



## Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae)

Edyane Moraes dos Santos<sup>1\*</sup> e Raimundo Reis Araujo<sup>1</sup>

Recebido: 6 de julho de 2017 Aceito: 26 de outubro de 2017  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/4010>

**RESUMO:** (Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae)). Neste artigo, são descritos os procedimentos para a extração de DNA, usando dois protocolos: CTAB e Fenol-Clorofórmio, a partir de tecido foliar fresco e seco de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae), conhecido popularmente como bacuri. O presente trabalho empregou o teste de maceração manual de tecido vegetal, com auxílio de almofariz e um pistilo, objetivando, dessa forma, realizar um experimento de menor custo. Obtivemos DNA em grandes e médias concentrações, o que poderá proporcionar amplificação por PCR para estudos em biologia molecular da espécie. Protocolos alternativos para a extração de DNA, que aceleram e barateiam o processo, fornecem condições para se obter produto genômico de qualidade e em grande quantidade.

**Palavras-chave:** Bacuri, isolamento de DNA, método CTAB, método Fenol-Clorofórmio.

**ABSTRACT:** (Tests comparing DNA extraction and plant tissue maceration protocols applied to *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae)). We describe here two protocols for DNA extraction, CTAB and phenol-chloroform, from fresh and dry leaf tissues of *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae), popularly known as 'bacuri'. We performed the plant tissue manual maceration test with mortar and pestle aiming to reduce experimental costs. We were able to obtain high and moderate DNA concentrations, which may provide PCR amplification for studies on the molecular biology of the species. Alternative DNA extraction protocols that accelerate and reduce costs of the extraction process provide the right conditions for obtaining large amounts of high-quality genomic products.

**Keywords:** Bacuri, DNA isolation, CTAB method, Phenol-Chloroform method.

### INTRODUÇÃO

O emprego de métodos alternativos para a extração de ácido desoxirribonucleico DNA de fontes vegetais, que sejam de baixo custo, rápidos e produzam amostras quantitativas e qualitativamente suficientes, possibilitam a realização de diversos estudos de diversidade e/ou divergência genética, incluindo a variedade de marcadores moleculares obtidos por amplificação por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction). Segundo Buckeridge (2010), a parede celular vegetal é uma matriz altamente ordenada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais frouxa conforme as necessidades da planta. Portanto, uma das fases que os protocolos de extração de DNA devem passar, é a maceração dos tecidos vegetais. Devido a constituição química da parede celular do tecido vegetal, emprega-se um equipamento de maceração ou nitrogênio líquido, o eleva o custo do procedimento.

O protocolo padrão utilizado para tecido vegetal é o de CTAB (Doyle & Doyle 1987) que utiliza o brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) é muito aplicada em tecidos vegetais e em uma variedade de outros materiais biológicos como sangue, sêmen, folículo piloso e tecidos orgânicos (Ferreira & Grattapaglia 1998). Outro protocolo clássico, porém, para tecido animal, é o Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989). Nesse protocolo,

o uso de fenol-clorofórmio permite que contaminantes proteicos sejam desnaturados com partição dos mesmos na fase orgânica ou interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa.

A espécie escolhida para os testes de extração foi o bacuri, *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae), por ser economicamente importante para a região amazônica. É nativa da floresta amazônica brasileira (Júnior *et al.* 2011), mas algumas variedades estão adaptadas às condições de clima e solos do cerrado (Soares *et al.* 2007). Há poucos trabalhos publicados na área de genética molecular com a espécie, entre eles os trabalhos de Souza (2011) e Souza *et al.* (2013) com marcadores moleculares ISSR. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é comparar dois protocolos de extração (CTAB e Fenol-Clorofórmio), utilizando o processo de maceração manual de folhas da espécie *Platonia insignis* para determinar a eficiência dos protocolos de extração de DNA.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois estados de tecido vegetal: tecido fresco e tecido seco, utilizando-se dois protocolos de extração, com CTAB desenvolvido por Doyle & Doyle (1987) e o protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989), com fenol-clorofórmio. As folhas secas de *Platonia*

1. Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Kerr (LabWick). Cidade Universitária Paulo Vi s/n, Tiritical, CEP 65055-310, São Luís, MA, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: edyanemoraes@hotmail.com

*insignis* foram coletadas na Reserva Extrativista Chapada Limpa, município de Chapadinha, Maranhão. Logo após a coleta, elas foram mantidas em sílica gel. As folhas frescas, provenientes do campus da Universidade Estadual do Maranhão, foram coletadas no mesmo dia em que se realizou o processo de extração de DNA. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Kerr - LabWick da Universidade Estadual do Maranhão.

Foram selecionadas 14 amostras para cada protocolo de tecido seco e 14 para tecido fresco, totalizando 28 amostras. Todas as amostras foram pesadas antes do processo de extração. As macerações foram realizadas recortando-se o tecido em pedaços e macerando com o auxílio de um almofariz e um pistilo de porcelana. Assim, seguem os passos dos protocolos usados nas extrações:

*Protocolo de Extração de DNA - Fenol-Clorofórmio (Sambrook et al. 1989)*

Em cada microtubo, foi adicionado 300 µL de tampão de lise (Tris-1M pH 8, EDTA- 1M H 8, NaCl-5M e H<sub>2</sub>O destilada) e incubados a 55°C até dissolver todo o tecido. Em seguida, adicionou-se 700 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), misturado manualmente, por 10 min e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O mesmo procedimento foi realizado com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Adicionou-se 100 µL de acetato de sódio (AcNa 3M, pH 4.8 e 700 µL de isopropanol) para precipitar o DNA. Nessa fase o tubo fica no freezer (-20°C) por 2 horas ou em *overnight*. Após esse período, centrifuga-se o tubo por 10 min a 10.000 rpm. Após isso, o isopropanol foi descartado com cuidado para não remover o “*pellet*”. Nas mesmas condições de centrifugação, a lavagem final foi realizada adicionando-se 200 µL de etanol 70% e o DNA foi seco em estufa a 37 °C. Após a secagem, o material foi ressuscitado em água estéril ultra pura (MILLI-Q) (20 µL para “*pellet*” bem pequeno; 50 µL para “*pellet*” maior) e submetido ao congelamento *overnight* (-20°C).

*Protocolo de Extração DNA- CTAB (Doyle & Doyle 1987)*

Foram adicionados aos microtubos 700 µL de tampão de extração CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio 2% e agitados em vórtex). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 30 min. O isolamento do DNA foi realizada adicionando-se 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), seguidos de agitação em vórtex, invertendo-os durante 5 min, até a formação de uma emulsão homogênea. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi separado em um novo microtubo. Repete-se todo esse procedimento com a adição de 300 µL de CTAB 10% e 600 µL de CIA. Adicionou-se então, 500 µL de isopropanol gelado, para precipitação. Os tubos foram levados ao freezer -20°C por 1 a 2 horas, seguido de centrifugação a 7.500 rpm por 5 min. Descartou-se o

álcool sem perder o *pellet*. Foi repetido o procedimento lavando duas vezes em 1000 µL de etanol 70% e uma vez em 1000 µL de álcool 90%. Logo após, foram colocados em estufa a 37 °C para completa evaporação do álcool. Após a secagem, o *pellet*, foi ressuscitado em 50 µL de TE (Tris 1M pH 8, EDTA 0,5 M e H<sub>2</sub>O destilada) seguido de congelamento *overnight* (-20 °C).

