



Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L.

Vinicius Delgado da Rocha^{1,*}, Kelli Évelin Müller Zórtea¹, Elisa dos Santos Cardoso¹, Rosimeire Barboza Bispo¹, Auana Vicente Tiago¹, Ana Aparecida Bandini Rossi¹

¹Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, Brasil.

*Autor Correspondente: viniciusdelgado123@hotmail.com

Recebido: 15/06/2017; Aceito: 12/07/2017

Resumo: *Piper aduncum* é uma espécie nativa da Amazônia com potencial para exploração econômica decorrente das suas propriedades medicinais e da produção de óleo essencial, sendo utilizado como fungicida, bactericida, larvicida, moluscicida e acaricida. Assim, estudos de diversidade genética com *P. aduncum* podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação e na obtenção de cultivares melhorados para a introdução da espécie em sistemas agrícolas, pois é possível conduzir os estudos de diversidade genética pelo uso de marcadores moleculares, e muitas dessas pesquisas requerem ácido desoxirribonucleico (DNA) de alta qualidade. Logo, o objetivo do presente estudo foi ajustar um protocolo de extração de DNA para *P. aduncum*, bem como avaliar o efeito da idade da folha na qualidade da extração, visando gerar informações que contribuam para a realização de posteriores estudos genéticos que utilizem técnicas moleculares. Para extração de DNA, foram coletadas folhas jovens, adultas e senescentes de *P. aduncum*, e testaram-se duas concentrações de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (2 e 5%) e o tempo de incubação em freezer com isopropanol. A qualidade e concentração de ácidos nucleicos foram analisadas por espectrofotômetro, e a integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1%. A espectrometria revelou que, por intermédio das folhas jovens, foi possível obter maior quantidade de DNA, utilizando CTAB 5%. Folhas jovens e adultas produziram DNA puro com alta qualidade, porém nas amostras provenientes de folha senescente foi observada a presença de contaminantes como proteínas e polifenóis. O tempo de incubação das amostras em freezer com isopropanol não interferiu na qualidade do DNA. Apenas amostras de DNA de folhas jovens e adultas foram passíveis de amplificação por meio dos marcadores *inter simple sequence repeat* (ISSR). Por fim, para extração de DNA de *P. aduncum*, recomenda-se o uso do protocolo de CTAB 5%, sem precipitação no freezer com isopropanol e a utilização de folhas adultas.

Palavras-chave: brometo de cetiltrimetilamônio; pimenta-de-macaco; recursos genéticos.

The effect of leaf age on the quality of DNA extracted from *Piper aduncum* L.

Abstract: *Piper aduncum* is a native species from the Amazon that can be economically exploited, due to its medicinal properties and the essential oil that comes from it, which can have been used as a fungicide, bactericide, larvicide, molluscicide and acaricide. Genetic diversity studies with *P. aduncum* can help to develop conservation strategies and to obtain improved cultivars for the insertion of the species in agricultural systems. Genetic diversity studies can be conducted using molecular markers, and much of this research requires high-quality deoxyribonucleic acid (DNA). The objective of this study was to determine a DNA extraction protocol for *P. aduncum*, as well as to evaluate the effect of leaf age on extraction quality, aiming to provide information that contributes to performed genetic studies utilizing molecular techniques. For DNA extraction, young, adult and senescent leaves of *P. aduncum* were collected. Also, we tested two concentrations of cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (2 and 5%) in addition to incubation time in a freezer with isopropanol. The quality and concentration of nucleic acids were analyzed using a spectrophotometer, and the integrity of the extracted DNA was evaluated in a 1% agarose gel. The spectrometry revealed that a greater quantity of DNA was obtained from young leaves, using 5% CTAB. The young and adult leaves provided pure, high-quality DNA, but the samples from the senescent leaf presented contaminants, such as proteins and polyphenols. Incubation time in a freezer with isopropanol did not interfere in the quality of the DNA. Only DNA samples from young and adult leaves were amplified by *inter simple sequence repeat* (ISSR) markers. In conclusion, for DNA extraction of *P. aduncum*, we recommend the use of the 5% CTAB protocol, without putting it a freezer with isopropanol, and we recommend the use of adult leaves.

Keywords: cetyl trimethylammonium bromide; pimenta-de-macaco; genetic resources.

1. INTRODUÇÃO

Piper aduncum L. (Piperaceae) é um arbusto nativo da região amazônica popularmente conhecido como pimenta-de-macaco. Produz alto teor de óleo essencial rico em dilapiol e vem sendo testado com sucesso como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida, além da vantagem de ser um produto biodegradável (SILVA et al., 2013). Na medicina popular, *P. aduncum* é utilizado para tratamento de inflamações e dores de estômago (LUSTOSA et al., 2007).

