

Eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA em macieira

Efficiency of different protocols of apple tree DNA extraction

Thyana Lays Brancher^{1*}, Maraisa Crestani Hawerroth², Marcus Vinícius Kvitschal² & Danielle Caroline Manenti³

¹ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. *Autor para correspondência: thyanalays@hotmail.com

² Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Caçador, SC, Brasil.

³ Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

Submissão: 20/09/2017 | Aceite: 13/06/2018

RESUMO

Existem diversos protocolos para a extração de DNA vegetal, que proporcionam concentrações e qualidade variáveis de DNA em função da interação entre os componentes das soluções de extração e os compostos dos tecidos vegetais interferentes, como polifenóis e proteínas. O objetivo da realização do trabalho foi testar a eficiência de protocolos de extração de DNA a partir de folhas de macieira. Testou-se três protocolos de extração de DNA: Kit FastDNA[®] SPIN da MP Biomedicals; adaptação a partir do Mini Kit DNeasy[®] Plant da Qiagen; adaptação do protocolo CTAB. Foram utilizadas folhas jovens frescas e congeladas dos genótipos M-10/09, SCS426 Venice e SCS427 Elenise. A pureza e a concentração das amostras de DNA obtidas foram analisadas em espectrofotômetro. O DNA foi testado via reações de PCR com o iniciador SAND, que acessa uma região do genoma da macieira associada a um fator de transcrição. As maiores concentrações de DNA foram proporcionadas pelo protocolo CTAB adaptado. Já quanto à pureza, considerou-se satisfatório o protocolo adaptado a partir do Mini Kit DNeasy[®] Plant e o CTAB adaptado, enquanto que todos os protocolos foram eficientes para a amplificação dos fragmentos alvo via reações de PCR. Dessa forma, os três protocolos podem ser utilizados para a extração de DNA de macieira a partir de folhas. Contudo, com a utilização do protocolo CTAB observou-se elevada eficácia, em razão da maior qualidade e concentração de DNA extraído, além do menor custo relativo no processo de extração.

PALAVRAS-CHAVE: *Malus domestica*, biologia molecular, tecido foliar, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Several protocols to extract plant DNA exist, which can provide varying concentrations and quality of DNA due to the interaction between the protocol components and plant tissue compounds that affect the extraction, such as polyphenols and proteins. The objective of this study was to test the efficiency of different protocols for extracting DNA from apple tree leaves. Three DNA extraction protocols were tested: FastDNA[®] SPIN Kit - MP Biomedicals; adaptation from Qiagen DNeasy[®] Plant Mini Kit; adapted CTAB. Fresh and frozen young leaves of the genotypes M-10/09, SCS426 Venice and SCS427 Elenise were used. The purity and concentration of the DNA were analyzed using a spectrophotometer. The DNA extracted was tested using PCR with one primer related to regions of the genome that access transcription factors in apples (SAND). The highest concentrations of DNA were provided by the adapted CTAB protocol. Regarding purity, the adaptation from Qiagen DNeasy[®] Plant Mini Kit and the adapted CTAB protocols were considered satisfactory. Regarding DNA quality verified by PCR, all protocols were efficient for amplification of the target fragments. Therefore, all three protocols can be used for DNA extraction from apple leaves; however, the use of the adapted CTAB protocol showed high efficiency, due to the higher quality and concentration of DNA, with the lowest relative cost in the process of DNA extraction.

KEYWORDS: *Malus domestica*, molecular biology, leaf tissue, polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie frutífera de elevada importância econômica e comercial em todo o mundo, sendo a maçã a terceira fruta mais produzida (FAOSTAT 2014). Devido ao aumento da exigência dos consumidores sobre a qualidade dos frutos, às mudanças climáticas e ao surgimento de novas doenças e pragas, o melhoramento genético de macieira se mostra fundamental para

a continuação do cultivo de macieira em todo o mundo (BAUMGARTNER et al. 2016).

Nos últimos anos, as pesquisas de melhoramento genético com a cultura da macieira passaram a incluir técnicas de biologia molecular. A utilização dessas técnicas em macieira tem como finalidade principal otimizar a eficiência e o tempo empregado nas pesquisas, facilitando a seleção de genótipos promissores, em razão que é uma espécie perene e algumas características demandam muitos anos para serem devidamente caracterizadas (BIANCO et al. 2014, CUSIN et al. 2017, GUAN et al. 2015, ZHANG et al. 2014). Entretanto, a eficiência das análises utilizando as técnicas de biologia molecular depende da obtenção de DNA de qualidade, íntegro, com baixo nível de contaminantes e em quantidade suficiente para ser utilizado nos passos seguintes de cada processo (EDGE-GARZA et al. 2014).

