

Foto: Fábio Gelape Faleiro



## Metodologia para Operacionalizar a Extração de DNA de Espécies Nativas do Cerrado Visando a Análises Moleculares

Fábio Gelape Faleiro<sup>1</sup>  
Alessandra Silva Gelape Faleiro<sup>2</sup>  
Maria Cristina Rocha Cordeiro<sup>3</sup>  
Cláudio Takao Karia<sup>4</sup>

Marcadores moleculares do DNA, especialmente, aqueles baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*), estão sendo utilizados como ferramenta muito útil em diferentes estudos genéticos, como avaliação de diversidade genética intra e interespecífica, construção de mapas genéticos, mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*), seleção de plantas assistidas por marcadores, entre outras (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A etapa básica para tais estudos é a extração de DNA genômico em quantidade e qualidade adequadas para que a PCR permita a obtenção de marcas moleculares nítidas e reprodutivas (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990).

Os procedimentos utilizados na extração e na purificação do DNA influenciam a quantidade, a estabilidade e a qualidade dele. Diferentes métodos de extração de DNA a partir de tecido foliar, como os baseados no CTAB e no SDS têm sido utilizados e estão bem estabelecidos para diferentes espécies. Entretanto, dependendo da espécie em estudo e das condições laboratoriais, são necessárias algumas modificações e adaptações nos protocolos para a

obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de bandas de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Determinadas espécies de planta, incluindo algumas nativas do bioma Cerrado, apresentam alto nível de polifenóis e a presença de mucilagens foliares, o que torna o procedimento de extração e de amplificação de DNA mais complexo, necessitando de otimizações que possam facilitar a operacionalização (Couch & Fritz, 1990).

Na Embrapa Cerrados, tem-se trabalhado com a caracterização da variabilidade genética de espécies nativas do bioma Cerrado com base em características morfológicas, ecológicas, agronômicas e moleculares. As características moleculares utilizadas são aquelas baseadas no ácido desoxirribonucléico (DNA). Para analisar essas características, foi necessário operacionalizar o processo de extração de DNA dessas espécies visando à obtenção de amostras de DNA de qualidade, estabilidade e em quantidade suficiente para realização de análises genéticas com base em marcadores moleculares.

<sup>1</sup> Eng. Agrôn., D.Sc., Genética e Melhoramento, Embrapa Cerrados, ffaleiro@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Econ. Domés., Esp. Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, ale@cpac.embrapa.br

<sup>3</sup> Biomédica, D.Sc., Biologia Molecular, Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

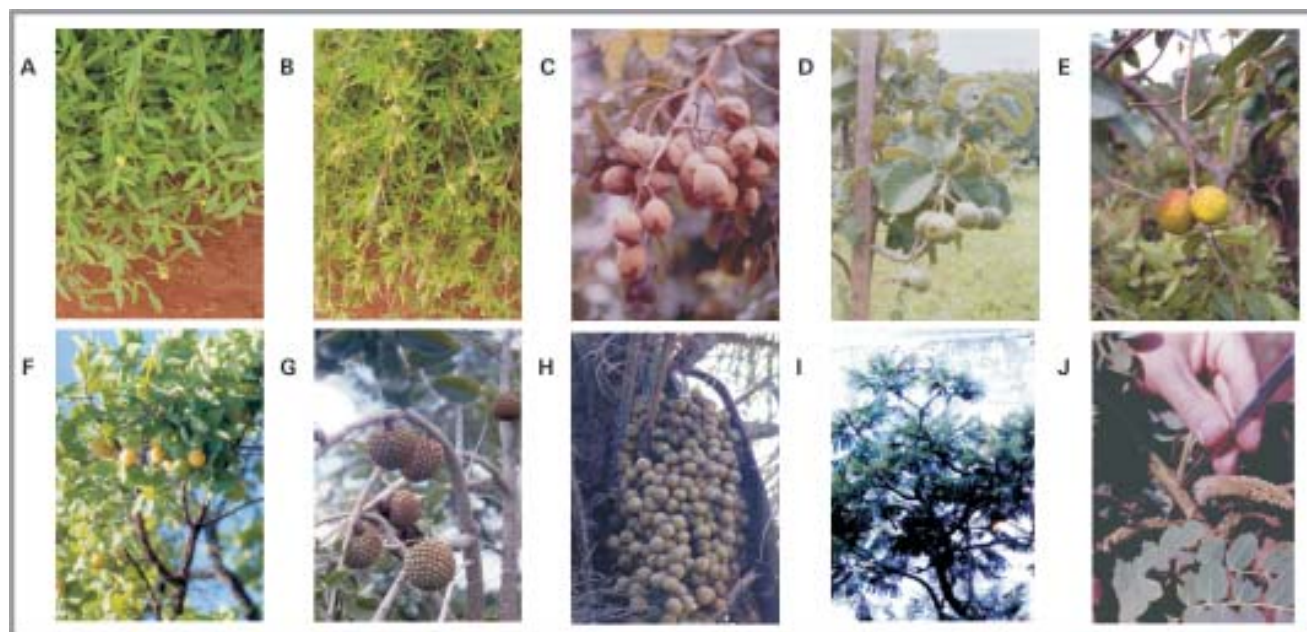
<sup>4</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Genética e Melhoramento, Embrapa Cerrados, karia@cpac.embrapa.br