O germoplasma de qualquer espécie deve ser protegido de eventuais perdas genéticas por meio de programas de melhoramento que assegurem seu uso sustentável (VIANA et al., 2015). O desenvolvimento de estratégias de conservação de germoplasma, seleção e manejo de uma espécie inclui a realização de estudos de biologia reprodutiva e caracterização da variabilidade genética dentro e entre populações (LACERDA & KAGEYAMA, 2003; DANNER et al., 2011). Com os avanços da biologia molecular, foram desenvolvidos vários métodos para estudos genéticos, com uso de marcadores moleculares capazes de identificar divergências mínimas entre dois ou mais indivíduos.

Para aplicação de técnicas moleculares, é crucial o isolamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) puro de alta qualidade. No entanto, o processo de isolamento de DNA é laborioso em algumas espécies ou tecidos vegetais, em razão da presença de altas concentrações de metabólitos secundários e polissacarídeos, sendo necessárias modificações e adequações nos protocolos para obtenção de padrões satisfatórios de quantidade e qualidade de DNA (OLIVEIRA et al., 2017; CANSAÇÃO & COUTINHO 2013).

Sendo assim, foram desenvolvidos vários métodos para isolar o DNA de plantas que contêm altos níveis de metabólitos secundários (SAHU et al., 2012), entre eles o método brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) descrito por Doyle & Doyle (1987), que é amplamente utilizado na maioria dos protocolos com espécies vegetais.

Considerando o potencial de *P. aduncum* para a exploração econômica, em função de suas propriedades medicinais e produção de óleo essencial, o presente estudo objetivou ajustar um protocolo de extração de DNA para essa espécie, bem como avaliar o efeito da idade da folha na qualidade da extração, visando gerar informações que contribuam para posteriores estudos genéticos aplicando técnicas moleculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coletaram-se folhas jovens, adultas e senescentes de *P. aduncum*. As amostras foliares foram armazenadas em sílica gel em campo e, posteriormente, conduzidas ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) para extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada utilizando o método CTAB proposto por Doyle & Doyle (1987). Por meio desse método, foram testados: tempo de incubação em *freezer* com isopropanol (0 minuto e 2 horas) e duas concentrações de CTAB (2 e 5%). Utilizou-se tampão de extração com 100 mM de tris hidrocloreto (Tris-HCl) (pH 8), 1,4 M de cloreto de sódio, 2% de polivinilpirrolidona (PVP), 1,8% de β -mercaptoetanol, 20 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e CTAB.

O protocolo utilizado consistiu nos seguintes passos:

1. maceração do material vegetal em presença de nitrogênio líquido;
2. transferência do pó (proveniente da maceração) aos microtubos de 2 mL;
3. adição de 800 μ L de tampão de extração no material;
4. homogeneização das amostras com auxílio de agitador tipo vórtex;
5. incubação em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, com agitação manual a cada 15 minutos;
6. centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos;
7. transferência da fase aquosa (sobrenadante) para microtubos de 1,5 mL;
8. adição de 700 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1);
9. homogeneização da solução em agitador tipo vórtex e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos;
10. coleta do sobrenadante e transferência para novos microtubos de 1,5 mL;
11. adição de 500 μ L de álcool isopropanol gelado;
12. incubação em *freezer* a -20°C por 2 horas para apenas metade das amostras, sendo o restante das amostras não submetido ao *freezer*;
13. centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos;
14. descarte do sobrenadante e três lavagens do *pellet*, sendo duas lavagens com etanol 70% e uma com etanol 95%. A cada lavagem os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos;
15. ressuspensão do *pellet* em 40 μ L de TE (10 mM Tris HCl e 1 mM EDTA) contendo RNase na concentração 40 μ g/mL.

A avaliação da integridade e qualidade do DNA extraído foi realizada em eletroforese, em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. A quantificação e pureza do DNA foram analisadas em espectrofotômetro, utilizando 1 µL de cada amostra.

Para os testes de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados cinco *primers* inter simple sequence repeat (ISSR), obtidos da Universidade da Colúmbia Britânica (UBC). Cada reação de amplificação continha volume final de 15 µL, sendo: 1 µL de DNA (20 ng/µL); 2 µL de tampão 10X (10 mM de Tris HCl (pH 8,3), 50 mM de cloreto de potássio e 0,1% de tween 20); 2 µL de cloreto de magnésio — MgCl₂ (25 mM); 2 µL de *primer* (0,2 µM); 4 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados — dNTPs (1 mM de cada trifosfato de desoxiguanosina — dGTP, desoxiadenosina trifosfatada — dATP, desoxicitidina trifosfatada — dCTP, desoxitimidina trifosfatada — dTTP); 0,5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO); 0,15 µL de Taq DNA polimerase; e 3,4 µL de água destilada autoclavada.

