

EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE SEIS ESPÉCIES DE *Catasetum* NATIVAS DA AMAZÔNIA MERIDIONAL

ANA APARECIDA BANDINI ROSSI^{1*}, IVONE VIEIRA DA SILVA², ANDRÉ LAVEZO³,
JULIANA DE FREITAS ENCINAS DARDENGO³, LIGIA EBÚRNEO³,
LUDILÉIA VANUCIA BONFANTE³

Recebido em 12.07.2013 e aceito em 11.06.2014.

^{1*}Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas. Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso. 78.580-000. Alta Floresta, MT. anabanrossi@gmail.com (*autor para correspondência). ²Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal). Laboratório de Biologia Vegetal. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso. 78.580-000. Alta Floresta, MT. ³Mestrandos do Programa de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Universidade do Estado de Mato Grosso. 78.580-000. Alta Floresta, MT.

RESUMO: A extração de DNA genômico em quantidade e qualidade adequadas para amplificação via PCR é uma etapa fundamental para os estudos que utilizam dados moleculares. Portanto, este estudo objetivou adaptar protocolo de extração de DNA e estabelecer condições de amplificação com os marcadores ISSR para as espécies: *Catasetum apolloi*, *C. schmidtianum*, *C. longifolium*, *C. osculatum*, *C. saccatum* e *C. juruenense*. Utilizou-se tecido foliar jovem de cada espécie para a extração de DNA. Foi testada a presença e ausência de proteinase K e acetato de amônio no tampão de extração CTAB 3%. Todas as espécies apresentaram um padrão de amplificação satisfatório com o DNA resultante do protocolo de extração sem proteinase. A presença de acetato não interferiu na qualidade do DNA, exceto para *C. juruenense*. Portanto, sugere-se a não utilização de proteinase K e acetato de amônio para a extração de DNA das espécies de *Catasetum* estudadas.

Palavras-chave: Orquídeas, biologia molecular, marcadores moleculares.

DNA EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF SIX *Catasetum* SPECIES NATIVE FROM SOUTHEAST AMAZON

ABSTRACT: The genomic DNA extraction in adequate quantity and quality for amplification by PCR is an essential step for the studies that use molecular data. Therefore, this study aimed to adapt the DNA extraction protocol and establish conditions for amplification with ISSR markers for the species: *C. apolloi*, *C. schmidtianum*, *C. longifolium*, *C. osculatum*, *C. saccatum* and *C. juruenense*. It was used young leaf of each species for DNA extraction. The presence and absence of proteinase K and ammonium acetate in CTAB extraction buffer 3% was tested. All species showed a satisfactory amplification pattern resulted of DNA extraction protocol without proteinase. The presence of acetate did not result in increasing the quality of DNA, except for *C. juruenense*. Thus, it is suggested not using proteinase K and ammonium acetate for the extraction of DNA from species of *Catasetum* studied.

Key words: Orchids, molecular biology, molecular markers

INTRODUÇÃO

O termo biodiversidade refere-se à diversidade biológica para designar a variedade de formas de vida em todos os níveis (Alho, 2012). Estima-se que 20% de toda essa

diversidade biológica esteja presente em território brasileiro, no entanto, ações antrópicas realizadas de maneira indiscriminada em ambientes naturais têm ocasionado a perda de habitats e a fragmentação florestal, consequentemente

reduzindo a diversidade biológica (Ehrlich, 1988).

Mudanças na cobertura florestal, como as observadas ao longo da Amazônia brasileira, podem acarretar uma série de consequências na biodiversidade, sendo uma das principais a fragmentação das florestas (Peres, 2001; Barlow & Peres, 2004; Barlow et al., 2006). Uma das consequências da fragmentação é que as populações remanescentes sofrem alterações nos padrões de troca de genes e têm sua variabilidade e estrutura genética alterada (Ballal et al., 1994).

O gênero *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth encontra-se distribuído desde o México até o Sul do Brasil e Norte da Argentina, em áreas tropicais quentes com grande representação para o Brasil (Scaglia, 1998), onde 26 espécies já foram confirmadas em Mato Grosso (Fernandes et al., 2006).

As populações das espécies de *Catasetum* que ocorrem no estado de Mato Grosso devem estar sobre o efeito da fragmentação, uma vez que durante a década de 70 o estado foi intensamente ocupado. Desde então a retirada da vegetação nativa para a implantação de culturas anuais e pastagens tem ocasionado a redução da vegetação original a pequenos fragmentos. Por isso tem sido considerada área prioritária para investigação científica (Maury, 2004).

Marcadores moleculares do DNA, especialmente aqueles baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction), são muito úteis para a avaliação de diversidade genética intra e interespecífica e gerar dados úteis à elaboração de práticas de manejo visando a conservação e a utilização dos recursos genéticos de maneira sustentável. A etapa básica para tais estudos é a extração de DNA genômico em quantidade e qualidade adequadas para que a PCR permita a obtenção de marcas moleculares nítidas e reprodutivas.