*Quantificação*

As amostras extraídas de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (5 µL do DNA extraído + 2 µL de blue- tampão de corrida), corados em solução 0,002% de brometo de etídio. Em seguida, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro UV-VIS-Spectrophotometer Bel Photonics - para verificar sua concentração em microgramas. As concentrações de DNA foram estimadas a partir das seguintes equações:  $[DNA] = 50 \mu\text{g/mL} \times DO_{260} \times \text{fator de diluição}$ , sendo: 1 DO = 50 µg/mL de DNA (Sambrook et al. 1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 28 amostras de DNA extraídas, 15 apresentaram extração de DNA em concentrações e qualidades satisfatórias. Foram no total oito amostras positivas do tecido seco (três obtidas por CTAB e cinco por Fenol-Clorofórmio) e sete do tecido fresco (cinco obtidas por CTAB e 2 por Fenol-Clorofórmio). Sendo assim, a extração pelo método CTAB foi mais efetiva, porém as maiores concentrações de DNA foram pelo fenol-clorofórmio.

O isolamento do DNA é afetado significativamente pela condição do tecido antes da extração. Por isso, recomenda-se utilizar material o mais fresco possível (Ferreira & Grattapaglia 1998). Alguns estudos têm mostrado a eficiência do método de extração de DNA por CTAB de folículos pilosos em caprinos (Mendonça & Araújo 2003), peixes (Paiva 2001), e em plantas, como observado no presente trabalho. A extração de DNA por CTAB, além de agilizar o processo, como não emprega enzimas de degradação de RNA e proteínas, possibilita a esse protocolo maior acessibilidade, menor custo e eficiência metodológica (Oliveira et al. 2007).

As concentrações de DNA obtidas no presente trabalho variaram de 50 a 1.850 ng. Esses valores são próximos aos obtidos por Giustina et al. (2015), onde as concentrações variaram de 94 ng/µL a 1,476 ng/µL em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*). Levando-se em consideração que o objetivo de uma extração é conseguir uma amostra de DNA de boa qualidade para o processo de PCR, no presente trabalho, obteve-se como menor concentração 50 ng. Souza (2011), usou uma concentração de 5 ng e Souza et al. (2013), de 12 ng, ambos para amplificação por PCR do marcador ISSR. Segundo Faleiro et al. (1996), Murray & Thompson (1980), as amostras de DNA com baixa concentração não inviabilizam a reprodutibilidade nas reações de PCR, contudo, podem dificultar o balanceamento do mix de reação. A baixa concentração de DNA resulta ainda, em amplificação errática ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não

reproduzíveis (Harbone *et al.* 1991, Demek & Adamset *al.* 1992, Ferreira & Grattapaglia 1998, Queiroz *et al.* 2002 e Vital *et al.* 2004).

As maiores concentrações obtidas foram de 1.500 ng e 1.850 ng (pelo método Fenol-Clorofórmio) e 300 ng e 1.050ng (pelo método CTAB). De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1996), empregando-se os procedimentos do método CTAB, é possível a obtenção de concentrações entre 10 a 200 ng mL<sup>-1</sup>, a partir de 50 a 200 mg de tecido foliar. Assim, o excesso de DNA também pode dificultar o processo de amplificação por PCR. Dessa forma, a diluição do DNA na concentração ideal de cada marcador molecular, torna-se necessária para evitar o excesso de DNA na reação de PCR. Segundo Cury *et al.* (2005), menores concentrações de DNA são requeridas para uma PCR ótima. O excesso de DNA molde pode favorecer o anelamento entre suas duas fitas, mais do que seu anelamento com o par de iniciadores. Costa & Moura (2001), relatam que o DNA em excesso na PCR pode resultar na falha completa da reação, devido à alta concentração de impurezas agregadas. No presente trabalho, foram obtidas boas quantidades de DNA extraído, seguindo ambos os protocolos, conforme tabela 1.

Os resultados das concentrações de DNA obtidos refletem, dentre outros fatores, o tipo de maceração realizada, sem o auxílio de macerador e/ou de nitrogênio líquido. Em ambos os protocolos foram utilizados tampão de lise, CTAB 2% para o protocolo CTAB e Tris (1M, EDTA 0,5M e NaCl 5M) para o protocolo Fenol-Clorofórmio.

