

# EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO VEGETAL DE *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

Maria Cristina Medeiros Mazza<sup>1</sup>  
Juliana Vitória Messias Bittencourt<sup>2</sup>

## RESUMO

Neste artigo, são descritos os procedimentos para a extração de DNA, a partir de acículas terminais (brotos) de indivíduos adultos de *Araucaria angustifolia*. O protocolo utilizado produziu DNA amplificável através de PCR ("Polymerase Chain Reaction").

**PALAVRAS-CHAVE:** isolamento de DNA , Araucária, conífera.

## EXTRACTION OF DNA FROM PLANT TISSUE OF *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

## ABSTRACT

In this paper we describe DNA extraction procedures for apical meristematic leaves (buds) of mature individuals of *Araucaria angustifolia*. The protocol yields DNA that can be amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction).

**KEY-WORDS:** DNA analysis, Araucaria, Coniferales.

---

<sup>1</sup> Zootecnista, Mestre, CRMV-PR nº 0371-Z , Pesquisadora da *Embrapa Florestas*.

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, CREA-PR nº 23903/P, Aluna de Mestrado, Bolsista da *Embrapa*.

## 1. INTRODUÇÃO

O passo chave na análise genética de populações de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade (Kidwell & Osborn, 1992) ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas (Milach, 1998) e ser passível de amplificação. Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal (Mercado et al., 1999; Romano & Brasileiro, 1999; Kidwell & Osborn, 1992), os quais são resultantes, principalmente, do co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários.

Contaminantes, como os compostos polifenólicos e terpenóides, liberados durante a lise celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação através de PCR - "Polymerase Chain Reaction" (Couch & Fritz, 1990). O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem muitas diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (Lodhi et al., 1994).

Tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbivoria, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Estes compostos, frequentemente, estão ausentes ou encontram-se em baixas concentrações, em folhas jovens e em sementes ou pólen (Mittton et al., 1979). Entretanto, quando se trabalha com espécies arbóreas em populações naturais, nem sempre se tem acesso a tais tecidos, restritos a determinado estágio reprodutivo da árvore ou maturidade da folha.

O método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente CTAB - *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (Romano & Brasileiro, 1999; Mercado et al., 1999; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vasconcelos, 1995; Doyle et al., 1987). Esse detergente solubiliza as membranas celulares e, dependendo da concentração de NaCl no tampão, forma um complexo com o DNA, podendo, portanto, ser utilizado para precipitá-lo seletivamente nos casos de difícil separação, como folhas maduras (Kidwell & Osborn, 1992).

A maioria dos protocolos para diferentes espécies, descritos na literatura, utiliza o método CTAB padrão (Romano & Brasileiro, 1999), com variações de acordo com a espécie estudada e o tecido a ser utilizado para a extração. Modificações nos métodos básicos, pela adição de anti-oxidantes, agentes desproteinizantes e outros, podem melhorar a eficiência,

ou mesmo possibilitar a obtenção de DNA, principalmente em espécies com elevada concentração de metabólitos secundários. Além desses aspectos, de acordo com Millach (1998), a forma de coleta e a condição final do tecido são fundamentais para a qualidade do DNA.

Neste trabalho, foram realizadas modificações no método padrão CTAB de extração de DNA a partir de acículas terminais (brotos) de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*, bem como estabelecidas condições de coleta e pré-tratamento das amostras, visando à obtenção de um protocolo para a espécie, ainda não registrado na literatura.

As principais modificações introduzidas referem-se ao emprego de Proteinase K, no tampão de extração, além do uso de tecido vegetal liofilizado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Soluções requeridas:

Tampão de extração –Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; PVP 40000 1%; 2- Mercaptoetanol 0,1% e Proteinase K 0,01% (estes dois últimos são adicionados no momento de uso).

TE - Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM.

CIA - clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Proteinase k (estoque) - 20 mg/ml.

RNAse - 10 mg/ml.

Etanol absoluto, 70% e 95%.

**Material vegetal:** Foram utilizadas acículas terminais (brotos) de ramos secundários de 176 indivíduos maduros de diferentes procedências. Os brotos, coletados diretamente nas árvores, foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer a -80° C. Previamente à extração, as amostras foram liofilizadas durante 72 horas, colocadas em dessecador e armazenadas à temperatura de -20° C.

