

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Passiflora* spp. PARA ANÁLISES PCR-RAPD¹

HUGO BRUNO MOLINARI² & MARIA LÚCIA CROCHEMORE³

RESUMO - A identificação e caracterização da diversidade genética de plantas por meio de técnicas moleculares envolvem a avaliação de vários indivíduos, necessitando-se, portanto, de métodos rápidos e precisos de extração do DNA. O co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal. Folhas das diversas espécies de *Passiflora* possuem níveis variados desses compostos que podem comprometer este procedimento. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade e quantidade de DNA de folhas de variedades de *Passiflora* spp., utilizando-se de três métodos de extração. Os três métodos forneceram DNA em qualidade e quantidade suficientes para a realização da técnica PCR-RAPD.

Termos para indexação: *Passiflora* spp., DNA, extração

GENOMIC DNA EXTRACTION FROM *Passiflora* spp. FOR PCR-RAPD ANALYSES

ABSTRACT - The identification and characterization of the genetic diversity of plants by molecular techniques involve the evaluation of several individuals, therefore requiring fast and precise extraction methods of DNA. Co-isolation of polysaccharides, phenols and secondary products is the main problem during isolation and purification of plant DNA. The leaves of several species of *Passiflora* have different levels of those compounds that can compromise this procedure. The objective of this study was to evaluate the quality and amount of DNA extracted from *Passiflora* spp. varieties using three extraction methods. The three methods supplied DNA in quality and quantity sufficient amount for PCR-RAPD analyses.

Index terms: *Passiflora* spp., DNA, extraction.

Normalmente, estudos de identificação e de caracterização da diversidade genética das plantas, por meio de técnicas moleculares, envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, necessitando-se de métodos rápidos e precisos de extração de DNA. O co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal, podendo danificar o DNA e inibir a ação da enzima *Taq* polimerase. As folhas das diversas espécies de *Passiflora* possuem níveis variados de alcalóides, estereóides, flavonóides, glicosídeos cianogênicos, gomas, taninos, resinas e alguns ácidos (Duke, 1989) que podem comprometer a extração de DNA.

De modo geral, o protocolo de extração de DNA mais utilizado para as diferentes espécies é o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) padrão, ou CTAB com algumas modificações e variações daquele descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Para extração de DNA de folhas do maracujazeiro, estes métodos são reportados, respectivamente, por Otoni *et al.* (1995) e Fajardo *et al.* (1998). A diferença básica entre esses protocolos está na composição do tampão de extração que, normalmente, integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8.0; um sal para dissociar as proteínas do DNA; um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas; e um inibidor de DNAses para proteger o DNA (Bered, 1998).

Os detergentes devem romper as membranas celulares para que ocorra a liberação do DNA. Dellaporta *et al.* (1983) usam SDS (dodecil sulfato de sódio) como detergente, enquanto Doyle & Doyle (1991) usam o CTAB e Cheung *et al.* (1993), o sarcosyl.

Protocolos extremamente simplificados como de Cheung *et al.* (1993) podem fornecer DNAs parcialmente degradados ou contaminados que, apesar de possibilitar ampliações PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando muitas vezes em falsos negativos (Romano, 1998).

Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar 3 métodos de extração de DNA de folhas de plantas de várias espécies de *Passiflora* spp., de forma a obter quantidade e qualidade de DNA suficiente para a realização da técnica PCR-RAPD.

Foram avaliados 8 lotes de matrizes e 7 acessos integrantes da coleção de *Passiflora* spp. do IAPAR (Tabela 1). As análises foram realizadas sobre 3 plantas por genótipo, instaladas em casa de vegetação, através de estaquia ou enxertia, sob condições controladas de luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar.

A amostragem das folhas dos diferentes genótipos foi realizada invariavelmente no mesmo estágio de desenvolvimento de plântula (primórdios foliares). As folhas foram coletadas e acondicionadas em gelo para serem transportadas até o

¹ Trabalho nº 153/2000. Recebido: 24/07/2000. Aceito para publicação: 13/06/2001.

