



OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae)

Edinéia Zulian Dalbosco^{1*}, Cintia Graciele da Silva¹, Estevão Augusto Lomberti Melhorança¹, Anderson Fernandes de Miranda¹, Celice Alexandre Silva¹

¹Centro de Pesquisa, Estudos e Desenvolvimento Agro-Ambiental, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra-MT, Brasil.

e-mail: *zulian_edineia@hotmail.com

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

RESUMO

A família Orchidaceae forma uma das mais distintas e numerosas famílias botânica. A elevada beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas apresentam relevância econômica, entre elas pode-se destacar a espécie *Epidendrum viviparum* Lindl. Estudos que envolvem a biologia molecular para obtenção de caracteres de DNA para a reconstrução da filogenia de um ou vários grupos de plantas e estudos de divergência genética, tem sido muito utilizado. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo padronizar um protocolo para a extração de DNA da espécie *Epidendrum viviparum*, visando futuros estudos com análises moleculares por meio de marcadores. As amostras da espécie em estudo *E. viviparum* fazem parte da coleção do Banco de Germoplasma do epítifário do Laboratório de Botânica da Universidade do Estado de Mato Grosso. Foi utilizado como padrão de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) o protocolo de DOYLE e DOYLE (1987). Foram avaliadas alterações nas concentrações de de CTAB e β -mercaptoetanol, bem como dois procedimentos de maceração, com nitrogênio líquido e direto no tampão de extração. As concentrações que apresentaram melhores resultados neste estudo foram com CTAB a 2%, aliado a maceração realizada com nitrogênio líquido e β -mercaptoetanol na concentração de 2,5%.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia molecular, marcadores moleculares, orquídea.

PROTOCOL OPTIMIZATION FOR GENOMIC DNA EXTRACTION IN *Epidendrum viviparum* Lindl. (Orchidaceae)

ABSTRACT

The orchid family forms one of the most distinctive and large families botany. The high beauty and exuberance of its flowers, orchids have economic importance, among them we can highlight the species *Epidendrum viviparum* Lindl. studies involving the use of DNA biology molecular characters for the reconstruction of the phylogeny of one or more groups plants, genetic diversity studies, has long been used. Thus, this study aims

to standardize a protocol for DNA extraction *Epidendrum viviparum* species, aiming future studies with molecular analysis via markers. The species studied *E. viviparum*, is part of the collection of the Germplasm Bank of the epifitario UNEMAT Botany Lab. Was used as the standard protocol of plant tissue extraction CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) DOYLE and DOYLE (1987) and evaluating two extraction protocols with changes in concentrations of CTAB and β -mercaptoethanol and two maceration procedures with nitrogen liquid and direct the extraction buffer. The concentrations that showed better results in this study were with CTAB 2%, combined with maceration performed with liquid nitrogen and β -mercaptoethanol at a concentration of 2.5%.

KEYWORDS: Molecular biology, molecular markes, orchid.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae forma uma das mais distintas e numerosas famílias botânica entre as fanerógamas. O número total de espécies não é consenso, mas estima-se entre 35 mil, distribuídas em 800 gêneros (PRIDGEON et al., 2009; REIS, 2011). No Brasil ocorrem 235 gêneros e 2.419 espécies (BARROS et al., 2011). Segundo JOHNSON (2001), a família das orquídeas possui uma ampla distribuição geográfica e uma grande diversidade de espécies. São chamativas devido às suas flores, neste aspecto, algumas espécies possuem auto fecundação, enquanto a maioria das espécies é polinizada por insetos.

Em razão da elevada beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas apresentam relevância ornamental, medicinal e a manutenção dos ecossistemas naturais (FARIA et al., 2006). O cultivo de plantas ornamental no Brasil está em pleno crescimento, no período de 2010 e 2011 houve um aumento de 35,6% no valor total de produtos da floricultura importados pelo Brasil (SECEX, 2015). Devido ao alto valor agregado dos produtos, esta é uma atividade que não demanda grandes áreas, o que a torna uma propícia alternativa para a agricultura familiar. É um ramo que exige muito em cuidados, pois para os consumidores de flores e plantas ornamentais o atributo estético que envolve características como cor, forma e tamanho é o mais importante (SÁ, 2010).