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C (temperatura do *primer*) por 1 minuto, 72°C por 3 minutos e um ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, em tampão de corrida TBE 1× (89,15 mM de Tris Base; 88,95 mM de ácido bórico e 2,23 mM de EDTA), com tensão de 80 V. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta, utilizando fotodocumentor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a idade da folha interferiu na qualidade e quantidade de DNA extraído de *P. aduncum*. Com folhas jovens, foi possível a obtenção de maior concentração de DNA utilizando CTAB a 5% (Tabela 1).

Os valores de absorvância (A_{260/280}) variaram entre 1,83 e 2,00 para folhas jovens e adultas, indicando que foi obtido DNA puro de boa qualidade. Já com a folha senescente, as razões de absorvância variaram de 1,52 a 2,36, demonstrando que houve produção de DNA contaminado por proteína e polifenóis em algumas amostras (Tabela 1). Isso pode estar relacionado com o acúmulo de metabólitos secundários, que são mais abundantes em folhas maduras, visto que essas substâncias se acumulam na folha ao longo de seu processo de desenvolvimento fisiológico (MOREIRA & OLIVEIRA et al., 2011).

Verificou-se que o aumento da concentração de CTAB de 2 para 5% possibilitou a extração de maior quantidade de DNA, sugerindo que esse componente tem efeito sobre a extração de DNA de amostras foliares de *P. aduncum*. De acordo com Romano & Brasileiro (1999), o CTAB é um detergente utilizado para separar o DNA dos polissacarídeos, pois tais compostos apresentam solubilidade diferenciada na presença dele.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram relatados por Schmitt et al. (2014) em *Curcuma longa* L. e por Zortéa et al. (2016) em *Eugenia stipitata* McVaugh. Ambos constataram que a maior concentração de CTAB (5%) foi mais eficiente para isolamento do DNA.

De acordo com a análise de integridade do DNA extraído de *P. aduncum* (Figura 1), as folhas adultas e senescentes produziram amostras íntegras com padrão satisfatório de banda, independentemente do tempo de incubação em *freezer* com isopropanol, utilizando CTAB a 5%. Nas amostras de folhas jovens, notou-se a presença de arraste vertical no gel, o que indica degradação por DNases ou quebra mecânica durante a extração com clorofórmio (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Em relação ao tempo de incubação em *freezer* com isopropanol, observou-se que não houve influência sobre a qualidade do DNA extraído. Portanto, não é necessário incubar as amostras em *freezer*, reduzindo assim o tempo de trabalho no laboratório durante o processo de extração.

As reações de amplificação com cinco *primers* ISSR (Tabela 2) demonstraram que a quantidade e a qualidade de DNA extraído tanto de folhas jovens quanto de folhas adultas de *P. aduncum* com CTAB a 5% foram passíveis de amplificação via PCR (Figura 2).

Tabela 1. Quantificação e análise de pureza de amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) extraídas de folhas jovens (FJ), folhas adultas (FA) e folhas senescentes (FS) de *Piper aduncum*, testando duas concentrações de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (2 e 5%) e tempo de incubação em *freezer* com isopropanol (TP).

	Concentração de DNA (ng/µL)				Qualidade de DNA A _{260/280}		
	TP	FJ	FA	FS	FJ	FA	FS
CTAB 2%	0 min	353,20	134,25	101,90	1,84	1,83	1,74
	2 horas	146,75	103,80	126,75	1,85	1,80	1,52
CTAB 5%	0 min	1.125,35	709,70	532,95	2,00	2,00	2,36
	2 horas	996,85	550,80	378,65	2,00	2,00	2,35

A amplificação de regiões genômicas de *P. aduncum* por meio dos *primers* ISSR sugere que esses marcadores podem ser utilizados em análise de diversidade genética com a espécie, pois apresentaram bom padrão de amplificação com bandas nítidas.

O isolamento de DNA é um passo importante para análises moleculares e pode ser obtido por intermédio de folhas de diferentes idades ou até mesmo caules (NOVAES et al., 2009). Em estudos moleculares de plantas, antes de o trabalho de campo ser conduzido para a coleta de amostras, faz-se necessário realizar testes de fontes de DNA (folhas adultas ou jovens, caule, raízes ou outros tecidos) para auxiliar na escolha de materiais vegetais que proporcionem a extração de ácidos nucleicos em maior quantidade e alta qualidade. Portanto, os resultados encontrados neste estudo são úteis para o planejamento de futuras expedições de campo que visem à coleta de fontes de DNA para pesquisas de genética molecular com *P. aduncum*.

4. CONCLUSÕES

O protocolo de extração com uso de CTAB 5% foi mais eficiente para extração de DNA genômico de *P. aduncum*, permitindo a obtenção de amostras com maior quantidade de DNA e de boa qualidade. Recomenda-se o uso do protocolo de CTAB 5%, sem precipitação no freezer com isopropanol, assim como o uso de folhas adultas para extração de DNA da espécie, visando estudos moleculares.

