

Foto: Embrapa Trigo



Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo

Ana Lídia Variani Bonato¹

Introdução

Atualmente, várias técnicas que geram marcadores moleculares estão disponíveis e estão sendo empregadas para a caracterização de germoplasma, para estudos básicos de genética, para estimar a diversidade genética ou para seleção assistida das plantas melhoradas por meio de seleção indireta, entre outras inúmeras utilizações. Aliadas à identificação de acessos superiores do ponto de vista agrônomo, elas contribuem para os programas de melhoramento genético.

O produto utilizado nas análises genéticas, realizadas com base em marcadores moleculares, é o DNA (ácido desoxirribonucléico). Sendo assim, a eficiência destas análises é essencialmente dependente da qualidade e da quantidade do DNA extraído. Em plantas, vários fatores podem influenciar estas características, incluindo desde os procedimentos para a coleta e armazenamento do tecido vegetal até o processo de extração de DNA e de armazenamento do DNA extraído.

Vários métodos de extração de DNA de plantas têm sido descritos na literatura. O fundamentado na utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Doyle & Doyle, 1987) é citado como o mais utilizado para a extração de diferentes espécies vegetais. Basicamente, os protocolos são utilizados com algumas

modificações visando solucionar problemas intrínsecos da espécie analisada (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os objetivos deste documento são descrever a metodologia de extração de DNA genômico, ajustada no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo para os cereais de inverno: trigo, cevada e triticale, a partir do protocolo utilizado por Saghai-Marouf et al. (1984) baseado na utilização de CTAB e tecer considerações sobre as etapas do processo, observadas especificamente para essas gramíneas, como referência atualizada e específica a ser utilizada em trabalhos correlatos.

Metodologia

- 1- Pesar aproximadamente 300 mg de tecido foliar fresco.
- 2- Macerar com nitrogênio líquido, cuidando para o tecido não descongelar.
- 3- Adicionar às amostras, 700 µl de tampão de extração CTAB (Tabela 1) pré-aquecido a 65°C e misturar bem.
- 4- Incubar as amostras a 65°C em banho-maria (ou hibridizador) por 60 min., invertendo os tubos, gentilmente, a cada 10 min.
- 5- Retirar do banho-maria (ou hibridizador) e deixar esfriar em temperatura ambiente por 5 min.

¹ Pesquisador Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, 99001-970 Passo Fundo, RS. Email: analidia@cnpt.embrapa.br

- 6- Adicionar 1 volume (700 µl) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter gentilmente por 10 min.
- 7- Centrifugar a 10.000 rpm por 7 min.
- 8- Retirar o sobrenadante para novos tubos e adicionar 1 volume (700 µl) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter gentilmente por 10 min.
- 9- Centrifugar a 10.000 rpm por 7 min.
- 10- Retirar o sobrenadante para novos tubos e adicionar 500 µl de isopropanol (-20°C).
- 11- Misturar para precipitar o DNA.
- 12- Incubar a -20°C por, no mínimo, 30 min. Ou neste passo pode deixar “over night”.
- 13- Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min.
- 14- Retirar o sobrenadante e deixar o *pellet*.
- 15- Lavar o *pellet* com aproximadamente 600µl de etanol 70% (-20°C).
- 16- Descartar o etanol 70%.
- 17- Lavar o *pellet* com aproximadamente 600 µl de etanol 96%
- 18- Descartar o etanol 96% e deixar secar a temperatura ambiente.
- 19- Ressuspender o *pellet* em TE: 50 ou 100 µl.
- 20- Adicionar 3 ul de RNase (10 mg/ml). Misturar e incubar por 1 h a 37°C.
- 21- Armazenar as amostras a -20°C ou a -80°C até o momento de uso.

Tabela 1. Tampão de extração CTAB.

Componentes (concentração final)	Volume final (50 ml)
CTAB 10% (2%)	2,0 ml
NaCl 5 M (1,4 M)	14,0 ml
Tris-HCl 1 M pH 8,0(100 mM)	5,0 ml
EDTA 0,5 M (20 mM)	2,0 ml
Água MilliQ	qsp para completar 50 ml

Considerações gerais

A obtenção do material vegetal mais comumente utilizada é através de tecido foliar. Entretanto, é possível utilizar

sementes, raízes, endosperma, e cultura de células em suspensão.

Para o procedimento de amostragem do tecido foliar, indica-se preferencialmente a coleta de tecido novo, onde ocorre a fase ativa de crescimento das plantas (Fig. 1). A extração pode ser realizada logo após a coleta, de preferência, mantendo resfriado ou congelado em nitrogênio líquido. No caso de armazenamento por períodos mais longos, é possível manter congelado a -20°C, a -80°C ou liofilizado a 4°C.

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo



Fig. 1. Coleta de folhas de trigo para extração de DNA.

Considerando que para as técnicas baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) somente alguns miligramas de tecido fresco são suficientes para gerar a quantidade necessária de DNA, o protocolo foi adaptado para realização em microtubos (2,0 e 1,5 ml) o que reduz o gasto de reagentes e o custo por amostra (Fig. 2).

