



## ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Annona mucosa*

*Edilson Marques Junior*<sup>1</sup>, *Rodrigo Monte Lorenzoni*<sup>2</sup>, *Taís Cristina Bastos Soares*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Agronomia, Alto Universitário, 29500-000 Alegre ES, Brasil, edilsonmarquesjr@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo /Pós-graduação em Produção Vegetal, Alto Universitário, 29500-000 Alegre ES, Brasil, rodrigomlorenzoni@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/ Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, 29500-000 Alegre ES, Brasil, tcbsoares@yahoo.com.br

**Resumo** – O biribazeiro é uma frutífera cujo os frutos apresentam boa aceitação popular e possui importância medicinal, onde tem-se buscado conhecer grupos de metabólitos com propriedades medicinais, bem como elucidar suas características de porta enxerto para outras anonáceas. A espécie vem apresentando demanda crescente, sendo necessário selecionar variedades com maior potencial produtivo. O uso de marcadores moleculares no auxílio aos novos programas de melhoramento, tem proporcionado grande vantagem na seleção de cultivares. A extração do DNA de qualidade para análises moleculares consiste em uma importante etapa fundamental, tornando necessário estabelecer metodologias eficientes para a execução deste procedimento. Objetivou-se com este trabalho comparar a quantidade e qualidade do DNA extraído de folhas e sementes de biribá, a partir de dois protocolos diferentes. A melhor qualidade de DNA foi obtida a partir da extração das folhas de biribá, utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações.

**Palavras-chave:** *biribá, relação 260/280 nm, PCR.*

### Introdução

O biribazeiro *Annona mucosa* (Jacq.) é uma árvore frutífera, cujo os frutos são consumidos *in natura* e possuem grande aceitação popular, principalmente na região norte do Brasil (FERREIRA et al., 2010).

Estudos com biribá tem buscado elucidar características de importância nessa espécie, como a presença de metabólitos com propriedades medicinais e a sua capacidade como porta-enxerto de outras espécies de anonáceas cultivadas, como a gravioleira (LORENZI, 2002). Apesar do cultivo de biribá ser uma realidade e apresentar demanda crescente devido ao aumento do consumo de espécies consideradas exóticas, existe a necessidade de seleção de variedades com maior potencial de produção (LORENZI, 2002).



28ª SEAGRO

O uso de abordagens biotecnológicas, como marcadores moleculares no auxílio aos novos programas de melhoramento tem proporcionado vantagens na seleção de cultivares, em relação ao melhoramento convencional, como menor tempo para seleção e a possibilidade acessar o genótipo do indivíduo a nível de DNA (TOPPA & JADOSKI, 2013). Para tanto, a obtenção de DNAs de boa qualidade para a realização das análises moleculares é fundamental, tendo em vista que DNA de má qualidade pode influenciar negativamente em todas as demais etapas subsequentes do processo (AGBAGWA, 2012).

Portanto, objetivou-se com este trabalho comparar a qualidade do DNA obtido a partir de sementes e folhas de biribá, por meio de diferentes protocolos de extração, e selecionar o melhor protocolo e tipo de tecido vegetal para obtenção de DNA de qualidade para análises moleculares.

## **Metodologia**

As folhas frescas e os frutos para extração das sementes foram coletados de acessos de biribá localizados na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES).

A extração do DNA foi feita por meio de dois diferentes protocolos de extração (1) Doyle e Doyle (1990) com modificações e (2) protocolo proposto por Rogers e Bendich (1988) com modificações realizadas por Teles e Isabel (2016). Para cada protocolo foram extraídos o DNA de sementes e folhas, com cinco repetições, constituindo 4 tratamentos.

No protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com as alterações proposta pelos presentes autores, onde as modificações foram: aumento de duas etapas de lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) e uma com tampão de extração juntamente com CIA, retirada da etapa de overnight e adição de acetato de amônio  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  para precipitação do DNA, obedecendo a seguinte sequência: 300 mg de tecido vegetal foi macerado, e transferido para tubos de 2 ml, em seguida adicionou-se  $700 \mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB 2 % w/v, Tris-HCl  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 8.0), EDTA  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 8.0), NaCl  $1.4 \text{ mol.L}^{-1}$ , PVP 1 % w/v,  $\beta$ -mercaptoethanol  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , e foram homogeneizados em vórtex. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho maria a  $65^\circ\text{C}$  por 30 minutos, sendo homegeneizada a cada 10 minutos. Após, foi adicionado  $650 \mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) 24:1, e levado à centrifuga por 10 minutos a 12000 rpm, coletando o sobrenadante e transferindo-o para um novo tubo de 2 mL. A adição de CIA e centrifugação foi feita mais uma vez. Após, a fase aquosa formada foi coletada e transferida para outro tubo de 2 mL, o qual foi adicionado  $200 \mu\text{L}$  do tampão de extração e  $650 \mu\text{L}$  de CIA, homegeneizando até formar uma emulsão, e