Para essa operacionalização, foi desenvolvido um protocolo otimizado único, com base na metodologia de extração descrita por [Doyle & Doyle \(1990\)](#) e modificada por [Faleiro et al. \(2002\)](#) para obtenção de amostras de DNA a partir de tecido foliar de cacaueteiro o qual apresenta sérios problemas relacionados com o alto teor de polifenóis e mucilagem ([Andebrhan, 1993](#)). As otimizações feitas estão relacionadas com o aumento da concentração do CTAB, diminuição da quantidade de tecido foliar e aumento do período de desproteção.

Para representar as espécies nativas do Cerrado com importância econômica atual ou potencial, foram selecionadas 10 espécies com diferenças marcantes em seus tecidos foliares, como a quantidade de pêlos e nervuras, presença de mucilagens, produção de látex, entre outras ([Almeida et al., 1998](#)). As espécies utilizadas foram: *Stylosanthes guianensis* e *S. macrocephala* (leguminosas forrageiras), Baru – *Dypterix alata*, Pequi – *Caryocar brasiliense*, Mangaba – *Hancornia speciosa*, Cagaita – *Eugenia dysenterica*, Araticum – *Annona crassiflora* (fruteiras), Macaúba – *Acrocomia aculeata* (produção óleo), Faveira – *Dimorphandra mollis* e Barbatimão – *Stryphnodendron barbadetimam* (plantas medicinais) (Figura 1).

Para a extração do DNA, foram coletadas folhas de cada uma dessas espécies em estágio intermediário de maturação. Essas folhas foram coletadas no campo e transportadas em sacos de papel até o laboratório. Aproximadamente 1 g de tecido foliar foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N<sub>2</sub> líquido.

Parte do macerado foi colocado em um tubo plástico de 2,0 mL, ocupando 1/5 do seu volume. Em seguida, foram adicionados 800 µL de tampão de lise constituído por Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) 20 mM, CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 2,8%, NaCl 1,3 M, Polivinilpirrolidona 1% e 2-mercaptoetanol 0,2%. O macerado foi misturado ao tampão de lise, e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por uma hora, sendo agitados a cada 10 minutos. Feita a incubação, fez-se a desproteção, adicionando-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, com suaves inversões, durante 10 minutos e centrifugadas a 4 °C, a 18845 g por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2,0 mL limpos, adicionando-se 55 µL de CTAB 7%, e o processo de desproteção foi repetido.



**Figura 1.** Espécies utilizadas para extração do DNA. *Stylosanthes guianensis* (A), *S. macrocephala* (B) [Leguminosas forrageiras]; Baru- *Dypterix alata* (C), Pequi - *Caryocar brasiliense* (D), Mangaba - *Hancornia speciosa* (E), Cagaita - *Eugenia dysenterica* (F), Araticum - *Annona crassiflora* (G) [fruteiras]; Macaúba - *Acrocomia aculeata* (H) [produção óleo], Faveira - *Dimorphandra mollis* (I) e Barbatimão - *Stryphnodendron barbadetimam* (J) [plantas medicinais].

Para a precipitação do DNA, adicionou-se ao sobrenadante final isopropanol gelado na quantidade de 700 µL.

Os tubos foram mantidos a -20 °C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente descrito. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e secado à temperatura

ambiente. Em seguida, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 150 µL de água contendo RNase na concentração de 40 µg/mL e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão. Passado esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspensado em 150 µL de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989). A relação  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese, em gel de agarose 0,8%, foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. Para cada espécie avaliada no trabalho, o processo de extração e as avaliações de quantidade e qualidade do DNA extraído foram repetidos pelo menos duas vezes.

