

COLETA DE FOLHAS DO CAFEIEIRO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE ALTA QUALIDADE

Gabriella Santos Pereira²; Édila Vilela de Resende Von Pinho³; Lílian Padilha⁴; Luciane de Resende Vilela⁵; Bruna Line Carvalho⁶; Iolanda Vilela Von Pinho⁷

¹ Projeto financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ

² Mestranda em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, gabipereira87@yahoo.com.br.

³ Professora, D.Sc., Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, edila@ufla.br

⁴ Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, ✉ lilian.padilha@embrapa.com.br

⁵ Professora, D.Sc., Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

⁶ Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

⁷ Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

RESUMO: Para a amplificação do DNA *in vitro*, é necessário que o DNA genômico seja de boa qualidade. É comum que seja realizada a coleta do tecido vegetal em local distante de onde será feita a extração e análises do DNA e muitas vezes, o armazenamento inadequado das amostras favorece as reações de oxidação, resultando na redução da qualidade deste. Realizou-se este trabalho com o objetivo de estabelecer um método simples e eficiente para coleta e armazenamento de folhas de *Coffea arabica* visando a obtenção de DNA de boa qualidade. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras, envolvendo doze tratamentos e duas testemunhas. Foram combinados os fatores umidade da folha (seca ou úmida) x tempo de armazenamento (24h e 48h) x condição do ambiente (T°C ambiente ou 4°C) x utilização de sílica no recipiente de armazenamento da folha (com ou sem sílica). Foram utilizados dois controles, onde as folhas coletadas foram armazenadas no campo em gelo ou em N₂ líquido e submetidas à extração do DNA logo após a sua coleta. A avaliação da qualidade do DNA foi feita pela eletroforese do DNA genômico em gel de agarose 0,7% e pela amplificação de fragmentos de DNA utilizando-se um par de *primer* microssatélite. Os resultados indicaram que a utilização da sílica quando as folhas estavam secas e o armazenamento das folhas a 4°C por 24h ou 48 h são favoráveis à oxidação das amostras, resultando em um DNA de má qualidade. A extração do DNA de alta qualidade passível de ser utilizado em PCR é viável quando folhas secas ou úmidas são coletadas e armazenadas em sacos plásticos por até 48 horas antes do início do procedimento da extração.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, armazenamento de amostra, folhas

COLLECTION OF LEAVES FROM TREE OF COFFEE E EXTRACTION OF DNA OF HIGH QUALITY

ABSTRACT: A genomic DNA with high quality is necessary to DNA *in vitro* amplification. It is usual the harvesting of vegetal tissue in a place distant from the laboratory where the DNA extraction and analysis will be done. Also, the inappropriate storage of samples contributes to oxidation reactions, reducing the DNA quality. This work aimed to determine a simple and efficient process for harvest and storage of *Coffea arabica* leaves to obtain a DNA with high quality. The experiment was conducted in Seed Analysis Laboratory at Lavras Federal University with 12 treatments. Were combined leaf moisture (dry and wet) x storage period (24h and 48h) x environment temperature (T°C environment and 4°C) x silica gel within leaf storage bag. Were used two controls with the leaves harvested and after this, stored next to ice or in liquid N₂ and immediately take to the laboratory for the DNA extraction. The DNA quality analysis was done by the agarose gel electrophoresis for the genomic DNA and by the amplification of DNA fragments using a microsatellite primer. To use silica gel when the leaves are dry and the leaves storage at 4°C by 24h or 48h contributes to sample oxidation and results in a bad quality of DNA. The high quality DNA is obtained when dry or wet leaves are harvested and stored in bags until 48 hours before the beginnings of extraction procedure.

Key words: *Coffea arabica*, sample storage, leaves.

INTRODUÇÃO

A multiplicação *in vitro* do DNA por meio da técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) exige a utilização de DNA de alta qualidade, livre de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos. Uma das etapas que é importante neste processo é a forma de coleta e a preservação do tecido vegetal a ser utilizado na extração. Os cuidados iniciais na coleta da amostra podem reduzir problemas posteriores relacionados à amplificação do DNA. É interessante que o material a ser utilizado seja o mais fresco possível, sendo que, frequentemente, aqueles em fase ativa de crescimento das plantas fornecem os melhores resultados (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Além disto, o

armazenamento da amostra até o momento de sua extração é também determinante para a obtenção do DNA de boa qualidade.

O cafeeiro é uma espécie sujeita a muita oxidação, principalmente nas folhas e nos frutos. Compostos fenólicos como o ácido 5-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico (CGA), principal substrato da polifenoloxidase (PFO) estão presentes em quantidades expressivas nesses tecidos. Eles exercem importante função no metabolismo, estando envolvidos em mecanismos de defesa da planta. Por outro lado, a oxidação dos compostos fenólicos se constitui em um problema limitante à extração do DNA. Durante o processo de oxidação, a PFO são ativadas e podem reagir com substratos fenólicos intra e extracelulares, oxidando-os a quinonas (Amorim, 1978) que podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas e acarretar a morte celular.

