OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM *Physalis* L.

André Pinto Lima¹; Adriana Rodrigues Passos²; Hortência Kardec da Silva³; Rafael Cruz Cordeiro⁴

1. Bolsista, PROBIC/UEFS, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andre8fs@hotmail.com

2. Professora Adjunta, Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana e-mail: adrianarpassos@yahoo.com.br

3. Mestre em Recurso Genético Vegetal, Co-orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hortenciakardec@hotmail.com

4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rccordeiro12@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Quantificação de DNA, Variabilidade genética, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

O gênero *Physalis* L., pertence à família das solanáceas, e corresponde a um grupo com espécies economicamente importantes como o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e a batata (*Solanum tuberosum* L.). As espécies, pertencentes ao gênero, são importantes porque fornecem frutos comestíveis e uma grande diversidade de bio-produtos, que têm um amplo espectro de atividades biológicas. Diante da importância da cultura tornam-se necessários estudos moleculares para analisar a diversidade genética, pois a quantificação da variabilidade genética auxilia no planejamento de estratégias mais eficazes que venham a maximizar a utilização dos recursos genéticos com vista a sua conservação (SILVA, 2014).

No entanto, estudos moleculares dependem diretamente da qualidade do DNA extraído, portanto a otimização e estabelecimento de protocolos de extração são necessários visto que, um bom procedimento de extração deve produzir DNA de qualidade e quantidades adequadas para manipulação (ROMANO, 1998). As técnicas de quantificação fornecem informações importantes, tendo em vista que podem revelar a qualidade da amostra de DNA, isenta ou não de contaminação por proteínas. A otimização de protocolos de extração de DNA para caracterização genética é um passo necessário no campo da biologia molecular. Segundo Chiari et al. (2009), os métodos convencionais de extração de DNA são executáveis em todas as espécies, sendo necessário adaptações e modificações de acordo com o organismo trabalhado. Os ajustes de protocolo são feitos para que a extração de DNA seja simples, rápida e de baixo custo e obtenham-se DNA de qualidade para análises moleculares (DANNER et al., 2011). A extração de DNA é a primeira etapa para a utilização de genomas em diferentes técnicas da genética molecular, e a sua pureza e qualidade são sempre os pré-requisitos principais (ARBI et al., 2010).

Assim, o trabalho proposto tem por objetivo testar protocolos de extração de DNA e estabelecer o que apresente uma maior quantidade e qualidade de DNA genômico de *Physalis*, para fins de análise de divergência genética via marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) da Unidade Experimental Horto Florestal, pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As sementes de *Physalis* foram semeadas em casa de vegetação e transplantadas com aproximadamente 40 dias para campo com adubação adequada. Para a extração do DNA, folhas jovens foram coletadas, desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%. Foram testados dois protocolos de extração de DNA.

Teste de Protocolos e Métodos de Extração - Foram testados dois protocolos para extração de DNA, o proposto por Doyle e Doyle (1990) e Santos (2017), em vias de publicação. Foram testados métodos de maceração com nitrogênio líquido, maceração direta no tampão de extração e maceração em areia na presença do tampão de extração. Ainda, serão realizados testes a fim de determinar a melhor forma de armazenamento do material vegetal, sendo utilizadas amostras do material vegetal fresco, armazenado em freezer e em sílica gel.

Protocolo 1. Doyle e Doyle (1990) - Cerca de 300 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido e transferidos para tubos de microcentrífuga de 2 mL. Foram adicionados ao material 800 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,3 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). Incubou-se a 70°C por 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 minutos, foi realizada a desproteinização, adicionando-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico. Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 minutos e centrifugadas a 4°C, a 18,845 g, por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2 mL, foram adicionados 55 µL de CTAB 2%, e o processo de desproteinização foi repetido, acrescentando-se o mesmo volume de clorofórmio-álcool isoamílico. Para a precipitação do DNA, foram adicionados ao sobrenadante 700 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em temperatura ambiente, por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 150 µL de água contendo RNase na concentração de 40 µg/mL e colocados em banho-maria, a 37°C por 60 minutos, para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 150 µL de água como já descrito. A conservação do DNA extraído foi feita a -20°C.

Protocolo 2. Santos et al (2017, no prelo) - Cerca de 0,3 gramas foram macerados de tecido vegetal com 3 ml de tampão de extração (CTAB 10%; NaCl 5M; Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M; Na Sulfite, PVP (Polivinilpirrolidona) e água mili-Q - mantido a 65°C) em um saco plástico. Assim transferidos 2 ml do macerado para tubos de 2 ml, sendo misturados por inversão e incubados por 30 minutos em banho-maria a 65°C, agitando a cada 10 minutos. Ao atingir o tempo, os tubos foram centrifugados a 10000 RPM a temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2 ml. Foram adicionados 800 µL de álcool Isoamílico e misturado por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 RPM a temperatura ambiente. Após coletado o sobrenadante houve a transferência para novos tubos de 1,5 ml. Adicionando 600 µL de álcool Isopropílico (gelado), equivalente a aproximadamente a 2/3 do volume coletado, sendo homogeneizado suavemente e incubado a -20°C por 30 minutos. Foram centrifugados a 10000 RPM a 4°C por 10 minutos e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%, assim deixando secar o pellet formado. O DNA isolado foi ressuspendido em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM), (RNase – 1 µL amostra) e as amostras foram colocadas na estufa a 37°C para a completa solubilização de DNA, por 30 minutos. O DNA concentrado foi conservado a -20°C.