A espécie *Epidendrum viviparum* Lindl. é de fácil identificação pelas flores grandes, brancas e principalmente pela forma triangular do ápice do lobo mediano do labelo. Outra característica da espécie é a forma de propagação vegetativa facilitada, pois na haste da inflorescência surgem mudas. Tem distribuição no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas e Peru. No Brasil distribui-se nos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará e Rondônia. O Estado do Mato Grosso, foi coletada na região norte, em floresta ribeirinha, e na região sudoeste em área de transição entre Cerrado e Floresta Amazônica (KOCH & SILVA, 2012).

O desenvolvimento tecnológico, especialmente em relação às novas biotecnologias, abriu inúmeras oportunidades para o conhecimento (KAGEYAMA & LEPSCH-CUNHA, 2001). Dentre elas, podem-se destacar os estudos biológicos que envolvem os aspectos moleculares das espécies, tal fato pode ser facilmente comprovado pelo aumento exponencial na utilização de caracteres de DNA para a

reconstrução da filogenia de um ou vários grupos de plantas, estudos de divergência genética, constituição e caracterização de um banco de germoplasmas, entre outros (FERES et al., 2005).

As técnicas de otimização de extração de DNA para o emprego na reação em cadeia polimerase (PCR) para estudos moleculares dependem diretamente da qualidade pureza e quantidade adequada para manipulação do DNA extraído (BUENO, 2004). Naturalmente, a obtenção de DNA de boa qualidade é um passo fundamental para o sucesso das análises moleculares.

De modo geral, o protocolo de extração de DNA mais utilizado para as diferentes espécies é o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) padrão (DOYLE & DOYLE, 1987) ou CTAB com algumas modificações e variações daquele descrito por DELLAPORTA et al. (1983). As adaptações de protocolo são realizadas visando o baixo custo, rapidez e eficiência na obtenção de DNA de qualidade para análises moleculares (DANNER et al., 2011). Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo padronizar um protocolo para a extração de DNA da espécie *Epidendrum viviparum*, visando futuros estudos com análises moleculares via de marcadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal:

A espécie em estudo *E. viviparum*, faz parte da coleção do Banco de Germoplasma do epítifário do Laboratório de Botânica da Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, *Campus* Universitário de Tangará da Serra.

O tecido foliar foi coletado e conduzido ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, onde foram realizados os procedimentos laboratoriais para a extração, quantificação e análise da integridade do DNA.

Extração do DNA total:

Os testes de extração do DNA foram realizados tendo como protocolo padrão de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) de DOYLE & DOYLE, (1987). Foram avaliados dois protocolos de extrações com modificações nas concentrações de CTAB e β -mercaptoetanol, conforme descrito abaixo:

O tampão de extração constituiu-se pelas seguintes substâncias: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,4M NaCl; 20mM de EDTA (ácido etileno diamonotetracético); 178 mM água destilada, com variações nas concentrações de CTAB (2% e 5%) e β -mercaptoetanol (0; 1 e 2,5%).

Em uma balança analítica foi pesado 150 mg de folhas jovens frescas e colocadas em cadinho de porcelana. As macerações passaram por dois procedimentos distintos: o primeiro adicionou-se 1.000 μ L de tampão de extração diretamente nas amostras e o outro as amostras foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até obter um pó, sendo adicionado 1.000 μ L de tampão, as quais foram transferidas para microtubos de 1,5 mL.

Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, a cada 10 minutos realizou-se suaves inversões. Após os primeiros 30 minutos foi adicionado 1,0 µL de proteinase K (20mg/mL), retornando ao banho-maria. As amostras foram resfriadas à ±5 °C e submetidas a centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm, sendo transferido a fase líquida para microtubos limpos.