É comum que seja realizada a coleta do tecido vegetal em local distante de onde será feita a extração e análises do DNA. Normalmente, para a extração de ácidos nucleicos, as folhas do cafeeiro são coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (N_2). Esse elemento paralisa a atividade das células e evita a oxidação de compostos fenólicos. Após a coleta e congelamento em N_2 , o tecido vegetal poderá ser mantido a $-20^\circ C$ por algumas semanas ou a -80° por um período mais prolongado (Ferreira & Grattapaglia, 1996), devendo ser descongelado imediatamente antes da extração.

Objetivou-se com esse trabalho determinar um método simples e eficiente de coleta e armazenamento de folhas do cafeeiro que permita a posterior extração do DNA de alta qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

A coleta das folhas foi realizada no período da manhã. Foram testadas diferentes formas de armazenamento de amostras coletadas do terceiro par de folhas da porção média do cafeeiro, combinando-se os fatores umidade da folha x tempo de armazenamento x condição do ambiente ($T^\circ C$) x utilização de sílica no recipiente de armazenamento da folha (Tabela 1). Foram utilizados dois controles: A - folhas coletadas, armazenadas no campo em gelo e submetidas à extração do DNA logo após a sua coleta; B - idem a A, porém foram armazenadas no em N_2 líquido. A umidade da folha, considerada neste trabalho, se refere ao fato da mesma ter sido secada com papel toalha eliminando com isto a água livre presente nela (“folha seca”) antes do armazenamento em saco plástico; ou simplesmente, coletada e acondicionada em sacos plásticos (“folha úmida”). A utilização da sílica teve o objetivo de reduzir a umidade relativa do saco plástico onde foram acondicionadas as folhas. Para a determinação do tempo de espera, considerou-se um tempo máximo de 48h necessário para que a amostra chegasse a um laboratório.

TABELA 1 – Tratamentos utilizados para coleta das folhas para extração do DNA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	
1	Folha úmida armazenada por 48 horas em 3 sacos plásticos contendo sílica em T° ambiente.
2	Folha úmida armazenada por 24 horas em 3 sacos plásticos contendo sílica em T° ambiente.
3	Folha seca armazenada por 48 horas em 3 sacos plásticos contendo sílica em T° ambiente.
4	Folha seca armazenada por 24 horas em 3 sacos plásticos contendo sílica em T° ambiente.
5	Folha seca incubada a $4^\circ C$ por 48 horas em saco plástico.
6	Folha úmida incubada a $4^\circ C$ por 48 horas em saco plástico.
7	Folha seca armazenada por 48 horas em saco plástico T° ambiente.
8	Folha úmida armazenada por 48 horas em saco plástico T° ambiente.
9	Folha seca armazenada a $4^\circ C$ por 24 horas em saco plástico
10	Folha úmida armazenada a $4^\circ C$ por 24 horas em saco plástico.
11	Folha seca armazenada por 24 horas em saco plástico T° ambiente.
12	Folha úmida armazenada por 48 horas em saco plástico T° ambiente.
13	Controle A
14	Controle B

A extração foi realizada com base na metodologia sugerida por Ferreira, & Grattapaglia (1996) com algumas modificações. As folhas foram maceradas em N_2 líquido até a obtenção de um pó bem fino. Após, foram adicionados a 200mg desse pó, 700 μ L do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 100mM Tris-HCl pH 7,5; 20mM de EDTA pH 8,0; 1,4M NaCl; 1% de PVP) com adição de 2% de β mercaptoetanol seguida de incubação a $65^\circ C$ por 30 minutos. Ao final deste período e as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e foram adicionados 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram invertidos gentilmente por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado 400 μ L de isopropanol a $-20^\circ C$. As amostras foram colocadas a $-20^\circ C$ por aproximadamente 15 minutos, para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm durante 5 minutos. O *pellet* foi lavado por

2 vezes com 500 µL de etanol 70% , ficando imerso por 5 a 10 minutos a cada vez e em seguida lavado com 1000µL de etanol absoluto durante 3 minutos. O *pellet* foi secado e ressuspensionado com 50 µL de água deionizada autoclavada e armazenado a -80°C. A extração do DNA foi realizada em duas repetições de cada tratamento. Durante o armazenamento do DNA extraído, houve a perda de uma das repetições dos tratamentos 2, 3 e 9. A quantificação foi realizada em gel de agarose 0,7%, sendo aplicadas duas repetições de cada amostra.

Após 60 dias da extração, para a confirmação da qualidade, as moléculas de DNA das amostras foram amplificadas por meio de PCR, utilizando um par de *primers* de microssatélites. O DNA amplificado foi aplicado em gel de acrilamida 10% e foi corado com solução de nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram consideradas as variáveis umidade, temperatura e tempo de espera da amostra (armazenamento) até o momento da extração para que fossem englobados fatores que poderiam influenciar a oxidação da amostra no momento de sua extração. Soares & Machado (2007) citam que as espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como, o oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) ou superóxido ($O_2\cdot^-$), em elevados níveis são tóxicas e diretamente relacionadas ao processo de oxidação. A produção de ERO é favorecida por vários fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, extremos de temperatura, estresse físico, mecânico e também como resposta a estresse bióticos, dentre outros.

Na quantificação em agarose todas as amostras apresentaram uma boa qualidade e as concentrações do DNA foram bem variáveis (Figura 1).

Os *pellets* das amostras 3, 4, 5, 6, 9 e 10 apresentaram uma coloração escura, indicando a ocorrência de oxidação do DNA extraído. As folhas dessas amostras antes da extração já se apresentavam escurecidas. Pode-se verificar então que quando as folhas foram mantidas a baixa temperatura (4°C) por 24 ou 48h após a coleta (tratamentos 5, 6, 9 e 10), houve o favorecimento do processo de oxidação das folhas do café. Além disto, a utilização da sílica quando as folhas foram secas com papel toalha (amostras 3 e 4) interferiu de maneira negativa na qualidade do DNA extraído. Já as moléculas de DNA extraídas das demais amostras (1, 2, 7, 8, 11, 12, 13, 14) eram transparentes, quase impossíveis de serem visualizados, o que é desejável, pois indica que o DNA é livre de impurezas como sais, carboidratos, compostos fenólicos, etc.

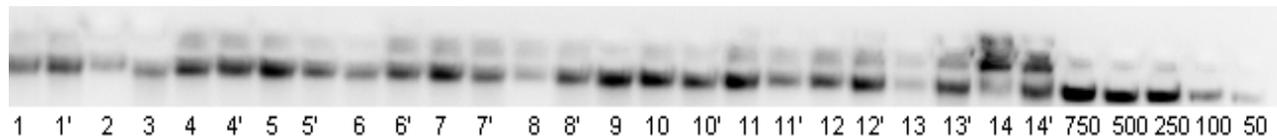


Figura 1: Quantificação de DNA de 14 amostras de folhas de café, realizada em gel de agarose 0,7%. O DNA foi extraído de diferentes formas combinando-se os fatores umidade da folha x tempo de armazenamento x condição do ambiente (T°C) x utilização de sílica no recipiente de armazenamento da folha.

Após 60 dias, o DNA das amostras foram amplificados com um par de *primers* microssatélite. O resultado mostrou uma degradação do DNA das amostras 3, 4, 5, 6 e 9, que apresentaram o *pellet* escurecido. O DNA das outras amostras amplificaram bandas nítidas. A utilização da sílica quando as folhas foram secas com papel toalha (3 e 4) interferiu de maneira negativa na qualidade do DNA extraído.

Os melhores resultados da amplificação do DNA foram observados para os tratamentos 7, 8, 11, 12 e para os controles A e B.

CONCLUSÕES

Folhas úmidas ou secas, acondicionadas em saco plástico, podem ser armazenadas por até 48 horas antes do início do procedimento de extração do DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionado com a determinação da qualidade.** 1978. 85 p. Tese (“Livre Docente” em Bioquímica) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Bertrand, C.; Noirot, M.; Doulebeau, S.; De Kochko, A.; Hamon, S.; Campa, C. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Quantitative comparison with leaves. **Plant Science** v.165, n.6, p.1355 a 1361. 2003.

Clifford, M. N.; Kazi, T., 1987. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. **Food Chem.** v.25, p. 59-69.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

Gooding, P. S.; Bird, C.; Robinson, S.P. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. **Planta**, v.213 n.5, p. 748 a 757. 2001.

Menezes, H. C.; Clifford, M. N. The influence of stage of maturity and processing method on the relation between the different isomers of caffeoylquinic acid in green coffee beans. **In:** 12th Int. Scientific Colloquium on Coffee, Montreux. ASIC, Paris. p.377 a 381. 1987.

Soares, A.M.S.; Machado, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 1; n.1, p.9 a 19. 2007.

Thygesen, P. W.; Dry, I. B.; Robinson, P. S. Polyphenol oxidase in potato: a multigene family that exhibits differential expression patterns. **Plant Physiol.** v.109, p. 525 a 531. 1995.