

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM *PHYSALIS IXOCARPA* E *PHILADELPHICA*

Gabriela Barreto Mota¹; Adriana Rodrigues Passos² Keylla Souza dos Santos³:

1. Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: gabi_118b@outlook.com

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

3. Doutora em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: keyllasouzas@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Quantificação; Protocolos; Extração de DNA.

INTRODUÇÃO

O gênero *Physalis* L. pertence à família Solanaceae e possui cerca de 90 espécies americanas, com exceção da espécie euroasiática *Physalis alkekengi* L. (Whitson e Manos, 2005). Apesar de seu cultivo não ser tão difundido quando comparado ao de outras frutíferas, de acordo com a literatura, algumas espécies desse gênero apresentam boas perspectivas de comercialização, tanto nacional quanto internacionalmente, em virtude, principalmente, do seu elevado conteúdo nutricional e das propriedades medicinais, capazes de proporcionar diversos benefícios à saúde humana. A *P.philadelphica* Lam, é largamente utilizada no setor alimentício, onde seus frutos se destacam como importantes ingredientes na culinária internacional. De acordo com Nee (1986), em alguns lugares do México, o fruto dessa planta é mais utilizado na culinária do que o tomate tradicional (*Lycopersicon esculentum*). Apesar da relativa escassez de informações sobre esse gênero, o número de estudos que vêm sendo desenvolvidos na tentativa de explorar o potencial nutracêutico que essas plantas apresentam é crescente, evidenciando a potencial relevância do gênero *Physalis* para a sociedade.

O melhoramento genético objetiva a melhoria de caracteres qualitativos e quantitativos, e para isso, busca-se quantificar e ampliar a variabilidade genética das espécies estudadas. Devido à importância da biotecnologia como ferramenta para auxiliar o programa de melhoramento genético de uma espécie, faz-se necessário o conhecimento sobre a constituição genética dos indivíduos, para que se possa realizar modificações desejadas, como seleção de caracteres de interesse. À vista disso, a primeira etapa para a análise inicial do genótipo e sua posterior manipulação, consiste na extração de DNA, que é o primeiro passo para utilizá-lo em técnicas moleculares. Ademais, para que as etapas subsequentes do estudo molecular obtenham êxito, o principal requisito que deve existir refere-se à qualidade do material extraído. Por conta disso, existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado, além da possibilidade da realização de ajustes nesses protocolos, visando uma otimização dos mesmos, e uma melhor adequação ao experimento (COSTA, 2001). Sabendo da importância atribuída às espécies do gênero *Physalis*, este trabalho objetivou a realização de ajustes nos protocolos de extração de DNA das espécies de *Physalis ixocarpa* e *Physalis Philadelphica*, a fim de obter DNA em boa quantidade e qualidade, com a finalidade de selecionar genótipos promissores para serem utilizados em futuros trabalhos de melhoramento genético com estas espécies.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Horto Florestal, do Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, localizada na cidade de Feira de Santana. A obtenção do material vegetal se deu através do plantio das sementes de *Physalis ixocarpa* e *philadelphica* em casa de vegetação, onde estas foram transplantadas com aproximadamente 40 dias para vasos com capacidade de 10 litros, contendo Terra vegetal e o substrato comercial Techns Vivato® (casca de pinus bio-

estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica) na proporção 3:1. Após o transplântio, quando as plantas apresentaram um bom desenvolvimento foliar, algumas folhas jovens foram coletadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% para que se realizasse a extração do DNA.

Extração do DNA vegetal

Foram testados dois protocolos de extração a fim de estabelecer o que apresentasse uma maior quantidade e melhor qualidade de DNA. Os protocolos utilizados foram:

A - Doyle e Doyle (1990), onde foram pesados 300 mg de tecido foliar de diferentes progênies das duas espécies. As amostras foram maceradas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, sendo, em seguida, transferidas para microtubos de 2 mL e congelados. Posteriormente, adicionou-se 700 µL da solução tampão de extração (CTAB a 2,0%, NaCl a 1,4 M, Tris HCl a 0,1M pH 8,0, EDTA a 20mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP (Polivinilpirrolidona) 1,0% e água purificada) aos macerados. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C e homogeneizada em intervalos de 15 minutos, suavemente, por inversão. Em seguida, o material foi retirado do banho-maria e adicionado ao sobrenadante 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1). As amostras sofreram homogeneização suave e foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante coletado foi transferido para novos microtubos de 2mL, onde adicionou-se 700 µL de clorofórmio e, novamente, houve a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Seguidamente, o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos microtubos de 2 mL, onde foram adicionados 450 µL de álcool Isopropílico (gelado), aproximadamente 2/3 do volume coletado, homogeneizado suavemente e incubado a (-20°C) por 20 minutos. O material retirado do *freezer*, foi levado para centrifuga, onde permaneceu por 10 minutos a 12.000 rpm e, em seguida, o DNA isolado foi ressuspense em 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adição de 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M. Os tubos foram incubados no gelo por 15 minutos. Novamente, realizou-se uma nova centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 mL, sendo adicionado a este 800 µL de etanol absoluto, sendo misturado suavemente por inversão e incubado por 1 hora a -20°C, e passando por uma nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. Após a lavagem do precipitado com etanol 70% gelado (v/v) (500 µL) e centrifugação novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos, o precipitado foi posto para secar à temperatura ambiente, durante 20 minutos, e ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1 µL de RNase (10 mg/ml), e incubado a 37°C por 1 hora. O armazenamento do DNA ocorreu no *freezer* a -20° C.

B - SANTOS (2016), em vias de publicação: foram pesados 300 mg de tecido foliar de cada genótipo. As amostras foram maceradas em sacos plásticos na presença de 2mL de tampão de extração (CTAB a 2,0%, NaCl a 1,4 M, Tris HCl a 100 mM pH 8,0, EDTA a 50mM, Na Sulfito 1%, PVP (Polivinilpirrolidona) 2,0% e água mili- Q) e em almofariz contendo areia e tampão de extração. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL, os quais, foram encubados a 65°C por 3 minutos, e, em sequência, centrifugados a 10.000 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse processo, coletou-se 1 mL do sobrenadante, que foi transferido para novos microtubos de 2 mL, sendo adicionado 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras sofreram homogeneização por inversão e, passaram pelo processo de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. Ao sobrenadante coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL, foi adicionado 600 µL de álcool isopropílico gelado. Após homogeneização e incubação das amostras à -20° C por 30 minutos, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 500 µL de álcool 70% gelado, sendo o *pellet* posto para secar por, aproximadamente, 20 minutos, em seguida, ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris- HCL

10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM +RNase 1 µL por amostra). Para total solubilização da amostra, o precipitado foi emergido em banho-maria a 37°C por 35 minutos. O armazenamento do DNA concentrado ocorreu à uma temperatura de -20°C.

Outros métodos de maceração foram utilizados, como o método com nitrogênio líquido, o de maceração direta no tampão de extração. As amostras do material vegetal fresco testadas, foram armazenado em freezer e em sílica gel. Os géis fotodocumentados foram armazenados para quantificação e utilização em análises de divergência genética via marcadores moleculares ISSR.

Quantificação e ajuste da concentração do DNA genômico

Para a realização da quantificação do material genético extraído foi utilizada a técnica de eletroforese em gel, que consiste na separação de moléculas atraindo-as de acordo com a sua carga parcial para polos carregados positivamente ou negativamente. A separação das moléculas submetidas a esse procedimento é determinada pela densidade do gel utilizado e pelo peso de tais moléculas analisadas. Sendo assim, moléculas de menor massa são atraídas mais facilmente pela carga oposta à sua, logo deslocam-se com maior velocidade pelo gel, no contrário, moléculas mais pesadas deslocam-se em uma velocidade menor em direção a carga oposta.

