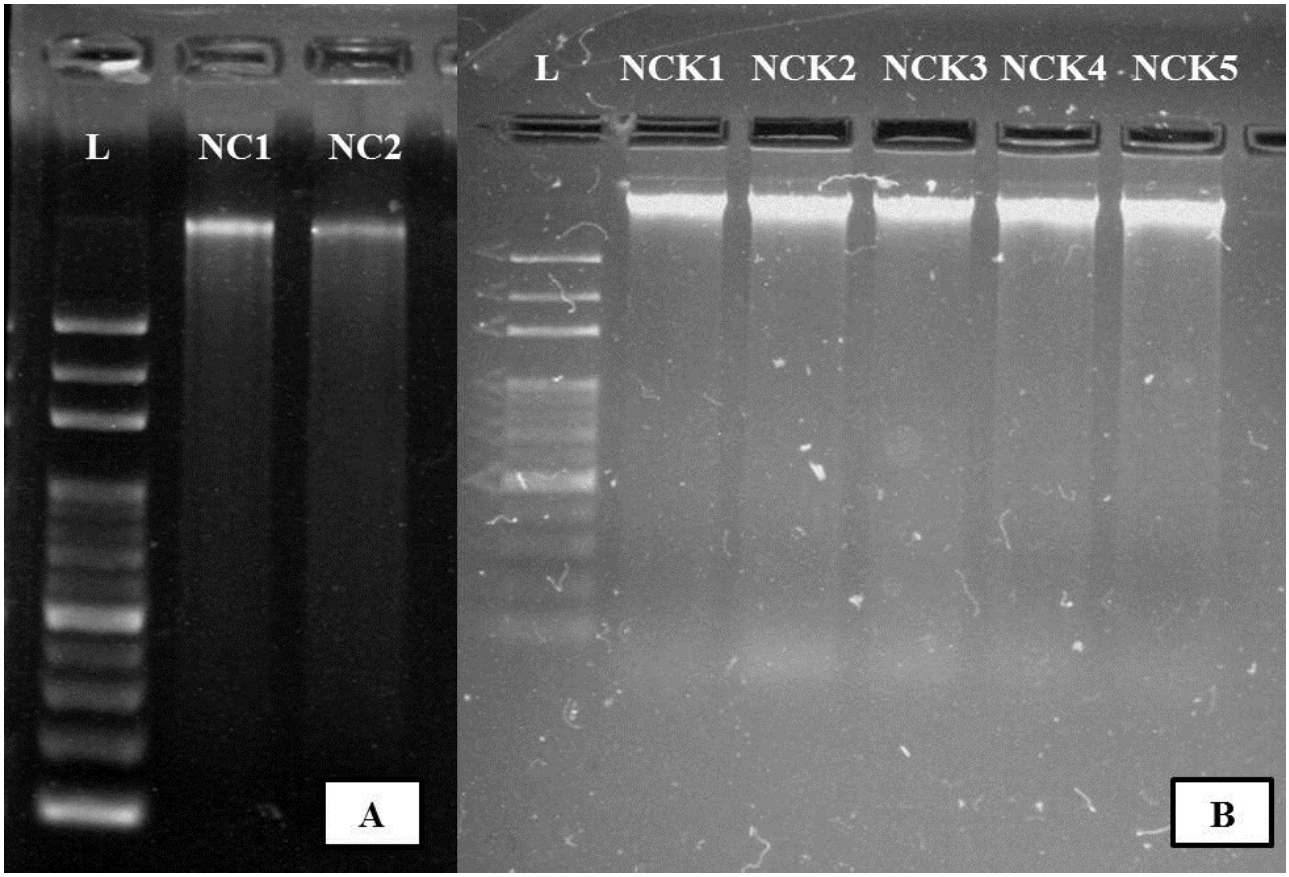

Figura 2: Amostras de *Nymphaea rudgeana* extraídas por metodologias diferentes. A: extração pelo método CTAB com adição de RNAse e Proteinase k (NC1-NC2). B: extração através do Kit Nucleon Phytopure (NCK1-NCK5).

Nossos dados demonstraram que, para a

obtenção de DNA de boa qualidade e uma eficiente proposta de trabalho com material genético de plantas, é necessária a observação de fatores não só como a coleta das amostras mas também como o transporte e o armazenamento das mesmas, visto que as regiões onde possuem a biodiversidade conservada normalmente apresentam difícil acesso e sem a infraestrutura adequada para a manutenção da qualidade das amostras que muitas vezes ficam acondicionadas em gelo.

Conclui-se então, que nos locais onde não existe o suporte e condições ideais para a realização dos experimentos, é necessário buscar alternativas aos protocolos muitas vezes já estabelecidos na literatura.

