

Isolamento de DNA genômico a partir de folhas secas de *Erythrina crista-galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado)

***Luciano Moura de Mello**

****Lia Silveira Reiniger**

*****Geri Eduardo Meneghello**

******Francisco Amaral Villela**

*******Monalize Salete Mota**

Resumo: *Erythrina crista-galli* L. (FABACEAE) é uma árvore nativa do Brasil, Uruguai, Paraguai, leste da Bolívia e Argentina, podendo ser utilizada na arborização e na restauração de ambientes naturais. Não foram encontradas na literatura metodologias para o isolamento de DNA genômico da espécie. O objetivo do trabalho foi testar três protocolos de isolamento de DNA aplicados a folhas secas à temperatura ambiente verificando a quantidade e qualidade do DNA isolado. Folhas secas mostraram constituir boa fonte de material para as avaliações genéticas da espécie estudada, entretanto, novos testes são necessários no sentido de aperfeiçoar os protocolos e solucionar as contaminações por polissacarídeos e polifenóis nas amostras.

Palavras-chave: DNA genômico, Folhas, *Erythrina*;

Abstract: *Erythrina crista-galli* L. (Fabaceae) is a tree native to Brazil, Uruguay, Paraguay, eastern Bolivia and Argentina, can be used in afforestation and restoration of natural environments. We have not found in literature methodologies for the isolation of genomic DNA of the species. The objective was to test three DNA isolation protocols applied to dried leaves at room temperature and checking the quantity and quality of DNA isolated. Dried leaves showed constitute good source of genetic material, however, new tests are needed to improve the protocols to solve contamination by polysaccharides and polyphenols in samples.

Key words: Genomic DNA, leaves, *Erythrina*;

*Instituto Federal Sul-Rio-Grandense - Biólogo, Especialista em Ecologia, Mestre e Doutor em Ciência & Tecnologia de Sementes pela UFPel. Professor de Biologia dos Cursos Técnicos Integrados de Eletroeletrônica, Informática para a Internet e Sistemas de Energias Renováveis do IFSul Santana do Livramento).

**UFSM, Professora, Eng. Agr. Dra. Departamento de Fitotecnia

***FAEM, UFPel, Eng. Agr. Dr. Departamento de Sementes

****FAEM, UFPel, Prof. Eng. Agrícola, Dr. Departamento de Sementes

*****UFPel, Biól. Dra. Pesquisadora PNPD no Centro de Genômica e Fitomelhoramento

1. Introdução

O isolamento de DNA em quantidade e qualidade é o primeiro passo para o desenvolvimento de estudos mais complexos no campo da genômica de uma espécie e os marcadores moleculares baseados em DNA podem ser usados para avaliação da diversidade genética em espécies florestais brasileiras.

O isolamento de DNA é, portanto, uma etapa fundamental para a aplicação de técnicas de avaliação da diversidade genética baseada em marcadores moleculares ou outros estudos e, no entanto, não relatadas na literatura técnicas para a realização desta etapa para *Erythrina crista-galli* L. Há, no entanto, outras fontes de informação acerca de procedimentos realizados com outras espécies do gênero *Erythrina* e que servirão de base para a exploração da aplicabilidade e da proposição de procedimento que atenda a essa necessidade.

Igualmente não foram localizados na literatura trabalhos com marcadores moleculares em *Erythrina crista-galli* L. que possam auxiliar na interpretação de sua diversidade e especialmente no entendimento da relação entre diversidade genética e qualidade fisiológica de sementes. Avaliar a diversidade genética entre acessos é um objetivo posterior a este trabalho, em função do que houve a concentração de esforços, nesta etapa, no isolamento de DNA em quantidade e qualidade suficientes para a realização da etapa com os marcadores RAPD.

O uso de folhas secas neste trabalho como fonte de DNA genômico deu-se em função dos resultados dos trabalhos de Thomson & Henry (1993) e Tai & Tanksley (1990). Os primeiros autores testaram quatro métodos de secagem das amostras foliares de pêssago (*Prunus persica*): secagem à temperatura ambiente, secagem a 42 °C ou a 65 °C e secagem em forno micro-ondas. Os autores verificaram que as soluções de DNA isoladas a partir das amostras foliares secas à temperatura ambiente apresentaram resultados de pureza e rendimento equivalentes às soluções de DNA isoladas a partir das amostras frescas. Tai & Tanksley (1990) também compararam a extração de DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) a partir de amostras foliares frescas e secas em estufa à 45 °C, por 24 h. Estes autores constataram, igualmente que as soluções de DNA extraídas das amostras secas foram de qualidade equivalente àquelas isoladas de amostras frescas.

Dada a importância dos estudos baseados em marcadores moleculares em uma futura avaliação da diversidade genética entre e dentro de diferentes fragmentos florestais nos quais esteja presente *Erythrina crista-galli*, este trabalho tem como objetivos testar folhas secas a temperatura ambiente como fonte de material genético e avaliar três protocolos para o isolamento de DNA genômico usando folhas secas bem como testar, com o uso de marcadores RAPD, a eficiência dos métodos de isolamento avaliados.

2. Material e Métodos

Fonte do Material Vegetal

As amostras estudadas são provenientes de fragmentos florestais localizados na região dos municípios de Bagé, Aceguá, Hulha Negra e Dom Pedrito, no Rio Grande do Sul (Figura 1).

