

Isolamento de DNA genômico  
utilizando sementes de *Erythrina*  
*cris-ta-galli* L. (Corticeira-do-  
banhado) e *Schizolobium*  
*parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu)

\***Luciano Moura de Mello**

\*\***Leonardo Severo da Costa**

\*\*\***Caetano Miguel Lemos Serrote**

\*\*\*\***Lia Rejane Reinige**

**Resumo:** A Corticeira-do-banhado é uma espécie nativa, muito comum no sul do Brasil com grande potencial na arborização urbana. Esforços com o isolamento de DNA genômico a partir de folhas e câmbio vascular em *E. crista-galli* indica-ram contaminação por polissacarídeos ou polifenóis. O Guapuruvu é nativo da Mata Atlântica e o DNA isolado de folhas já foi utilizado com sucesso na avaliação da diversidade genética desta espécie. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo e mais rápido protocolo para o isolamento de DNA destas espécies, utilizando sementes. O protocolo proposto apresentou melhores resultados qualitativos em relação às fontes anteriormente avaliadas para *E. crista-galli* e o tempo médio da execução da técnica mostrou-se significativamente menor.

**Palavras-chave:** Genômica, semente, embrião.

**Abstract:** Corticeira-do-banhado is a native species, very common in southern Brazil with great potential in urban forestry. Efforts with the genomic DNA isolation from leaves and exchange vascular *E. crista-galli* indicated contamination by polysaccharides or polyphenols. The Guapuruvu is native of Forest Atlantic and the isolated leaves has used successfully in the assessment of genetic diversity. The objective of this study was to develop a

---

\*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, Doutorando. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, UFSM

\*\*\*UFSM, Mestrando. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, UFSM

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

new and faster protocol for DNA isolation using seeds of these species. The proposed protocol showed better qualitative and quantitative results in relation to the sources previously evaluated for *E. cristagalli* and the average time of the technical implementation was significantly lower.

**Key words:** genomic DNA, seed, embryo.

## 1. Introdução

A Corticeira-do-banhado é uma planta de ampla distribuição em todo o Bioma Pampa, compondo as formações arbóreas em ambientes úmidos e das orlas de florestas ciliares no Brasil, Uruguai, Paraguai, leste da Bolívia e Argentina.

Os esforços para o isolamento de DNA genômico desta espécie a partir de folhas secas e frescas e de câmbio mostrou, com dois diferentes protocolos, altos índices de contaminação por polissacarídeos e polifenóis, o que reduz a qualidade do DNA genômico isolado a partir destes materiais (Mello, 2014). Um material genômico isolado de excelente qualidade é necessário para os trabalhos com marcadores moleculares, entre eles o RAPD, um marcador de iniciadores (ou *primers*) arbitrários que pode ser utilizado na avaliação da diversidade genética entre acessos. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (Romano e Brasileiro, 2001).

Mello (2014) verificou ainda que o isolamento de material genômico a partir de câmbio vascular de *Erythrina crista-galli* revelou não só a baixa qualidade como a pequena quantidade de DNA, o que inviabiliza o uso desta fonte para estudos moleculares na forma testada.

O Guapuruvu é uma espécie igualmente importante no Bioma Mata Atlântica, ocorrendo naturalmente desde o sul da Bahia até Santa Catarina (Barneby, 1996). É uma espécie de alto porte, caducifolia, pioneira, de crescimento rápido e ampla distribuição, características interessantes para os trabalhos de recomposição florestal, especialmente para este Bioma altamente impactado. Para esta espécie já foram realizados trabalhos de pesquisa no campo da diversidade genética (Freire et al., 2007 e Zolet, 2009), nos quais o isolamento de DNA genômico a partir de folhas utilizando o método do CTBA (Doyle & Doyle, 1990) mostrou qualidade e quantidades suficientes.

Sousa et al. (2002), entretanto, lembra que sementes podem ser uma fonte importante de material genômico nos casos em que folhas (os materiais mais comumente utilizados) ou estão ausentes ou constituem fontes de contaminação pela presença de compostos polifenólicos e utilizou sementes para o isolamento de DNA de alfaca.