A principal dificuldade para isolar o material genético de macieira se deve às plantas do gênero *Malus* possuírem alta concentração de metabólitos secundários, que interferem significativamente na qualidade e na quantidade do DNA extraído (AUBAKIROVA et al. 2014). Portanto, os protocolos de extração utilizados em macieira devem ser capazes de eliminar esses compostos interferentes, minimizando possíveis efeitos negativos nos processos seguintes nos quais o DNA será utilizado. Além disso, dá-se preferência a protocolos que sejam de baixo custo e de rápida realização, em razão da necessidade de se manipular um grande número de amostras. Sendo assim, visando agilidade, eficiência e economia, o melhor método de extração de DNA de macieira é aquele que proporciona maior quantidade e qualidade do material genético isolado, em função da integridade e pureza do DNA extraído.

Nesse sentido, teve-se como objetivo avaliar a eficiência de protocolos de extração de DNA vegetal aplicados à extração de DNA de folhas de macieira.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), Estação Experimental de Caçador, em Caçador, SC. Testou-se três protocolos de extração de DNA de plantas: a) kit FastDNA® SPIN da marca MP Biomedicals (Kit FastDNA® Spin); b) protocolo adaptado por ANTANAVICIUTE et al. (2015) a partir do kit DNeasy® Plant da marca Qiagen (DNeasy adaptado); e c) protocolo de extração de DNA de folhas desenvolvido por LEFORT & DOUGLAS (1999), com as modificações (REVERS et al. 2006) (CTAB adaptado) (Tabela 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 (protocolo de extração de DNA e tipo de material vegetal), com 15 repetições, representadas por duas amostras de cada genótipo. O genótipo não foi considerado como fator de variação por não caracterizar o foco desta avaliação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram coletadas folhas jovens de três genótipos de macieira (seleção M-10/09, cultivar SCS426 Venice e cultivar SCS427 Elenise), com até 5 cm de comprimento, retiradas de estacas cuja brotação foi induzida artificialmente em câmaras de crescimento com umidade e temperatura controladas ($90 \pm 1,5\%$ e 25 ± 1 °C). Metade das folhas coletadas foi acondicionada em sacos plásticos, devidamente identificados, e mantidas à - 20 °C por sete dias (congeladas) antes da extração de DNA e a outra metade foi submetida aos protocolos de extração de DNA imediatamente após a coleta.

Em todos os protocolos utilizou-se 150 mg de tecido vegetal, cuja maceração foi realizada no extrator da marca MP Biomedicals, com a programação padrão recomendada pelo fabricante para tecido foliar de pereira, que se assemelha ao tecido foliar de macieira (6 m s^{-1} por 40 segundos), utilizando o tubo Lysing Matrix A, específico desse aparelho.

Após a extração de DNA foi realizada a leitura da concentração e qualidade do DNA extraído em espectrofotômetro modelo S50 e microcubeta QuantiMate500, ambos da marca Biochrom, utilizando 5 µL de amostra. Além disso, com a intenção de eliminar possíveis contaminações de RNA, todas as amostras foram tratadas com 2 µg de RNase A (PureLink™) por µL de amostra de DNA, e incubadas à 37 °C por 30 min. Os procedimentos de análise das amostras de DNA em espectrofotômetro e o tratamento com RNase foram idênticos para os três protocolos utilizados. Após o tratamento e leitura, o DNA extraído foi mantido à -20 °C até a sua utilização.

- Kit FastDNA® Spin: Foram seguidas as orientações do fabricante do “Kit FastDNA® SPIN” para a extração do DNA (MPBIO 2016).

