

Avaliação de dois métodos de extração de DNA genômico em melancia

Maria L. da Silva¹, Luiz M. da Silva¹, Manoel A. Queiroz² e Carlos Antonio F. dos Santos³

¹LGMH-UFPE, Recife-PE(misluciene@yahoo.com.br); ²DTCS-UNEB, Caixa Postal 171, 48905-680. Juazeiro-BA;

³Embrapa Semi-Árido, Caixa Postal 23, 56300-970, Petrolina-PE.

RESUMO

A extração de DNA genômico constitui rotina na aplicação de técnicas moleculares que auxiliam os programas de caracterização de germoplasma. Contudo, para muitos trabalhos de biologia molecular como identificação de marcadores moleculares e clonagem gênica o êxito, muitas vezes, depende da utilização de DNA em quantidade e qualidade adequadas. Para isso, diferentes protocolos têm sido desenvolvidos e ajustados para cada situação, porém, quase nada foi feito para a melancia. Assim, foram testados dois métodos de extração de DNA, a extração por CTAB 2% (Método 1) e a pelo método estabelecido por Fulton et al. (1995) com algumas modificações (Método 2) utilizando-se nove acessos de melancia do Banco de Germoplasma localizado em Petrolina-PE. Os resultados revelaram a eficiência do Método 2 pelo qual foi obtido uma média de 500ng de DNA de tecido cotiledonar e média de 1593ng de DNA de folhas jovens definitivas. No entanto, a seleção final do método dependerá da avaliação da integridade e da pureza do DNA extraído o que será feito após a amplificação do DNA.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, técnica molecular, germoplasma.

ABSTRACT

Evaluation of two methods of DNA extraction in watermelon

The extraction of genomic DNA is a routine in the application of molecular techniques that assist programs of germplasm characterization. However, for several molecular biology works such as molecular markers and gene cloning the success is dependent of the DNA utilization in terms of an adequate amount and quality. For this reason, different protocols had been developed and adjusted for each situation, although, very little has been done for watermelon. Thus, two DNA extraction methods (CTAB 2% - Method 1 and Fulton et al. (1955)'s modified – Method 2) were used in nine watermelon accessions from the Watermelon Germplasm Bank based at Petrolina-PE. The results revealed that the efficiency of the Method 2 from which it was obtained 500ng of DNA of cotyledonary leaves and 1593ng from definitive young leaves.

However, the final choice of the DNA extraction method will depend of the evaluation of the DNA integrity and purity which in turn will be done after DNA amplification.

Keywords: *Citrullus lanatus*, molecular techniques, germplasm.

Boa parte da variabilidade da melancia encontrada no Nordeste brasileiro encontra-se preservada em um Banco Ativo de Germoplasma de cucurbitáceas (BAG), localizado em Petrolina – PE (Queiróz et al., 1999), onde estudos de multiplicação vem sendo desenvolvidos no manejo do banco. Concomitantemente, tem sido realizada a caracterização dos acessos e descrição da variabilidade genética de acessos para características da planta e fruto (Queiróz, 1993; Romão, 1995).

No entanto, os estudos realizados limitaram-se aos caracteres morfológicos e é sabido que as técnicas moleculares são importantes para descrever a variabilidade genética em bancos de germoplasma (Jarret et al., 1997). Para tanto, torna-se necessário otimizar a extração de DNA genômico de melancia para que se tenha quantidade de DNA suficiente para as diversas etapas de estudo. Assim, foram avaliados dois protocolos para extração de DNA vegetal em diferentes acessos da BAG, utilizando-se folhas cotiledonares e folhas definitivas jovens.

MATERIAL E MÉTODO

Nove acessos de melancia do BAG foram semeados em bandejas de isopor contendo substrato de hortaliças e conduzido em casa de vegetação na Embrapa Semi-Árido (Método 1-CTAB 2%) e na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Método 2 -Fulton et al., 1995 modificado pela adição de 30uL de proteinase K, com posterior incubação a 55°C por 30minutos e pela substituição do bissulfito de sódio por 2-mercaptoetanol a 1%). A germinação em ambos os locais foi monitorada em intervalos de cinco dias a partir do plantio até os 15 dias. A extração do DNA, no Método 1 foi realizada no Laboratório de Genética da Embrapa Semi-Árido e no Método 2 no Laboratório de Genética Molecular Humana na UFPE em Recife-PE.

A extração de DNA pelo método CTAB 2% foi realizada tomando-se amostras de folhas jovens definitivas com cerca de 33 dias após o plantio de todos os acessos utilizando-se o protocolo descrito por Ferreira & Gratapaglia (1996) enquanto que a extração de DNA pelo Método 2 foi feita aos quatorze dias após o semeio (folhas cotiledonares) e aos 23 dias (folhas definitivas jovens) sendo as mesmas envolvidas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -20C por dois dias.