As amostras foram preparadas contendo 5 microlitros de tampão da amostra (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol) e 3 microlitros do DNA extraído. Em seguida, foi realizada a verificação da qualidade e quantidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com gelRed, imerso em tampão TBE 1X, com uma voltagem igual a 60 W por 1 hora que foram visualizadas através do sistema de fotodocumentação. A quantificação do DNA foi feita por comparação com o DNA lambda de concentração conhecida. Após quantificação, as amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 5ng/µL por diluição em tampão TE (Tris HCl 10mM, pH = 8,0; EDTA 1,0 mM) e verificadas, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima. O material pronto foi acondicionado em ultra freezer (-80° C) até o momento de sua utilização para a aplicação de marcadores ISSR por meio da técnica de reação PCR (Reação de Polimerização em Cadeia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois protocolos utilizados apresentaram-se eficientes na extração de DNA de *P. ixocarpa* e *P. philadelphica*. Apesar do protocolo Doyle e Doyle (1990) ter apresentado uma quantidade maior de DNA extraído, o protocolo desenvolvido pela Embrapa também apresentou quantidade suficiente de DNA para a amplificação via marcadores moleculares ISSR, e com a vantagem de não utilizar o nitrogênio líquido e o reagente 2-mercaptoetanol, reduzindo assim o custo da extração e redução de riscos a saúde, pelo fato deste último reagente ser altamente tóxico quando ingerido, inalado ou ao entrar em contato com a pele. Pôde-se observar uma pequena degradação do DNA nas amostras maceradas, em sacos, na presença do tampão em relação as amostras maceradas no nitrogênio líquido. Foram obtidas amostras com DNA de boa qualidade e quantidade, principalmente para os métodos de extração com maceração do material vegetal na presença de nitrogênio líquido e diretamente no saco na presença do tampão de extração (Figuras 1). O material fresco apresentou DNA com melhor quantidade e qualidade, entretanto o armazenamento em sílica também apresentou uma boa alternativa de conservação do material.

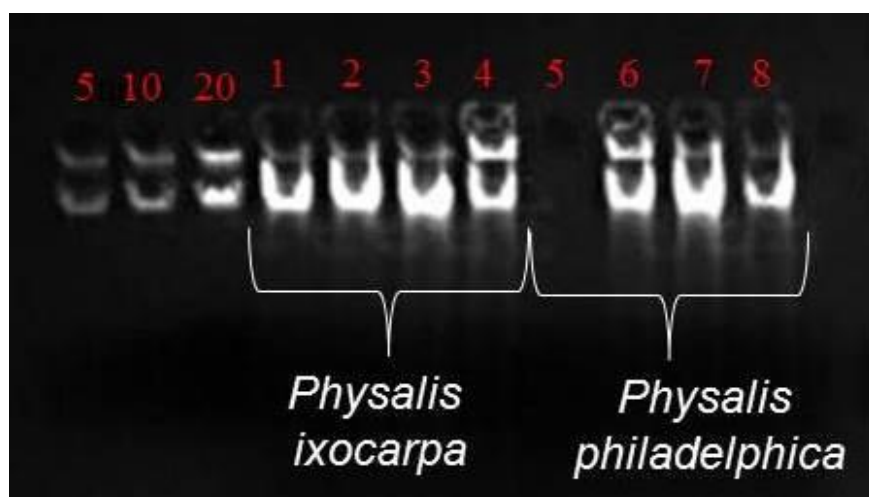


Figura 1: Extração de DNA de *P. ixocarpa* e *P. philadelphica* obtidas utilizando o protocolo Doyle e Doyle (1990). Feira de Santana/BA, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à importância da biotecnologia como ferramenta para auxiliar o programa de melhoramento genético, no que se refere à melhoria de caracteres qualitativos e quantitativos das espécies e a dependência que os estudos de diversidade genética apresentam quanto à qualidade do DNA extraído, a otimização e o estabelecimento de protocolos de extração são fundamentais, uma vez que, metodologias adequadas de extração proporcionarão a obtenção de DNA de boa qualidade e em quantidades adequadas para manipulação, repercutindo eficientemente nas demais etapas que são dependentes desta.

REFERÊNCIAS

- BARROSO, S. N. **Maturação de frutos e viabilidade de sementes de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hormen.** 2015. 39 f. Tese (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana. 2015.
- COSTA, M.R.; MOURA, E.F. Manual de extração de DNA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).
- CUNHA, S.S; LIMA, P.R.L. 2006. **Influência do tipo de reforço no comportamento à flexão de painéis laminados.** In: XI Seminário de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana, p.21-22.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L.; HORTORIUM, L. H. B.; **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.
- FERREIRA, Márcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- NEE, M., 1986. Solanaceae I (IV). En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 49. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
- SILVA, A. H. B. **Seleção e variabilidade Genética para caracteres qualitativos e quantitativos em progênie de *Physalis angulata* L. (Solanaceae),** 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica), UEFS, Feira de Santana. 78 p.
- SILVEIRA, L.T. 1991. Revisão taxonômica do gênero *Periandra* Mart. ex Benth. Univ. Estadual de Campinas, MSc diss.
- TANAN, T. T. **Fenologia e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano.** 2015. 46 f. Tese (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana. 2015.