- DNeasy adaptado: A solução de lise celular (Tabela 1) foi aquecida à 60 °C por 10 min no momento de sua utilização. O tecido foliar foi adicionado a cada tubo “Lysing Matrix A”, juntamente com 400 µL da solução de lise celular previamente aquecida. Após a maceração, os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C durante 10 min, invertendo-os duas vezes durante o período de incubação (aos 5 e 9

min). Posteriormente, 130 μL da solução de purificação foram adicionados a cada tubo, os quais foram homogeneizados e mantidos à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. As amostras foram centrifugadas durante 5 min a 20.000 g em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante resultante foi transferido para um novo microtubo contendo 675 μL da solução de precipitação gelada ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), seguido por homogeneização com auxílio da micropipeta. As amostras foram centrifugadas durante 2 min a 6.000 g em TA. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado duas vezes com 500 μL da solução da lavagem, e as amostras foram suavemente invertidas três a quatro vezes. Após cada uma das lavagens, as amostras foram centrifugadas a 6.000 g durante 1 min em TA. O *pellet* foi mantido em TA até a secagem completa e posteriormente ressuspensionado em 100 μL da solução de ressuspensão.

- CTAB adaptado: O material vegetal foi adicionado ao tubo "Lysing Matrix A", juntamente com 600 μL de solução de lise celular (Tabela 1). Após a maceração das amostras, os tubos foram incubados em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 min, invertendo-os a cada ≈ 6 min. Em seguida, os tubos foram mantidos em TA por 5 min, sendo posteriormente adicionados 600 μL da solução de purificação e homogeneizados gentilmente por inversão constante dos tubos durante 5 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min em TA, sendo a fase aquosa ($\approx 450\text{ } \mu\text{L}$) transferida para um novo microtubo. Ao microtubo com o líquido remanescente da etapa anterior foram adicionados 250 μL de NaCl 5M e 750 μL de isopropanol gelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo agitado vigorosamente e refrigerado ($4\text{ a }6\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 20 min. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min em TA para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 900 μL de etanol 75% gelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente seco em TA e ressuspensionado em 100 μL da solução de ressuspensão.

Tabela 1. Características das soluções que compõem os diferentes protocolos de extração de DNA de plantas de macieira testados.

Table 1. Characteristics of the solutions that make up the different DNA extraction protocols of apple plants tested.

Solução	Características da solução utilizada em cada protocolo de extração de DNA de macieira		
	Kit FastDNA® Spin	DNeasy adaptado	CTAB adaptado
Solução de lise celular	CLS-VF + PPS*	Triton X-100 2%; SDS 1%; cloreto de sódio 0,5 M; cloridrato de guanidina 0,5 M; Tris pH 8,0 100 mM e MOPS 40 mM	CTAB 1%; PVP40 2%; Tween 20 0,5%; Tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 20 mM; cloreto de sódio 1,1 M, cloreto de lítio 0,4 M; β -mercaptoetanol 0,2% + PVPP**
Solução de purificação	Binding Matrix*	Acetato de potássio 5M	Clorofórmio: álcool isoamílico 24:1
Solução de precipitação	SEWS-M*	Cloridrato de guanidina 0,66 M e etanol 63,3%	Cloreto de sódio 5 M + isopropanol***
Solução de lavagem	-	Tris pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM; cloreto de sódio 50 mM e etanol 67%	Etanol 75%
Solução de ressuspensão	DES*	Tris-HCl pH 8,0 10 mM e EDTA pH 8,0 0,5 mM	Tris-HCl pH 8,0 10 mM e EDTA 1 mM

*Solução comercial. **Não faz parte da solução. É adicionado à amostra logo após a aplicação da solução de lise celular. ***Solução de cloreto de sódio e o isopropanol são mantidas separadas.

Avaliação da eficiência dos protocolos testados

A eficiência dos protocolos de extração de DNA em macieira foi avaliada pela concentração ($\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) do DNA obtido e a respectiva pureza pelo quociente das leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260 e 280 ηm (A_{260}/A_{280}), e 260 e 230 ηm (A_{260}/A_{230}). Esses comprimentos de onda correspondem à proteínas e outros contaminantes (280 ηm), compostos orgânicos, como fenóis (230 ηm) e ácidos nucleicos (260 ηm) (DESJARDINS & CONKLIN 2010).

Para testar a integridade do material genético resultante dos métodos de extração, as amostras de maior e menor concentração de DNA obtidas em cada uma das condições de avaliação (protocolo vs condição do material vegetal, para cada um dos três genótipos) foram submetidas à amplificação pela técnica de PCR utilizando um par de iniciadores para o gene referência "SAND" em macieira, referente a um fator de transcrição (*Forward*: TACTAATGTGCAAACACAAG; *Reverse*: TGATTCTGATGCCATGACAAAGT) (PERINI et al. 2014).