A quantificação do DNA resultante de ambos protocolos foi realizada em espectrofotômetro UV, medindo-se a absorvância em 260nm. A concentração é dada pela fórmula $[DNA]=50\mu g/ml \times D \times A_{260}$, onde D é o fator de diluição e A₂₆₀ é a leitura em absorvância de 260/280nm.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os acessos apresentaram diferença de comportamento quanto à germinação nos dois locais (Tabela 1) sendo que em Recife a maioria dos acessos tiveram menor germinação do que em Petrolina. Vários acessos já apresentavam a germinação total aos cinco dias após o plantio em Petrolina-PE enquanto que em Recife o máximo de germinação só foi conseguido em um acesso na última avaliação. Os acessos 01 e 07 apresentaram comportamento típico de dormência, um caráter de importância evolutiva (Romão, 1995).

Tabela 1. Porcentagem de germinação de sementes de diferentes acessos de melancia em casa-de-vegetação em Recife e Petrolina.

| Acesso | % de germinação em Recife-PE | | | | % de germinação em Petrolina-PE | | | |
|--------|------------------------------|--------|---------|-------|---------------------------------|---------|---------|-------|
| | 5 dias | 8 dias | 15 dias | Total | 7 dias | 10 dias | 14 dias | Total |
| 01 | 25 | 66 | 100 | 100 | 25 | 75 | 100 | 100 |
| 02 | 25 | 31 | 62 | 62 | 50 | 88 | 100 | 100 |
| 03 | 31 | 31 | 56 | 56 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 05 | 6 | 6 | 6 | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 06 | 25 | 44 | 63 | 63 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 07 | 31 | 50 | 94 | 94 | 75 | 88 | 100 | 100 |
| 08 | 19 | 57 | 70 | 70 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 09 | 25 | 50 | 63 | 63 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 10 | 25 | 63 | 82 | 82 | 88 | 100 | 100 | 100 |

O protocolo estabelecido por Fulton et al. (1995) modificado, apresentou maior quantidade de DNA tanto de tecido cotiledonar como de folhas definitivas jovens em todos os acessos, exceto o acesso 06 (Tabela 2) indicando que o mesmo poderá ser adotado para extração de DNA genômico em plantas de melancia para estudos moleculares, mesmo que alguns acessos possam apresentar baixa quantidade de DNA na fase cotiledonar, neste caso, recorrendo-se a folhas definitivas. Contudo, para que o método seja definitivamente escolhido é necessário se

fazer análises que confirmem a integridade e pureza do DNA o que será feito após as reações de amplificação.

Tabela 2. Quantificação de DNA (ng) obtidos de folhas cotiledonares e definitivas pelos Métodos 1 e 2. Laboratório de Genética Molecular Humana. UFPE, 2003.

| Acessos | Método 1 (ng de DNA) | Método 2 (ng de DNA) | |
|---------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | Folhas definitivas | Folhas cotiledonares | Folhas definitivas |
| 01 | 115 | 569 | 2677 |
| 02 | 108 | 363 | 1038 |
| 03 | 84 | 783 | 1515 |
| 05 | 77 | 292 | 1594 |
| 06 | 73 | 14 | 951 |
| 07 | 15 | 171 | 1591 |
| 08 | 43 | 834 | 1599 |
| 09 | 90 | 944 | 1615 |
| 10 | 62 | 534 | 1758 |
| Média | 74 | 500 | 1593 |
| Desvio Padrão | 31 | 316 | 491 |

LITERATURA CITADA

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 2^o edição. Embrapa. 219p. 1996.

FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 13, n. 3, p.207-209, 1995.

JARRET, R.L.; MERRICK, L.C.; HOLMS, T.; EVANS, J. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. *Genome*, v. 40, p. 433-449. 1997.

QUEIRÓZ, M.A. Potencial do Germoplasma de Cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 1, p.7-9. 1993

QUEIROZ, M.A.; RAMOS, S.R.R.; MOURA, M. da C.C.L.; COSTA, M. S.V.; SILVA, M.A. S. Situação atual e prioridades do Branco Ativo de Germoplasma de cucurbitáceas do Nordeste Brasileiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.17, Suplemento, p.25-29, 1999.

ROMÃO, R. L. *Dinâmica Evolutiva e Variabilidade de Populações de Melancia* [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] em três regiões do Nordeste brasileiro. Piracicaba:ESALQ-USP. 75p. 1995. (Dissertação).