



## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE TECIDO FOLIAR DE FUMO PARA OBTENÇÃO DE DNA PARA ESTUDOS MOLECULARES

**Edilson Marques Junior, Rodrigo Dadalto Carvalho, Rodrigo Monte Lorenzoni, Taís Cristina Bastos Soares.**

Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alto Universitário, C. Postal 16 - 29500-000 - Alegre - ES, Brasil, edilsonmarquesjr@hotmail.com.br, rodrigo122144@gmail.com, rodrigomlorenzoni@gmail.com, tcbsoares@yahoo.com.br.

**Resumo** - A fumicultura apresenta considerável importância para o agronegócio brasileiro. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando o melhoramento da cultura e a aplicação de técnicas biotecnológicas, como marcadores moleculares, têm contribuído significativamente para o êxito de diversos programas de melhoramento. Um dos primeiros passos para o uso desta técnica consiste na obtenção de DNA de qualidade. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes métodos de armazenamento de folhas de fumo para obtenção de DNA de qualidade para análises moleculares. Folhas de fumo completamente expandidas foram armazenadas em seis diferentes métodos sendo: temperatura ambiente com e sem sílica; em geladeira à 4°C com sílica; congeladas; tecido foliar fresco e liofilizadas. A extração do DNA foi realizada pelo método proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações e avaliado a qualidade por meio das relações de pureza 260/280 nn e 260/230 nn. Todas as metodologias testadas foram eficientes para a obtenção de DNA de qualidade. As relações de pureza variaram de 1,92 a 1,99 para a relação 260/280 nn e de 1,99 a 2,14 para 260/230 nn.

**Palavras-chave:** Qualidade, Pureza, Relação 260/280 nn, Relação 260/230 nn, Armazenamento.

**Área do Conhecimento:** Agronomia

### Introdução

O Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de tabaco do mundo, o que demonstra a importância da fumicultura para o agronegócio brasileiro, em especial a agricultura familiar. O fumo é o único produto, cujo o valor de venda é previamente assegurado aos produtores e com garantia de escoamento de toda a produção, representando a principal fonte de receita para centenas de municípios e apresenta significativa participação nos lucros em exportações brasileira, movimentando cerca de dois bilhões dólares em 2016 (PORTAL DO TABACO; REVISTA GLOBO RURAL, 2017).

Diante da grande importância do tabaco, vem sendo realizadas diversas pesquisas visando melhoramento do potencial produtivo, aumento da qualidade do produto, a obtenção de cultivares com baixos teores de substâncias nocivas a saúde, especialmente as nitrosaminas que são cancerígenas e cultivares resistentes as pragas e doenças, diminuindo assim a utilização de agrotóxicos. Concomitante a essa redução tem-se um menor risco de contaminação ambiental e humana, levando a uma produção mais sustentável (GAVILANO et al., 2006; DAHAL et al., 2015; FAO, 2016).

Com o advento da biotecnologia, grandes avanços têm sido alcançados nos programas de melhoramento genético de plantas. Uma importante ferramenta que tem auxiliado os programas são os marcadores moleculares, que permitem acessar diretamente o genótipo do indivíduo, obtendo informações a nível genético sem a influência da expressão do fenótipo, além de possibilitar a caracterização da variabilidade genética da população, dentre outras vantagens (TOPPA; JADOSKI, 2013). A qualidade do DNA é o primeiro passo a ser observado para aplicação de técnicas moleculares, como por exemplo, estudos de diversidade e seleção assistida por marcadores, visto que DNA de má qualidade pode comprometer o sucesso das demais etapas do processo (AGBAGWA, 2012).

A forma de coleta e armazenamento de tecido foliar para posterior extração pode influenciar diretamente sobre a qualidade do DNA obtido, onde armazenamento inadequado pode levar a oxidação dos tecidos, e gerar grande teor de contaminantes nas amostras (MAZZA; BITTENCOURT, 2000).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar diferentes formas de armazenamento das folhas de tabaco, analisando dentre os mesmos qual o método que permite obter DNA com maior quantidade e melhor qualidade.

## Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciência Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES). Foram coletadas folhas de fumo completamente expandidas e armazenadas em seis diferentes formas para posterior extração de DNA. As metodologias de armazenamento das folhas foram as seguintes:

1. Tecido foliar fresco (TFF):

As folhas foram coletadas diretamente da planta em casa de vegetação e em seguida realizada a extração do DNA;

2. Tecido foliar congelado (TFC):

As folhas coletadas em casa de vegetação foram acondicionadas em saco de alumínio e levadas ao congelador por sete dias.