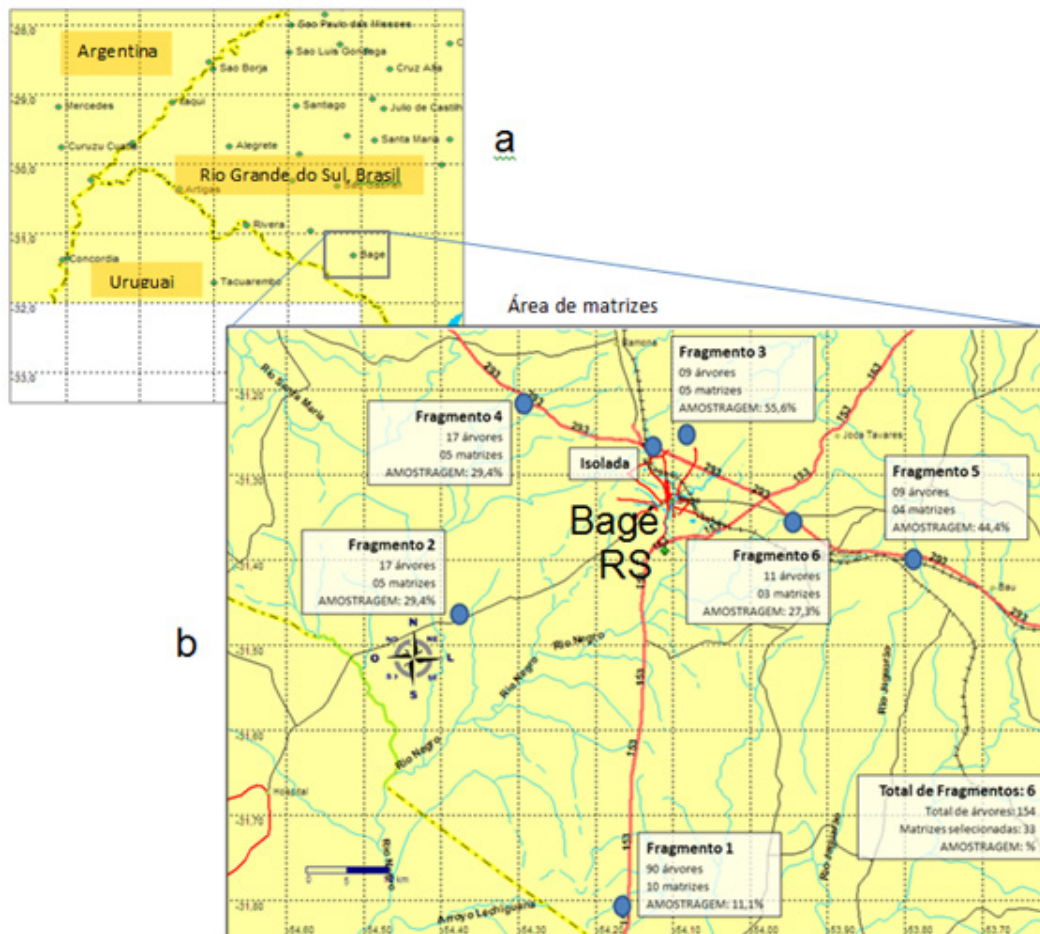


Figura 1. Mapas de referência: (a) localização geral da área de coleta de material para os testes; (b) os seis fragmentos florestais amostrados mais a matriz “isolada”, com número de indivíduos (plantas adultas de *Erythrina crista-galli*) em cada fragmento e de matrizes selecionadas para o estudo (imagens do GPS Track-Maker®).

Como fonte de material foram utilizadas folhas secas de *Erythrina crista-galli* conservadas em sacos de papel comum e mantidos à temperatura ambiente.

As folhas foram coletadas nos dias 14 e 15 de outubro 2013, sendo colhidas das plantas-matrizes e acondicionadas em embalagens plásticas contendo sílica gel. Após 24 horas, em laboratório, as folhas foram reclassificadas e 10 unidades foram aproveitadas, quando disponível esta quantidade, foram acondicionadas em embalagens de papel e armazenadas em local seco e à temperatura ambiente, sem sílica gel.

Os critérios para a seleção dos fragmentos florestais estudados foram a distância mínima de oito quilômetros entre os fragmentos e o isolamento mínimo de 350m entre o fragmento e qualquer outro indivíduo, seja em formações florestais ciliares ou mesmo qualquer outro indivíduo isolado. As matrizes utilizadas no trabalho foram selecionadas considerando-se a qualidade e quantidade do material disponível (folhas) entre as árvores da espécie estudada, em cada fragmento.

A fim de verificar diferenças quantitativas e qualitativas no material genético isolado a partir da fonte testada realizou-se o isolamento de DNA genômico baseado em três métodos, um método descrito por Nienhuis et al. (1995), com modificações, a segunda metodologia com um kit comercial padrão (PROME-

GA®, 2014) e a terceira metodologia seguiu o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998).

A seleção desta primeira estratégia de coleta de material para o isolamento de DNA genômico deve-se aos resultados de trabalhos anteriores (Thomson & Henry, 1993 e Tai & Tanksley, 1990) e, sobretudo, à simplicidade do método em relação ao uso de folhas frescas e câmbio congelados, que necessitam de resfriamento e maiores cuidados desde o momento da coleta.

Isolamento do DNA genômico a partir de folhas secas

Para o isolamento de DNA genômico foram utilizados 150mg de folhas jovens secas e mantidas à temperatura ambiente.

Os testes de isolamento de DNA genômico foram conduzidos no Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS.

As amostras foliares para o isolamento de DNA genômico foram compostas de limbo foliar e pecíolos (Tabela 1). Para estes testes foram utilizadas amostras de matrizes, identificadas por dois números, onde o primeiro número refere-se ao fragmento (1 para município de Aceguá; 2, 3 e X no município de Bagé; 4, em Dom Pedrito; 5 em Candiota e 6 em Hulha Negra). O segundo número refere-se às matrizes georreferenciadas em cada fragmento. A matriz denominada X corresponde a uma matriz isolada, às margens da BR 293, em Bagé, Rio Grande do Sul.

Tabela 1. Matrizes utilizadas nos testes de protocolos de isolamento de DNA genômico a partir de folhas secas de *Erythrina crista-galli* L e percentual de matrizes amostradas em relação ao número de matrizes em cada fragmento (PA). A numeração que identifica as matrizes foi tomada pela ordem da coleta no campo.

Testes e percentual amostrado*						
Fragmento	Nienhuis et al. (1995)	PA (%)	Kit Promega®	PA (%)	Ferreira & Grattapaglia (1998)	PA (%)
1	(1.1) (1.4) (1.5) (1.7) (1.9) (1.10)	6,7	(1.5)	1,1	(1.5)	1,1
2	(2.1) (2.2) (2.3) (2.5)	23,5	(2.1)	5,9	(2.1)	5,9
3	(3.1) (3.3) (3.4) (3.5)	23,5	(3.3)	5,9	(3.3)	5,9
4	(4.1) (4.2) (4.5)	33,3	(4.1) (4.2)	22,2	(4.2)	11
5	(5.1) (5.2) (5.3)	33,3	(5.1) (5.2)	22,2	(5.2)	11
6	(6.1) (6.2) (6.3)	27,3	(6.1)	9,0	(6.1)	9,0
Isolada	X	100	X	100	X	100

* Todas as matrizes tiveram posições georreferenciadas para posterior identificação a campo.

Teste de isolamento de DNA genômico de folhas secas de *Erythrina crista-galli* L. utilizando o protocolo de Nienhuis et al. (1995), com modificações:

As amostras de folhas secas de *E. crista-galli* permaneceram 170 dias nas condições já apresentadas.

Foram utilizadas para este teste as seguintes matrizes: (1.1), (1.4), (1.5), (1.7), (1.9) e (1.10); (2.1), (2.2), (2.3) e (2.5); (3.1), (3.3), (3.4) e (3.5); (4.1), (4.2) e (4.5); (5.1), (5.2) e (5.3); (6.1), (6.2) e (6.3); (X).

As amostras foliares (150mg de limbo foliar e pecíolos) foram maceradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e posteriormente o macerado foi transferido para microtubos de centrífuga contendo 700 µL de tampão CTAB [Cetiltrimetil brometo de amônio a 2%; Cloreto de sódio (NaCl) 1,4mM; Tris 1mM pH 8,0; Polivinilpirrolidona (PVP) 1%].

As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, agitando-as a cada 15 minutos para homogeneização do material.

Após este período de incubação, foi adicionado 1 volume do solvente orgânico clorofórmio : álcool isoamílico, 24:1 (CIA), sendo, imediatamente, centrifugado por 30 segundos a 10.000 x g.