² Estudante de graduação da Faculdade de Agronomia – Universidade Estadual de Londrina e Bolsista do CNPq – PIBIC/IAPAR

³ Eng. Agrônoma, Dr, Pesquisadora da Área de Propagação Vegetal – Instituto Agronômico do Paraná, mlcroche@pr.gov.br

laboratório. Foram avaliados três protocolos: Cheung *et al.*, 1993, Tai & Tanksley (1991) - Dellaporta modificado e Doyle & Doyle (1991). Todos os protocolos foram testados partindo-se de amostras de tecido de folhas frescas pesando 40 mg.

Método de Cheung *et al.* (1993) - modificado: 20 a 40 mg de peso frescos foram colocados em tubos de microcentrifuga esterilizados e pulverizados no homogeneizador elétrico com 160 µl de tampão de extração [200 mM Tris HCl (pH 8,0), 70 mM EDTA (pH 8,0), 2 M NaCl e 20 mM de Metabissulfito de Sódio]. Foram adicionados 40 µl de solução de sarcosyl 5% e, após incubação a 60 °C por uma hora, centrifugou-se por 15 minutos a 18407 g. Foram adicionados 90 µl de acetato de amônia (10 M) e 200 µl de isopropanol gelado, deixando-se em repouso em temperatura ambiente por 15min. Centrifugou-se novamente por 15 min a 18407 g e lavou-se com etanol 70% gelado. Em seguida, descartou-se o etanol e secou-se em estufa a 37 °C por 15 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA] com RNase (10 µg/ml).

Método de Tai & Tanksley (1991) - modificado: 20 - 40 mg de peso frescos foram colocados dentro de tubos de microcentrifuga esterilizados, contendo 400 µl/tubo do tampão de extração (Tris-HCl 1M + EDTA 0,5M + NaCl 5M + SDS 10% + Na bissulfite) e incubou-se a 65 °C em banho-maria por 15 min. Adicionaram-se 125 µl/tubo de acetato de potássio (5M), homogeneizando-se e deixando-se por 20min no gelo. Centrifugou-se a 18407 g durante 5 min, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 350 µl de isopropanol gelado e, em seguida, homogeneizou-se delicadamente, deixando-se repousar por 30min a TA. Centrifugou-se a 18407 g durante 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 50 µl de etanol 75% gelado. Centrifugou-se a 18407 g por 1 min e eliminou-se o etanol. Os tubos foram levados para secar na estufa a 37 °C durante 20 min. Ressuspendeu-se o DNA em 50 µl/tubo de TE buffer (TRIS 10 mM EDTA 50 mM pH 8,). Após centrifugação a 18407 g durante 1min, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos aos quais foram adicionados 2 µl de RNase a 2,5 mg/ml. Centrifugou-se rapidamente, deixou-se repousar por 15min a TA, e o DNA foi precipitado com 3,5 µl de acetato de sódio (10% do volume). Foram adicionados 165 µl/tubo de etanol 95% gelado, e o DNA foi precipitado durante uma noite a -20 °C. Centrifugou-se a

18407 g durante 5min, descartou-se o sobrenadante e lavou-se com 50 µl/tubo de etanol 75% gelado. Centrifugou-se novamente por 3min a 18407 g, os tubos foram levados para secar no exaustor por 15min ou em estufa a 37 °C. Posteriormente, o DNA foi ressuspensionado em 50 µl de água esterilizada (ultrapura).