28ª SEAGRO

centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm novamente e a fase aquosa coletada e transferida para um tubo de 2 mL. Neste, novamente foram adicionados 650 $\mu$ L de CIA, as amostras homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm. A fase aquosa formada foi transferida para um tubo de 1,5 ml, onde foi feita a precipitação do DNA com 1 volume de isopropanol gelado + 230  $\mu$ L de Acetato de amônio 1 mol.L<sup>-1</sup> e homogeneizado. Novamente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, o pellet formado foi lavado com álcool 70% e secado a temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi ressuscitado em 100  $\mu$ L de TE com RNase (40  $\mu$ g/mL) e deixado em banho maria a 37 °C por 30 min. Para extração com o protocolo Rogers e Bendich (1988) as etapas seguiram as modificações propostas por Teles e Isabel (2016).

A qualidade e quantidade do DNA extraído foi verificada em NanoDrop® (Thermo Scientific).

### **Resultados e Discussão**

As maiores concentrações de DNA foram obtidas a partir do protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com as modificações, onde os valores médios foram de 816,025 ng/ $\mu$ L e 705,12 ng/ $\mu$ L, para sementes e folhas respectivamente. No entanto, ao analisar a pureza do DNA obtido, relação da absorvância (260/280nm e 260/230nm), verificou-se que o DNA extraído das folhas apresentou melhor qualidade que o DNA extraído das sementes, 2,00 e 0,88, respectivamente. Portanto, os valores para folhas ao observar a relação 260/280nm, ficaram dentro da faixa ideal para os dois protocolos, sendo 2,00 quando usado o protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado e 1,98 para o descrito por Rogers e Bendich (1988), enquanto que os DNAs extraídos das sementes apresentaram qualidade inferior 0,89 e 0,9, respectivamente. Para a relação 260/230nm, foi verificado valores de 1,81 e 1,52 para as folhas, e de 0,32 e 0,26 para as sementes, na mesma sequência para os protocolos acima. Segundo LUCENA-AGUILAR et al. (2016), valores ideais de pureza para a relação 260/280nm devem estar entre 1,8 e 2,0, enquanto que para a relação 260/230nm são esperados valores entre 1,6 e 1,9.

Apesar do DNA obtido pelo protocolo de extração proposto por Rogers e Bendich (1988) com modificações proposta por Teles e Isabel (2016) ter apresentado menores quantidades de DNA que o outro protocolo, a extração do DNA das folhas apresentou concentração de DNA elevada (418,02 ng/ $\mu$ l) e relação 260/280nm satisfatória (1,98). Já a extração a partir das sementes, foi o que apresentou menor concentração de DNA dentre as quatro análises (170 ng/ $\mu$ l) e grau de pureza abaixo do esperado para análises moleculares.



## 28ª SEAGRO

Em extração de DNA para análises moleculares, é importante analisar não somente a quantidade de DNA extraído, sendo imprescindível atentar a obtenção de um DNA de qualidade (AGBAGWA, 2012).

A maior eficiência na obtenção de DNA em maiores quantidades e qualidade pelo método de Doyle e Doyle, pode estar relacionado com o maior número de lavagens com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), o que promove uma maior retirada de proteínas, polissacarídeos e outros compostos intrínsecos ao material vegetal que venha a contaminar o DNA extraído, inibindo a ação da DNA polimerase nas análises posteriores de amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

### Conclusão

A extração de DNA de *Annona mucosa* (Jacq.) é mais eficiente, quando feita a partir de folhas, baseando-se no protocolo de Doyle e Doyle (1990) com as modificações descritas no presente trabalho.

### Referências

- AGBAGWA, I. O. et al. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. **Genetics and Molecular Research**. v.4, p. 4632-4639, 2012.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12., p. 13-15, 1990.
- FERREIRA, M. das G. R. et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill) (Annonaceae) em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 31, n. 2, p. 373-380, 2010.
- LORENZI H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Bativas do Brasil**, vol. 4. Plantarum, Nova Odessa, 2002.
- LUCENA-AGUILAR, G. et al. DNA source selection for downstream applications based on dna quality indicators analysis. **Biopreserv. Biobank**. v. 14, n. 4, p. 264-270, 2016.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology**, p. 1–10, 1988.
- TELES, C. D. S. Jr; MONTEIRO, N. M. DNA Extraction from Seeds. **Springer Science Business Media**, New York, 2016.
- TOPPA, E. V. B; JADOSKI, C. JUNIOR. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 12, n. 1, p.1-5, 2013.