

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS FOLIARES DE ERVA-MATE ARMAZENADAS EM SÍLICA-GEL

Y.S. Diaz¹, M.A. Moreno¹, E.M. Ferraz¹, B. Ibañes¹, D.R. Kestring², C.E.S. Seoane², P.Y. Kageyama¹.

¹Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP/ESALQ), Av. Pádua Dias, 11, CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba, Brasil, vinicius.diaz@usp.br; amoreno@esalq.usp.br; emferraz@esalq.usp.br; [bibanes@usp.br](mailto:bibaner@usp.br); kageyama@esalq.usp.br
²Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, CP 319, CEP 83411-000, Colombo, PR, Brasil, eduardo@cnpf.embrapa.br; drigoni@cnpf.embrapa.br

Resumo

Estudos com marcadores moleculares em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) podem ser utilizados para diversas aplicações, desde estudos de genética de populações até programas de melhoramento. Para trabalhos de caracterização e diversidade genética é exigido um grande número de indivíduos, necessitando de métodos confiáveis de armazenamento. Este trabalho avaliou a viabilidade do método de armazenamento de material vegetal foliar em sílica-gel para extração de DNA genômico de erva-mate, comparando quantidade e qualidade do DNA total obtido de amostras conservadas a frio e de amostras conservadas em sílica-gel. O protocolo utilizado foi adaptado de Ferreira & Grattapaglia (1998), que consiste em: CTAB 3%, 1,4 NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, adicionado PVP 1,0%, B-mercaptoetanol 0,2%. Após 45 dias de armazenamento foi possível extrair DNA das amostras foliares, com boa qualidade, sem sinais de oxidação, rastro de proteína e RNA.

Palavras-chave: preservação de amostras, análises moleculares, transporte de material, marcadores moleculares.

EXTRACTION OF GENOMIC DNA SAMPLES OF LEAF YERBA MATE STORED IN SILICA-GEL

Abstract

Studies with molecular markers in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) can be used for various applications, ranging from studies of population genetics to plant breeding. To work on characterization and genetic diversity is required a large number of individuals requiring a reliable method of storage. This study evaluated the feasibility of the method of storage of plant leaf material in silica gel for extraction of genomic DNA of yerba mate comparing the quantity and quality of total DNA obtained from samples stored cold and samples preserved in silica gel. The protocol used was adapted from Ferreira & Grattapaglia (1998), which consists of: 3% CTAB, 1.4 NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, plus 1.0% PVP, 0 B-mercaptoethanol, 2%. After 45 days of storage was possible to extract DNA from leaf samples, with good quality, with no signs of rust, trace of protein and RNA.

Keywords: preservation of samples, molecular analysis, material transport, molecular markers.

Introdução

Estudos com marcadores moleculares em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) podem ser utilizados para diversas aplicações, desde estudos de genética de populações até programas de melhoramento. Para trabalhos de caracterização e diversidade genética é exigido um grande número de indivíduos, necessitando de métodos confiáveis de armazenamento do material vegetal. Sempre que possível é indicado o uso de material fresco, entretanto, em trabalhos com populações nativas as amostras podem estar distante dos centros de pesquisa, levando por vezes

tempo considerável de transporte até os laboratórios.

A preservação de amostras em sílica-gel tem por vantagem conservar o material vegetal a um baixo custo, pois dispensa estruturas de refrigeração no transporte e no local de armazenamento (Chase e Hills, 1991). Tecidos secos em estudos moleculares são rompidos com maior facilidade, além de serem menos suscetível à degradação química ou enzimática, preservando desta forma o DNA com qualidade. (Murray e Thompson, 1980). Vários estudos confirmam a eficácia da sílica-gel como método de armazenamento. Moraes Filho (2010) comparou o uso de material conservado em sílica-gel e material fresco conservado a frio para o gênero *Citrus*, e verificou que não houve diferença significativa. Santos et al. (2007)) extraiu adequadamente DNA com material conservado em sílica-gel para a espécie *Aniba roseodora* Ducke (Pau-rosa). Stefenon e Nodari (2003) utilizaram com sucesso a sílica-gel para Araucária; e De Almeida Vieira et al. (2010) utilizou a sílica-gel para a extração de DNA da espécie *Ficus bonijesulapensis*. Entretanto, o uso deste método de conservação deve ser realizado com cautela, pois, como demonstrou Feres et al. (2005) a sílica-gel não foi eficaz para a obtenção de DNA de alta qualidade em folhas de plantas de várias espécies coletadas no cerrado ou campos rupestres.

Estes estudos demonstram a necessidade de realizar estudos prévios da viabilidade da aplicação do método. A técnica de conservação em sílica-gel, quando viável, é uma importante ferramenta para estudos populacionais, sendo adequada a condição de trabalho de campo por ser de simples execução; e ideal para o transporte por não necessitar de equipamentos de refrigeração.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do método de armazenamento de material vegetal foliar em sílica-gel para extração de DNA genômico de ervamate.

Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP/ESALQ). As amostras foliares foram coletadas de 11 indivíduos adultos de ervamate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) no município de Colombo, estado do Paraná. As amostras foliares de cada árvore foram armazenadas em sílica-gel e também foram mantidas frescas por meio de refrigeração de aproximadamente 05 °C. Após 15 e 45 dias de armazenamento foi realizado o primeiro e segundo teste de extração de DNA genômico. Foi comparada a quantidade e qualidade do DNA total obtido do material foliar conservado a frio e do material armazenado em sílica-gel,

O protocolo utilizado foi adaptado de Ferreira & Grattapaglia (1998), que consiste em: CTAB 3%, 1,4 NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, adicionado PVP 1,0%, 13-mercaptoetanol 0,2%. Para extração de DNA genômico das amostras foliares foi utilizado aproximadamente 100 mg de tecido vegetal. As amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,7 ml e maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado 700 µl de tampão de extração. Os microtubos foram incubados no banho-maria à 65°C por uma hora, sendo agitados manualmente a cada 10 minutos. Após essa etapa, os microtubos foram resfriados até temperatura ambiente, e foi adicionado 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1. Posteriormente foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante, de aproximadamente 400 µl foi transferido para um novo microtubo. Em seguida foi adicionado 400 µl de isopropanol e o material foi armazenado em freezer a -20°C por 12 horas. Posteriormente foi centrifugado durante 10 minutos a 13000 rpm para formação dos pellets. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados por duas vezes a 500 µl de etanol 70%, e por uma vez a 500 µl de etanol 95%. Retirado o etanol os microtubos permaneceram à temperatura ambiente sobre a bancada por aproximadamente 05 horas para secagem. Os pellets foram ressuspensos com 60 µl de tampão TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM de

EDTA, pH 8,0) acrescido de RNase (15 mg / ml) e incubados a 37°C por uma hora. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada por meio da análise comparativa com amostras de concentração conhecida (Å.) de 50 ~1, 100 ~1 e 300 ul. O DNA das amostras e os Å foram submetidos à eletroforese durante 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

De acordo com apresentado nas **figuras 1 e 2**, foi possível extrair DNA de boa qualidade do material conservado em sílica-gel. As amostras não apresentaram sinais de oxidação, rastros de proteína e RNA. A principal diferença entre os dois períodos de armazenamento foi a quantidade de DNA obtido, menor para o período de armazenamento de 45 dias. Os resultados indicam que a sílica-gel é uma técnica viável de armazenamento de amostras foliares para a ervamate. A escolha do método de armazenamento deve considerar o tempo entre a coleta e o transporte ao centro de pesquisa. Nesse sentido, a técnica de conservação em sílica-gel é adequada a condição de trabalho de campo onde o transporte até os laboratórios podem necessitar de um tempo considerável. Para coleta em locais próximos, onde é menor esse intervalo de tempo, o uso de material fresco é mais indicado.

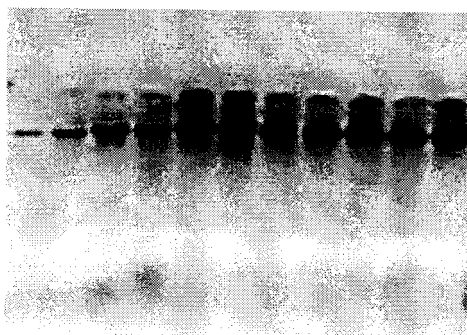


Figura 1: gel de quantificação de amostras com 15 dias de armazenamento

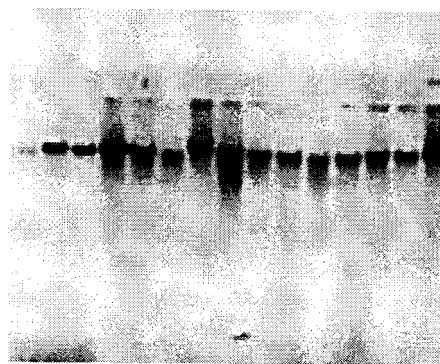


Figura 2: gel de quantificação de amostras com 45 dias de armazenamento

Conclusão

Foi possível extrair DNA genômico sem sinais de oxidação, rastro de proteína e RNA das amostras armazenadas em sílica-gel.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de mestrado do primeiro autor, processo 14725112010-9.

Referências

- Almeida Vieira, F.; Da Silva Santana J. A.; Dos Santos, R. M. Métodos de extração de DNA e seleção de primers de cpDNA para *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae), Revista Caatinga, V. 23, n. 4, p.69-74. 2010.
- Chase, M.; Hills, H. Silica-gel - an ideal material for field Preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon, v. 40, n. 2, p. 215-220, 1991.
- Feres, F.; Souza, A. P.; Amaral, M. C.; Bittrich, V Evaluation of methods of Neotropical Savanna

- plant samples preservation for yielding high quality DNA for molecular studies. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, p. 277-283, 2005.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p.1998.
- Moraes-Filho, R M.; Jimenez, H. J.; Martins, L. S. S.; Montarroyos, A. Y. Y.; Musser, R S.; Ferreira da Silva, E.; Moura da Silva, M. Estudo comparativo entre protocolos de extração de DNA para o gênero *Citrus*. *Star*, v.1, p.6-8, 2010.
- Murray, M. G; Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 8, n. 19, p.4321, 1980.
- Novaes, R; Rodrigues, J.; Lovato, M. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 1, p. 86-96,2009.
- Santos, R. P.; Angelo, P. C. D. S.; Quisen, R. C.; Oliveira, C. L.; Sampaio, P. D. T. B. RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras in situ, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. *Acta Amazonica*, v. 37, n. 2, p.253-259. 2007.
- Stefenon, V M.; Nodari, R O. Marcadores moleculares no melhoramento genético de araucária. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Edição nº, v. 31, p. 95, 2003.