Embora a presença de polifenóis e polissacarídeos em folhas secas e, especialmente expressiva em câmbio e folhas frescas congeladas tenha se apresentado como uma dificuldade para o isolamento de DNA genômico de Corticeira-do-banhado, não mostra-se relevante para o Guapuruvu. Sementes destas duas Fabáceas, no entanto, merecem ser avaliadas como fonte de material genético em função de sua facilidade de coleta, armazenagem, transporte e manutenção, tendo, contudo, limitações com relação a sua disponibilidade dependendo do período fenológico das plantas matrizes.

Kestring & Seoane (2010) informam que uma das mais importantes etapas nas análises genéticas quando utilizam-se fragmentos de DNA é o isolamento e a purificação do DNA em quantidades suficientes e de boa qualidade. Para isso, os protocolos devem: romper paredes e membranas celulares, bloquear a ação de DNases, separar os ácidos nucleicos das proteínas e polissacarídeos e ainda proteger o DNA da ação de compostos fenólicos, evitando sua oxidação permitindo a obtenção de um DNA de alta qualidade. Os mesmos autores otimizaram o protocolo descrito por Mazza e Bittencourt (2000) para o uso no isolamento de DNA de sementes de Araucária.

O presente trabalho teve como objetivo fazer uma avaliação prévia de isolamento de DNA genômico com sementes, utilizando o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998) e, posteriormente, propor um novo protocolo rápido e específico para o uso com sementes de *Erythrina crista-galli* e *Schizolobium parahyba*. Para isso testou-se o isolamento a partir da radícula e epicótilo de sementes pré-germinadas das Fabáceas citadas.

## 2. Material e métodos

### TESTE PRELIMINAR

Um teste preliminar usando sementes inteiras foi realizado utilizando o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998). As sementes de Corticeira-do-banhado foram coletadas no município de Aceguá e as sementes de Guapuruvu foram coletadas no município de Santana do Livramento, ambos no estado do Rio Grande do Sul.

Os trabalhos de isolamento de DNA genômico foram realizados 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.

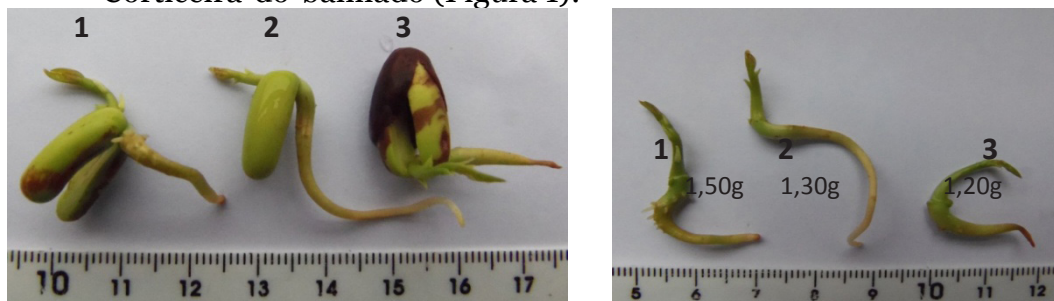
Para os testes iniciais foram utilizadas três sementes de Corticeira-do-banhado, constituindo as repetições do teste, sendo assim caracterizadas:

- A. Uma semente seca inteira, com 0,292g.
- B. 1. Metade de uma semente, com 0,106g.
- B. 2. Metade de uma semente, com 0,94g.

O segundo teste com sementes utilizou sementes germinadas em placas de petri com papel mata-borrão, à temperatura controlada de 20°C. Estas sementes tiveram como tratamento para superação de dormência o corte do tegumento com estilete e foram utilizados a radícula e epicótilo. Após o corte do tegumento as sementes foram submetidas à assepsia com exposição por 5 min ao hipoclorito de sódio a 1%, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

