



NOTA CIENTÍFICA

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE CACAUEIRO, *Theobroma cacao* L.

Almiro Neves dos Santos Júnior¹, Guilherme Silva Nascimento², Franco Jesus de Andrade¹, Joao Pedro Alves de Almeida Takahash², Emili Rane de Jesus Nascimento², Karina Peres Gramacho^{1,2}*

¹FITOMOL/CEPEC/CEPLAC, km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna. 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil; almiro39@live.com.

²Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Ilhéus/ Itabuna, km16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Autor para correspondência: gramachokp@hotmail.com

Existem diversos protocolos para extração de DNA vegetal que fornecem concentrações variáveis e qualidade de DNA. Testamos a eficiência de três protocolos de extração de DNA de folhas do cacau: Kit Qiagen DNeasy® (A); Kit Promega Wizard® (B); e uma adaptação do protocolo CTAB (C). A pureza e concentração das amostras de DNA obtidas foram analisadas por espectrofotômetro. O Protocolo B forneceu maiores concentrações de DNA. Quanto à pureza, todos os protocolos foram considerados satisfatórios, sendo que o Protocolo A apresentou melhores valores. Todos os protocolos se mostraram eficientes na extração de DNA.

Palavras-chave: Ácido nucleico, biologia molecular, tecido foliar.

Comparison between different DNA extraction protocols from leaves of the cocoa tree, *Theobroma cacao* L. There are several protocols useful for plant DNA extraction that provide variable concentrations and quality of DNA. We tested the efficiency of three DNA extraction protocols from cocoa tree leaves: Kit Qiagen DNeasy® (A); Kit Promega Wizard® (B); and an adaptation of the CTAB protocol (C). The purity and concentration of the DNA samples obtained were analyzed using a spectrophotometer. Protocol B provided the highest concentrations of DNA. Regarding purity, all protocols were considered satisfactory, with Protocol A having better values. All protocols proved to be efficient for DNA extraction.

Key words: Molecular biology, nucleic acid, leaf tissue.

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma planta originária da América Tropical que foi domesticada há cerca de 5.300 anos e é bem adaptada às características climáticas da floresta úmida. Suas amêndoas são essenciais para a fabricação de chocolate, bebidas, cosméticos e uma variedade de produtos, impulsionando um mercado internacional que movimentou bilhões de dólares a cada ano.

Nos últimos anos, passaram a se utilizar de técnicas de melhoramento genético com o cultivo do cacauero, tendo como finalidade principal otimizar a eficiência e o tempo gasto em pesquisa, facilitando a seleção de genótipos promissores. A primeira etapa crucial para essas investigações consiste na extração de DNA genômico em quantidade e qualidade suficientes, possibilitando a obtenção de um melhor material amostral (WILLIAMS et al., 1990; WELSH e MCCLELLAND, 1990) para diversos tipos de estudos genéticos.

Isolar o material genético do cacauero é desafiador devido ao alto teor de polifenóis e à presença de mucilagens foliares, tornando o procedimento de extração de DNA complexo (COUCH e FRITZ, 1990). Portanto, é muito importante a utilização de protocolos que eliminem esses compostos interferentes para minimizar impactos negativos nos processos

subsequentes. Além disso, a preferência é por métodos que sejam eficientes, de baixo custo e rápidos, devido à necessidade de lidar com muitas amostras. O método ideal para a extração de DNA do cacau é aquele que oferece a maior quantidade e qualidade de material genético isolado, garantindo a integridade e pureza do DNA extraído.

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a eficiência de protocolos de extração de DNA de folhas de cacauero, incluindo abordagens caseiras e o uso de kits comerciais.

Para a extração de DNA, folhas de *Theobroma cacao* L. em estágio intermediário de maturação (Figura 1) foram coletadas em campo, desinfestadas, e colocadas em sacos de papel etiquetados, e armazenadas em geladeira por cerca de 14 dias. No dia da extração, cerca de 1g de tecido foliar da planta foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó bem fino, e cerca de 200 mg de tecido foi transferido para um tubo Eppendorf de 2,0 mL, ocupando no máximo 1/5 de seu volume.

As amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando três protocolos diferentes: dois comerciais e, para elemento comparativo, um *in house* (FALEIRO et al. 2002):

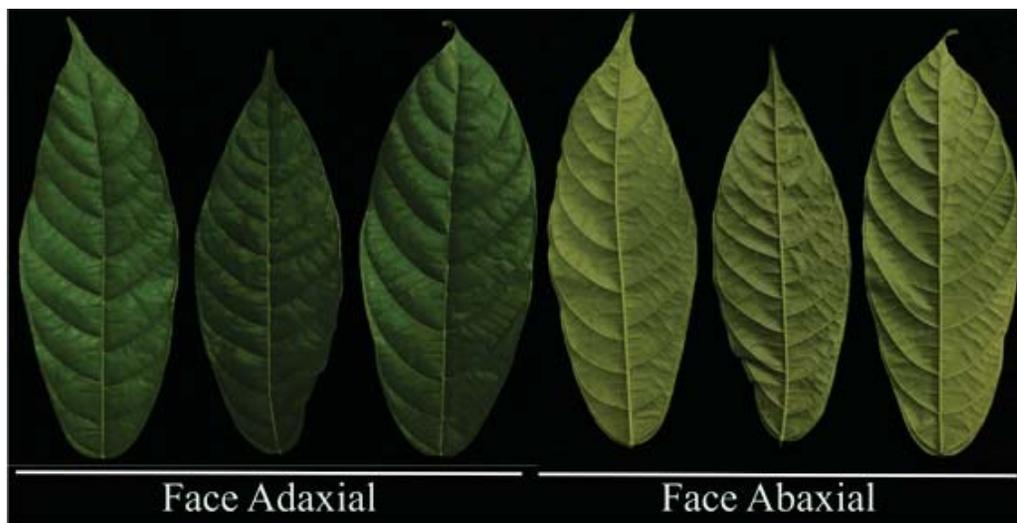


Figura 1. Folhas de cacau em crescimento, com maturação intermediária (coloração verde clara).