Os procedimentos utilizados na extração e purificação do DNA influenciam a quantidade, estabilidade e qualidade do mesmo. Diferentes métodos de extração de DNA a partir de tecido foliar, como os baseados no CTAB, têm sido utilizados para espécies do gênero *Catasetum* (Oliveira et al., 2010). Entretanto, dependendo da espécie em estudo e das condições laboratoriais, são necessárias algumas modificações e adaptações nos protocolos, para reduzir gastos e tempo, bem como para a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de bandas de DNA para posteriores estudos moleculares.

Portanto, o objetivo deste estudo foi adaptar o protocolo de extração de DNA descrito por Oliveira et al. (2010) e estabelecer condições de amplificação com os marcadores ISSR para as espécies *Catasetum apolloi* Benelli & Grade, *Catasetum schmidtianum* F. E. L. Miranda & K. G. Lacerda, *Catasetum longifolium* Lindl., *Catasetum juruenense* Hoehne, *Catasetum osculatum* Lacerda & V.P. Castro e *Catasetum saccatum* Lindl.), visando futuros estudos de diversidade genética.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular do Campus Universitário da UNEMAT (Universidade do Estado de Mato Grosso) no município de Alta Floresta – MT.

Foram coletadas folhas jovens das seis espécies de *Catasetum*. As amostras foliares foram identificadas e armazenadas em sílica gel até posterior extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído com base no protocolo descrito por Oliveira et al. (2010), a partir do qual foram realizados quatro testes de extração a partir do protocolo básico, para as seis espécies em estudo: protocolo com proteinase K e com acetato de amônio (teste 1); sem proteinase K e com acetato de amônio (teste 2); com proteinase K e sem acetato de amônio (teste 3), sem proteinase K e sem acetato de amônio (teste 4).

Para todos os testes foi macerado cerca de 300 mg de folha em nitrogênio líquido. Em seguida, acrescentou-se 800 µL de tampão CTAB 3 % com 2 % de PVP (polivinilpirrolidona) e 0,25 % de β-mercaptoetanol. Em cada amostra dos testes 1 e 3 foram acrescentado 3 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹).

As amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido e acrescentou-se 700 µL de Clorofórmio/Álcool-isoamílico (24:1). Foram adicionados 500 µL de isopropanol e 40 µL de acetato de amônio (7,5M) em metade das amostras (testes 1 e 2), sendo acrescentado no restante das amostras apenas isopropanol (testes 3 e 4). Em seguida as amostras foram incubadas em freezer a -20°C por três horas. Após este período, foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, o

sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) lavado duas vezes com etanol 70 % e uma vez com etanol 95 %. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 40 μL de TE 0,1 mM (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), adicionou-se RNase, na concentração final de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para cada teste foram realizadas três repetições.

A avaliação da quantidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio (0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). As amostras foram diluídas em água ultrapura e padronizadas em 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Os testes de amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizados utilizando quatro *primers* ISSRs: 807, 826, 827 e 842, pertencentes ao conjunto UBC (University of British Columbia) set nº 9. Foram utilizados para amplificação os DNAs extraídos com os testes 3 (sem acetato e com proteinase) e 4 (sem acetato e sem proteinase).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 μL em termociclador MJ 96 (Biocycler), contendo 5,8 μL de água ultrapura, 2 μL de tampão 10X, 2 μL de MgCl_2 (50mM), 1 μL de DMSO, 4 μL de dNTPs (0,1 mM de cada dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 3 μL de *primers* (2 mM); 1 U de enzima Taq DNA polimerase e 2 μL de DNA (aproximadamente 20 ng).

O programa de amplificação para as espécies em estudo foi de acordo com o descrito por Rodrigues (2010). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão de corrida TBE 1X (1 M de Tris Base; 1 M de MgCl_2 e 1 M KCl) em voltagem constante de 90 V por quatro horas. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida o gel foi fotografado sob luz ultravioleta usando Transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia) e câmera digital (Sony).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, todos os testes realizados para a extração de DNA das seis espécies de *Catasetum* foram eficientes.

Para as espécies *C. osculatum* e *C. saccatum*, o padrão de qualidade do DNA decaiu

com a utilização de proteinase e acetato no protocolo de extração (protocolo 1); para a espécie *C. longifolium* o protocolo 2 (com acetato e sem proteinase) resultou em uma banda com menor quantidade de DNA (Figura 1); e a espécie *C. juruenense* apresentou melhor padrão de banda (com menos arraste) com a utilização do mesmo protocolo.