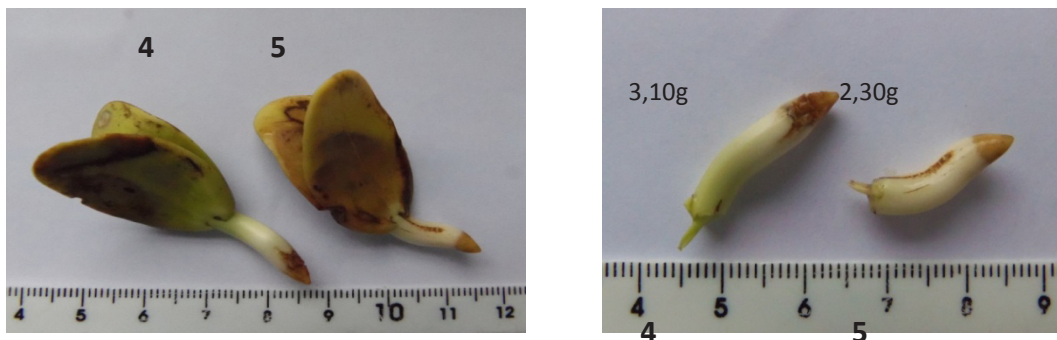
O material utilizado neste teste foi sementes sadias germinadas e sem danos causados por insetos, das quais posteriormente removeu-se os cotilédones, apresentando as seguintes características:

Corticeira-do-banhado (Figura 1):



**Figura 1.** Sementes de *Erythrina crista-galli* L. (Corticeira-do-banhado): 1, 2 e 3, antes e após a remoção dos cotilédones, com o massa fresca dos embriões utilizados.

Guapuruvu (Figura 2):



**Figura 2.** Sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu): 4 e 5, antes e após a remoção dos cotilédones, com o massa fresca dos embriões utilizados.

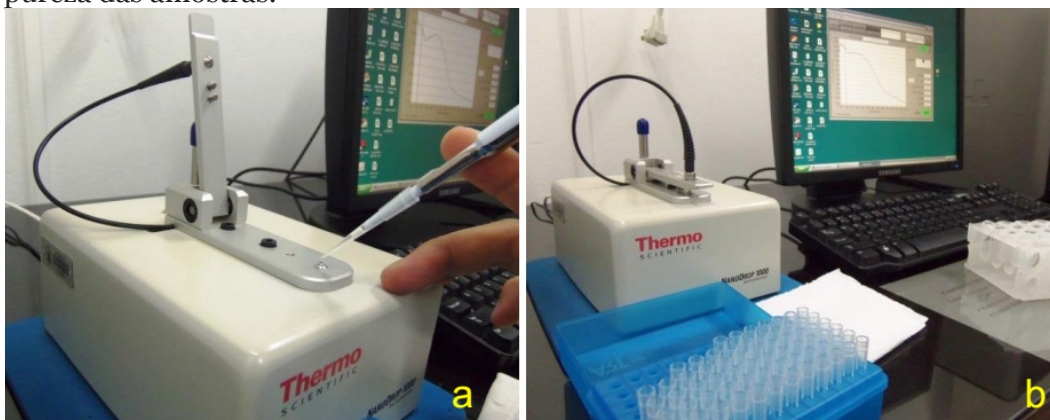
Para esta proposição de protocolo de isolamento foi priorizada a eficiência do método, dada pela maior agilidade, por meio do menor tempo empregado no trabalho, pela boa qualidade e suficiente quantidade do material genômico isolado. O protocolo desenvolvido foi o seguinte:

- (a) maceração de amostras de embriões, com almofariz, utilizando nitrogênio líquido e colocação do macerado em microtubos de centrífuga de 2mL;
- (b) adição de 700µL de CTAB com adição de 2µL de β-mercaptoetanol por amostra;
- (c) realização de vortex por 15s e incubação a 60°C por 20 minutos em banho-maria;
- (d) adição de 2,5µL de RNase;
- (e) vortex por 15s e incubação a 37°C por 20 minutos em banho-maria;
- (f) adição de 600µL do solvente orgânico clorofórmio : álcool isoamílico, 24:1 (CIA);
- (g) centrifugação das amostras por 5 min, a 10.000xG;
- (h) retirada do sobrenadante e transferência para novos microtubos de centrífuga;
- (i) adição de 400µL de isopropanol gelado (a -20°C) e realização de lentas inversões;
- (j) centrifugação por 5 min a 10.000xG;
- (k) lavagem do *pellet* com 1mL de álcool 70%;
- (l) lavagem do *pellet* com 1mL de álcool 95%;
- (m) realização de secagem do material, a 30°C durante 30 minutos;

(n) Ressuspensão dos *pellets* com 150µL de TE-buffer e armazenagem em freezer.