As reações de PCR foram compostas por 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), tampão da enzima 1x, 2,00 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 50 ng de DNA genômico. As reações foram conduzidas em termociclador T100™ da marca Bio-Rad, com a seguinte configuração: 3 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos compostos de 94 °C por 1 min, pareamento à 62 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, seguindo-se de uma etapa final de extensão à 72 °C por 7 min e, mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% (80 V por 2 horas). As amostras foram coradas com o fluoróforo intercalante GelRed® e a leitura do perfil dos fragmentos amplificados foi realizada mediante análise do gel por imagem capturada em fotodocumentador Kodak Geologic 2012 Pró.

Estimativa de custo por amostra

Para estimar o custo por amostra resultante dos diferentes protocolos de extração de DNA, os valores dos reagentes utilizados foram consultados junto às principais fornecedoras do Brasil (Sigma-Aldrich®, Promega®, Interprise® e ThermoFisher®). Enquanto o valor do kit FastDNA® SPIN foi cotado junto à empresa Síntese Biotecnologia, representante da marca MP Biomedicals no Brasil atualmente. Como informação adicional, o tempo aproximado de extração de DNA utilizado em cada protocolo foi estimado considerando unicamente o processo de extração, desconsiderando o tempo de preparo das soluções.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade das amostras de DNA foi influenciada pelo tipo de material vegetal (M) utilizado nos diferentes protocolos testados (P), uma vez que se verificou interação M x P significativa para as relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . Contudo, a concentração de DNA obtida foi dependente apenas dos protocolos testados, não sofrendo efeito significativo da condição do tecido foliar utilizado e nem da interação entre esses fatores de variação.

Considerando a relação das absorvâncias A_{260}/A_{280} , todos os protocolos utilizados proporcionaram extração de DNA dentro do padrão de qualidade preconizado, tendo sido obtidos valores superiores a 1,8 (Tabela 2).

O uso do protocolo “CTAB adaptado” proporcionou a extração de amostras de DNA de melhor qualidade que os demais métodos testados, visto que a relação A_{260}/A_{280} média (2,137) foi superior em comparação ao uso do “DNeasy adaptado” (2,045) e do “Kit FastDNA® Spin” (1,835) (Tabela 2). Para o “Kit FastDNA® Spin”, o uso de folhas frescas proporcionou relação A_{260}/A_{280} superior ao das congeladas. O DNA extraído de folhas congeladas utilizando o protocolo “CTAB adaptado”, por sua vez, proporcionou valor superior para a relação A_{260}/A_{280} do que o DNA extraído de folhas frescas. A relação A_{260}/A_{280} das amostras extraídas com o uso do protocolo “DNeasy adaptado” não sofreu alteração em função do tipo de material vegetal utilizado.

De modo geral, para a relação de absorvâncias A_{260}/A_{230} , o uso dos protocolos “CTAB adaptado” e “DNeasy adaptado” também evidenciou a extração de amostras de DNA de boa qualidade, visto que as relações A_{260}/A_{230} foram superiores à 2,0. O protocolo “CTAB adaptado” proporcionou a extração de amostras de DNA de melhor qualidade, tendo sido a relação A_{260}/A_{230} (2,384) superior em comparação aos demais (Tabela 2). AUBAKIROVA et al. (2014) realizaram testes de extração de DNA em macieira que incluíam dois protocolos semelhantes ao “CTAB adaptado”, e obtiveram valores de A_{260}/A_{280} variando entre 1,09 a 1,68, valores abaixo dos considerados ideais e aos valores encontrados nesta avaliação. O uso de folhas congeladas proporcionou amostras de DNA com relação A_{260}/A_{230} superior (1,600) ao uso de folhas frescas (1,526). Apenas para o protocolo “DNeasy adaptado” o tipo de tecido, fresco ou congelado, interferiu na qualidade da amostra de DNA extraído, sendo observada a relação A_{260}/A_{230} superior mediante o uso de folhas congeladas (2,186) em detrimento à de folhas frescas (2,002). Uma vez que os valores das relações de absorvâncias A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} considerados ideais quanto à qualidade das amostras de DNA são acima de 1,8 e 2,0, respectivamente (ANTANAVICIUTE et al. 2015, CHENG et al. 1997, DESJARDINS & CONKLIN 2010), pode-se inferir que o “Kit FastDNA® Spin” foi o protocolo menos eficiente para a extração de DNA em macieira, principalmente em função das médias de A_{260}/A_{230} terem sido muito abaixo de 2,0.