O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de centrífuga de 2mL. A seguir, foram adicionados 400µL de isopropanol gelado a -20 °C e misturados suavemente por inversão dos tubos. As amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C por 1h para precipitação do DNA, sendo, na sequência, centrifugadas a 18.000 x g por 60 segundos para formação do sedimentado (pellet). O sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, para não acarretar descarte acidental do pellet. Os pellets foram lavados com 1mL de etanol 70% por 5min. A fase aquosa foi descartada e os pellets foram secos à temperatura ambiente, por 45 min.

O DNA extraído foi ressuscitado em 200µL de TE Buffer (1µM de TRIS + 0,1µM EDTA) e foi adicionado 2µL de RNase (10mg.mL⁻¹), sendo as amostras incubadas a 37°C, por 60 min.

Posteriormente, foram adicionados 200µL de isopropanol gelado (a -20°C), os quais foram misturados, suavemente, por inversão dos tubos, sendo, na sequência centrifugados a 18.000 x g por 60 segundos, para nova formação do sedimentado (pellet).

A fase aquosa foi descartada e o pellet foi novamente lavado com 1mL de etanol 70% por 5 min. As amostras foram submetidas a um spin, por 30 segundos. A fase aquosa foi descartada e os pellets secos à temperatura ambiente por 60 min.

Por fim, o DNA extraído foi ressuscitado em 100µL do tampão de eluição TE Buffer (1µM de TRIS + 0,1µM EDTA).

As soluções de DNA foram armazenadas em freezer, a -20°C até o dia da quantificação de DNA das amostras e realização da PCR.

Teste de isolamento de DNA genômico de folhas secas *Erythrina crista-galli* utilizando o protocolo do Kit comercial padrão PROMEGA® (Kit Wizard® Genomic DNA, Ref. A1123)

Para essa avaliação foram utilizados 40mg de folhas jovens (secas), conforme especificações do teste. As folhas foram colhidas, secas por 170 dias e acondicionadas nas mesmas condições do teste descrito anteriormente.

Foram utilizadas amostras foliares de sete matrizes (1.5), (2.1); (3.3); (4.2); (5.2); (6.1), sorteadas uma amostra dentro de cada fragmento mais a matriz isolada (X).

As amostras foliares foram maceradas em almofariz com auxílio de nitrogê-

nio líquido e posteriormente o macerado foi transferido para microtubos de centrífuga. Fo-ram adicionados 600µL de solução de lise nuclear (Nuclei Lysis Solution). O material foi incubado a 65°C por 15 minutos em banho-maria. Após este período de incubação, as amostras receberam 3µL de solução de RNase (RNase Solution), sendo realizadas lentas inversões para homogeneizar os reagentes. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e, posteriormente deixada por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionada a solução para a precipitação de proteínas (Protein Precipitation Solution) e a mistura foi submetida a vortex por 20 segundos para homogeneização. Posteriormente o material foi centrifugado por 5 minutos a 18.000 x g (e não por 3 minutos a 16.000 x g conforme estabelecia o protocolo uma vez que estes procedimentos não produziram inicialmente os efeitos esperados), tendo sido feita, após a centrifugação, a separação do sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml, já contendo 600µL de isopropanol. Foram realizadas lentas inversões no material e centrifugação por 5 minutos a 18.000 x g, à temperatura ambiente.

O isopropanol foi descartado e foram adicionados 600µL de álcool 70% para a lavagem do DNA (pellet). Após lentas inversões o álcool também foi descartado, deixando-se os tubos secarem sobre papel absorvente limpo, durante 15 minutos. A fim de fazer a reidratação do DNA foram adicionados 100µL de DNA Rehydration Solution, com incubação de 60 minutos a 65°C.

Teste de isolamento de DNA genômico de *Erythrina crista-galli* utilizando o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998)

Foi utilizado o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998) com folhas que permaneceram nas condições já citadas pelo período de 10 meses.

Para estes testes foram utilizadas amostras foliares de nove matrizes, assim identificadas: (1.5), (2.1), (3.3), (4.1), (4.2), (5.1), (5.2), (6.1) e (X).

Análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico

A análise da qualidade e concentração das amostras de DNA genômico obtidas a partir do emprego dos diferentes protocolos foi realizada por meio de um espectrofotômetro de UV-Vis NanoDrop®ND-1000. Neste equipamento utilizou-se 2µL da solução de DNA.

O software do equipamento baseia-se na equação de Lambert-Beer para correlacionar a absorvância com a concentração da amostra (SCIENTIFIC, 2010):

$$A = E \cdot b \cdot c(1)$$

sendo “A” a absorvância, representada em unidades de absorvância (A); “E” o coeficiente de absorvância molar dependente do comprimento de onda (ou coeficiente de extinção), em unidades de mol-cm.L-1; “b” é o comprimento do caminho, em cm; e “c” a concentração do analito, em mol L-1 ou molaridade (M).

No caso particular da quantificação de ácidos nucleicos, a equação de Lambert-Beer é modificada para usar o coeficiente de extinção específico para DNA em ng-cm µL-1 (SCIENTIFIC, 2010):

$$c = (A \cdot e) b / (2)$$

sendo “c” corresponde à concentração de DNA em ng.µL-1; “A” a absorvância a 260 nm (comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância de DNA); “e”, o coeficiente de extinção (para DNA é igual a 50 ng-cm.µL-1); e “b”, a altura da coluna criada no espectrofotômetro (neste caso corresponde a 1 cm).

Logo, o aparelho mede a absorvância a 260 nm, obtém-se um valor, que, multiplicado pelo coeficiente de extinção, indica a concentração de DNA na amostra, em ng.µL-1 (SCIENTIFIC, 2010).

Para a análise da qualidade das amostras, foi utilizada a razão A260/A230 e A260/A280. O software do equipamento utiliza as leituras da absorvância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm para calcular, automaticamente, as razões.

Para elaborar uma curva padrão de absorvância esperada para uma solução de DNA livre de contaminantes, foram utilizados dados disponíveis no Manual do Usuário do equipamento (SCIENTIFIC, 2010).

Reações de RAPD

A fim de verificar o potencial do material isolado e o protocolo de realização de reação de RAPD foram realizadas as reações utilizando-se 5 iniciadores (Primers), seguindo-se o protocolo de reação citado por Melo (2010).

Foram utilizadas as seguintes amostras para as reações de RAPD (n=13):

(1.1) (1.4) (1.5) (1.9) (2.2) (2.3) (2.5) (3.1) (4.1) (4.5) (5.3) (6.3) (X)

A seleção das amostras utilizadas neste teste foi realizada em função da melhor qualidade e maior quantidade de DNA extraída das amostras em cada fragmentos e, exceto a amostra (1.5), que provinha de amostra de DNA extraído por meio do Kit Wi-zard® Genomic DNA, todas as demais foram tomadas a partir de folhas secas utilizando-se o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995).