Os resultados foram avaliados por meio de espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000 (Figura 3).

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. Estas duas razões utilizadas podem ser consideradas uma medida da pureza das amostras.



**Figura 3.** Espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000. Pipetagem da solução (a) e análise da solução pelo software do equipamento (b), com o gráfico correspondente ao no monitor ao fundo. Fotos: Luciano Moura de Mello, Santa Maria, Departamento de Veterinária da UFSM, 2014.

Para a variável A260/A230 os valores esperados encontram-se na faixa de 1,6 - 1,9 (PAGE, 2010), sendo que um valor menor ou igual a 1,6 e maior que 1,9 indicará a presença de polissacarídeos. Para a razão A260/A280, o valor esperado deve situar-se entre 1,8 e 2,0 e valores inferiores ou superiores a estes limites indicam contaminação por proteínas (SCIENTIFIC, 2010).

A fim de avaliar a quantidade de pares de bases das amostras 1, 2, 3, 4 e 5 bem como a integridade do DNA isolado foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com 4µL de Brometo de Etídio, a 90 V, durante 50 min.

### 3. Resultado e discussão

A Tabela 2 apresenta os valores de concentração (quantidade) e as frações A260/280 e A260/230 (qualidade) dos isolados de sementes, tanto em testes preliminares quanto usando o protocolo proposto neste trabalho.

Verifica-se que quando sementes são utilizadas inteiras para o isolamento de DNA genômico, baseando-se no protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998), os isolados apresentam alta concentração de DNA, com médias acima de 1.100ng/µL, entretanto apresentam alta concentração de polissacarídeos e polifenóis, o que inviabiliza este material como fonte de DNA genômico. Tal contaminação é visível após a realização do protocolo, resultando num isolado denso oriundo dos materiais cotiledonares (amido e outros) macerados.

Já os materiais provenientes das sementes germinadas, sem os cotilédones

e utilizando o protocolo proposto, apresentaram pureza superior em relação ao outro tratamento (semente inteira), resultando num isolado translúcido e visualmente limpo.

As avaliações com o espectrofotômetro, entretanto mostram contaminação por proteínas e polissacarídeos/polifenóis. Estes valores, contudo, aproximaram-se muito dos valores esperados para uma amostra limpa de contaminação e constituem o material de melhor qualidade obtido até o momento para a espécie, utilizando folhas ou câmbio (MELLO, 2014).

**Tabela 2.** Concentração e frações A260/280 e A260/230 dos testes de isolamento de DNA genômico realizado com amostras de embriões de *Erythrina crista-galli* L. A, B e C: sementes inteiras testadas com o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998), 1, 2 e 3 embriões de *Erythrina crista-galli* e 4 e 5 embriões de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake.

Amostras	Sementes (epicótilo e radícula)				
	ng/ul	Sementes (epicótilo e radícula)		A260/A280	A260/A230
		A260	A280	Proteínas (valor esperado: entre 1,8 e 2,0)	Polissacarídeos (valor esperado: entre 1,6 e 1,9)
A	-	-	8.415	-	-
B	1189.00	23.980	12.649	1.9	1.3
C	1076.76	21.835	10.419	2.1	1.8
<b>MÉDIA</b>	<b>1132,88</b>	<b>22,91</b>	<b>10,49</b>	<b>2,0</b>	<b>1,5</b>
1	289,57	5.791	2.765	2.09	-
2	128,11	2.562	1.173	2.18	-
3	136,84	2.737	1.298	2.11	-
<b>MÉDIA</b>	<b>184,84</b>	<b>3,696</b>	<b>1,745</b>	<b>2,1</b>	<b>-</b>
4	723,64	14.473	7.093	2.04	2.26
5	646,35	12.927	6.386	2.02	1.94
<b>MÉDIA</b>	<b>685,0</b>	<b>13,700</b>	<b>6,740</b>	<b>2,0</b>	<b>2,01</b>

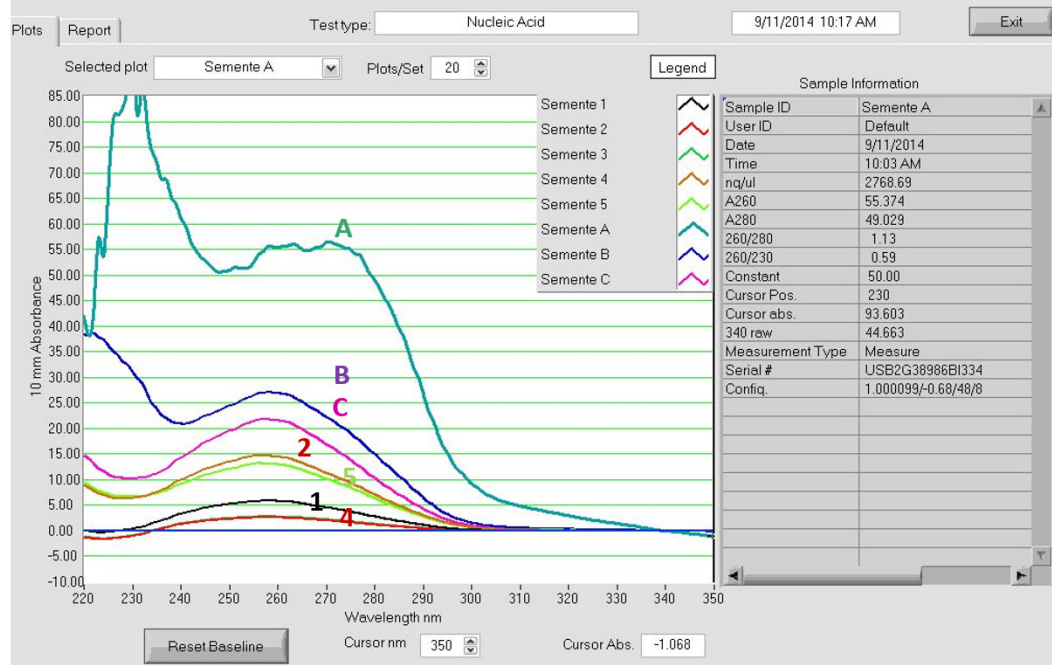
Os valores ignorados apresentaram leitura com valor negativo dada pelo equipamento.

O protocolo mostrou-se mais eficiente também no aspecto do tempo de realização. A variação do tempo ainda depende da organização e habilidade do operador, entretanto, contabilizando-se a etapa de pesagem e maceração, estabeleceu-se um tempo médio de dez minutos somando-se aos demais procedimentos que exigem, em média, duas horas e quarenta minutos.

As curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas a partir de sementes (Figura 4) permitem uma visualização comparativa entre as diferentes amostras. O comprimento de onda referente a 230nm corresponde à faixa de absorvância de polissacarídeos e polifenóis, mostrando a amostra A e B grande contaminação,

por exemplo. O comprimento de onda 260nm refere-se à faixa de absorvância de ácidos nucleicos, sendo neste caso identificado o DNA genômico.