Método de Doyle & Doyle (1991): 20 – 40 mg de folhas frescas foram homogeneizadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, contendo 300 µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 0,2%, 2-mercaptoetanol, 20mM EDTA, 100 mM Tris-HCl-pH 8,0). Após 30 min de incubação a 65 °C, o material foi centrifugado por 10 min a 11000 g, e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), após suave homogeneização e centrifugação por 2 min a 11000 g, para separação das fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 2/3 do volume de isopropanol gelado, permanecendo por 30 min em gelo. Em seguida, centrifugou-se novamente por 15 min a 11000 g. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% gelado e deixado secar a TA. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de TE buffer (TRIS 10 mM EDTA 50 mM pH 8) e estocado a -20°C.

Para os três protocolos de extração, o DNA obtido foi quantificado em fluorímetro (Dyna Quant™200 – Hoefer). Os resultados obtidos em ng/µl foram transformados em ng/mg de tecido (peso fresco). Para a determinação da qualidade do DNA, 1000 ng de cada amostra foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (80 V) já corado com brometo de etídio, visualizado em Ultravioleta (UV) e fotografado com equipamento EDAS 120 Kodak Digital Science 1D™.

Análises preliminares da técnica RAPD, conforme aquela descrita para alfafa por Crochemore *et al.* (1996), utilizando-se do primer A04-Operon (AATCGGGCTG) (Fajardo *et al.*, 1998), foram realizadas apenas com o objetivo de ser mais um parâmetro para a avaliação da qualidade do DNA extraído pelos 3 métodos.

A concentração média de DNA extraído das folhas de *Passiflora* spp. pelos três métodos é apresentada na Figura 1. Observa-se que concentrações maiores foram obtidas quando se utilizou o protocolo Tai & Tanksley (1991), seguido por Cheung *et al.* (1991) e Doyle & Doyle (1991). Os três métodos produziram concentrações adequadas para análises PCR-RAPD. Estas concentrações encontram-se entre 379 e 4205 ng/mg de tecido

TABELA 1 - Material vegetal utilizado (Londrina, 2000)

Origem	Genótipo	Espécies	Origem	Genótipo	Espécies
	BG04	<i>P. alata</i>		LM157	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>
	BG05	<i>P. alata</i> x <i>P. quadrangularis</i>	Lotes	LM118	“
Acessos	BG08	<i>P. serrato digitata</i>	de	LM117x123	“
	BG09	<i>P. edulis</i>	matrizes	LM156x180	“
	BG10	<i>P. caerulea</i>		LM123	“
	BG15	<i>P. coccinea</i>		LM123x154	“
	BG26	<i>P. chile</i>		LM87	“
				LM180	“