O mix de reagentes para cada matriz foi composto por 2,92 µL de água ultra-pura; 1,30 µL de tampão 10X; 1 µL de cloreto de magnésio (25mM); 1,04 µL de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados); 1,04 µL de BSA (Soro Albumina Bovina); 0,2 µL da enzima Taq polimerase; 2,5 µL do oligonucleotídeo e 3 µL do DNA de trabalho (MELO, 2010).

O DNA de trabalho foi equalizado para que todas apresentassem 20ng/µL antes da realização do PCR.

Foram testados cinco iniciadores (oligonucleotídeos) da marca SIGMA® para cada um das 13 matrizes, selecionadas durante estudo em função da quantidade e qualidade de DNA isolado. Estes iniciadores apresentaram bom desempenho nas reações de RAPD para outra congênera, *Erythrina velutina* Willd., segundo o trabalho de Melo (2010):

Iniciadores (nº)	Sequência 5' – 3'
05	TTC GAG CCA G
14	GGC ACT GAG G
15	GGT CGG AGA A
16	TCG GAC GTG A
18	GGA GGA GAG G

O programa de amplificação do DNA consistiu de uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos que envolvem temperaturas de 94°C por 1 minuto, 36°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. A amplificação ocorreu em termociclador Mastercycler (EPPENDORF®), utilizando microtubos de 200 µL, contendo 13 µL do mix (MELO, 2010).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, realizada a 110 V, em gel de agarose a 1%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal, contendo tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X em quantidade suficiente para assegurar a submersão do gel. Em seguida, as amostras foram carregadas em tampão de carregamento contendo GelRed™ e os produtos da amplificação visualizados sob luz ultra-violeta.

3. Resultados e Discussão

As avaliações resultaram em diferenças entre o DNA extraído das amostras, não só dentro dos fragmentos florestais como entre os três protocolos testados.

No fragmento 1 (região de Aceguá), por exemplo, observa-se que as matrizes apresentaram, mesmo utilizando-se o mesmo material para o isolamento de DNA e se-guindo-se o mesmo protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995), pronunciadas dife-renças na quantidade e na qualidade do material genético isolado (Figura 2). Este proto-colo modificado forneceu ainda o maior número de isolados com quantidade e qualida-de de isolados para os testes com marcadores moleculares.

A principal constatação na interpretação das concentrações fornecidas pelo NA-NODROP® é feita pela leitura a 260 nm, que corresponde ao pico de absorvância de ácidos nucleicos, em que uma unidade de absorvância corresponde a 50 µg/mL (SAM-BROOK & RUSSELL, 2001).

Para estimativas da pureza do DNA extraído devem ser realizadas também as leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm, correspondentes aos picos de absorção de polissacarídeos e proteínas, respectivamente (PAGE et al., 2010). Por fim, procede-se ao cálculo das razões A260/A230 e A260/A280.

Não foram observadas a campo diferenças fenotípicas ou ambientais marcantes entre as matrizes que pudesse explicar, numa análise preliminar, as variações entre os resultados dos testes de isolamento de DNA. Mesmo assim, a matriz 1.4 no comprimen-to de onda representativo do DNA apresentou altos valores quando comparativamente com a matriz 1.5.

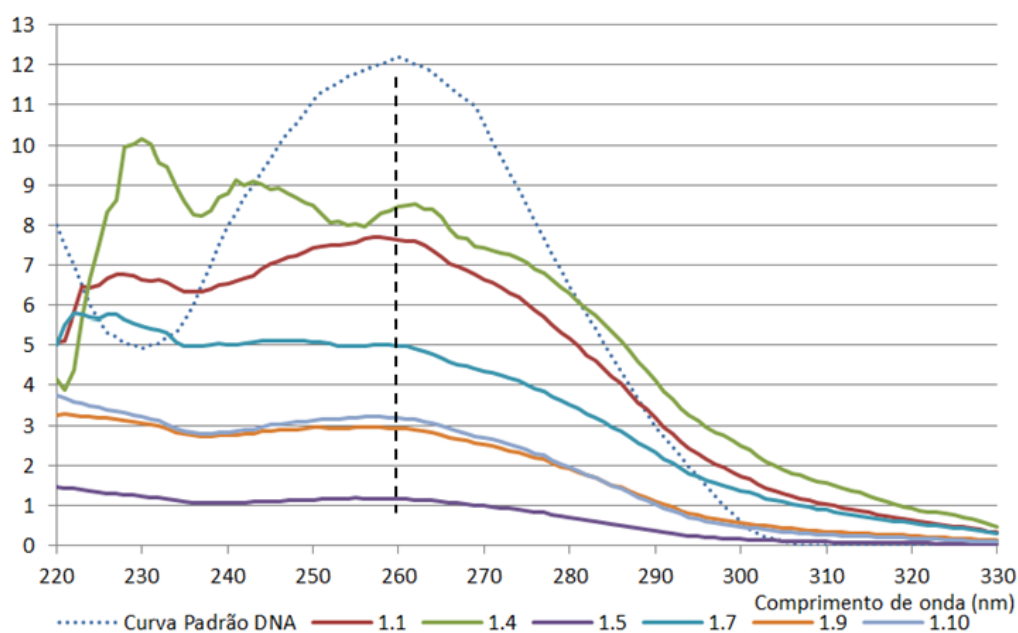


Figura 2. Curvas de absorvância das soluções de DNA das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 1 (Aceguá), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

A melhor qualidade (pureza) do material (por semelhança à curva padrão dada pelo equipamento Nano-Drop®) foi representada pela amostra 1.1. Todas as amostras apresentaram altos valores de polissacarídeos (230 nm). As leituras

representativas de proteínas (280 nm) foram satisfatórias para todas as amostras do fragmento estudado.

No fragmento 2 (Figura 3), no município de Bagé (região conhecida como Serri-lhada) as diferenças entre as matrizes também foi expressiva entre os grupos de matrizes 2.1-2.3 e 2.2-2.5 entretanto ficaram muito abaixo dos valores padrão (dados pelo Na-noDrop®).

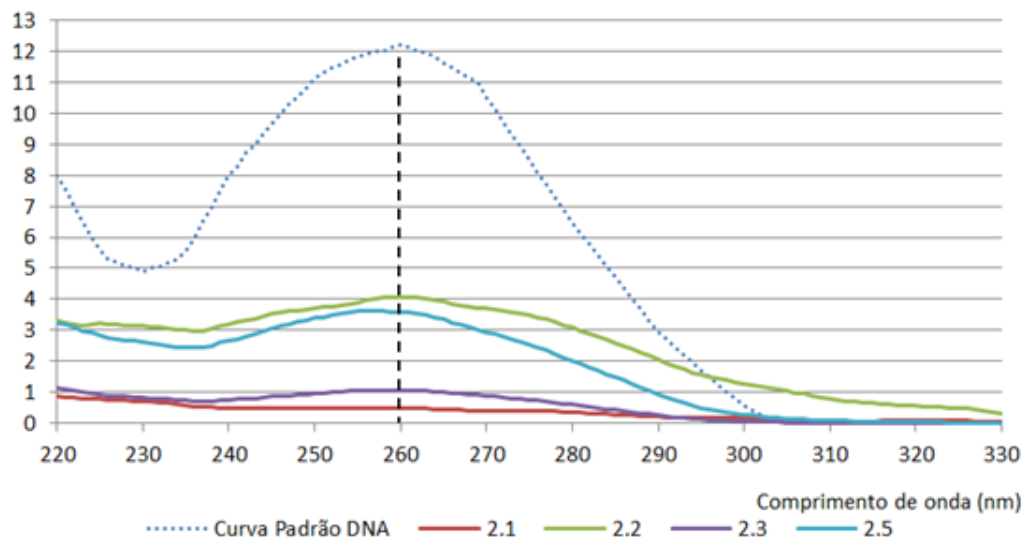


Figura 3. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 2 (Serrilhada, Bagé-RS), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

A quantidade e qualidade de material genético extraído, entretanto, mostrou-se suficiente para a realização de análises envolvendo DNA de *Erythrina crista-galli*, ex-ceto em 2.1 que ficou abaixo do limite esperado de 30 ng/mL.

