



Fotos: Simone de Miranda Rodrigues

COMUNICADO  
TÉCNICO

318

Belém, PA  
Novembro, 2019



# Otimização do protocolo de extração de DNA para espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia

Simone de Miranda Rodrigues  
Ilmarina Campos de Menezes  
Eduardo Filipe Torres Vieira

# Otimização do protocolo de extração de DNA para espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Simone de Miranda Rodrigues, Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Ilmarina Campos de Menezes, engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, analista da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Eduardo Filipe Torres Vieira, graduando em Agronomia na Universidade Federal Rural da Amazônia, bolsista PIBIC/CNPq na Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

## Introdução

A família Piperaceae apresenta dez gêneros que englobam aproximadamente 2 mil espécies no mundo, sendo encontrada em toda a região tropical, principalmente em condições sombreadas (Cronquist, 1981). No Brasil, dentro do gênero *Piper*, foram identificadas 265 espécies (Yuncker, 1972), as quais apresentam potencial medicinal, são fontes de alimentos para alguns grupos de mamíferos (Di Stasi et al. 1989; Pio-Correa, 1974; Mello, 2002) e também atuam como plantas aromatizantes, ornamentais, inseticidas ou condimentares, como a espécie *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino), conhecida como a rainha das especiarias. As espécies desse gênero acumulam compostos e metabólicos de grande importância para indústrias químicas e alimentares, consequentemente despertando interesse científico em áreas como melhoramento genético, biologia molecular, fitotecnia, sanidade animal e vegetal, entre outras.

Em virtude da ampla importância científica de espécies do gênero, há a necessidade da realização de estudos genéticos e moleculares envolvendo avaliação de variabilidade e diversidade genética, identificação de espécies e uso em programas de melhoramento genético de espécies do gênero com expressiva importância econômica. Para tal, faz-se necessário trabalhar com protocolos eficientes para obtenção de ácidos nucleicos de qualidade. A escolha do protocolo de extração de DNA é decisiva, principalmente quando se busca a utilização de técnicas de PCR, que, em razão da sensibilidade de detecção, necessita de DNA padrão de qualidade para não comprometer o resultado final da técnica, uma vez que, ocorrendo a oxidação das amostras, o processo de isolamento de ácidos nucleicos pode ser comprometido. Para neutralizar a ação de enzimas oxidantes, usualmente são usados  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido ascórbico, albumina do soro bovino (BSA), polivinilpirrolidona (PVP) ou polivinilpolipirrolidona (PVPP) nos protocolos de extração (Dehestani; Tabar, 2007; Silva, 2010).

O processo de extração inclui essencialmente dois procedimentos básicos, os quais consistem da lise celular e do isolamento do DNA. Este último deve ser obtido livre de restos celulares, proteínas e/ou compostos fenólicos que contribuem para a oxidação e o comprometimento da qualidade do DNA. Para cada espécie ou tecido vegetal, vários protocolos devem ser testados, visando otimização e obtenção de DNA de alta qualidade (Oliveira et al., 2007).

Neste trabalho, faz-se o relato do protocolo de extração e amplificação do DNA para 12 espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia (*Piper tuberculatum*, *Piper arboreum*, *Piper hispidum*, *Piper aduncum*, *Piper alatipetiolatum*, *Piper colubrinum*, *Piper peltatum*, *Piper callosum*, *Piper marginatum*, *Piper montealegreanum*, *Piper divaricatum*, *Piper schwakei*) que fazem parte da coleção de piperáceas pertencentes à Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, localizada na sede da Unidade (latitude 01°. 27'S, longitude 48°. 30'W e altitude de 10 m) e deverão ser usadas no programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino pela Embrapa. Subamostras dessas espécies são mantidas em vasos com 22 cm de altura e 25 cm de diâmetro, cultivadas em casa de vegetação, com irrigação diária, visando à conservação desses germoplasmas.

Amostras de folhas jovens de todas as espécies foram coletadas, colocadas em sacos plásticos, depositadas

imediatamente em isopor com gelo e levadas ao laboratório para a imediata extração de DNA. O protocolo de extração otimizado teve como base o desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) com modificações, incluindo-se PVPP e  $\beta$ -mecaptoetanol no processo de maceração. O processo utilizado é descrito a seguir:

- Primeiramente, folhas tenras foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,1%, sendo em seguida lavadas em água destilada e secas com papel-toalha antes de iniciar o processo de extração do DNA.
- A maceração dos tecidos foi realizada em cadinho com auxílio de pistilo na presença de nitrogênio líquido, acrescido de 0,10 g de PVPP e 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mecaptoetanol até a formação de um pó.
- Foram transferidos para um tubo tipo Falcon de 15 mL 5 g do macerado e adicionou-se 5 mL de tampão de extração (tampão CTAB) contendo 1,4 M de NaCl, 20 mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) pH 8,0, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1% de PVP e 0,2% de CTAB.
- Os tubos foram agitados por 5 minutos e incubados em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, sendo homogeneizados a cada 10 minutos.

- Após a incubação por 60 minutos, adicionou-se igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v), homogeneizado por 5 minutos e centrifugado novamente por duas vezes a 10 mil rpm por 10 minutos.
- O sobrenadante foi transferido para novo tubo tipo Falcon e adicionou-se igual volume de álcool 95% para a precipitação do DNA. Os tubos foram mantidos em -20 °C por 24 horas e centrifugados por 10 mil rpm durante 10 minutos, antes do descarte do sobrenadante.
- O *pellet* foi lavado com etanol 70% (v/v), centrifugado por 10 mil rpm durante 10 minutos e seco em estufa a 37 °C durante 30 minutos. O DNA foi ressuspenso em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA) contendo RNase, antes de ser congelado.
- Uma alíquota do DNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e comparada com amostras do DNA do fago lambda ( $\lambda$ ) em três concentrações (50 ng/µL, 100 ng/µL e 150 ng/µL) para confirmar a integridade das amostras.

As concentrações das amostras de DNA obtidas foram avaliadas em

espectrofotômetro Biodrop µLite a 260 nm, e a pureza foi medida com a relação entre as medidas de absorvância a 260 nm e 280 nm. Para a análise espectrofotométrica, as amostras foram diluídas (1:50) em tampão TE.

Após a quantificação em espectrofotômetro, foi retirada uma alíquota de DNA de cada uma das espécies, as quais foram diluídas para a concentração final de trabalho de 10 ng/µL para uso nas reações de amplificação por PCR por meio do uso de *primers* randômicos (RAPD). O volume final de reação foi de 20 µL, sendo: 1,5 µL do DNA; 3,5 µL (1 mM) do *primer* RAPD OPA-07 (5' - GAAACGGGTG - 3') ou 3,5 µL (1 mM) do *primer* RAPD OPA-15 (5' - TTCCGAACCC - 3'); 1,5 µL de dNTP (10 mM); 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 2,0 µL do tampão da enzima 10X; 11,3 µL de H<sub>2</sub>O e 0,2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen).

A PCR foi feita em termociclador PTC-200 thermocycler (MJ Research), usando as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 37 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um passo final de 72 °C por 7 minutos. Uma alíquota de cada uma das reações de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corada com brometo de etídio (0,5 mg/mL) para confirmar a amplificação das amostras de DNA.

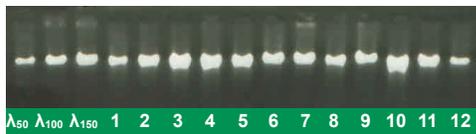
Esse protocolo foi realizado com sucesso para as espécies, usando o método descrito, exigindo poucos reagentes e apresentando facilidade para ser conduzido em laboratórios. Ao processo de maceração foi acrescentado

0,10 g de PVPP para facilitar a maceração dos tecidos e evitar excesso de oxidação destes, juntamente com os 100  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol que foram acrescidos ao tampão de extração/homogeneização, para maximizar a eficiência do processo. Além disso, a atividade da polifenol oxidase foi reduzida em razão do pH alcalino do tampão de homogeneização. O acréscimo de PVPP foi necessário para a extração de DNA de tecidos foliares das espécies de piperáceas usadas neste estudo, já que sua eliminação resultou na obtenção de DNA degradado, demonstrando a ineficiência do protocolo inicial.

Nesse protocolo, apenas foi utilizado CTAB, clorofórmio e álcool isoamílico para atuarem na dissolução de membranas e promover a eliminação de proteínas desnaturadas, lipídeos e restos celulares. Diferentemente do protocolo sugerido por Doyle e Doyle (1990), a incubação em banho-maria ocorreu no dobro do tempo utilizado pelos autores. Clorofórmio e álcool isoamílico foram suficientes para precipitar quantidades pequenas de polissacarídeos, o que resultou numa melhor condição de integridade das amostras de DNA. Observou-se a obtenção de amostras de DNA com qualidade e bem concentradas, o que demonstrou a eficiência do protocolo modificado (Figura 1).

Pela análise espectrofotométrica a 260 nm, após tratamento com RNase, foi constatado que o método produziu grandes quantidades de DNA (2.383 ng/ $\mu\text{L}$ ), reforçando que o novo protocolo foi eficaz em promover a precipitação de ácidos nucleicos livres de contaminantes celulares. A pureza

(razão) 260/280 variou de 1,859 a 2,932 (Tabela 1), sugerindo que o DNA pode ser utilizado em análises mais sensíveis.



**Figura 1.** Visualização em gel de agarose da qualidade das amostras de DNA das 12 espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia e obtidas de folhas jovens, após realização do protocolo de extração.  $\lambda_{50}$   $\lambda_{100}$   $\lambda_{150}$ : DNA do fago  $\lambda$  nas concentrações de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 100 ng/ $\mu\text{L}$  e 150 ng/ $\mu\text{L}$ , respectivamente; 1-12: *Piper tuberculatum*, *P. arboreum*, *P. hispidum*, *P. aduncum*, *P. alatipetiolatum*, *P. colubrinum*, *P. peltatum*, *P. allosum*, *P. marginatum*, *P. montealegreanum*, *P. divaricatum*, *P. schwakei*.