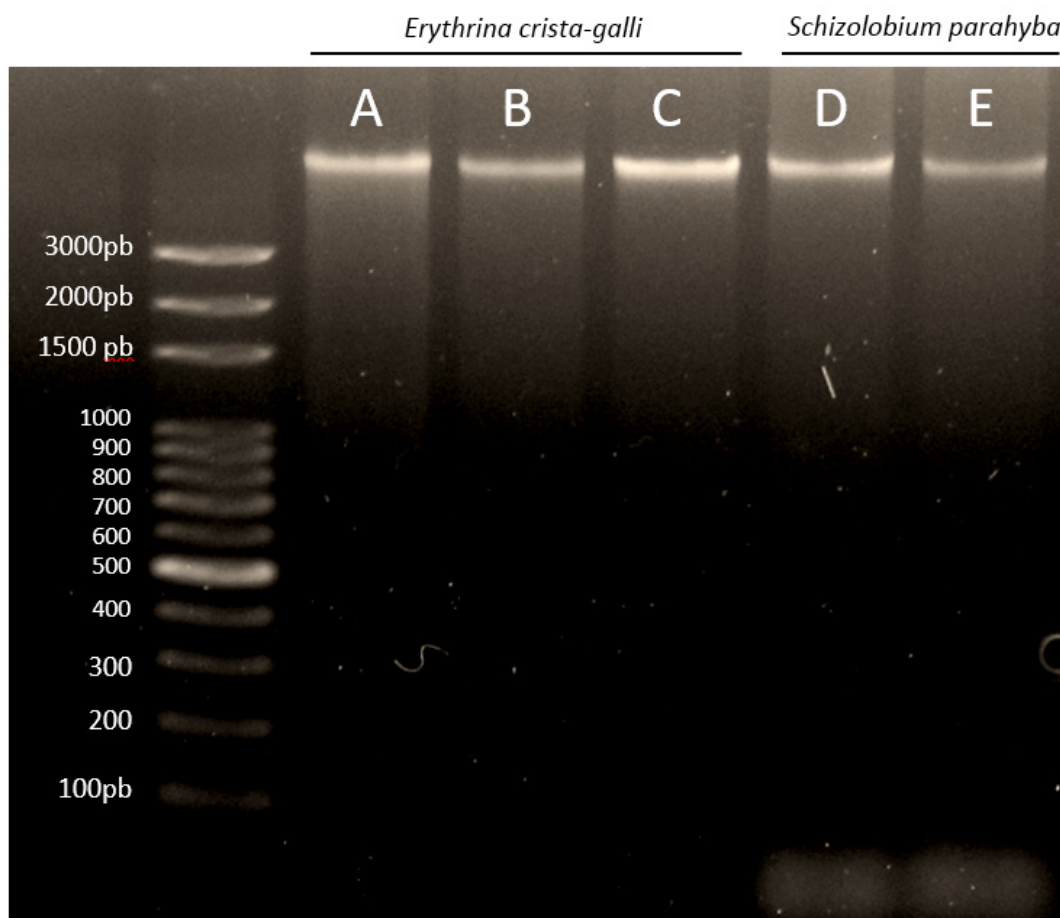
**Figura 4.** Curvas de absorvância das soluções de DNA isoladas das amostras de sementes (epicótilo e radícula) de *Erythrina crista-galli* (1, 2 e 3) e de *Schizolobium parahyba* (1 e 2). Imagem do software Nanodrop®.



As amostras C e as numeradas (sem cotilédones e utilizando o protocolo de isolamento proposto) apresentam estes valores acima dos valores em 260nm, o que é um bom indicativo de quantidade e qualidade do isolado. A faixa correspondente a 280nm, que identifica proteínas apresentara-se aproximadamente dentro dos valores esperados para os materiais testados, exceto na amostra A cuja avaliação das razões correspondentes mostra relevante contaminação também por proteínas.

Por fim, a avaliação em gel de agarose da corrida eletroforética das amostras de sementes sem cotilédones e tegumento e utilizando o protocolo proposto (Figura 5), mostra que os isolados apresentam valores entre 5.000 e 6.000 pares de bases. Para a eletroforese foi utilizado gel de agarose a 1,5% corado com 4uL de Brometo de Etídio. A corrida eletroforética foi realizada durante 45 minutos e com voltagem de 100v. O gel foi visualizado e fotografado em transluminador.





**Figura 5.** Aspecto das bandas de soluções de DNA genômico isoladas de embriões: radícula e epicótilo de *Erythrina crista-galli* (1, 2 e 3) e de *Schizolobium parahyba* (4 e 5), obtidas mediante o emprego do protocolos de isolamento de DNA propostos neste trabalho. As bandas foram obtidas a partir de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coradas com Brometo de Etídio. Santa Maria, RS, UFSM, 2014.

#### 4. Conclusões

Embriões (radícula e epicótilo), sem cotilédones, constituem uma fonte satisfatória de DNA genômico livre de contaminação por polifenóis/polissacarídeos com o uso do protocolo proposto neste trabalho.

As repetições mostraram-se suficientes, apresentando pequena variação entre si nos resultados dos testes de isolamento.

O protocolo proposto neste trabalho pode ser realizado em menor tempo do que os protocolos testados para outros tipos de fontes (folhas secas à temperatura ambiente, folhas frescas e câmbio vascular congelado) e com procedimentos mais simplificados, reduzindo as fontes de erro e contaminações, podendo ser executado, em média, em 02:40h, acrescentando-se aproximadamente 10 minutos por amostra.