De modo geral, para a relação de absorvâncias A_{260}/A_{230} , o uso dos protocolos “CTAB adaptado” e “DNeasy adaptado” também evidenciou a extração de amostras de DNA de boa qualidade, visto que as relações A_{260}/A_{230} foram superiores à 2,0. O protocolo “CTAB adaptado” proporcionou a extração de amostras de DNA de melhor qualidade, tendo sido a relação A_{260}/A_{230} (2,384) superior em comparação aos demais (Tabela 2). AUBAKIROVA et al. (2014) realizaram testes de extração de DNA em macieira que incluíam dois protocolos semelhantes ao “CTAB adaptado”, e obtiveram valores de A_{260}/A_{280} variando entre

1,09 a 1,68, valores abaixo dos considerados ideais e aos valores encontrados nesta avaliação. O uso de folhas congeladas proporcionou amostras de DNA com relação A_{260}/A_{230} superior (1,600) ao uso de folhas frescas (1,526). Apenas para o protocolo “DNeasy adaptado” o tipo de tecido, fresco ou congelado, interferiu na qualidade da amostra de DNA extraído, sendo observada a relação A_{260}/A_{230} superior mediante o uso de folhas congeladas (2,186) em detrimento à de folhas frescas (2,002). Uma vez que os valores das relações de absorbâncias A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} considerados ideais quanto à qualidade das amostras de DNA são acima de 1,8 e 2,0, respectivamente (ANTANAVICIUTE et al. 2015, CHENG et al. 1997, DESJARDINS & CONKLIN 2010), pode-se inferir que o “Kit FastDNA® Spin” foi o protocolo menos eficiente para a extração de DNA em macieira, principalmente em função das médias de A_{260}/A_{230} terem sido muito abaixo de 2,0.

Tabela 2. Qualidade e concentração de DNA em amostras de DNA obtidas utilizando diferentes protocolos de extração a partir de folhas frescas e folhas congeladas de macieira.

Table 2. Quality and concentration of DNA samples obtained using different extraction protocols from fresh leaves and frozen leaves of apple trees.

Relação A_{260}/A_{280}				
Tipo de material vegetal	Protocolo de extração de DNA de macieira			
	Kit FastDNA® Spin	DNeasy adaptado	CTAB adaptado	Média
Folha fresca	1,854 Ac	2,030 Ab	2,121 Ba	2,002 A
Folha congelada	1,816 Bc	2,061 Ab	2,153 Aa	2,010 A
Média	1,835 c	2,045 b	2,137 a	--
Relação A_{260}/A_{230}				
Tipo de material vegetal	Protocolo de extração de DNA de macieira			
	Kit FastDNA® Spin	DNeasy adaptado	CTAB adaptado	Média
Folha fresca	0,222 Ac	2,002 Bb	2,354 Aa	1,526 B
Folha congelada	0,200 Ac	2,186 Ab	2,414 Aa	1,600 A
Média	0,211 c	2,094 b	2,384 a	--
Concentração de DNA na amostra ($\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)				
	Protocolo de extração de DNA de macieira			
	Kit FastDNA® Spin	DNeasy adaptado	CTAB adaptado	Média
Média	285,44 c	819,24 b	2405,74 a	--

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Compostos identificados no comprimento de onda 280 nm são, em grande parte, proteínas e outros contaminantes (DESJARDINS & CONKLIN 2010) que, possivelmente, não foram eliminados e/ou extraídos juntamente com o DNA mediante o uso dos três protocolos testados nessa avaliação. Entretanto, em 230 nm são identificados compostos orgânicos, como fenóis (DESJARDINS & CONKLIN 2010). Como a macieira é rica em compostos identificados em ambas as faixas de leitura no espectrofotômetro, sugere-se que os reagentes que compõem o “Kit FastDNA® Spin” não são eficientes para a separação e retirada dos mesmos, resultando em menor qualidade das amostras de DNA extraído, representada pelas relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} .