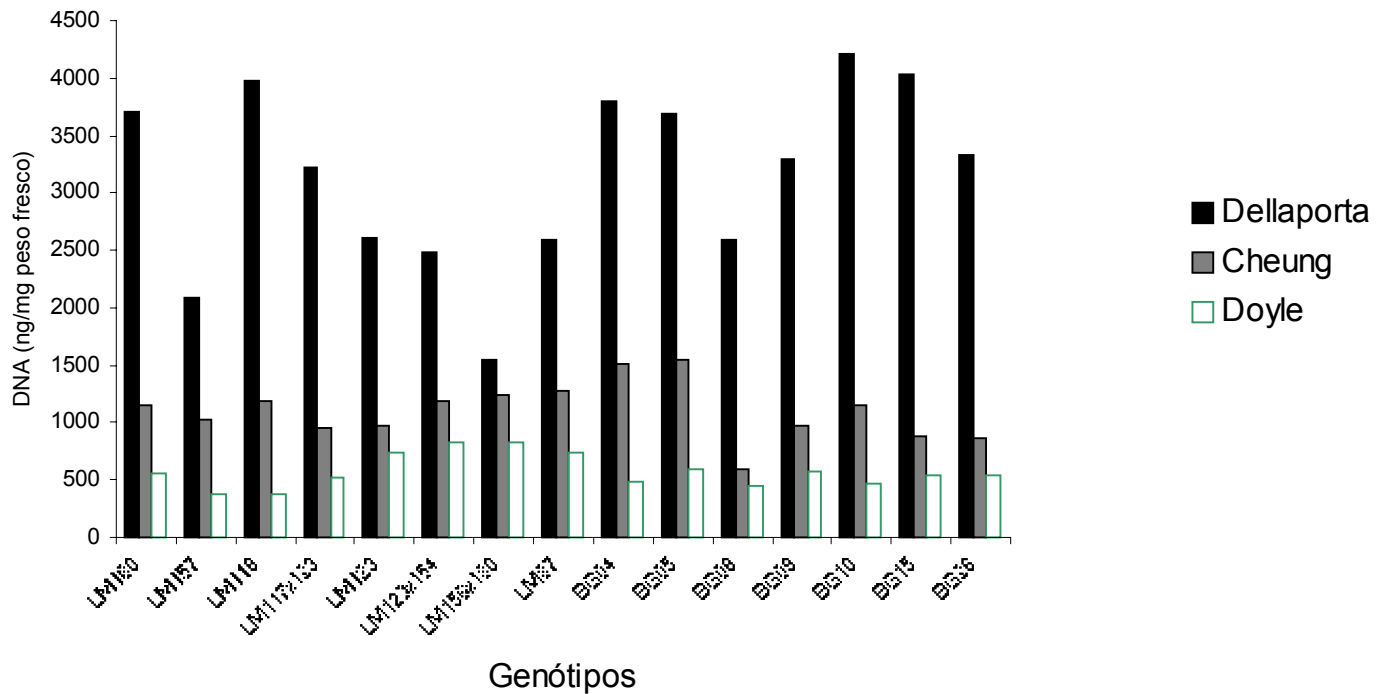


FIGURA 1 - Concentração média de DNA extraído de folhas de *Passiflora* spp. em ng/mg de tecido fresco obtido pelos métodos de Tai & Tansley, 1991 (Dellaporta modificado), Cheung *et al.*, 1993 e Doyle & Doyle (1991). Londrina, 2000.

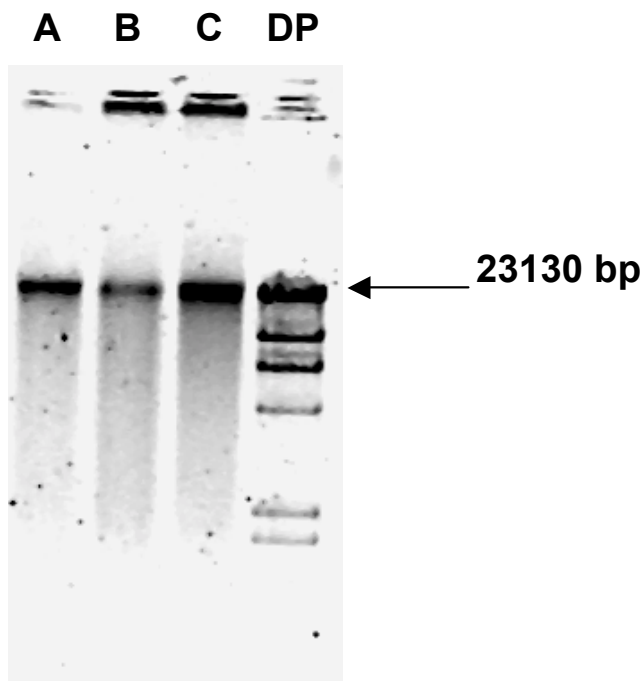


FIGURA 2 - Perfil eletroforético de DNA [1000 ng/ μ l] extraído de folhas de *Passiflora* spp. pelos métodos A. Tai & Tansley (1991), B. Cheung *et al.* (1993) e C. Doyle & Doyle (1991). DP=DNA padrão (Hind III) (Londrina, 2000)