**Tabela 1.** Quantificação das amostras de DNA extraídas de folhas de *Platonia insignis*. As amostras foram nomeadas com a primeira letra, referindo-se ao protocolo de extração (C-CTAB e F-Fenol) e a segunda letra ao estado do tecido (seco – S e fresco-F). Em outras amostras, o Pi refere-se ao nome científico, seguido pela tipo de protocolo usado (ex.: PiF01 e PiC05). Abreviaturas: A260nm, absorvância medida a 260 nm; A280nm, absorvância medida a 280 nm; [DNA] (ng/μl), concentração de DNA em nanogramas por microlitros; Razão 260/280, fração entre A260nm e A280nm.

Amostra	A260 nm	A280 nm	[DNA] (ng μl <sup>-1</sup> )	Razão 260/280
<b>Secas-CTAB</b>				
PiC05	0,002	0,31	100	0,006
CS01	0,013	0,001	650	13
CS02	0,028	0,001	1400	28
<b>Secas-Fenol</b>				
PiF01	0,030	0,001	1500	30
PiF03	0,037	0,007	1850	5,285
PiF05	0,003	0,010	150	0,3
FS01	0,006	0,001	300	6
FS02	0,005	0,003	250	1,66
<b>Frescas-CTAB</b>				
PiCf02	0,021	0,130	1050	0,161
PiCf03	0,001	0,001	50	1
PiCf05	0,006	0,026	300	0,230
CF01	0,005	0,017	250	0,294
CF02	0,005	0,133	250	0,037
<b>Frescas-Fenol</b>				
FF01	0,005	0,137	250	0,036
FF02	0,003	0,001	150	3

Para Danner *et al.* (2011), o macerado obtido na ausência de nitrogênio líquido, mas com solução tampão, pode degradar, contaminar as amostras e formar um excesso de espuma durante processo de maceração. Nas amostras do presente trabalho, não houve a formação de espuma. Conforme Romano & Brasileiro (1999), o uso de tampão de extração é uma alternativa viável à extração de DNA de plantas. Ao extrair DNA genômico de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.), Cansação & Coutinho (2013), também propuseram um protocolo de extração mecânica, ausente de nitrogênio líquido, que ofereceu bons resultados, o que condiz com os resultados do presente estudo.

As amostras foram analisadas por espectrofotometria referente a concentração de DNA e a pureza, expressa pela razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, que indica o nível de contaminação das amostras por proteína. A razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> esperada como satisfatória é de 1,8 a 2,0 (de acordo com Sambrook *et al.* (1989) e razão maior indica contaminação por fenol (Romano 1998), enquanto que valores abaixo de 1,8 indicam contaminação por proteínas, o que ocorreu com as amostras CS01, CS02, PiF01, PiF03, FS01 e FF02. Um dos motivos para esse resultado foi a não utilização de proteinase K nas extrações de ambos os protocolos. Quanto à comparação de pureza, não houve diferença significativa entre os dois protocolos testados. De acordo com o trabalho de Barbosa (1998), um DNA puro tem OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> de 1,8 a 2,0 e uma razão de 1,6 ou menos indica que deve haver proteínas e/ou outras substâncias em demasia na amostra, enquanto a razão maior que 2,0 indica que as amostras devem estar contaminadas com clorofórmio ou fenol, nessas situações é aconselhável reprecipitar o DNA. As amostras que indicaram contaminação por clorofórmio, de acordo com a razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, foram CS01 e CS02 e as contaminadas por fenol/clorofórmio foram PiF01, PiF03 e FS01.

Em algumas amostras, para ambos os protocolos observou-se o que é descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996) onde, na precipitação de DNA na presença de etanol ou isopropanol, a partir de uma extração com o detergente CTAB, resulta em uma massa gelatinosa e excessivamente viscosa, possivelmente, rica em polissacarídeos. Medidas propostas por Murray & Thompson (1980), Ferreira & Grattapaglia (1996) e Romano (1998), podem ser eficientes para a eliminação de proteínas e polissacarídeos. Entre elas, o aumento da concentração do detergente CTAB, lavagens adicionais com NaCl, acetato de amônio e clorofórmio-octanol e a purificação por gradiente de cloreto de céσιο.