O fragmento 3 (Figura 4), município de Bagé, região conhecida como Olhos d'água, apresentava o material foliar aparentemente melhor preservado (embora estivesse submetido às mesmas condições de armazenamento), entretanto as quantidades de DNA extraídas foram baixas com o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995). As quantidades e a qualidade do material genético isolados por esse método não permitiriam a realização de reações de PCR.

A causa da variação significativa entre as amostras do mesmo fragmento, bem como de distintos fragmentos não é conhecida uma vez que todas foram coletadas no mesmo período e estiveram sob as mesmas condições de armazenamento pelos 170 dias de secagem até a data das extrações.

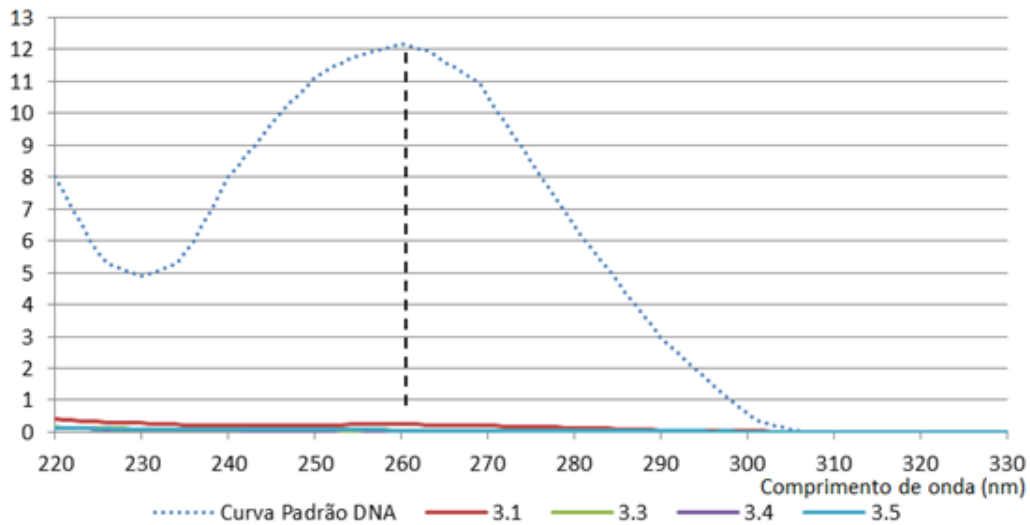


Figura 4. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 3 (Olhos d'água, Bagé-RS), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

Os materiais utilizados para as extrações provenientes do fragmento 4 eram compostos exclusivamente por brotações formadas por ramos e folhas muito jovens que, depois do período de secagem, constituía material muito ressecado e de difícil seleção para a formação das amostras a serem maceradas e, portanto, não se esperava encontrar suficiente material genético para realização das análises. No entanto, a quantidade de DNA isolado nestes materiais (ainda que com significativa contagem de polissacarídeo polifenóis) foi suficientemente alta para a realização de testes, indicando que tecidos mais jovens desta espécie possam constituir fontes potenciais para a exploração de material genético.

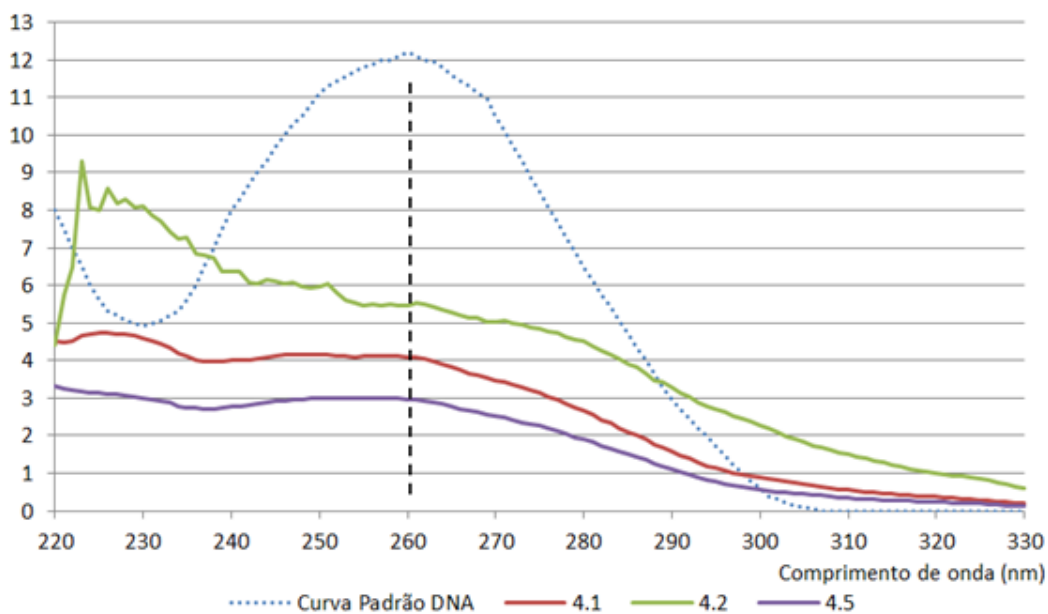


Figura 5. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 4 (Dom Pedrito), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo

y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

As amostras do fragmento 5 (Figura 6), município de Candiota, mostraram baixa quantidade de ácidos nucleicos extraídos, onde apenas uma amostra (5.3) atingiu a quantidade necessária de DNA para as análises seguintes.

Este fragmento apresenta matrizes em um ambiente fortemente impactado pela descontinuidade do ambiente ciliar esperado para as bordas de curso de água e somente a matriz 5.3 efetivamente encontra-se em uma área de margem de curso de água relativamente bem conservada.