PROTOCOLO MODIFICADO

Procedimento

I. Pesar aproximadamente 0,3 g de tecido vegetal fresco (preferencialmente folhas jovens e congeladas na porção exata o que facilita no momento da extração);

II. Colocar as folhas no almofariz também previamente congelado;

III. Macerar as folhas com um pilão até obter um pó fino. Não deixar o material descongelar.

IV. Adicionar 3 mL de tampão CTAB - CTAB (2%), NaCl 5 M (1,4 M), Tris-HCl 1M pH 8,0 (100 mM), EDTA 500 mM (20 mM) e adicionado somente no momento da utilização e em capela o β-mercaptoetanol (0,2%) pré-aquecido a 65°C no almofariz. Misturar até descongelar a amostra. Despejar o homogeneizado em microtubos de polipropileno. Incubar a 65°C, entre 30 minutos e uma hora, agitando a cada 10 minutos.

V. Opcionalmente, adicionar 2,5µl de Proteinase K (50µg/ml) e incubar a 50ºC overnight.

VI. Adicionar 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar o tubo manualmente, por 10 minutos (agitação suave).

VII. Centrifugar por 10 minutos a 5.000 g.

VIII. Transferir a fase aquosa (fase superior) para novo tubo. Repetir a extração com clorofórmio:álcool isoamílico (a partir da etapa 6).

IX. Opcionalmente adicionar 10µl de RNAse A (100µg/mL) e incubar a 37°C, por 30 minutos.

X. Adicionar 0,6 volume de isopropanol gelado ou 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Misturar suavemente por inversão do tubo, várias vezes.

XI. Centrifugar a amostra por 20 minutos a 10.000 g e descartar o sobrenadante.

XII. Lavar o precipitado com aproximadamente 1mL de etanol 70%. Centrifugar por 3 minutos a 10.00 g.

XIII. Secar o precipitado, deixando o tubo invertido em papel-toalha. O precipitado não deve ter resíduos de isopropanol ou secar demais, o que pode dificultar a ressuspensão do DNA.

XIV. Dissolver o precipitado em 20 a 50 µL de água deionizada e autoclavada ou em TE, incubar a 4°C, por meia hora ou mais, antes de armazenar a -20ºC ou -80ºC.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal de Roraima, principalmente à Biofábrica pelo fornecimento dos materiais necessários para a realização deste projeto e ao PPBio - Amazônia Ocidental por disponibilizar toda a infraestrutura e o acesso para a coleta do material e a análise do mesmo. Ao CNPq por conceder bolsa de iniciação científica à primeira autora e, também, por todo auxílio financeiro durante a execução do trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio Amazônia). 2005. *Delineamento espacial e protocolo de coletas*. INPA/MPEG, Belém, 66p.

Danner, M. A.; Sasso, S. A. Z.; Bittencourt, J. V. M.; Citadin, I. & Sachet, M. R. 2011. Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. *Ciência Florestal* 21(2):363-367.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Esteves, S.A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Interciência – FINEP, Rio de Janeiro, 575p.

Feres, F.; Souza, A. P.; Amaral, M. C. E. & Bittrich, V. 2005. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. *Revista Brasileira de Botânica* 28(2): 277-283.

Mazza, M. C. M. & Bittencourt, J. V. M. 2000. Extração de DNA de tecido vegetal de Araucaria angustifolia (Araucariaceae). *Boletim de Pesquisa Florestal* 41: 12-17.

Molinari, H. B. & Crochemore, M. L. 2001.Extração de DNA genômico de Passiflora spp. para análises PCR-RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23(2): 447-450.

PPBIO. 2013. Programa de Pesquisa em Biodiversidade. <http://ppbio.inpa.gov.br.> Acesso em: 15/08/2014.

Rogers, S. O. & Bendich, A. J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Gelvin, S. B. & Schilpe- Roort, R. A. (Eds.) *Plant molecular biology manual.* Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, p. 183-190.

Romano, E. 1998. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: Brasileiro, A. C. M. & Carneiro, V. T. C. (Eds.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI - Embrapa-Cenargen, p. 163-189.

Romano, E. & Brasileiro, A. C. M. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 2(9): 40-43.

Roso, A. C. & Vidal, R. A. 2010. Determinação de protocolo para extração de DNA da espécie daninha *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL). In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, XXVII, 2010, Ribeirão Preto. *Anais*... Ribeirão Preto: SBCPD, p. 411-415.

Silva, M. L.; Silva, L. M.; Queiroz, M. A. & Santos, C. A. F. 2003. Avaliação de dois métodos de extração de DNA genômico em melancia. *Horticultura Brasileira* 21(2). Suplemento em CD-ROM <ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/29540/.../OPB299.pdf>. Acesso em: 03/12/2014.

Souza, L. S. A.; Silva, J. F.; Medeiros-Galvão, R. S. & Costa Neto, P. Q. 2012. Ajustes de protocolo para extração de DNA em *Arrabidaea bilabiata* para uso em estudos com marcadores moleculares AFLP. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas na ERA da Biotecnologia, XXVIII, 2012, Campo Grande. *Anais*... Campo Grande: SBCPD, p. 551-555.

Stefenon, V. M.; Nodari, R. O. & Guerra, M. P. 2004. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. *Biotemas* 17(1): 47-63.

Torres, R. A. 2003. New frontiers in conservation biology: the era of the genome. *Journal for Nature Conservation* 1(2): 60-62.

Weising, K.; Nybom, H.; Pfenninger, M.; Wolff, K. & Meyer, W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi.* Flórida: CRC Press, 336p.