

Otimização da extração de DNA a partir de cladódios de *Opuntia* spp.



Joana Raimundo¹, Carlos Manuel Gaspar Reis^{1,2,3}, Maria Margarida Ribeiro^{1,2,4}

¹Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, Qta Sr^a de Mércules, 6001-909, Castelo Branco, Portugal

²Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Qta Sr^a de Mércules, 6001-909, Castelo Branco, Portugal

³CERNAS - Instituto Politécnico de Castelo (FCT UID/AMB/00681/2013), Portugal

⁴Forest Research Center, School of Agriculture, University of Lisbon, Lisboa, Portugal
jfrainundo@gmail.com; creis@ipcb.pt; mataide@ipcb.pt

Introdução

Racional:

O género *Opuntia* tem quantidades de mucilagem variável com a espécie. Os polissacarídeos formam complexos insolúveis com os ácidos nucleicos, dificultando o isolamento de DNA genómico a partir de material fresco, além de inibirem a ação de enzimas de restrição e Taq polimerases.

Objetivos:

- 1) Testar 8 métodos de extração de DNA em *Opuntia ficus-indica*, *O. robusta*, *O. dillenii* e *O. elata*,
- 2) Selecionar o método com melhor rendimento e pureza para cada espécie,
- 3) Verificar a amplificação do DNA com um conjunto de primers nuSSR desenvolvidos para o género.

Metodologia



Código	Protocolos de extração de DNA
1	Kit NucleoSpin® Plant II – PL1 (MACHEREY-NAGEL)
2	Kit NucleoSpin® Plant II – PL2 (MACHEREY-NAGEL)
3	Kit FavorPrep™ Plant Mini (FAVORGEN® Biotech Corp.)
4	Kit DNeasy® Plant Mini (Qiagen)
5	CTAB [1, 2]
6	CTAB – Recomendado pelo fornecedor
7	Lise com CTAB + SDS e precipitação com acetato de potássio 3 M
8	Lise com CTAB + SDS, purificação com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e kit DNeasy® Plant Mini



Amplificação com 15 marcadores nuSSR: OPUNTIA [3] e OPUFIC [4]

Resultados e conclusões

Método	<i>O. ficus-indica</i>		<i>O. robusta</i>		<i>O. elata</i>		<i>O. dillenii</i>	
	Concentração de DNA (µg.g ⁻¹ peso fresco)	A260/ 280	Concentração de DNA (µg.g ⁻¹ peso fresco)	A260/ 280	Concentração de DNA (µg.g ⁻¹ peso fresco)	A260/ 280	Concentração de DNA (µg.g ⁻¹ peso fresco)	A260/ 280
4	18.3 ± 5.2	1.84 ± 0.22	12.5 ± 2.4	1.74 ± 0.16	x	x	x	x
8	14.5 ± 0.5	1.91 ± 0.05	15.4 ± 0.7	1.72 ± 0.03	15.9 ± 11.3	1.67 ± 0.12	13.2 ± 7.8	2.01 ± 0.25



Fig. 1. Produtos de amplificação por PCR com os primers OA9. 1 - controlo negativo, 2 a 5 - ecótipos *O. ficus-indica*, 6 - *O. robusta*, 7 - *O. dillenii*, 8 - *O. elata*, 9 - marcador de peso molecular.

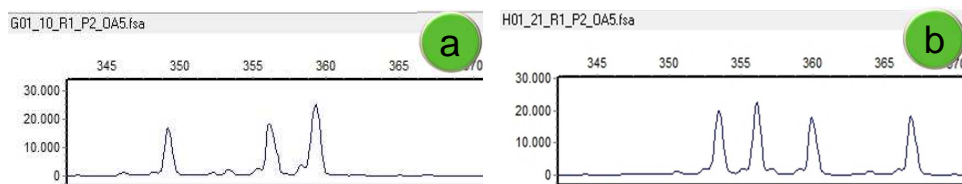


Fig. 2. Eletroferogramas com os primers OA5 obtidos com DNAs de *O. dillenii* (a) e *O. elata* (b) extraídos com o Método 8.

O método 8 tem potencial para ser universal para a extração de DNA de boa qualidade (Fig. 1) em Cactos e amplificação (Fig. 2), particularmente do género *Opuntia*, e noutras espécies de difícil extração.

Referências:

[1] Doyle and Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15, [2] Ferreira and Grattapaglia. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen Brasília, [3] Helsen et al. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. *Mol. Ecol. Notes.* 7:454-456, [4] Erre et al. 2011. Identification of microsatellite loci in *Opuntia* spp. and their characterization in cultivars and species. *Acta Hort.* 918:327-332.