Para a extração dos ácidos nucléicos, foi adicionado 700 µL de solvente orgânico clorofórmio, durante 10 minutos realizou-se suaves inversões até formar uma emulsão. Logo, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, separando-se em duas fases orgânica e aquosa (precipitado e sobrenadante).

O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e transferido para outro microtubos novos sendo acrescentado 1,0 µL de RNase (10mg/mL) e retornando ao banho-maria por 30 minutos. As amostras foram resfriadas à ±5 °C e posteriormente, adicionado 700 µL de solvente orgânico clorofórmio, durante 10 minutos realizou-se suaves inversões até formar uma emulsão, novamente as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, retirando o sobrenadante. Esta etapa foi realizada duas vezes.

Nas amostras foram adicionados 700 µL de isopropanol gelado e incubados a -20 °C, por 12 horas para precipitação. Após este período, os microtubos foram novamente centrifugados, a 12.000 rpm por 30 minutos. Todo o líquido foi descartado permanecendo nos microtubos apenas o pellet (pequena massa esbranquiçada aderida à parede inferior do microtubo composta por DNA e eventuais impurezas), este por sua vez, foi lavando por três vezes seguidas com 1.000 µL de álcool 70% gelado. O pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 50µL de TE 0,1 mM (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA). As amostras foram acondicionadas a 4°C.

Análise da integridade do DNA extraído:

Para avaliar a qualidade e integridade do DNA extraído foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,2 mg/mL). Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados por câmera digital Sony 16.1 Mega Pixels.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos, observou-se que a concentração de CTAB a 2% no tampão de extração de DNA genômico interferiu nos resultados. Assim como a forma de maceração realizada com nitrogênio líquido e 2,5% concentração de β-mercaptoetanol, influenciaram na qualidade da banda apresentada na eletroforese, como pode ser observado na Figura 01.

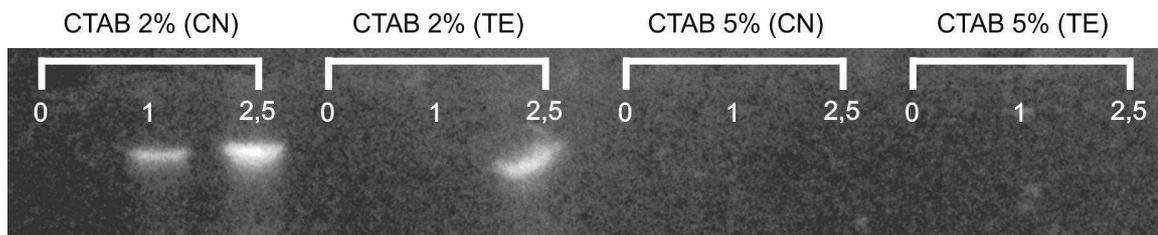


FIGURA 01 - Gel de agarose com bandas de DNA de *Epidendrum viviparum* sob diferentes formas de maceração com a presença de nitrogênio líquido (CN) e diretamente no tampão de extração (TE), duas concentrações de CTAB (2% e 5%) e três de β -mercaptoetanol. Os números 0, 1 e 2 significam 0%, 1% e 2,5% de β -mercaptoetanol, respectivamente.

A diferença básica entre os protocolos de extração de DNA está na composição do tampão de extração que, normalmente, integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8,0, 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).

Para DANNER et al. (2011), ao propor o protocolo de extração de DNA de Jabuticabeira sugeriu a necessária a adição de nitrogênio líquido na maceração, o qual otimizou a extração e reduz a presença de compostos indesejados. CARDOSO (2007), ao testar diferentes protocolos de extração verificou que a utilização do detergente CTAB a 2% foi significativamente superior os demais tratamentos com SDS (sodium dodecyl sulfate) na quantidade de DNA de massa fresca, com melhor padrão de qualidade no emprego em técnicas de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR

Entretanto outros estudos apresentaram resultados diferentes. Como o estudo de HIKMAT et al. (2011), ao avaliarem genótipos *Curcuma Longa*, os melhores resultados obtidos foram alcançados utilizando-se CTAB 5%. Assim, SILVA et al. (2014), em seu estudo com a família Anacardiaceae, obteve resultados satisfatórios com as mesmas concentrações de CTAB.