## **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 Fisiotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS pelo apoio em equipamentos necessários à realização deste trabalho.

## Referências bibliográficas

BACKES, Paulo; IRGANG, Bruno. **Árvores do Sul: guia de identificação & interesse ecológico: as principais espécies nativas sul-brasileiras**. Instituto Souza Cruz, Rio de Janeiro. 2002. 326p.

BARNEBY, Rupert. C. Neotropical Fabales at NY: asides and oversights. **Brittonia**, v.48, n.2, p.174-187, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf), acesso em 25 Fev 2015.

CARPANEZZI, Antonio; TAVARES, Fernando; SOUSA, Valdares A. Estaquia de corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L.). Comunicado Técnico. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 6p. Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/304666/1/comtec64.pdf>, acesso em 26 Fev 2015.

DOYLE, Jane L.; DOYLE, John. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13- 15.1990.

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

FREIRE, Juliana Müller; PIÑA-RODRIGUES, Fátima Conceição Marquez; LIMA, Edilberto Rosendo de; SODRÉ, Sérgio Ricardo Cardoso; CORRÊA, Ronan Xavier. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**. n. 74, p. 27-35, junho 2007.

GALLETO, Leonardo; BERNARDELLO, Gabriel; VESPRINI, José; ISELE, Irene; SPERONI, Gabriela; BERDUC, Alfredo. Reproductive biology of *Erythrina crista-galli* (Fabaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.87,n. 2, p.127-145, 2000.

GRATIERI-SOSSELLA, Ariane; PETRY, Cláudia; NIENOW, Alexandre Augusto. Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (FABACEAE) pelo processo de estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 1, p. 163-171, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v32n1/18.pdf>, acesso em 23 Fev 2015.

HONG, T. D.; ELLIS, Richard; LININGTON, S. Compendium of information on seed storage behaviour, v.2. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 1998.

KESTRING, Daiane Rigoni; SEOANE, Carlos Eduardo Sicoli. Otimização de protocolo para extração do DNA de endosperma de sementes de *Araucaria*

*angustifolia*. In: Evento de iniciativas e melhorias das atividades de apoio técnico-administrativo da Embrapa Florestas, 5., Colombo. Anais. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2010.

KÖPPEN, Wladimir. Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. **Geogr. Zeitschr.** v.6, p.593–611, 657–679. 1900.

LINK, Dionísio; COSTA, Ervandil C. Danos causados por insetos em sementes de timbaúva, *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. **Ciência Florestal**, v.5, n.1, p.113-122, 1995. Disponível em <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaflorestal/article/view/314/181>, acesso em 26 Fev 2015.

LOZANO, Evangelina C.; ZAPATER, Maria A. El género *Erythrina* (Leguminosae) en Argentina. **Darwiniana**. v.48, n.2, p.179-200. 2010.

MAZZA, Maria Cristina Medeiros; BITTENCOURT, Juliana Vitória Mesias. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000.

MELLO, Luciano Moura de. **Classificação de frutos, emergência de plântulas e isolamento de DNA genômico de *Erythrina crista-galli* L. (FABACEAE)**. Pelotas, UFPel. Tese, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, 2014.

ROMANO, Eduardo; BRASILEIRO, Ana Cristina Miranda. Extração de DNA de Plantas. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, 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.

SILVA, Ariadne Josiane C.; CARPANEZZI, Antonio A., LAVORANTI, Osmir José. Quebra de Dormência de Sementes de *Erythrina crista-galli*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.53, p. 65-78, 2006. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/download/206/156>, acesso em 26 Fev 2015.

SOUZA, Cristina S.; PEREIRA, Cícero D.; BONETTI, Ana M.; GOULART, Luiz R.; KERR, Warwick E. Extração de DNA genômico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) para análises AFLP. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, jul. 2002.

ZOLET, Andreia Carina Turchetto. **Filogeografia e Sistemática Molecular de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu) através do sequenciamento de regiões cloroplásticas e nucleares**. *Dissertação de Mestrado*. Porto Alegre (RS): Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociência da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 138. 2009.