1 - QIAGEN (kit DNeasy Plant Mini Kit – Qiagen catalog #69106) - Esse protocolo realiza a extração de DNA e possibilita a purificação por meio de colunas de sílica;

2 - PROMEGA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit; sessão 3. E Isolamento de DNA genômico do Tecido Vegetal) - protocolo recomendado para uma variedade de amostras,

apresenta a vantagem de obter DNA com alto peso molecular;

3 - CTAB (CTAB adaptado de Faleiro et al. 2002) - método *in house*, A extração de DNA é feita utilizando o tampão CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) a 2% no tampão de extração (NaCl 1,4 M; EDTA (Ethlenediaminetetraacetic acid) 20 mM; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; PVP (polyvinylpyrrolidone) 1% e CTAB a 5% no mesmo tampão de extração e durante a segunda lavagem com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

Os testes foram repetidos pelo menos três vezes no laboratório. No entanto, parte dos resultados apresentados corresponde aos dados obtidos em uma das repetições. Para as comparações, foram avaliados dados relativos à quantidade e qualidade do DNA extraído.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260nm (SAMBROOK et al., 1989). A relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. O DNA genômico total foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com o GelRed® a uma concentração de 0,01 % (v/v).

A concentração média de DNA obtida com o protocolo de extração a partir dos kits comerciais foi de 28,17ng/iL (DNeasy®, Qiagen) e 293,27 ng/iL (Wizard®, Promega). Com o protocolo *in house* obteve-se concentração média de 165,67 ng/iL (Tabela 1). Os protocolos permitiram extrair aproximadamente 30µg de DNA para cada amostra testada, sendo esta uma quantidade mínima suficiente para realização de 2000 PCRs (FALEIRO et al. 1996).

Os níveis de pureza, representados pela razão entre as absorvâncias 260/280nm, apresentaram valores similares. Os melhores resultados foram observados para os protocolos de extração de DNA com os kits comerciais DNeasy® e Wizard® com média total de 1,74 (Tabela 1).

A integridade do DNA foi analisada pela eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2). Foram obtidas amostras íntegras de DNA com todos os protocolos, sendo os Protocolos B e C gerando DNAs com maiores pesos moleculares.

O resultado preliminar das análises comparativas dos três protocolos permitiu concluir que todos os métodos avaliados neste estudo são eficientes para

extração de DNA genômico de boa qualidade. Os resultados mostraram que tanto o método de extração pelo CTAB como o kit DNeasy® (Qiagen) e método Wizard® (Promega) permitiram a extração de DNA das amostras. No entanto, o protocolo de extração utilizando o kit DNeasy® demonstrou ser mais eficiente quanto ao tempo e uniformidade da qualidade do DNA extraído. Mas, comparativamente aos demais protocolos usados, este apresenta maior custo para Brasil. O kit comercial Wizard® apresentou concentração/ qualidade satisfatória e menor custo despendido, sendo acessível às diversas infraestruturas laboratoriais.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir dos valores médios da concentração de DNA e a razão da absorvância (260/280 e 260/230) dos protocolos de extração de DNA de amostras de tecido foliar de *Theobroma cacao*

KIT	Amostra	Concentração (ng/µl)	Razão 260/280	Razão 260/230
DNeasy® Qiagen	F1	23,30	1,59	0,53
	F2	24,90	1,93	0,51
	F3	36,30	1,70	0,60
	média	28,17	1,74	0,55
Wizard® Promega	F4	295,10	1,62	0,08
	F5	256,40	1,73	0,43
	F6	328,30	1,88	0,77
	média	293,27	1,74	0,43
CTAB (<i>in house</i>)	F7	279,80	1,54	0,50
	F8	105,10	1,56	0,30
	F9	112,10	1,53	0,26
	média	165,67	1,54	0,35

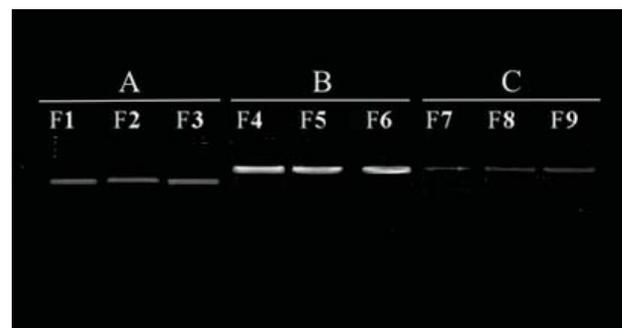


Figura 2. DNA genômico de folhas de cacau (F1-F3) obtidos com os kits comerciais DNeasy®, Qiagen(A) e Wizard®, Promega (B) e o método *in house* CTAB adaptado de Faleiro et al. 1996 (C).

Literatura Citada

- COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 8-12.
- FALEIRO, F. G. et al. 1996. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. *Fitopatologia Brasileira* 21(2): 304-307.
- FALEIRO, F. G. et al. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. *Agrotropica* 14.2: 31-34.
- SAMBROOK, J. et al. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. N° 2. Cold spring harbor laboratory press.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18.24: 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.