Para as espécies *C. apolloi* e *C. schmidtianum*, todos os protocolos resultaram em uma boa qualidade e quantidade de DNA, resultado observado no gel de agarose a 1 % (Figura 1), não ocorrendo degradação e contaminação.

A proteinase K tem a finalidade de facilitar a separação do DNA das proteínas de cromatina (Silva, 2000), e pode ou não ser incorporada em protocolos de extração. O acetato de amônio é utilizado como uma das formas para a purificação do DNA quando este se encontra contaminado por polissacarídeos (Romano & Brasileiro, 1999) e, assim como a proteinase, pode ou não ser adicionado em protocolos de extração.

Em estudo com 37 espécies do gênero *Catasetum*, entre elas *C. schmidtianum*, *C. osculatum*, *C. saccatum* e *C. juruenense*, Oliveira et al. (2010) utilizaram proteinase e acetato de amônio na concentração 3 M na extração de DNA. Contudo, o presente trabalho demonstrou que a utilização de proteinase e acetato de amônio não resultou em aumento de quantidade e nem de qualidade do DNA (Figura 1), (exceto para *C. juruenense*), indicando que a presença de polissacarídeos não é problemática na extração de ácidos nucleicos na maioria das espécies analisadas.

Os DNAs dos testes de extração 3 e 4 foram passíveis de amplificação com os marcadores ISSR (Figura 2), confirmando que o DNA extraído por estes protocolos foram eficientes. Portanto sugere-se a não utilização da proteinase K e de acetato de amônio no processo de extração de DNA das seis espécies de *Catasetum* avaliadas, visando minimizar os custos.

As condições de amplificação foram eficientes para as seis espécies de *Catasetum* avaliadas neste estudo (Figura 2). A PCR resultou em um padrão de banda nítida de DNA no gel de agarose, podendo estas condições de extração e amplificação serem utilizadas em posteriores estudos moleculares.

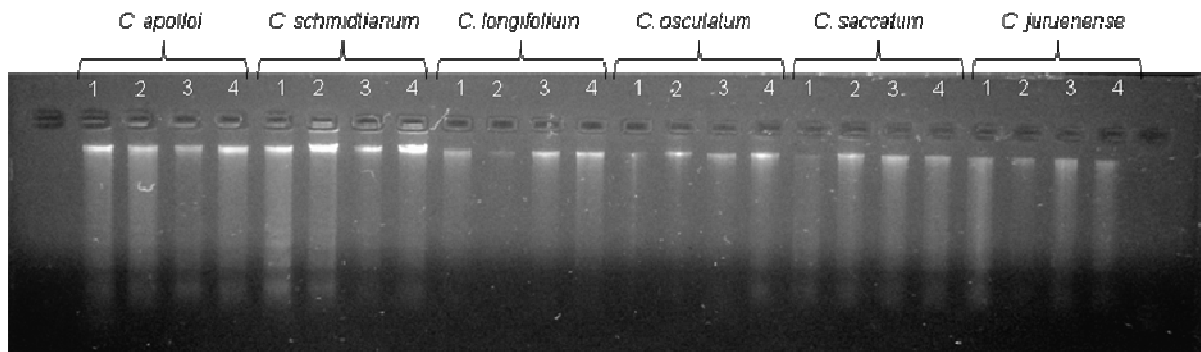


Figura 1. DNA genômico extraído de seis espécies de *Catasetum* nativas da Amazônia, com diferentes modificações no protocolo de extração. 1- acetato com proteinase; 2- acetato sem proteinase; 3- sem acetato com proteinase; 4- sem acetato e sem proteinase.