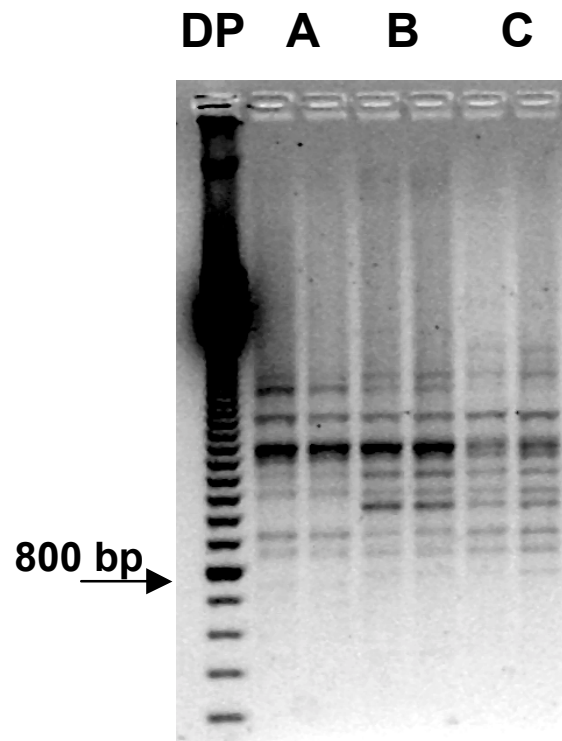


FIGURA 3 - Perfil eletroforético de RAPD usando DNA extraído de *Passiflora edulis* pelos métodos A. Cheung *et al.* (1993), B. Tay & Tansley (1991) e C. Doyle & Doyle (1991) e amplificado com o primer A04 (PCR-RAPD). DP=DNA padrão (Ladder 100 bp). Londrina, 2000.

(peso fresco).

A qualidade do DNA pode ser observada em gel sob UV, tanto em concentrações de 1000 ng (Figura 2), como em fragmentos amplificados por RAPD, cuja concentração de DNA utilizada para a reação foi de 25 ng/µl (Figuras 3). De modo geral, os três métodos produziram DNA de boa qualidade para PCR-RAPD; no entanto, melhor resolução foi observada no perfil RAPD quando o DNA foi extraído pelo método Dellaporta (Figura 3).

O protocolo de Cheung *et al.* (1993) é o mais rápido de ser executado, enquanto o protocolo de Doyle & Doyle (1991) é mais trabalhoso, necessitando de maiores cuidados devido à volatilidade e toxicidade do 2-mercaptoetanol. Enquanto no protocolo de Cheung *et al.* (1991) há apenas uma etapa para a eliminação de impurezas, no protocolo Dellaporta modificado são sete as etapas de purificação, o que nos leva a obter quantidades maiores de DNA.

Assim, com base nos resultados obtidos e nas condições em que se realizou o presente estudo, conclui-se que os 3 métodos foram eficientes para a obtenção de DNA de qualidade e em concentrações suficientes para a realização da técnica PCR-RAPD. Sugere-se, no entanto, a preferência pela técnica de Dellaporta para a extração de DNA de folhas do maracujazeiro, considerando-se a melhor resolução apresentada no perfil RAPD produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998, 141 p.

CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p.69-70, 1993.

CROCHEMORE, M.L.; HUYGHE, C.; KERLAN, M.C.; DURAND, F.; JULIER, B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. **Agronomie**, Paris, v.16, p. 421-432, 1996

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**. v.1, p. 19-20, 1983.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1, 13-15, 1991.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Florida: CRC Press, 1989. 667p.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; ROCA, W.M.; SANCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* l. using rapd markers. **Euphytica**. v. 101, p. 341-347, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. pp.220. (Documento, 20).

OTONI, W. C.; BLACKHALL, N.W.; D'UTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.; POWER, J.B. DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis f. flavicarpa* degener and *P. incarnata* L. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 288, p. 777-785, 1995.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.163-177.

TAI, T.H., TANSLEY, S.D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. **Plant tissue. Plant Molecular Biology Report**, v. 8, p.297-303, 1991.