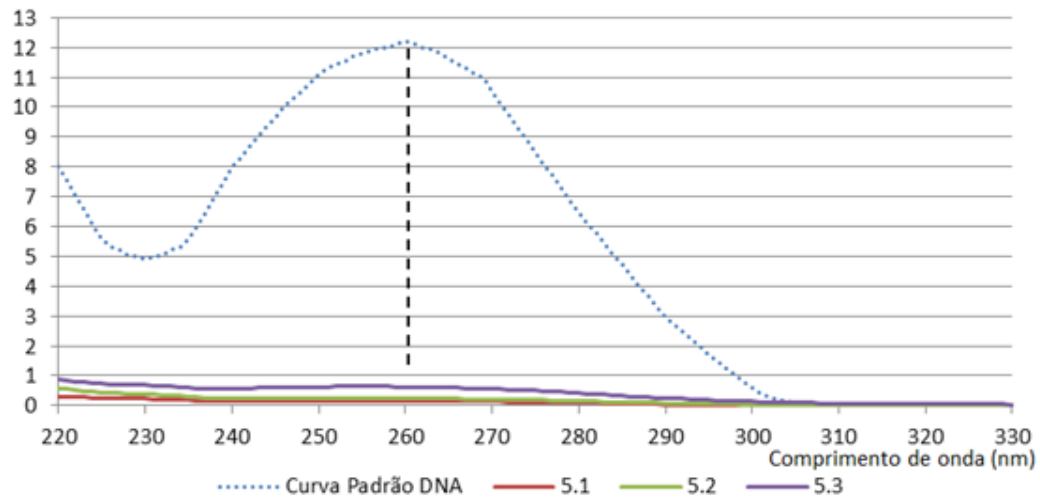


Figura 6. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 5 (Candiota), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

Os valores de absorvância do fragmento 6 (Figura 7), no município de Hulha Negra, mostraram que praticamente não foi possível isolar o material genético destas matrizes. Tal observação se relaciona às matrizes 6.1 e 6.2, ao passo que a amostra 6.3 apresenta não só a quantidade quanto mostrou relativa qualidade do material.

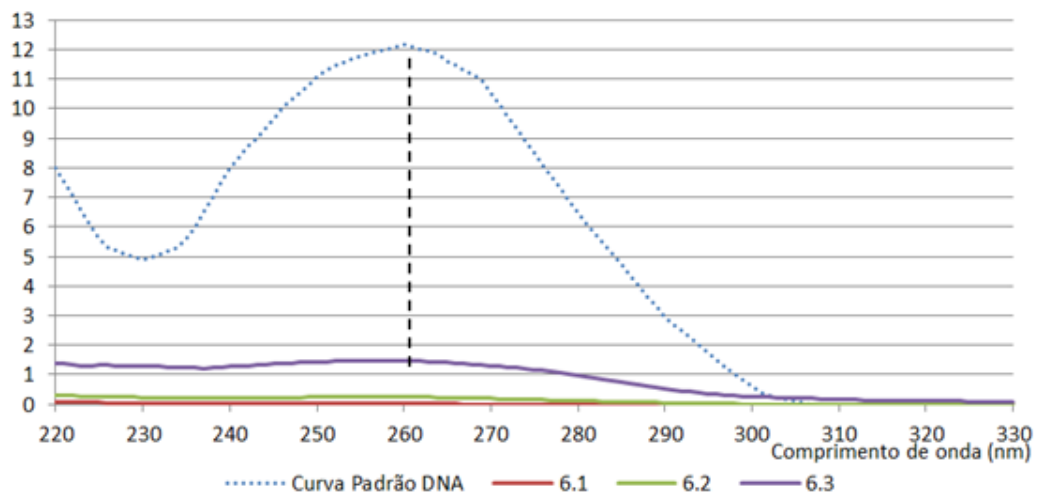


Figura 7. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* do fragmento 6 (Hulha Negra),

pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

Com relação à matriz isolada (município de Bagé) a quantidade e qualidade do material genético extraído foi relativamente satisfatória (Figura 8).

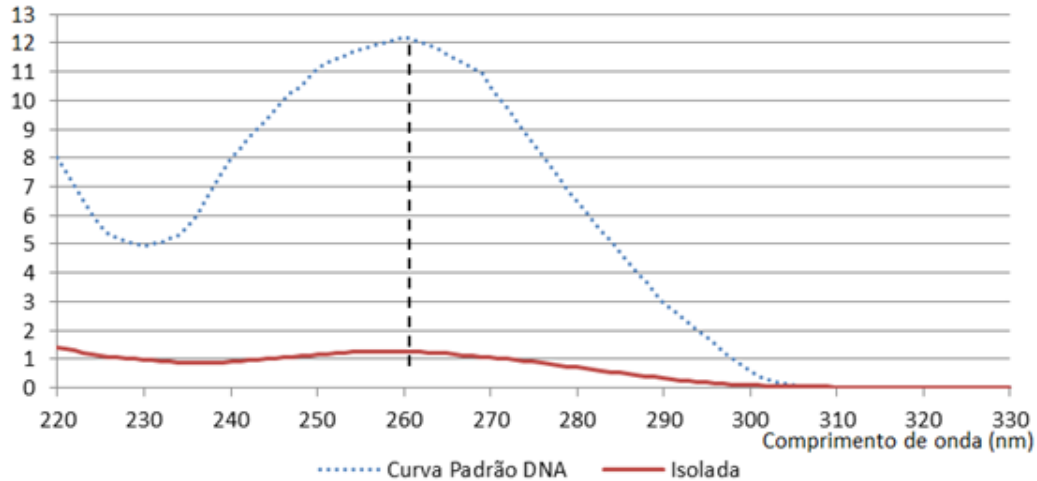


Figura 8. Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas da amostra foliar de *Erythrina crista-galli* (matriz isolada), pelo método modificado de Nienhuis et al. (1995). Uma unidade de absorvância (eixo y) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL.

Avaliando-se os resultados especificamente da quantidade de material dado o comprimento de onda correspondente a 260nm observa-se que há significativas diferenças entre as amostras utilizando-se o protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995), variando desde o máximo extraído na matriz 1.4, com 422,31 nm.mL⁻¹ ao mínimo de 0,83 nm.mL⁻¹, na matriz 6.1 (Figura 9).

A qualidade do material genômico isolado de folhas secas pelo protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995) mostrou maiores valores de polissacarídeos ou polifenóis nas amostras das matrizes 1.1, 1.4, 1.7 e 4.2.

