



ENCONTRO
COM A CIÊNCIA
E TECNOLOGIA
EM PORTUGAL

16 a 18 MAIO 2022
#ciencia2022PT



CERNAS

Centro de Estudos
de Recursos Naturais,
Ambiente e Sociedade

Lisboa, 18 de maio, 2022

Otimização da extração de DNA para avaliação da biodiversidade da espécie *Arbutus unedo* L.

Maria Manuel Vidal^{1*}, J. Pinto¹, D. Reis¹, E. Andrade², F. Gomes¹

CERNAS/ESAC/IPC¹, INIAV I.P.²

*balseiro@esac.pt

Projeto: PDR2020-784-042742 RG-PCMG-Medronheiro



Espécies florestais nativas

- Biodiversidade
- Regulação do clima
- Resistência ativa aos incêndios florestais
- Regeneram zonas degradadas

Arbutus unedo

(valor económico, ecológico e cultural)

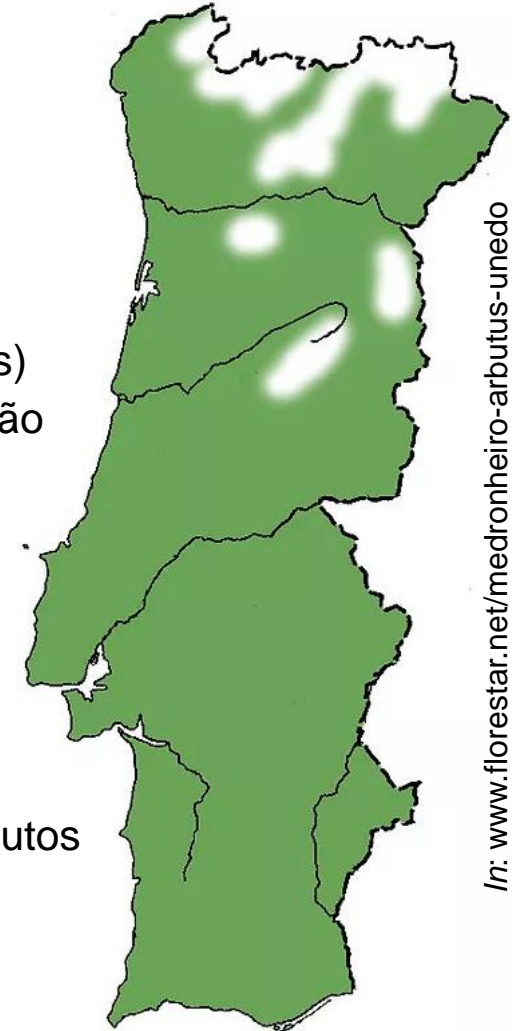
- Importante fonte de compostos bioativos
- Promotor associações com diferentes fungos micorrízicos (tolerância das plantas à seca, salinidade e agentes patogénicos)
- Promotor de ligações interespecíficas (e.g., *Q. ilex*) na associação com diferentes fungos micorrízicos

Plasticidade edafo-climática

Adaptado ao clima mediterrânico, prospera também sob influência atlântica

Frutos para consumo fresco ou em compotas, marmeladas, mel, bebidas espirituosas e outros produtos alimentares mais recentes como pão de medronho* (redução da dependência de cereais anuais)

*Pão de medronho. R.Lopes, investigador CiTechCare, IP Leiria



Caracterização genética da população de melhoramento

Prospecção e colheita do material vegetal

Localização geográfica: 205 acessos pertencentes à população de melhoramento

Material vegetal: Frutos (estudos morfológicos e bioquímico) e Folhas (extração do DNA)

Época da colheita: outono; folhas com elevada concentração de metabolitos secundários

Remoção dos metabolitos secundários:

Polissacarídeos → **Sorbitol**

Polifenóis → **PVP40** (Polivinilpirrolidona mol wt 40000)

Proteínas e polissacarídeos → **BME** (β -mercaptoetanol)

Protocolo de extração do DNA (Doyle & Doyle, 1987)

Protocolo 1

Grind material and DNA Extraction

CTAB Buffer (65 °C)

[2% CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 0.1M Tris]

[0.34M **Sorbitol**, 0.2% **BME** 1% **PVP40**]



única modificação introduzida

Protocolo 3

Grind material

Pre-Wash Buffer (4 °C)

[0.1M Tris, 5mM EDTA]