3. Tecido foliar em sílica e refrigerado (TFSC):

As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel dentro de saco plástico contendo sílica gel e mantidas a menos 4°C por sete dias.

4. Tecido foliar em sílica a temperatura ambiente (TFSTA):

As folhas de fumo foram coletadas e acondicionadas em sacos de papel, dentro de saco plástico contendo sílica e mantida a temperatura ambiente por sete dias.

5. Tecido foliar em temperatura ambiente (TFTA):

As folhas de fumo coletadas foram armazenadas em saco de papel por sete dias a temperatura ambiente.

6. Tecido foliar liofilizado (TFL):

As folhas coletadas foram armazenadas em freezer -30°C por 3 dias e posteriormente foram liofilizadas.

Após o período de armazenamento, as amostras foram submetidas a extração de DNA para posterior avaliação da melhor metodologia de armazenamento das mesmas. A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações, como descrito abaixo:

Aproximadamente 300 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubo eppendorf de 2 mL. A amostra liofilizada foi macerada diretamente sem uso de nitrogênio líquido. Após a transferência do tecido macerado para o tubo eppendorf, 800 µL de tampão de extração (NaCl a 1,4mol/L; Tris-HCl, pH 8 a 100mmol/L; EDTA, pH 8,0 a 20mmol/L; PVP 1%; CTAB 2%; β-mercaptoetanol a 0,2%) foi adicionado as amostras, as quais foram agitadas em vórtex. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho maria a 65°C por 30 min e homogeneizadas a cada 10 minutos.

Posteriormente, 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1) foi adicionado às amostras e homogeneizado até formar uma emulsão. Em seguida foram levadas a centrifuga a 12000 rpm por 10 min. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo eppendorf de 2 mL e adicionado 650 µL de tampão de CIA mais 200 µL de tampão de extração, e então homogeneizadas e centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. Mais uma vez o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 650 µL de CIA e centrifugado a 12000 rpm por 10 min. Na sequência a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e procedeu a precipitação do DNA com um volume de isopropanol gelado e 230 µL de acetato de amônio, os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente, o líquido foi eliminado e o precipitado foi lavado três vezes com 250 µL de etanol 70%. Após a secagem do pellet foi feita a ressuspensão com TE + Rnase (40 µg.µL) e levados ao banho maria por 37°C por 30 min.

As amostras foram quantificadas em Nanodrop® (Thermo Scientific), observando a quantidade de DNA obtido e a qualidade por meio da relações de pureza 260/280nm e 260/230nm, visando selecionar o melhor método de armazenamento.

## Resultados

Todas as metodologias de armazenamento de tecido foliar de fumo permitiram a obtenção de DNA suficiente para realizar análises moleculares, entretanto observa-se variação entre as quantidades de DNA extraídas entre as metodologias (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração, relação 260/280 e 260/230 de DNA genômico extraído de folhas de fumo a partir de diferentes metodologias de armazenamento.

Armazenamento	Concentração de DNA (ng.µL <sup>-1</sup> )	Relação 260/280	Relação 260/230
TFF	913,1	1,98	2,06
TFC	1247,5	1,99	2,14
TFSG	1195,7	1,98	2,08
TFSTA	1715,8	1,99	2,11
TFTA	1298,1	1,94	2,09
TFL	3122,8	1,92	2,00

Observou-se que a maior quantidade de DNA foi obtida a partir de folhas de fumo liofilizadas (3122,8 ng.µL<sup>-1</sup>), enquanto a menor quantidade obtida a partir de tecido foliar fresco (913,1 ng.µL<sup>-1</sup>). No entanto não só a quantidade de ácido nucléico obtido na extração é importante para selecionar metodologias para o armazenamneto de folhas vegetais. As relações 260/280 e 260/230 nm são importantes para verificar a presença de impurezas na amostra. O valor das relações 260/280 nm variaram de 1,92 a 1,99, já na relação 260/230 os valores diferem-se entre 1,99 a 2,14.