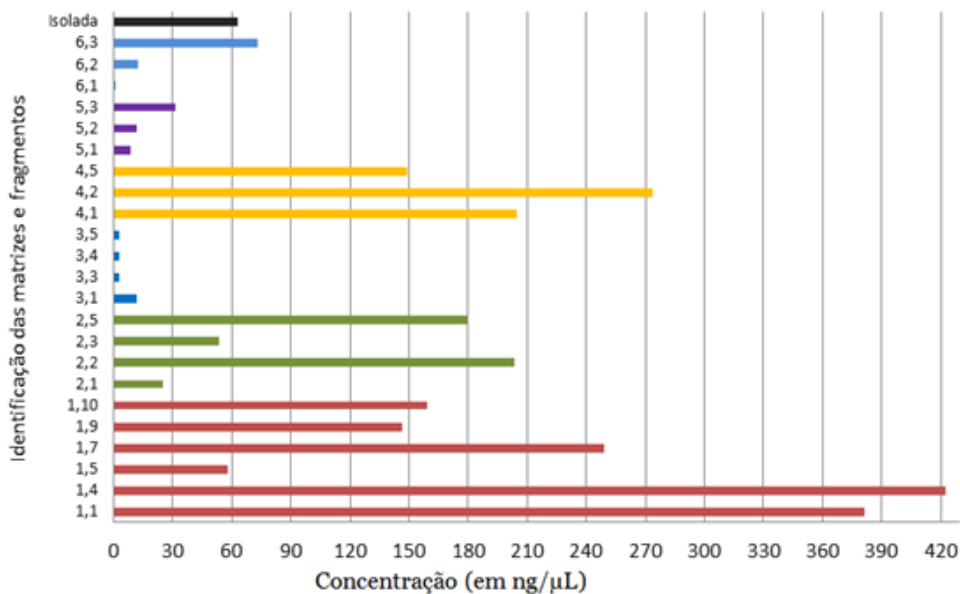


Figura 9. Concentrações de DNA das amostras foliares de *Erythrina crista-galli* L. obtidas com o protocolo de extração de Nienhuis et al. (1995), com modificações.

Mazza & Bitencourt (2000) explicam que 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. O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (LODHI et al., 1994).

O tipo de protocolo usado também mostrou acentuada diferença nos testes com folhas secas. O teste comercial (Wizard® Genomic DNA, PROMEGA®) pode ser desenvolvido em laboratório de maneira mais prática, rápida e como menores fontes de erro (simplicidade de procedimentos e reagentes prontos) do que os demais protocolos testados. Foram significativas as diferenças de desempenho qualitativo entre os protocolos na análise comparativa das frações A260/280 e A260/230. Observa-se que o protocolo modificado não foi suficientemente útil na produção de um isolado de qualidade por conta da contaminação por polissacarídeos e polifenóis, entretanto, a quantidade mostrou-se suficiente para os trabalhos (valor esperado superior a 30ng/mL), para a maioria das amostras.

Pureza do material extraído pelos protocolos de Nienhuis et al. (1995), Ferreira & Grattapaglia (1998) e Kit Wizard® Genomic DNA (PROMEGA®)

Foram utilizadas duas razões para a avaliação da qualidade do DNA extraído pelos protocolos testados em folhas secas (Tabela 2).

A razão A260/A230 pode ser considerada uma medida da pureza das amostras. Para esta variável os valores esperados encontram-se na faixa de 1,6 - 1,9 (PAGE, 2010), sendo que um valor menor que 1,6 ou maior que 1,9 indicará a presença de polissacarídeos.

A avaliação da fração A260/A230 demonstra que os protocolos testados foram ineficientes em remover satisfatoriamente os polissacarídeos e polifenóis das amostras (Tabela 2), situando-se sempre os resultados abaixo do mínimo esperado como indicador de qualidade, entretanto, a média dos resultados das amostras teve melhor condição no protocolo modificado de Ferreira & Grattapaglia (1998).

Para a razão A260/A280, que indica a contaminação por proteínas, o valor esperado deve situar-se entre 1,8 e 2,0 e valores inferiores ou superiores a estes limites indicam contaminação (SCIENTIFIC, 2010). Para esta razão, um único valor esteve dentro do ideal, que foi o valor da matriz 5.1 no protocolo modificado de Nienhuis et al. (1995), tendo sido também neste protocolo que a média mostrou melhores resultados para a razão A260/A280.

Tabela 2. Comparação das frações A260/280 e A260/230 de amostras comuns entre diferentes protocolos de isolamento de DNA genômico utilizando folhas secas de *Erythrina crista-galli* L: Kit PROMEGA® (1), protocolo modificado de Nienhuis et al., 1995 (2) e protocolo de Ferreira & Grattapaglia, 1998 (3).

Amostras	Folhas secas					
	A260/A280			A260/A230		
	Proteínas (valor esperado: entre 1,8 e 2,0)			Polissacarídeos (valor esperado: entre 1,6 e 1,9)		
	1	2	3	1	2	3
1.5	1,24	1.64	-	0,46	0.94	-
2.1	1,30	1.32	1.06	0,87	0.69	0.86
3.3	1,50	-	1.77	0,55	0.59	1.77
4.1	-	-	-	-	-	-
5.1	1,38	1.83	-	0,52	0.73	-
5.2	-	-	1.11	-	-	1.11
6.1	1,51	-	1.33	0,47	0.34	1.33
X	1,38	1.76	1.37	0,80	1.28	1.37
MÉDIA	1,39	1.64	1.33	0,61	0.76	1.29

Os valores das matrizes não apresentadas em cada avaliação não puderam ser mensurados pelo equipamento ou não estavam disponíveis nas análises. Os dados para comparação **entre os protocolos modificado de Nienhuis et al. (1995) e Kit PROMEGA®** foram dadas por Mello (2014). Em negrito o valor que se encontra dentro dos limites esperados na avaliação da qualidade do DNA isolado.

De acordo com a razão A260/A230, que indica a contaminação por polissacarídeos e polifenóis, todos os protocolos mostraram contaminação, sendo mais eficiente entre os testados, o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998).

As concentrações de DNA isolado, em qualquer das amostras foliares utilizando o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998) são suficientes para a realização dos testes com marcadores moleculares (Tabela 3). Valores esperados para a esta concentração são os superiores a 30ng/mL do isolado.

Reação de PCR

Das reações de PCR foram obtidos os produtos da amplificação constantes da Figura 10, utilizando-se cinco iniciadores (primers) RAPD. A figura mostra os resultados obtidos sem a equalização da concentração de DNA entre as amostras.

Tabela 3. Concentração de DNA genômico (em ng/μL) isolado de folhas secas de *Erythrina crista-galli* com os protocolos modificado de Nienhuis et al. (1995), Kit PROMEGA® e Ferreira & Grattapaglia (1998).

Amostra	Concentração de DNA genômico (em ng/μL)		
	Nienhuis et al. (1995)	Kit PROMEGA®	Ferreira & Grattapaglia (1998)
1.5	57,76	1342,66	-
2.1	24,84	941,43	1651,00
3.3	3,03	290,57	1866,79
4.1	-	-	-
4.2	-	-	-

5.1	8,3	581,84	-
5.2	-		3750,90
6.1	0,83	731,46	649,43
X	62,94	520,14	1490,02
MÉDIA	26,28	734,68	1881,63

Os resultados das amostras equalizadas para a concentração de DNA não apresentaram bandas indicando que a quantidade testada (20ng/uL) pode ser insuficiente para as avaliações nas condições de qualidade que se encontravam as amostras.

Todas as amostras utilizadas nos testes com iniciadores RAPD provinham de folhas secas pelo método de Nienhuis et al., (1995) e somente foi aproveitado o DNA extraído da amostra foliar seca (1.5), obtido por meio do Kit Wizard® Genomic DNA que continha adequada quantidade e qualidade dos materiais.