Contudo, outras concentrações de β -mercaptoetanol também mostraram serem suficientes para a extração de DNA genômico de *E. viviparum*. Concentrações a 1% com maceração com nitrogênio líquido apresentou uma boa qualidade de banda na amostra.

Segundo SILVA (2010), em estudos com espécies nativas do Cerrado, araticunzeiro (*Annona crassiflora*), cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), cajueiro (*Anacardium humilis*), mangabeira (*Hancornia speciosa*) e pequi (*Caryocar brasiliensis*) sugerem a utilização de altas concentrações de β -mercaptoetanol (1,0% a 5%) no tampão de extração permitem a obtenção de maiores quantidades de DNA de boa qualidade. A maceração sem nitrogênio se mostrou eficiente apenas para o protocolo com CTBA a 2% com β -mercaptoetanol a 2,5%. Todas as demais

combinações do protocolo não se apareceram eficientes para a obtenção de DNA genômico de *E. viviparum*.

CONCLUSÕES

As técnicas biotecnológicas disponíveis oferecem contribuições para a análise, conservação, preservação e melhoramento das espécies que compõem a biodiversidade.

A otimização do protocolo de extração permitiu a obtenção de DNA de boa qualidade a partir das folhas de *Epidendrum viviparum* Lindl., com tampão de extração nas concentrações de CTAB a 2% e β -mercaptoetanol a 2,5%.

A maceração na presença de nitrogênio líquido propiciou a redução da presença de compostos indesejados.

Assim essas concentrações podem ser padronizadas para extração de DNA genômico da espécie *Epidendrum viviparum* Lindl., para posteriores análises via marcadores moleculares.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Mato Grosso (FAPEMAT) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M. **Orchidaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011.

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

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, n. 4, p. 233-4, 2004.

CARDOSO, R. D. L. **Caracterização morfológica e citológica de gérbera : Subsídio para o melhoramento genético.** Passo Fundo: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF.2007.p.189. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; CITADIN, I.; SACHET, M. R. Proposta de protocolo para extração de DNA de Jabuticabeira. **Ciência Florestal.** v.21, p. 363-367, 2011.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v.1, p. 19-20, 1983.

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

FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERES, F.; SOUZA, A. P. de; AMARAL, M. do C. do; BITTRICH, V. 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**. v.28, n.2, p.277-283, 2005.

HIKMAT, U. J.; RABBANI, M. A.; SHINWARI, Z. K. Assessment of genetic diversity of indigenous turmeric (*Curcuma longa* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 823-830, 2011.

JOHNSON, A. E. **Las Orquídeas del Parque Nacional Iguazú**. L.O.L.A. Buenos Aires: Argentina. 2001. 296p.

KAGEYAMA, P. Y.; LEPSCH-CUNHA, N. M. Singularidade da Biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I.; DIAS, B. F. de S. (Ed.). **Conservação de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001.

KOCH, A. K.; SILVA, C. A. **Orquídeas Nativas de Mato Grosso**. Editora Carlini & Caniato, 2012.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*. New York: **Oxford University Press**, v.5. 2009.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? **IX Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**. Brasília. 2011.

SÁ, C. D. de. **Propriedade Intelectual na Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais: uma análise da Legislação Brasileira de proteção de Cultivares** (Tese de mestrado). Universidade de São Paulo E Administração. 2010.

SECEX, **Ministério do Comércio Exterior**, 2015, disponível em <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>> Acessado em 30/03/2015.

SILVA; B. M. da. DALBOSCO. E. Z.; BOTINI, N.; FARIA, R. B. de; 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 da. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa. v. 34, n. 6. 2010.