Quanto a concentração de DNA obtido (Tabela 2), o uso do protocolo “CTAB adaptado” proporcionou maior concentração de DNA (2405,74 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), seguido pelo protocolo “DNeasy adaptado” (819,24 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) e pelo “Kit FastDNA® Spin” (285,44 $\eta\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). É importante ressaltar que a concentração de DNA obtida nos três protocolos não foi influenciada pelo tipo de material vegetal utilizado, o que possibilita a utilização de folhas frescas ou congeladas à -20 °C, sem a obrigatoriedade de congelamento à -80 °C. Este é um aspecto que permite maior flexibilidade na utilização desse tipo de protocolo, considerando que muitas vezes as amostras são coletadas em pomares distantes dos laboratórios, não sendo possível a extração imediata ou

armazenamento à -80 °C.

Considerando que em todos os protocolos foram utilizados 150 mg de material vegetal, o rendimento da extração foi de 1,90 $\eta\text{g mg}^{-1}$ de DNA com o “Kit FastDNA® Spin”, de 5,46 $\eta\text{g mg}^{-1}$ com o “DNeasy adaptado” e de 16,04 $\eta\text{g mg}^{-1}$ com o “CTAB adaptado”. CHENG et al. (1997) realizaram testes utilizando um protocolo similar ao protocolo “CTAB adaptado” e obtiveram concentrações de DNA entre 10 e 35 $\eta\text{g mg}^{-1}$ de tecido vegetal em diferentes espécies, entre elas o gênero *Malus*, confirmando a boa eficiência do “CTAB adaptado” para extração de DNA de macieira.

Observando-se os produtos da PCR para o gene SAND em gel de agarose 3% (Figura 1) pode-se verificar que as amostras extraídas com os três protocolos testados apresentaram resultados satisfatórios, caracterizados por bandas nítidas, tanto para amostras de menor quanto de maior concentração de DNA.

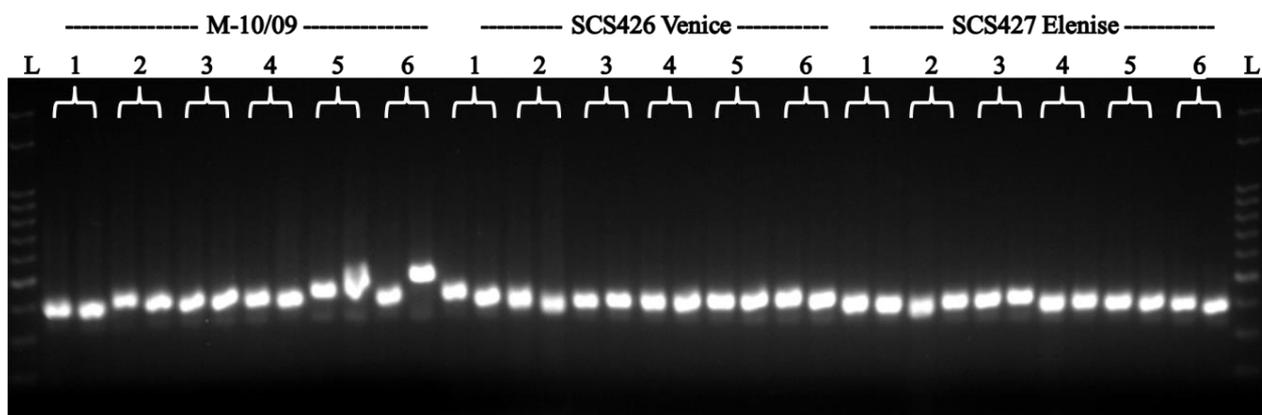


Figura 1. Gel de agarose 3% após a eletroforese dos produtos das reações de PCR com o gene SAND realizadas utilizando as amostras de DNA de maior e menor concentração a partir de folhas frescas e congeladas, respectivamente, em cada protocolo testado, para cada genótipo de macieira considerado. L: Marcador de peso molecular de 50 pb; 1: Folhas frescas, utilizando o protocolo “Kit FastDNA® Spin”; 2: Folhas congeladas utilizando o protocolo “Kit FastDNA® Spin”; 3: Folhas frescas utilizando o protocolo “DNeasy adaptado”; 4: Folhas congeladas utilizando o protocolo “DNeasy adaptado”; 5: Folhas frescas utilizando o protocolo “CTAB adaptado”; 6: Folhas congeladas utilizando o protocolo “CTAB adaptado”.