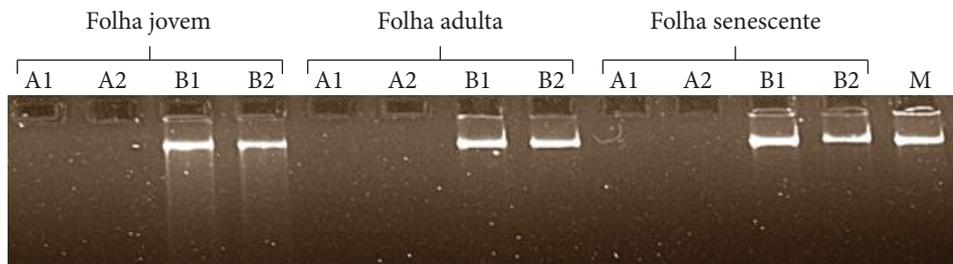


Figura 1. Perfil eletroforético do ácido desoxirribonucleico (DNA) extraído de folhas jovens, adultas e senescentes de *Piper aduncum* testando duas concentrações de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e tempo de incubação em freezer com isopropanol. (A) Extração com CTAB 2%; (B) CTAB 5% e zero minuto de incubação em freezer com isopropanol (1) e 2 horas de incubação em freezer com isopropanol (2). M: marcador DNA λ de 100 ng.

Tabela 2. Relação de *primers inter simple sequence repeat* (ISSR) utilizados para amplificação de *Piper aduncum*, com suas respectivas seqüências e temperatura de anelamento (TA).

Primers	Seqüência 5-----3'	TA (°C)
UBC 808 — DiAG3'C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50
UBC 889 — DiAC5'DBD	DBDACACACACACACAC	50
UBC 835 — DiAG3'YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC*	50
UBC 825 — DiAC3'T	ACACACACACACACACT	50
UBC 826 — DiAC3'C	ACACACACACACACACC	50

*Y: (C ou T).

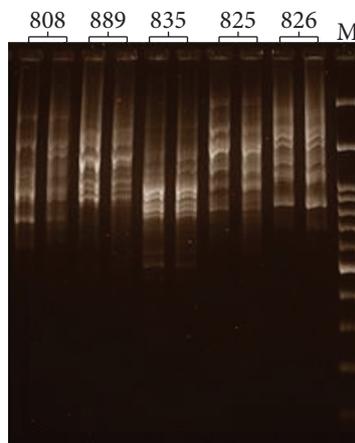


Figura 2. Produtos da amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) usando cinco *primers inter simple sequence repeat* (ISSR): UBC808, UBC889, UBC835, UBC825, UBC826, com ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico de *Piper aduncum* obtido de folhas jovens e adultas utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 5%. M: marcador 100 pb DNA Ladder.

5. AGRADECIMENTOS

À UNEMAT, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANSANÇÃO, I. F.; COUTINHO, H. D. M. Estudo comparativo de dois métodos de extração de DNA genômico do Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 13-17, 2013.
- 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, n. 2, p. 363-367, 2011. <http://dx.doi.org/10.5902/198050983241>
- 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.
- LACERDA, M. B. L.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* e *M. Allemão* na Região Semi-Árida, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 145-150, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000200004>
- LUSTOSA, F. L. F.; OLIVEIRA, S. C. C.; ROMEIRO, L. A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 849-851, 2007.
- MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011. DOI: 10.4238/vol10-1gmr1030
- NOVAES, R. M. L.; RODRIGUES, J. G.; LOVATO, M. B. 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.
- OLIVEIRA, L. C.; RODRIGUES, D. P.; HOPKINS, M. J. G. The effects of leaf age on the quality of DNA extracted from *Parkia* R.Br. (Fabaceae) occurring in the Central Amazon. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 2, p. 22-28, 2017.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.
- SAHU, S. K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. **ISRN Molecular Biology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- SCHMITT, K. F. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; SANDER, N.; SILVA, C. J. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa*. (L). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1560-1568, 2014.
- SILVA, A. L.; CHAVES, F. C. M.; LAMEIRA, R. C.; BIZZO, H. R. Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 670-674, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000500007>
- VIANA, J. P. G.; BORGES, A. N. C.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BRITTO, F. B.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18003-18008, 2015. <https://doi.org/10.4238/2015.December.22.26>
- ZORTÉA, K. E. M.; MIKOVSKI, A. I.; CASTRILLON, R. G.; RUZZA, D. A. C.; ROSSI, A. A. B. Estabelecimento de protocolo de extração de DNA para *Eugenia stipitata* MC. VAUNG, visando estudos moleculares. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, p. 495-502, 2016. DOI: 10.18677/EnciBio_2016B_045