Da análise dos produtos de amplificação (Figura 10) observa-se que a metodologia de isolamento do DNA genômico, utilizando-se neste teste marcadores RAPD, mostrou-se eficiente, entretanto a contaminação com polissacarídeos não permitiu outras interpretações, como a diversidade genética entre e dentro dos fragmentos florestais estudados.

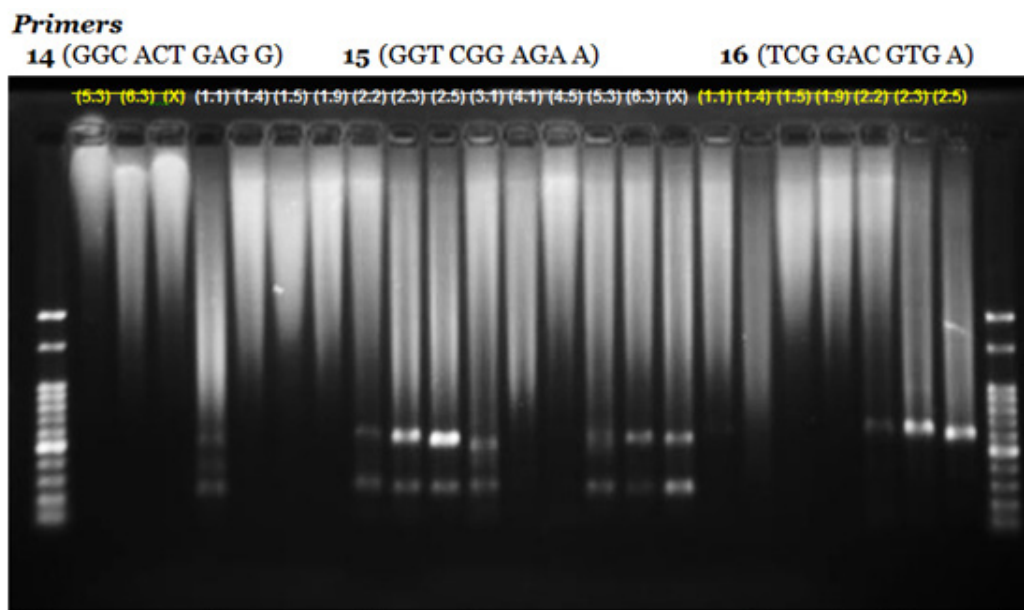


Figura 10. Produto de amplificação de RAPD gerados com oligonucleotídios testados em matrizes de *Erythrina crista-galli* L. de diferentes fragmentos florestais em Bagé, Dom Pedrito, Hulha Negra e Aceguá, RS. Mostra-se na figura os resultados dos *primers* que apresentaram amplificação: continuação do *primer* 14 (3 matrizes, em amarelo), *primer* 15 (as 13 amostras testadas, em branco) e *primer* 16 (7 amostras, em amarelo). Foto: Rafael Matielo, UNIPAMPA, São Gabriel, RS.

Para avaliações da diversidade genética entre e dentro dos fragmentos, além de outros trabalhos, devem ser requeridas otimizações nos protocolos bem como outras modificações relativas às reações de PCR e RAPD que permitam a obtenção

de melhores resultados.

4. Conclusões

A análise da qualidade e concentração das soluções de DNA genômico de folhas secas de *Erythrina crista-galli*, pelos métodos de Nienhuis et al.(1995), por meio do Kit Wizard® Genomic DNA e do protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1988) resultam em diferenças, tanto entre amostras dos fragmentos florestais quanto entre os três protocolos testados.

Não é possível determinar em campo diferenças fenotípicas ou ambientais marcantes entre matrizes de *Erythrina crista-galli* L. que permitam explicar rapidamente as diferenças verificadas nas extrações.

A análise visual de folhas secas de *Erythrina crista-galli* utilizados no isolamento de DNA genômico não permite prever a qualidade do DNA extraído, porém brotações jovens e secas podem constituir-se em fonte adequada de material.

Levando-se em conta a homogeneidade ambiental a que estão submetidas as matrizes e o número de matrizes de *Erythrina crista-galli* em cada fragmento florestal não é possível estabelecer a relação com a quantidade ou a qualidade do DNA genômico isolado de amostras.

O protocolo modificado de Nienhuis et al.(1995) é mais eficiente na remoção de proteínas das amostras, enquanto o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1988) é mais eficiente na remoção de polifenóis e polissacarídeos, entretanto, a concentração de DNA isolado pelo protocolo de Nienhuis et al.(1995) e sua qualidade foram suficientes para a amplificação por meio de marcadores RAPD.

Folhas secas de *Erythrina crista-galli*, mantidas em sacos de papel e à temperatura ambiente por até 10 meses após a coleta, constituem-se em material adequado como fonte para o isolamento de DNA e uso em reações de PCR utilizando marcadores RAPD. Uma otimização dos protocolos usados, entretanto, é necessária a fim de melhorar a qualidade do DNA isolado a ser usado nessas avaliações.

5. Agradecimentos

Agradeço às equipes do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) do Departamento de Veterinária e ao Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS pelo apoio em equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1998.

LODHI, Muhammad A; YE, Guang-Ning.; WEEDEN, Norman F.; REISCH, Bruce 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.

MAZZA, Maria Cristina Medeiros; BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, jul./dez, 2000. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim41/mazza.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

MELLO, Luciano Moura de. **Superação de dormência e influência da temperatura, substrato e fotoperíodo na germinação de sementes de *Erythrina crista-galli* Linn. (FABACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

MELLO, Luciano Moura de; CANTOS, Alexandra Alves; SILVA, Ana Carolina S. da; MENEGUELLO, Geri Eduardo; VILLELA, Francisco Amaral. Maturação fisiológica, aspectos biométricos e insetos associados a frutos, flores e sementes de Corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L., FABACEAE), em Bagé, RS. **Informativo ABRATES**, vol. 23, n. 3, 2013. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/informativo/artigos-publicados/30-informativo-abrates-volume-23-numero-3>, acesso em 26 Fev 2015.

MELO, Marília Freitas de Vasconcelos. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2010.

NIENHUIS, James; TIVANG, Jan; SCKROCH, Paul.; SANTOS, João B dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Madison, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995. Disponível em: <http://journal.ashspublications.org/content/120/2/300.full.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

PAGE, Andrew F. Detection and Avoidance of Polysaccharides in Plant Nucleic Acid Extractions. **Thermo Fisher Scientific - NanoDropProducts**, Wilmington, 2010. Disponível em: <http://www.thermo.com.cn/Resources/201305/3110520421.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

PROMEGA. Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Technical Manual. Revisado em Dezembro de 2014. Disponível em: <https://www.promega.com.br/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/o/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>, acesso em 14 Jul 15.

AMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Spectrophotometry of DNA or

RNA. In: **Molecular Cloning**. 3 ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. n. 3, A8.20-A8.21, 2001.

SCIENTIFIC, Thermo. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual**. 2010. Disponível em: <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

TAI, Thomas H.; TANKSLEY, Steven D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, p. 297-303, 1990.

THOMSON, Darelle; HENRY, Robert. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**. n. 11, p. 202-206. 1993.