**Protocolo de extração de DNA:** Macerar 0,3 a 0,4 g de cada amostra, previamente liofilizada, com auxílio de pistilo e almofariz, até obter um “pó” bem fino. Dividir o material em três partes, transferindo para três

microtubos de 1,5 ml. Em cada microtubo, adicionar 850 µl de tampão de extração, previamente aquecido à 65°C. Misturar por inversão e, quando necessário, auxiliar com um bastão. Incubar em banho-maria a 65°C por 45 min, agitando a cada 15 min. Após atingir a temperatura ambiente, adicionar, na capela, 500 µl de CIA. Agitar, cuidadosamente, por inversão, durante 15 min. Em seguida, centrifugar a 13000 rpm, 4°C, por 15 min. Transferir o sobrenadante para um microtubo limpo. Adicionar 3 µl de RNase, agitando lentamente por inversão, e deixar em banho de gelo por 40 min. Adicionar 600 µl de CIA, agitando por inversão por 15 min. Centrifugar a 13000 rpm, 4°C, por 10 min. Transferir o sobrenadante para um outro tubo e adicionar 800 µl de etanol P.A. gelado, misturando com suaves inversões, até a precipitação do DNA. Deixar no freezer -20°C por 60 min. Com o auxílio de uma alça de vidro, "pescar" o DNA, lavá-lo com etanol 70% gelado por 30 min. e com etanol 95% gelado, por mais 30 min. cada. Secar bem o pellet e ressuspendê-lo em 100µl de TE.

**Avaliação do DNA obtido:** Estimar a quantidade de DNA através de espectrofotometria, assumindo uma equivalência de 50 µg/ml para 1 unidade de absorbância a 260 nm. Avaliar a qualidade através da razão  $A_{260}/A_{280}$ , por visualização das bandas na eletroforese em gel de agarose 0,8% e pela amplificação através de PCR.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o método descrito, obteve-se um DNA incolor, livre de substâncias viscosas que, freqüentemente, se ligam a ele durante a sua precipitação. A produção variou de 14,49 a 357,32 mg por g de tecido vegetal fresco, com um valor médio de  $110,65 + 57,39$  µg. A razão  $A_{260}/A_{280}$  situou-se entre 1,7 e 2,0, em 77% das amostras, indicando baixa contaminação com polifenóis, polissacarídeos e proteínas. A pureza do DNA obtido foi satisfatória, visível no gel de agarose (Figura 1) e mostrando-se amplificável através de PCR - "Polymerase Chain Reaction" (Figura 2).

A obtenção do DNA de tecido foliar de araucária de boa qualidade somente foi possível com a desidratação do material, através da liofilização. Este procedimento também possibilitou a eliminação do uso de nitrogênio líquido durante a maceração. O isolamento de DNA de plantas previamente secas tem se mostrado mais eficiente do que usando tecido fresco (Tai & Tanksley, 1988).

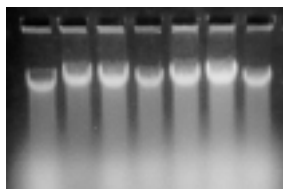
Outro fator fundamental para a obtenção de DNA na espécie foi o uso

da Proteinase K. O uso de CIA simples ou conjugado com fenol, utilizado em testes preliminares, não possibilitou a obtenção de DNA, a partir de brotos de araucária.

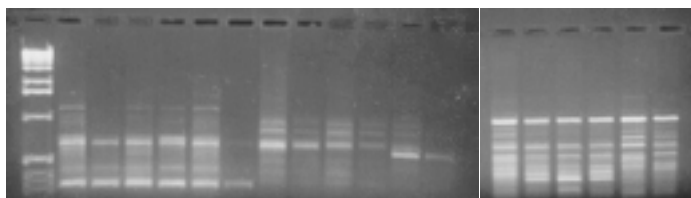
#### 4. CONCLUSÕES

O protocolo desenvolvido permitiu a obtenção de DNA de boa qualidade, a partir de brotos de árvores adultas de araucária, e tem servido de base para o estudo genético das populações desta e de outras espécies nativas da Floresta com Araucária.

Com os resultados obtidos, abre-se a perspectiva de análise genética de populações de *Araucaria angustifolia*, utilizando marcadores de DNA.



**FIGURA 1.** Gel corado com brometo de etídio mostrando o DNA de brotos de araucária.



**FIGURA 2.** Gel mostrando os fragmentos amplificados através de PCR.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, p.8-12, 1990.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. **Plant genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.
- LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p.6-13, 1994.
- MERCADO, J.A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.35, n.2, p.152-153, 1999.
- MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.
- MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- TAI, T.H.; TANKSLEY, S.D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, n.4, p.297-303, 1988.
- VASCONCELOS, M.J.V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD**. Viçosa: UFV, 1995. 54p. Tese Mestrado.