Para facilitar o processo de avaliação da pureza, quantificação e diluição do DNA elaborou-se um programa dentro do aplicativo Excel for Windows. Esse programa tem como *input* as leituras de absorbância a 260 e 280

nm e como *output* a relação  $A_{260}/A_{280}$ , a concentração do DNA extraído em ng/ $\mu$ L, a quantidade total de DNA em ng e o volume de DNA concentrado e de água para o preparo de 300  $\mu$ L de DNA na concentração de 10 ng/ $\mu$ L (Figura 2).

Analisando as leituras médias de absorbância a 260 nm e as estimativas da quantidade do DNA extraído de tecidos foliares de cada espécie estudada neste trabalho (Tabela 1), verifica-se que foi possível, com base no protocolo único desenvolvido, extrair mais de 37  $\mu$ g de DNA de cada amostra. Essa quantidade é suficiente para a realização de mais de 2000 PCRs para a obtenção de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), por exemplo (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990).

No. TUBO	AMOSTRAS	A260	A280	A260/A280	[ ] DNA (ng/ $\mu$ L)	QUANT. TOTAL (ng)	YOL. DNA conc.	YOL. ÁGUA
1	<i>S. guyanensis</i>	0,113	0,073	1,548	565	84750	5,3	294,7
4	<i>S. macrocephala</i>	0,103	0,059	1,746	515	77250	5,8	294,2
5	Baru	0,076	0,041	1,854	380	57000	7,9	292,1
8	Pequi	0,09	0,049	1,837	450	67500	6,7	293,3
9				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
10				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
11				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
12				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
13				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
14				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
15				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
16				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
17				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
18				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!
19				#DIV/0!	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!

Figura 2. Programa do aplicativo Excel for Windows para análise de pureza, concentração e diluição de DNA com base nas leituras de absorbância a 260 e 280 nm.

Tabela 1. Quantificação e análise de pureza de amostras de DNA, extraídas de tecido foliar de 10 espécies nativas do bioma Cerrado, utilizando-se leituras de absorbância a 260 e 280 nm.

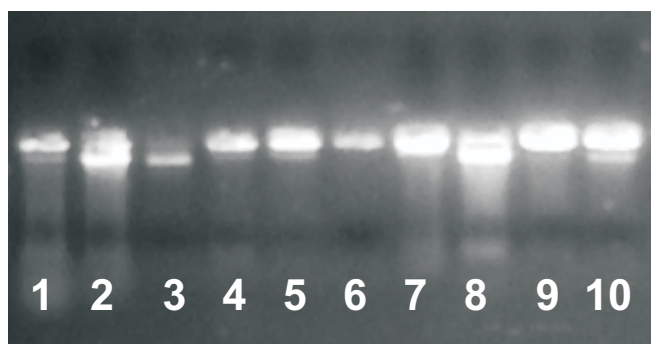
Espécie	$A_{260}$ *	$A_{280}$ *	$A_{260} / A_{280}$	[DNA] ng/ $\mu$ L **	Total DNA ( $\mu$ g)
<i>S. guyanensis</i>	0,113	0,073	1,548	565	84,75
<i>S. macrocephala</i>	0,103	0,059	1,746	515	77,25
Baru	0,076	0,041	1,854	380	57,00
Pequi	0,100	0,053	1,887	500	75,00
Mangaba	0,053	0,031	1,710	265	39,75
Cagaíta	0,075	0,042	1,786	375	56,25
Araticum	0,111	0,063	1,762	555	83,25
Macaúba	0,118	0,07	1,686	590	88,50
Faveira	0,050	0,034	1,471	250	37,50
Barbatimão	0,084	0,050	1,680	420	63,00

\* Média de pelo menos duas repetições.

\*\* a ressuspensão do DNA foi feita com 150  $\mu$ L de água.

Na análise de pureza do DNA extraído, verificada pela relação  $A_{260} / A_{280}$ , constatou-se que foram obtidas amostras de boa qualidade (Tabela 1). Apenas o DNA obtido da faveira apresentou relação  $A_{260} / A_{280}$  menor que 1,5, indicando a presença de maior teor de proteínas nas amostras de DNA, o que não tem inviabilizado a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de produtos de amplificação via PCR (Faleiro et al., 1996).

A análise da integridade do DNA, verificada pela eletroforese em gel de agarose 0,8%, é apresentada na Figura 3. Foram obtidas amostras íntegras de DNA de todas espécies analisadas neste trabalho. A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995).