## Discussão

Um fator determinante para realização de análises moleculares é a qualidade do DNA, que pode ser mensurada pelas relações de absorbância 260/280nm e 260/230nm. Como demonstrado na tabela 1, todas as formas de armazenamento proporcionaram DNA em quantidades e qualidade suficientes para realização de análises moleculares. Quanto a qualidade dos DNAs obtidos, os valores da relação 260/280nm ficaram entre 1,6 e 2,0, Valores dentro dessa amplitude caracterizaram pureza do DNA extraído (LUCENA-AGUILAR et al. 2016). Valores inferiores a 1,6 indica menor qualidade do DNA, visto que é um indicativo da presença de proteínas, fenóis e outros contaminantes na amostra. Bem como valores superiores a 2,0, indicativo da presença de RNA na amostra, que pode levar a formação de bandas inespecíficas, de menor massa molecular nos géis. Altas concentrações de polissacarídeos, fenóis e taninos ao oxidar podem levar os polissacarídeos a se complexar na molécula de DNA e impedir a perfeita ligação da enzima Taq polimerase (RAWAT et al., 2016).

A relação 260/230nm consiste em outra variável para avaliar a qualidade do DNA extraído. Neste caso, é considerado puro as amostras de DNA, cuja a relação esteja situada entre 2 e 2,2. Proporções muito inferiores aos valores esperados podem indicar a presença de substâncias que absorvam na faixa do 230nm, como proteínas, fenol e outros contaminantes. Já a presença de RNA na amostra pode levar a um acréscimo significativo nas leituras, visto que as leituras de absorbância não podem discriminar entre DNA e RNA, assim leituras acima de 2,2 pode ser um indicativo de contaminação da amostra por RNA (LUCENA-AGUILAR et al., 2016). No presente trabalho a maior relação 260/230nm encontrada foi do DNA extraído da amostra a partir de tecido foliar congelado (2,14), um dos motivos que pode ter levado ao aumento da relação 260/230 nm, ou seja, presença de maior quantidade de contaminantes na amostra, é que o congelamento poda causar a formação de cristais de gelo nas células e danificar o conteúdo celular, extravasando diversas substâncias que podem levar a oxidação de compostos.

## Conclusão

Todas as metodologias de armazenamento de folhas de fumo forneceram DNA em quantidade e qualidade suficiente para análises moleculares.

## Referências

- AGBAGWA, I. O.; DATTA, S.; PATIL, P. G.; SINGH, P.; NADARAJAN, N. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. **Genetic Molecular Resource**, v.4, p. 4632-4639, 2012.
- DAHAL, K.; MARTYN, G.D.; VANLERBERGHE, G.C. Improved photosynthetic performance during severe drought in *Nicotiana tabacum* overexpressing a nonenergy conserving respiratory electron sink. **New Phytologist**, v.208, n.2, p.382-95, 2015.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12., p. 13-15, 1990.
- GLOBO RURAL. Exportação de tabaco do Brasil ultrapassa US\$ 2 bilhões em 2016. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/>>. Acesso em: 29 ago. 2017.
- LUCENA-AGUILAR, G; SÁNCHEZ-LOPES, A. M.; BARBERÁN-ACEITUNO, C.; CARRILLO-ÁVILA, J. A.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A.; AGUILAR-QUESADA, R. DNA source selection for downstream applications based on dna quality indicators analysis. **Biopreserv Biobank**, v. 14, n. 4, p. 264-270, 2016.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 41, p.12-17, 2000.
- PORTAL DO TABACO. Quase 50% dos municípios da região Sul do Brasil produzem tabaco. Disponível em:<<http://portaldotabaco.com.br/>>. Acesso em: 26 ago. 2017.
- RAWAT, S.; JOSHI, G.; ANNAPURNA, D.; ARUNKUMAR, A. N.; KARABA, N. N. Standardization of DNA extraction method from mature dried leaves and ISSR-PCR conditions for *Melia dubia* Cav. – A fast growing multipurpose tree species. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p.437-445, 2016.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. JR. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.1, p.1-5, 2013.
- FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Disponível em:<<http://www.fao.org/brasil/programas-e-projetos/pt/>>. Acesso em: 05 set. 2016.
- GAVILANO L.B.; COLEMAN N.P.; BURNLEY L.E.; BOWMAN M.L.; KALENGAMALIRO N.E.; HAYES A.; BUSH L.; SIMINSZKY B. Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nornicotine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.24, p.9071-9078, 2006.