Avaliação do DNA obtido - Após a extração do material genético, foi realizada a diluição do DNA com o uso de TE gelado. Em seguida, realizou a verificação da qualidade e quantidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, as amostras foram coradas com GelRed, e a eletroforese a uma voltagem igual a 60W por 1 hora. As amostras foram visualizadas através do sistema de fotodocumentação. A

quantificação do DNA foi realizada por comparação com o DNA Fago lambda de concentração conhecida. Após quantificação, as amostras tiveram a sua concentração ajustada para 5ng/μL por diluição em tampão TE e foram verificadas, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao visualizar o perfil eletroforético das amostras foi possível verificar que apenas um dos protocolos testados foi eficiente para isolamento de DNA de *Physalis* L. em quantidade adequada para estudos moleculares, tendo sido detectadas diferenças nos dois protocolos utilizados. O protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) se mostrou insatisfatório para a extração de DNA de *Physalis* L., tanto em relação à quantidade quanto à qualidade do DNA isolado, uma vez que este se apresentou totalmente danificado em todas as amostras (Figura 1).

Figura 1: Análise Eletroforética do DNA genômico de *Physalis* L. utilizando o protocolo de Extração do DNA, Doyle e Doyle (1990). Amostras aplicadas com volume de 5μL. Amostras de genótipos da Unidade Experimental Horto Florestal.

O protocolo 2, Santos et al. (2017, no prelo), produziu DNA de boa qualidade para todas as formas de armazenamento do material vegetal testadas (material vegetal fresco, armazenado em freezer e em sílica gel) para *Physalis* L., não havendo contaminação e degradação (Figura 2). Segundo Romano e Brasileiro (1999) essa boa qualidade é definida pela falta de DNA confinado no poço e de arraste vertical no gel, na devida ordem. A liberação de DNA também foi favorecida pela maceração das folhas com o tampão onde foi acrescentada uma maior quantidade em porcentagem de CTAB (tampão de extração), este protocolo decorreu de modificações nas etapas de maceração e na maior porcentagem do CTAB (tampão de extração), possibilitando a obtenção de materiais com melhor qualidade e quantidade do que foi encontrado no protocolo anterior.

Figura 2: Análise Eletroforética do DNA genômico de *Physalis* L. utilizando o protocolo de Extração do DNA, Santos et al (2017, no prelo). Amostras aplicadas com volume de 5μL. Amostras de genótipos da Unidade Experimental Horto Florestal.

O aumento da concentração de CTAB no tampão apresentou melhor quantidade e qualidade do DNA extraído (Figura 2). O procedimento com CTAB tem sido muito empregado para extração de tecidos frescos e diversos protocolos têm sido apresentados para esse propósito, (Machado, 1990). O tampão com o CTAB na concentração de 10% foi eficiente para a extração de DNA no protocolo 2 quando comparado com o tampão de extração de concentração de 5% de CTAB do protocolo 1. Protocolos que utilizam CTAB na extração tem o efeito de proporcionar a degradação dos ácidos nucleicos dos polissacarídeos, já que os polissacarídeos possuem dissolução específica na presença desse detergente (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Autores como Schmitt et al. (2014) e Ferreira et al. (2008), testaram concentrações de CTAB (2% e 5%) e verificaram que apenas na concentração de 5% houve isolamento de DNA, sendo que Schmitt et al. fazendo extração de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) observaram que a concentração de 2% não foi eficaz e resultado semelhante foi encontrado por Ferreira et al. (2008), que afirmam que com a utilização de CTAB a 2% não houve isolamento de DNA de buriti na extração. Segundo Silva et al. (2014) utilizando o CTAB a 5% a uma maior eficiência na extração de DNA de *Anacardium giganteum* utilizando folhas jovens. Neste trabalho destaca-se que a concentração de CTAB de 10% obteve uma melhor eficiência no processo de extração.

Analisando a totalidade e qualidade dos DNAs extraídos, verificada pela eletroforese em gel de agarose, apresentada nas Figuras 1 e 2. Foram obtidas amostras íntegras de DNA através do protocolo 2 para as amostras analisadas, pois não se notou arraste vertical dos DNAs no gel, em grandes proporções que pudessem afetar a qualidade do material extraído.

CONCLUSÕES

O protocolo 2 foi mais eficiente na extração de DNA de folhas de *Physalis* L., revelando grande potencial para extrair DNA genômico de boa qualidade e quantidade. Ademais, esse protocolo apresenta custo menos elevado, sendo uma alternativa viável para uso rotineiro.

REFERÊNCIAS

- ARBI, G. et al. **A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae).** Afr. J. Biotechnol, 2010.
- CHIARI, L. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*.** Circular Técnica – Embrapa. Campo Grande, MS, 2009.
- CHAVES, A.C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. na região de Pelotas-RS.** 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- DANNER, M. A. et al. **Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira,** Ciência Florestal, Santa Maria, 2011.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 1990.
- FERREIRA, M. F. M.; PIMENTA, M. A. S.; JÚNIOR, A. F. M.; TISSOT, S. A.; FERREIRA, P. H. G.; VALÉRIO, H. M.; OLIVEIRA, D. A. **Avaliação da eficiência de três metodologias de extração de DNA do buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) a partir de folhas e caule.** In: IX Simpósio Nacional do Cerrado. Brasília, 2008.
- MACHADO, M. A. Isolation of DNA from Frech Tissue: **Focus**, 1990.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, 1999.
- SANTOS, R. M. F. et al. A PROTOCOL FOR LARGE SCALE GENOMIC DNA ISOLATION FOR CACAO GENETICS ANALYSIS. **African Journal of Biotechnology**. 2014.
- SILVA, B. M.; DALBOSCO, E. Z.; BOTINI, N.; FARIA, R. B.; ROSSI, A. A. B. Protocolo para extração de DNA genômico de *Anacardium giganteum* W. Hancock Ex. Engl. (Anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, 2014.
- 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**, Goiânia, 2014.