**Figura 3.** DNA genômico extraído de 10 espécies nativas do Cerrado: 1. *Stylosanthes guianensis*; 2. *S. macrocephala*; 3. Baru; 4. Pequi; 5. Mangaba; 6. Cagaita; 7. Araticum; 8. Macaúba; 9. Faveira e 10. Barbatimão.

## Recomendações

A metodologia desenvolvida pode ser utilizada para obtenção de amostras de DNA de todas as 10 espécies nativas do bioma Cerrado em quantidade e qualidade satisfatórias para análises genéticas, com base em marcadores moleculares. Considerando a diversidade dos tecidos foliares das 10 espécies analisadas neste trabalho, acredita-se que será possível, com base no mesmo protocolo, a extração de DNA de amostras de tecidos foliares de outras espécies. A utilização de protocolo único de extração de DNA e de aplicativos específicos estão sendo importantes para operacionalizar o processo de extração de DNA, aumentar a qualidade das amostras, diminuir o tempo gasto em cada extração, otimizar o uso de reagentes e equipamentos e melhorar a reprodutibilidade das análises moleculares realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados.

## Referências Bibliográficas

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa – CPAC, 1998. 464 p.

ANDEBRHAN, T. **Identificação de genótipos do cacau resistentes a *Crinipellis pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacau, através de RAPD e Uso de PCR na classificação dos isolados de *Crinipellis pernicioso***. Ilhéus: CEPEC: CEPLAC, 1993. 22 p. Relatório técnico.

COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenols. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 8, p. 8-12, 1990.

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

FALEIRO, F. G.; BARROS, E. G.; VILARINHOS, A. D.; CORRÊA, R. X.; PAULA JÚNIOR, T. J.; MOREIRA, M. A. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 304-307, jun.1996.

FALEIRO, F. G.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. F.; YAMADA, M. M.; ANHERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. **Agrotropica**, Ilhéus, 2002. No prelo

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 653 p.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

# DNA extraction methodology from leaves of native central brazilian region species to operate molecular analysis

**Abstract** - DNA extraction methodology was developed from another previously described but, with some original and important adaptations as the reduction of started foliar tissue, increase of cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) concentration in cell disruption buffer, as well as the time for chloroform-isoamyl alcohol protein extraction stage. It was tested successfully for different species as leguminosae forrages (*Stylosanthes guianensis* and *S. macrocephala*), fruit plants (*Dipteryx alata* Vog., *Caryocar brasiliense* Camb., *Hancornia speciosa* Gomez, *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. and *Annona crassiflora* Mart.), species for oil production (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd and, medicinal uses (*Dimorphandra mollis* Benth. and *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Forrero). For all tested species, it was obtained high quality and quantity DNA for molecular markers analysis. Excel for Windows Software was utilized to study the purity and quantity of the obtained DNA by the relation of optic density in 260 and 280 nanometers wave length absorption data and, estimated using basic methods previously described. The developed methodology is considered an operational DNA extraction protocol as it improves the process increasing the recover and quality of extracted DNA in each sample for better reproducible molecular analysis with reduction of working time and minimal use of chemicals and equipment.

**Index terms:** *Stylosanthes guianensis*, *macrocephala*, *Dipterix alata*, *Caryocar brasiliense*, *Hancornia speciosa*, *Eugenia dysenterica*, *Annona crassiflora*, *Acrocomia aculeata*, *Dimorphandra mollis*, *Stryphnodendron barbadetimam*.

## Comunicado Técnico, 92

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

**Endereço:** BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa postal: 08223 CEP 73301-970

**Fone:** (61) 388-9898

**Fax:** (61) 388-9879

**E-mail:** sac@cpac.embrapa.br

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

**1ª edição**

1ª impressão (2003): 100 exemplares

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Dimas Vital Siqueira Resck.

**Editor Técnico:** Carlos Roberto Spehar.

**Secretária Executiva:** Nilda Maria da Cunha Sette.

## Expediente

**Supervisão editorial:** Jaime Arbués Carneiro.

**Revisão de texto:** Maria Helena Gonçalves Teixeira

Jaime Arbués Carneiro.

**Normalização bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro

Shirley da Luz Soares.

**Editoração eletrônica:** Leila Sandra Gomes Alencar.

**Impressão e acabamento:** Divino Batista de Souza

Jaime Arbués Carneiro.