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo

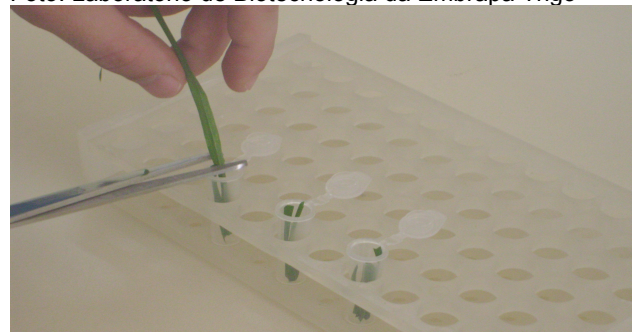


Fig. 2. Preparo de material vegetal em microtubo de 2,0 ml para maceração mecânica.

Na maceração mecânica, onde há o rompimento das paredes e membranas celulares do tecido, deve-se cuidar para manter as folhas congeladas pela adição de nitrogênio líquido. Em etapa seguinte, o tecido macerado é suspenso em um tampão de extração, contendo o detergente catiônico CTAB, para solubilizar as membranas protéicas (Fig. 3). Para a solubilização e ação do CTAB é adicionada uma concentração de 1,4 M NaCl e é utilizado um sistema Tris-HCl pH 8,0 para manutenção do pH constante. Outros componentes desse tampão visam proteger o DNA da ação de enzimas nativas ou compostos secundários liberados com o rompimento das células. O EDTA (etilenodiaminotetracetato) quelata cátions divalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} . Originalmente utiliza-se o 2-mercaptoetanol, um agente redutor que desnatura proteínas como peroxidases e polifenoloxidasas. Entretanto, após testes no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, verificou-se que não é necessário a adição deste componente no tampão para as espécies em estudo, além de se eliminar um produto altamente tóxico nesse processo.

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo



Fig. 3. Tecido (sementes e folhas) suspenso em tampão de extração CTAB.

Após o procedimento com o tampão de extração, o material é submetido a uma extração com solvente orgânico, clorofórmio-álcool isoamílico, seguida de centrifugação para separação da fase orgânica da fase aquosa (Fig. 4). Na fase orgânica, que fica na parte inferior da solução, são retidos e descartados os lipídeos, proteínas e alguns polissacarídeos. Na fase aquosa ficam o DNA e alguns

contaminantes como RNA e alguns polissacarídeos. Esta etapa é repetida para purificar o DNA dos contaminantes, diferente do protocolo original que faz esta purificação apenas uma vez.

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo



Fig. 4. Extração com solvente orgânico para separação da fase orgânica da fase aquosa.

Posteriormente, na presença de um sal e de um álcool o DNA é precipitado e, então, sedimentado por centrifugação (Fig. 5). Seguem-se a lavagem do DNA com etanol 70% e a secagem à temperatura ambiente.

Finalmente, o DNA é suspenso em um tampão TE (Tris-EDTA), e é realizado um tratamento com RNase, para eliminação do RNA. Após, o DNA estará em condições de uso ou poderá permanecer armazenado na forma concentrada em condições de $-20^{\circ}C$ ou $-80^{\circ}C$. A diluição para uma solução de trabalho é feita com água miliQ.

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo

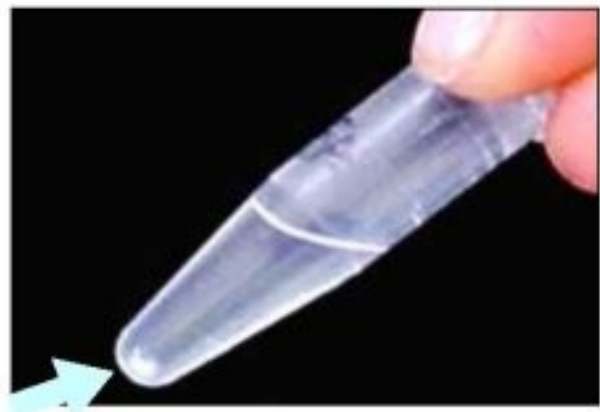


Fig. 5. DNA precipitado e sedimentado por centrifugação.

A verificação da concentração e qualidade final do DNA extraído pode ser verificada pela visualização em gel de agarose, comparando-se com padrões de concentrações moleculares conhecidas (Fig. 6).

Foto: Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

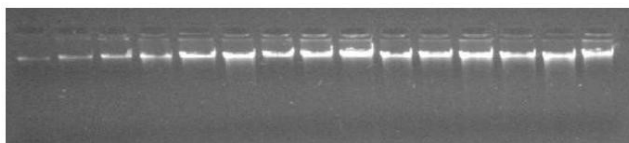


Fig. 6. Quantificação de DNA genômico em gel de agarose corado com brometo de etídio. Amostras 1, 2 e 3 com DNA padrão nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/μl, respectivamente. Amostras 4 a 15 com DNA de genótipos de trigo.

Referências Bibliográficas

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SLOMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribossomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.



Comunicado Técnico Online, 235

Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Expediente

Comitê de Publicações

Presidente: **Leandro Vargas**

Ana Lúcia V. Bonato, José A. Portella, Leila M. Costamilan, Márcia S. Chaves, Paulo Roberto V. da S. Pereira

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BONATO, A. L. V. **Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 235). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm.