

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO A SECO E CONGELADO DE TECIDOS FOLIARES DE *Solanum tuberosum* L.

Caroline Vitoriano Reis, Rafael Pereira, Adelson Lemes da Silva Júnior, Tiago de Souza Marçal, Lucimara Cruz de Souza.

Universidade Federal de Lavras, Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, s/n
Caixa Postal 3037 - 37203-202 – Lavras – MG, Brasil, caroline.reis2@estudante.ufla.br,
rafaell.pereira@ufla.br, adelson.lemes@ufla.br, tiago.marcal@ufla.br, lucimaracruz@ufla.br.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo realizar testes comparativos adotando dois métodos de armazenamento de amostras foliares de *Solanum tuberosum* L., aspirando à obtenção de DNA de ótima qualidade para serem empregados em estudos moleculares. Testou-se a qualidade dos tecidos foliares secos com sílica gel em recipientes individuais (TSI) e coletivos (TSC) e tecidos congelados em nitrogênio líquido (TC), por meio de ensaios utilizando análises de pureza via gel de agarose 0,8%, quantificação por NanoDrop® e testes de amplificação com marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Os resultados evidenciaram a existência de diferenças na quantidade de DNA obtido na extração com valores médios de 2720,74 ng/μL para TSI; 2667,90 ng/μL para TSC e 1277,74 ng/μL para TC. Para a análise de pureza os valores foram de 1,85 para TSI, 1,89 para TSC e 1,88 para TC (na relação 260/280 em NanoDrop®). Apesar da pequena diferença dos resultados entre os métodos, o armazenamento a seco mostrou-se mais prático e proporcionou uma maior concentração de DNA.

Palavras-chave: Otimização de protocolo. Método de secagem. Conservação do DNA.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas/Genética

Introdução

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a cultura que domina a produção mundial dentro da família de raízes e tubérculos, e em termos de importância nutricional global, ocupa a quarta posição, estando atrás apenas do milho, trigo e arroz (OECD-FAO, 2023). No Brasil, as condições tropicais e a alta incidência de pragas e doenças, diminuem o potencial produtivo da cultura (FAGUNDES *et al.*, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares superiores de batata é fundamental para os avanços nos programas de melhoramento da espécie.

Para atender essas demandas, a avaliação e caracterização de germoplasma são fundamentais para os avanços nos programas de melhoramento da cultura. Com o advento da biotecnologia os programas de melhoramento genético estão alcançando grandes avanços e descobertas, como o uso de marcadores moleculares, que permitem integrar a informação fenotípica com a informação diretamente do DNA (genótipo) (TOPPA; JADOSKI, 2013). A qualidade do DNA é primordial para realizar as técnicas moleculares e não comprometer as etapas dos protocolos (AGBAGWA, 2012). A maneira de coleta e armazenamento de tecidos foliares para futura extração influencia diretamente a qualidade do DNA obtido, podendo acarretar na degradação da amostra pelo aumento do teor de contaminantes (MAZZA; BITTENCOURT, 2000). Assim, pesquisadores procuram, desde muito tempo, alternativas para aprimorar as condições de armazenamento, coleta e tratamento das amostras foliares destinadas a pesquisas moleculares (CHASE; HILLS, 1991; SYTSMA *et al.*, 1993; TAYLOR; SWANN, 1994; DESSAUER *et al.*, 1996).

Sendo assim, o trabalho teve como objetivo comparar dois métodos de armazenamento de tecido vegetal para extração de DNA de *S. tuberosum* para sua utilização em análises moleculares.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

Foram coletados tecidos foliares jovens e saudáveis de cinco clones de *S. tuberosum* L. Amostrou-se ao todo cinco folhas em cada procedimento:

01. Tecido foliar congelado (TC): as amostras foram adequadamente colocadas em sacos confeccionados com papel alumínio para manter a amostra mais conservada e resfriada com nitrogênio líquido, devidamente etiquetados e acondicionadas em freezer (-20°C) para posterior extração.
02. Tecido seco com sílica gel em recipientes individuais (TSI): as amostras foram adequadamente colocadas em tubos Falcon etiquetados e preparados com uma quantidade padronizada de sílica no fundo. Além disso, foi inserido papel filtro para evitar o contato direto da folha com a sílica, de modo que cada indivíduo possuía seu próprio recipiente individualizado para armazenamento a seco.
03. Tecido seco com sílica gel em recipientes coletivos (TSC): as amostras de cada indivíduo foram colocadas dentro de um envelope confeccionado com papel filtro devidamente etiquetado e, posteriormente, armazenado em um saco vedável de alumínio com sílica gel.

Todos os experimentos ocorreram no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), campus Lavras. Os clones utilizados foram provenientes do Programa de Melhoramento de Batata da UFLA (PROBATATA).

Em todos os tratamentos utilizou-se o protocolo de extração Doyle e Doyle (1987) com modificações na concentração de polivinilpirrolidona (PVP, 1%) e de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, 2%), adicionando três etapas de desproteinização com clorofórmio álcool isoamílico (CIA) 24:1 e, 1 volume de álcool isopropílico gelado e 1/3 do volume de acetato de amônio (7,5M) para a precipitação do DNA. As amostras secas foram maceradas com auxílio de graal e pistilo e as folhas congeladas foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração, foi realizada a quantificação e a pureza do DNA via espectrofotometria no aparelho NanoDrop®, adotando-se como parâmetro a relação de absorbância a 260 e 280 nm (A260 /A 280) (BARBOSA, 1998). A qualidade do DNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio em TBE 1X (Tris - 0,089 M, Ácido bórico - 0,089 M e EDTA- 0,002 M), a uma voltagem de 100 Volts, por 50 minutos e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

Efetuuou-se também um teste de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o *primer* ISSR UBC 810 para observar a qualidade de amplificação do DNA obtido. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12 µL por amostra, contendo: 5x FIREPol Master Mix (Solis Biotec), *primer* (0,2 µmol/L) e 50 ng de DNA genômico. A programação do termociclador consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidas de 35 ciclos constituídos por 3 etapas: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 90 segundos a 72 °C, e extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% em TBE 1X, a uma voltagem de 100 Volts, por 90 minutos e fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com base em marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100 pb.

Resultados

A concentração média de DNA das amostras sofreu alterações dependendo do método de armazenamento utilizado. As amostras armazenadas a seco obtiveram maior concentração de DNA e relação de pureza se comparada às amostras congeladas (Tabela 1).

Tabela 1- Quantificação e pureza das amostras de DNA genômico de *Solanum tuberosum* L. Obtido pelos métodos de armazenamento.

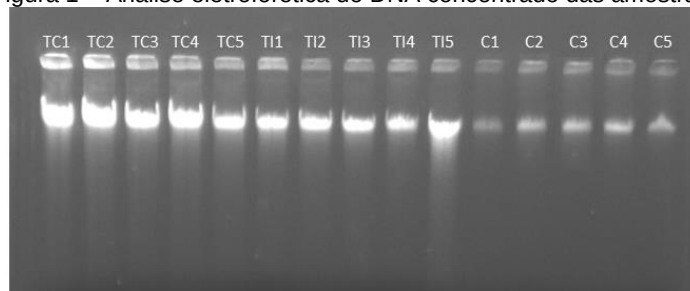
Tipos de armazenamentos	Quantificação (ng/µL)	Razão (260/280 nm)
TC	1277,74	1,88
TSI	2720,74	1,85
TSC	2667,90	1,89

TC- Tecido congelado/ TSI- Tecido seco individualmente/ TSC- Tecido seco coletivamente

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A quantidade de DNA concentrado das amostras com método de armazenamento foram maiores em relação ao método de armazenamento congelado (Figura 1).

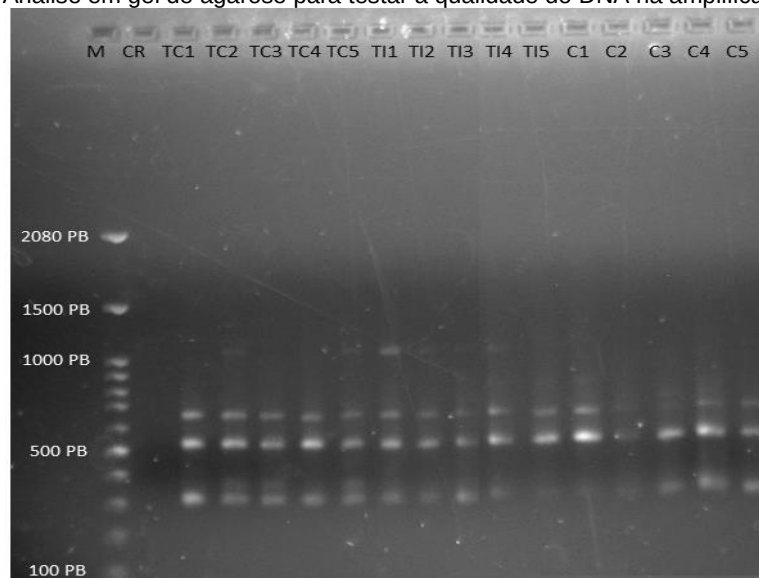
Figura 1 – Análise eletroforética do DNA concentrado das amostras.



TC- Tecido seco coletivamente/ TI- Tecido seco individualmente/ C- Tecido congelado.
Fonte: o autor

A Análise do gel de agarose para testar a qualidade do DNA na amplificação in vitro (PCR), demonstrou ótimos resultados em todos os métodos de armazenamento (figura 2).

Figura 2– Análise em gel de agarose para testar a qualidade do DNA na amplificação (PCR).



TC- Tecido seco coletivamente/ TI- Tecido seco individualmente/ C- Tecido congelado.
Fonte: o autor

Discussão

Pesquisas sobre metodologias de armazenamento, coleta e tratamento de amostras de plantas para estudos moleculares têm apresentado grande visibilidade na comunidade científica (HEPP; NONOHAY, 2016). Certamente, é essencial obter um DNA de boa qualidade para o sucesso de análises moleculares.

As médias dos valores de pureza de DNA das amostras após a quantificação pelo NanoDrop® (Tabela 1) indicam que ambos os métodos de armazenamento adquiriram DNA de boa qualidade e pureza. De acordo com os resultados de Barbosa (1998) são ótimos valores para pureza de DNA entre 1,8 a 2,0 (razão 260/280 nm).

Outra maneira de realizar testes de qualidade do DNA é com a utilização de marcadores moleculares. Foi utilizado o marcador ISSR que atua em regiões de DNA flanqueadas por sequências microssatélites e que são altamente reprodutíveis e universais (NG; TAN, 2015). O indício de boa qualidade de DNA é a presença de bandas nítidas e delineadas, como observado no gel na Figura 2.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Em relação à diferença dos dois tipos de armazenamento, embora ambos tenham tido resultados satisfatórios, a utilização de tecido seco em estudos traz diversos benefícios, devido à sua simplicidade e otimização de tempo para coleta. Vale destacar que o DNA desidratado é menos suscetível à degradação enzimática ou química (Murray; Thompson 1980). A Sílica-gel é um produto sintético muito confiável e utilizado para absorver umidade de amostras, sendo uma substância de baixo custo (CHASE; HILLS, 1991) o que representa uma vantagem em relação ao nitrogênio líquido, que por sua vez, tem custo mais elevado devido às grandes quantidades requeridas nos processos de coleta e extração.

Conclusão

Os dois métodos de armazenamento testados adquiriram valores dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade e pureza de DNA. Entretanto, o armazenamento a seco proporcionou maior quantidade de DNA, praticidade na coleta, na maceração e no armazenamento, podendo ser indicado para as análises com a cultura da batata.

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.
- BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. *In*: MILACH, S. ed. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, p.99-106, 1998.
- CHASE, M. W.; HILLS, H. H. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**. n.40, p.215-220, 1991.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DESSAUER, H.C, COLE, C.J.; HAFNER, M.S. Collection and storage of tissues. *In*: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. eds. **Molecular systematic**. 2.ed. Sinauer, Sunderland, p.29-47, 1996.
- FAGUNDES, J. D.; PAULA, G. M. D.; LAGO, I.; STRECK, N. A.; BISOGNIN, D. A. Aquecimento global: efeitos no crescimento, no desenvolvimento e na produtividade da batata. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1464-1472, 2010.
- HEPP, D; NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **ScientiaTec**, v. 3, n. 2, p. 114-124, 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.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p. 4321-4325, 1980
- NG, W.I.; TAN, S.G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? **Asm Science Journal**, Selangor, v. 9, n. 1, p.30-39, 5 out. 2015.
- OECD-FAO. Agricultural Outlook 2023-2032, OECD Publishing, Paris, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>. Acesso em: 4 ago. 2023
- SYTSMA, K.; GIVNISH, T.J.; SMITH, J.F.; HAHN, W.J. Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. *In*: ZIMMER, E.A.; WHITE, T.J.; CANN, R. L.; WILSON, A.C. eds.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data Academic Press, San Diego. v.24, p.23-38, 1993.

TAYLOR, J.W.; SWANN, E.C. Dried Samples: Soft Tissues - DNA from Herbarium Specimens. *In*: HERRMANN, B.; HUMMEL, S. eds. **Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens**. Springer-Verlag, New York, p.167-181, 1994.

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.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) que concedeu bolsa de iniciação científica para a primeira autora, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras (PPGGM/UFLA) e o Programa de Melhoramento de Batata da UFLA (PROBATATA).