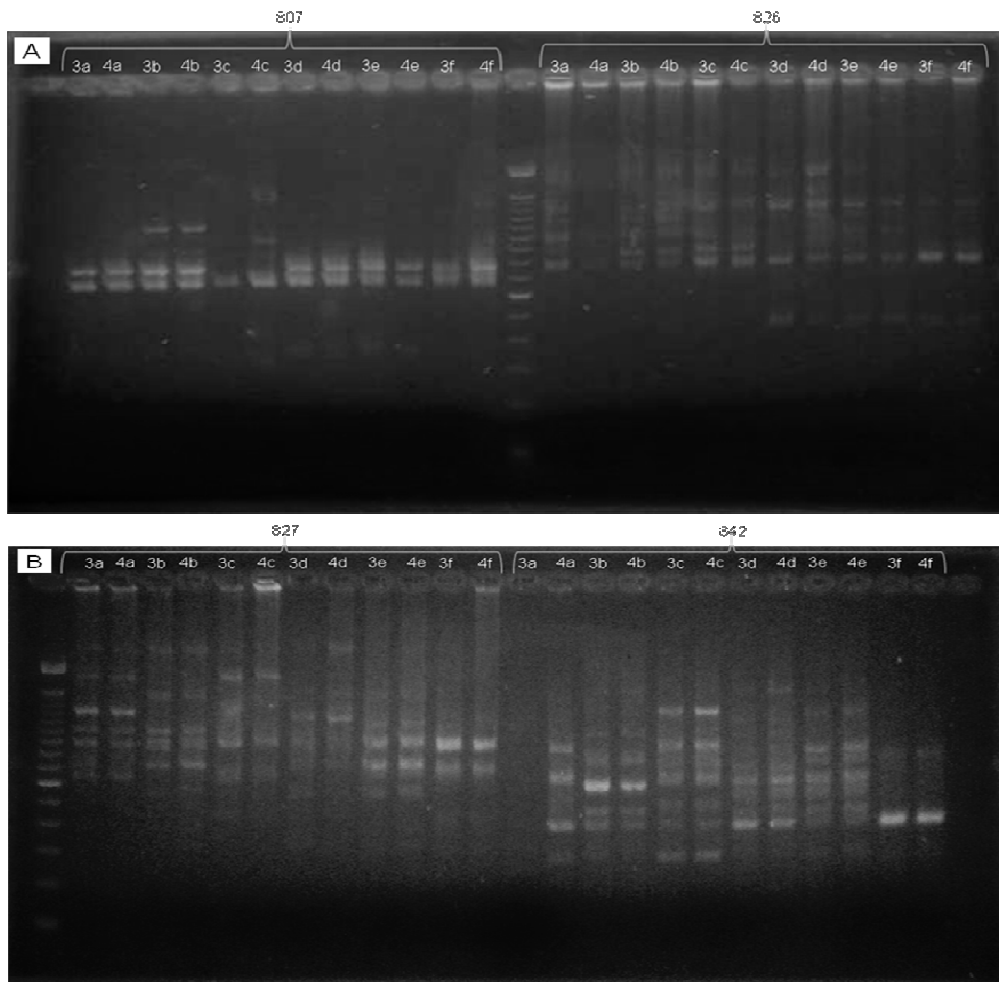


Figura 2. Produtos de ampliações da PCR com os *primers* ISSR 807 e 826 (figura A) e 827 e 842 (figura B) do DNA genômico de *Catasetum* spp. Extração sem acetato e com proteinase (3) sem acetato e sem proteinase (4), de: *C. apolloi* (a); *C. schmidtianum* (b); *C. longifolium* (c); *C. osculatum* (d); *C. saccatum* (e) e *C. juruense* (f).

CONCLUSÃO

Todas as espécies apresentam um padrão satisfatório de banda com o protocolo de extração sem proteinase K. A utilização de acetato não resulta na melhoria da qualidade do DNA para a maioria das espécies do gênero *Catasetum*, exceto para *C. juruenense*. Dessa forma, sugere-se a não utilização de proteinase K e acetato de amônio para a extração de DNA das espécies de *Catasetum* testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C.J.R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: Uma perspectiva ecológica. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.26, pg.151-166, 2012.
- BALLAL, S.R.; FORÉ, S.A.; GUITTMEN, S.I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in fores fragments. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v.72, p.1311-131, 1994.
- BARLOW, J.; PERES, C.A. Avifaunal responses to single and recurrent wildfire in Amazonian forests. **Ecological Applications**, New York, v.14, p.1358-1373, 2004.
- BARLOW, J.; PERES, C.A.; HENRIQUES, C.M.P.; STOUFFER, P.C.; WUNDERLE, J.M. The responses of understory birds to forest fragmentation, logging and wildfires: an Amazonian synthesis. **Biological Conservation**, Boston, v.128, p. 182-192, 2006.
- EHRlich, P.R. The loss of diversity – causes and consequences. In: WILSON, E.O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington: National Academy Press, p. 21-27, 1988.
- FERNANDES, E. R.; MACEDO, M.; PETINI-BENELLI, A. **O gênero *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth em Mato Grosso, Brasil**. Cuiabá: UNIC, 2006. 269p.
- MAURY, C.M. (Org.) **Biodiversidade Brasileira: Avaliação, identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Probio, 2004. 404p.
- OLIVEIRA, L.V.R.; FARIA, R.T.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; SANTOS, M.O.; CARVALHO, V.P. Genetic Analysis of Species in the Genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.2, p.375-387, 2010.
- PERES, C.A. Synergistic effects of subsistence hunting and habitat fragmentation on Amazonian forest vertebrates. **Conservation Biology**, Washington, v.15, p.1490-1505, 2001.
- RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. *C. mantiqueirae* (Fowlie) Van Den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotechnology**, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- SCAGLIA, J.A.P. Como classificar corretamente um *Catasetum*. **O Mundo das Orquídeas**, São Paulo, v. 4, p. 7-8, 1998.
- SILVA, F.C.O. **Aplicação de marcadores RAPD em análise genética**. Salvador: CEPLAC, 2000. 45 p.