A amplificação do DNA em PCR usando primers RAPD demonstra que o novo protocolo foi capaz de extrair DNA íntegro e não degradado, o que permitiu que os primers se anelassem em diversos pontos do DNA fita simples, o que pode ser observado pela obtenção dos múltiplos produtos de amplificação nas amostras. Foi possível obter, no mínimo, duas bandas de comprimentos distintos para cada amostra utilizada, o que confirma a qualidade do DNA obtido com o uso do protocolo (Figura 2). Não foi possível a obtenção de produtos de amplificação utilizando o primer OPA 07 nas amostras de DNA provenientes de *P. marginatum* e *P. schwakei*, as quais foram submetidas à amplificação com o uso do primer OPA-15, confirmando a eficiência do protocolo de extração para as 12 espécies de piperáceas avaliadas nesse estudo.

**Tabela 1.** Quantificação espectrofotométrica das amostras de DNA de 12 espécies do gênero *Piper* extraídas de folhas jovens.

Espécie de <i>Piper</i> sp.	Total de DNA (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>
<i>P. tuberculatum</i>	261,1	2,194
<i>P. arboreum</i>	567,5	2,580
<i>P. hispidum</i>	725,9	2,063
<i>P. aduncum</i>	850,8	2,076
<i>P. alatipetiolatum</i>	574,2	2,117
<i>P. colubrinum</i>	399,4	2,202
<i>P. peltatum</i>	1.320,0	1,935
<i>P. allosum</i>	705,3	2,079
<i>P. marginatum</i>	2.383,0	1,859
<i>P. montealegreanum</i>	570,8	2,100
<i>P. divaricatum</i>	1.835,7	1,979
<i>P. schwakei</i>	385,4	2,932

Foto: Eduardo Filipe Torres Vieira



**Figura 2.** Visualização em gel de agarose dos produtos da PCR obtidos nas amostras de DNA das 12 espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia, utilizando os *primers* OPA-07 e OPA-15. Os números indicam as espécies usadas no estudo, segundo a ordem (1-12): *Piper tuberculatum*, *P. arboreum*, *P. hispidum*, *P. aduncum*, *P. alatipetiolatum*, *P. colubrinum*, *P. peltatum*, *P. allosum*, *P. marginatum*, *P. montealegreanum*, *P. divaricatum*, *P. schwakei*.

Tomados em conjunto, pode-se considerar que os resultados confirmaram a viabilidade do protocolo

apresentado aqui, facilitando futuras investigações envolvendo estudos de genomas, filogenia, DNA barcodes e marcadores moleculares das referidas espécies. Esse protocolo também poderia ser útil para outras espécies do gênero *Piper* contendo níveis elevados de compostos oxidáveis, como o acúmulo de compostos fenólicos, encontrado em *P. cernuum* Vell.; *P. dilatatum* Rich; *P. glabratum* Kunth; *P. gaudichaudianum* Kunth; *P. hispidinervum* C. DC.; *P. lindbergii* C. (Gogosz et al., 2012).

Embora existam vários protocolos de isolamento de DNA de planta, foi possível padronizar a extração para essas espécies do gênero *Piper* nativas da Amazônia, pois o protocolo testado com as modificações feitas mostrou-se eficiente, o que trará avanços aos estudos moleculares dessas espécies.

## Referências

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: University Press, 1981. 1262 p.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1974. v. 5.

DEHESTANI, A.; TABAR, S. K. K. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 6, p. 977-981, 2007.

DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M. dos; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Ed. UNESP, 1989. 194 p. il. (Natura naturata).

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n. 1, p.13-15, 1990.

GOGOSZ, A. M; BOEGER, M. R. T; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

MELLO, M. A. R. Morcegos gostam de pimentas. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 189, p. 74-76. 2002.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. J. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 43 p.

SILVA, M. N. da. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil **Hoehnea**, v. 2, p. 19-366, 1972.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Oriental**

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n  
CEP 66095-903, Belém, PA  
Fone: (91) 3204-1000  
www.embrapa.br

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicação

Presidente

*Bruno Giovany de Maria*

Secretária-Executiva

*Ana Vânia Carvalho*

Membros

*Alfredo Kingo Oyama Homma, Alysson Roberto Baizi e Silva, Andréa Liliane Pereira da Silva, Luciana Gatto Brito, Michelliny Pinheiro de Matos Bentes, Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana, Patricia de Paula Ledoux Ruy de Souza*

Supervisão editorial e revisão de texto

*Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana*

Normalização bibliográfica

*Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves (CRB 2-495)*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Tratamento de fotografias e editoração eletrônica

*Vitor Trindade Lôbo*

Fotos da capa

*Simone de Miranda Rodrigues*