Figure 1. Agarose gel (3%) after the electrophoresis of the PCR products performed using the highest and lowest concentration DNA samples from fresh and frozen leaves, respectively, in each protocol tested, for each apple genotype considered. L: 50 bp molecular weight marker; 1: Fresh leaves using the “FastDNA® Spin Kit” protocol; 2: Frozen leaves using the “FastDNA® Spin Kit” protocol; 3: Fresh leaves using the “adapted DNeasy” protocol; 4: Frozen leaves using the “adapted DNeasy protocol; 5: Fresh leaves using the “adapted CTAB Adapted” protocol; 6: Frozen leaves using the “adapted CTAB” protocol.

Considerando o custo médio e o tempo para a execução de cada protocolo, a extração de DNA realizada com o “Kit FastDNA® Spin” foi a mais rápida, sendo dedicados 45 min para uma bateria de 10 amostras, porém apresentou um custo elevado (aproximadamente R\$ 26,50 por amostra). Para o protocolo “DNeasy adaptado”, o preço médio de cada amostra foi de R\$ 1,82, sendo realizado em aproximadamente 1 hora e 30 min (bateria de 10 amostras). Na execução do protocolo “CTAB adaptado” foram gastos aproximadamente 3 horas e 30 min para a extração de DNA de 10 amostras, a um custo de R\$ 3,95 cada.

Comparativamente, para se obter a mesma quantidade de DNA fornecida pelo uso do protocolo “CTAB adaptado” seriam necessárias aproximadamente oito extrações utilizando o protocolo “Kit FastDNA® Spin”, a um custo total equivalente a R\$ 223,35. Já com o “DNeasy adaptado” seriam necessárias aproximadamente três extrações (custo total aproximado de R\$ 5,46). Esses valores sugerem que a maior demanda de tempo para a realização do “CTAB adaptado” é compensada pela elevada concentração de DNA obtida ao final do processo, resultando em uma maior eficiência e economia em comparação aos demais protocolos testados.

CONCLUSÃO

Os três protocolos testados podem ser utilizados para a extração de DNA a partir de folhas de macieira. Porém, o protocolo “CTAB adaptado” proporcionou melhor custo-benefício e qualidade, bem como

maior concentração de DNA extraído, sugerindo maior eficiência para utilização na extração de DNA de macieira a partir de tecido foliar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EPAGRI, à FAPESC, à UDESC, à FINEP, à CAPES e ao CNPq pelo fomento à pesquisa e financiamento de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- ANTANAVICIUTE L et al. 2015. An inexpensive and rapid genomic DNA extraction protocol for rosaceous species. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 90: 427-432.
- AUBAKIROVA K et al. 2014. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris*. *Genetics and Molecular Research* 13: 1278-1287.
- BAUMGARTNER IO et al. 2016. Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies. *Tree Genetics & Genomes* 12:35.
- BIANCO L et al. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plos One* 9: 1-9.
- CHENG FS et al. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience* 32: 921-922.
- CUSIN R et al. 2017. New biotechnological tools to accelerate scab-resistance trait transfer to apple. *Genetics and Molecular Biology* 40: 305-311.
- DESJARDINS P & CONKLIN D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments* 45: 2565.
- EDGE-GARZA DA et al. 2014. A high-throughput and cost-efficient DNA extraction protocol for the tree fruit crops of apple, sweet cherry, and peach relying on silica beads during tissue sampling. *Molecular Breeding* 34: 2225-2228.
- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Database. Production/Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 24 jul. 2017.
- GUAN Y et al. 2015. QTLs detected for individual sugars and soluble solids content in apple. *Molecular Breeding* 35: 1-13.
- LEFORT F & DOUGLAS GC. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56: 259-263.
- MPBIO. 2016. Application manual FastDNA® SPIN Kit. Disponível em: <https://www.mpbio.com/includes/protocol/FastDNA%20SPIN%20kit.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2017.
- PERINI P et al. 2014. Reference genes for transcriptional analysis of flowering and fruit ripening stages in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 34: 829-842.
- REVERS LF et al. 2006. Uso prático de marcadores moleculares para seleção assistida no melhoramento de uvas de mesa apirênicas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 104-108.
- ZHANG XJ et al. 2014. A and MdMYB1 allele-specific markers controlling apple (*Malus x domestica* Borkh.) skin color and suitability for marker-assisted selection. *Genetics and Molecular Research* 13: 9103-9114.