Diante dos resultados obtidos, a proposta do presente trabalho foi atingida pela obtenção de boas quantidades de DNA extraído de tecido vegetal para os protocolos de CTAB e Fenol-Clorofórmio, utilizando maceração manual. Objetivamos, dessa forma, demonstrar que a extração de DNA de tecido vegetal pode ter o custo atenuado, não necessitando do uso de maceração realizada por equipamento especializado e/ou por nitrogênio líquido, caracterizando uma importante contribuição para estudos em biologia molecular vegetal.



## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.M. 1998. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH S. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS. p.99-106.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, W.D. dos & SOUZA, A.P. 2010. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.) *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Editora Blucher. p.365-380.
- CANSANÇÃO, I.F. & COUTINHO, D.M.C. 2013. Estudo comparativo de dois métodos de extração de DNA genômico do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). *Rev. Biol. Farm.*,9(1):13-17.
- COSTA, M.R. & MOURA, E.F. 2001. *Manual de extração de DNA*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89. 24 p.
- CURY, P.R., FURUSE, C. & ARAÚJO, N.S. 2005. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. *Revista Odontológica de Araçatuba*,26(2): 34-39.
- 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.
- DEMEK, T. & ADAMS, R.P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechnology*,12(3):333-334.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- FALEIRO, F.G., BARROS, E.G., VILARINHOS, A.D., CORRÊA, R.X., PAULA JÚNIOR, T.J. & MOREIRA, M.A. 1996. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. *Fitopatologia Brasileira*, 21(2):304-307.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 220 p.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 220 p.
- GIUSTINA, L.D., BALDONI, A.B., PINTO, J.M.A., TARDIN, F.D. 2015. Otimização de um protocolo para a extração do DNA de *Bertholletia excelsa* Bonpl. a partir do câmbio vascular. In: IV Jornada científica da Embrapa Agrossilvi pastoril. Brasília: Embrapa. 189 p.
- HARBONE, J. B., PALO, R.T. & ROBBINS, C.T. 1991. *Plant defenses against mammalian herbivore*. Boca Raton: CRC Press LLC, 192p.
- JÚNIOR, J. S. da C., de Almeida, A.A., Tomé, A.R., Citó, A.M., Saffi, J., & de Freitas, R.M. 2011. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy & Behavior*, 22:678-684.
- MENDONÇA, P.T. & ARAÚJO, M.A. 2003. Técnica de extração de DNA de folículos pilosos em caprinos. In: XIII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (SIC), 13, 2003. Viçosa. *Anais... Viçosa: UFV*. CD-ROM.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-5.
- OLIVEIRA, M.C. DE S., REGITANO, L.C. DE A. & ROESE, A.D., ANTHONISEN, D.G., PATROCÍNIO, E. DO, PARMA, M.M., SCAGLIUSSI, S.M.M., TIMÓTEO, W.H.B., JARDIM, S.N. 2007. *Fundamentos práticos-teóricos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 38 p.
- QUEIROZ, C.R.A. dos A., MORAIS, S.A.L. de & NASCIMENTO, E.A. do. 2002. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, 26(4): 485-492.
- ROMANO, E. 1998. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. p.163-177.
- ROMANO, E. & BRASILEIRO, A.C.M. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia*. 2(9): 40-43.
- PAIVA, S.R. 2001. *Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce-MG*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 628 p.
- SOARES, J.L.N., ESPÍNDOLA, C.R. & PEREIRA, L.C. 2007. Projeto de assentamento rural no cerrado maranhense: uma proposta Agroecológica. *Rev. Bras. Agroecologia*, 2(1): 1618-1621.
- SOUZA, I.G. de B. 2011. Caracterização morfológica e molecular do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). 110 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Teresina, Universidade Federal do Piauí, 2011.
- SOUZA, G. de B., SOUZA, V.A.B. & LIMA, O.S. da C. 2013. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. ("Bacurizeiro") using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol Biol Rep.*, 40: 3835-3845.
- VITAL, B.R. et al. 2004. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. *Revista Árvore*, 28(4): 571-582.