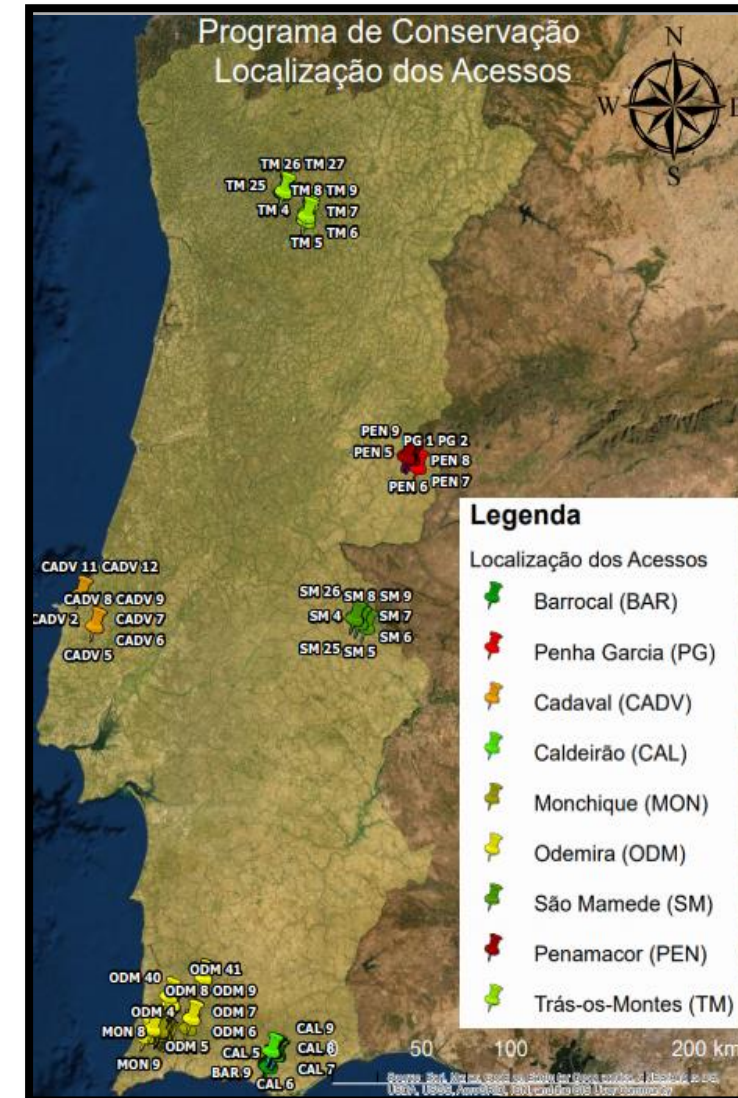
[0.34 M **Sorbitol**, 2% **BME** 1% **PVP40**]

DNA extraction

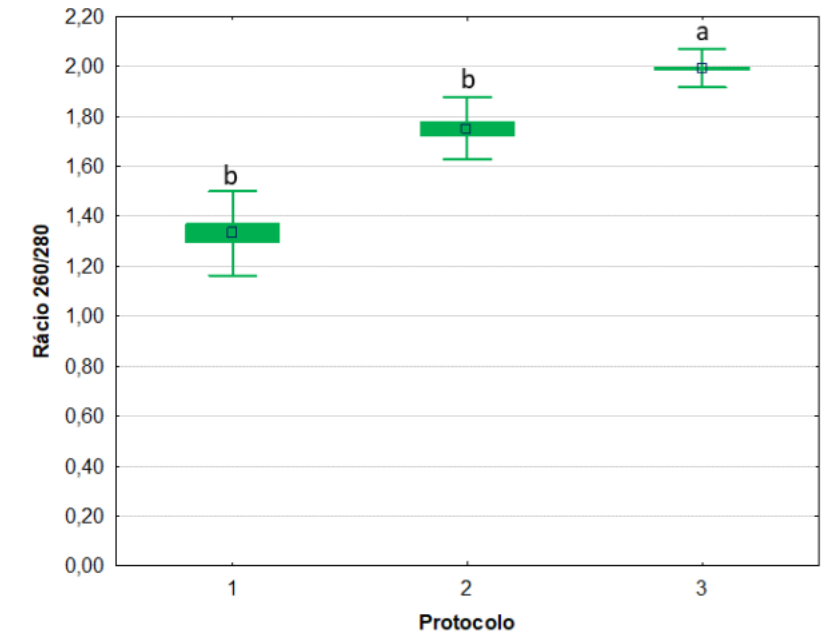
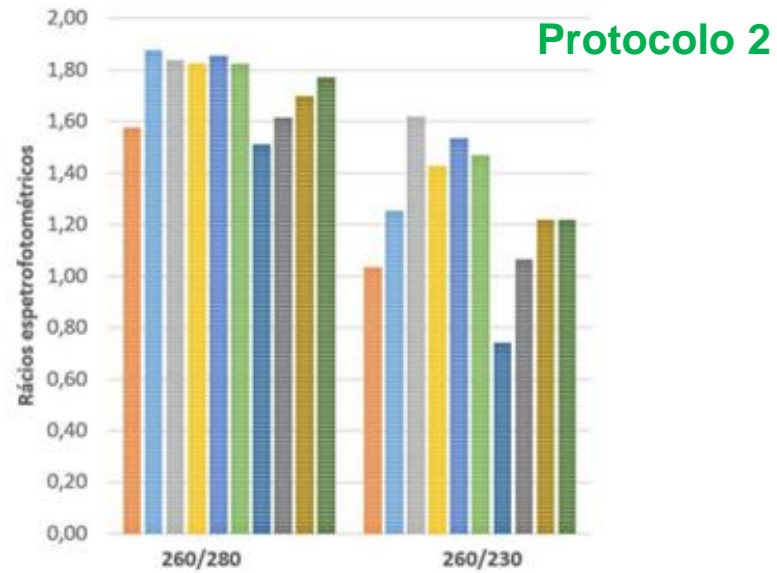
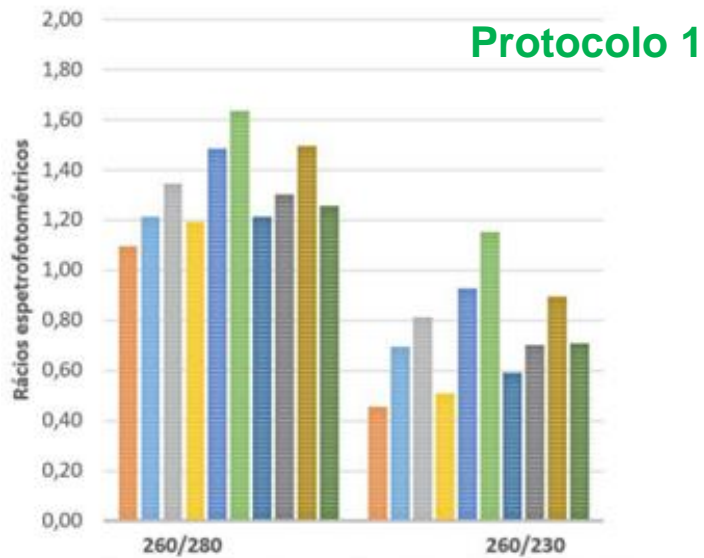
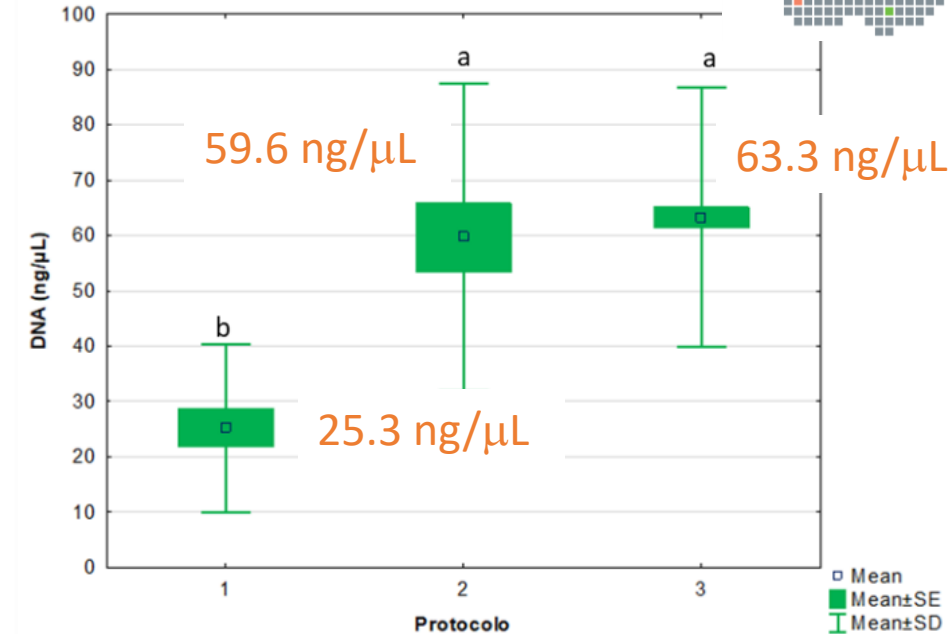
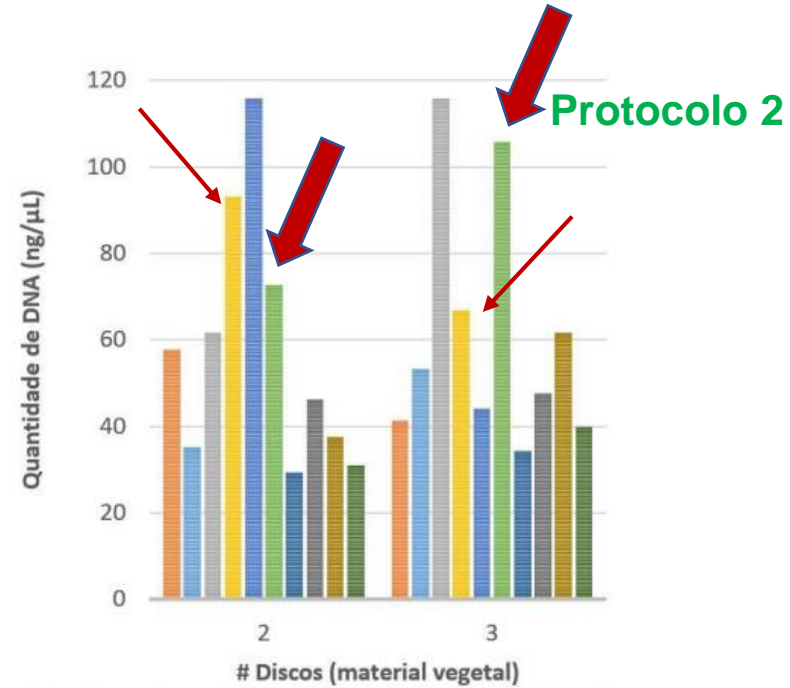
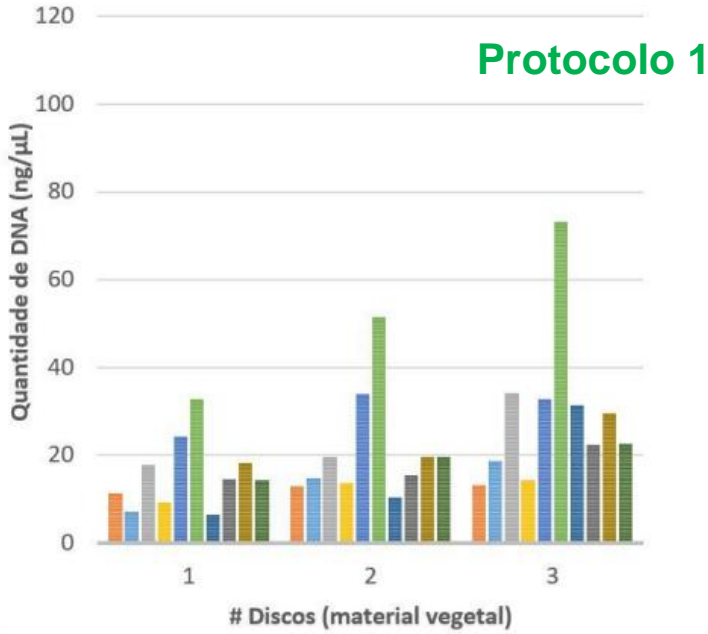
CTAB Buffer (75 °C)

[2% CTAB, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1M Tris]

[0.34M **Sorbitol**, 2% **BME** 1% **PVP40**]



Avaliação espectrofotométrica do rendimento da extração de DNA



Avaliação da qualidade do DNA por PCR e gel de agarose

- A presença de contaminantes no DNA interfere com a atividade da Taq Polimerase, tornando o DNA não amplificável por PCR (Polimerase Chain Reaction)
- A figura apresenta um gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR utilizando microsátélites

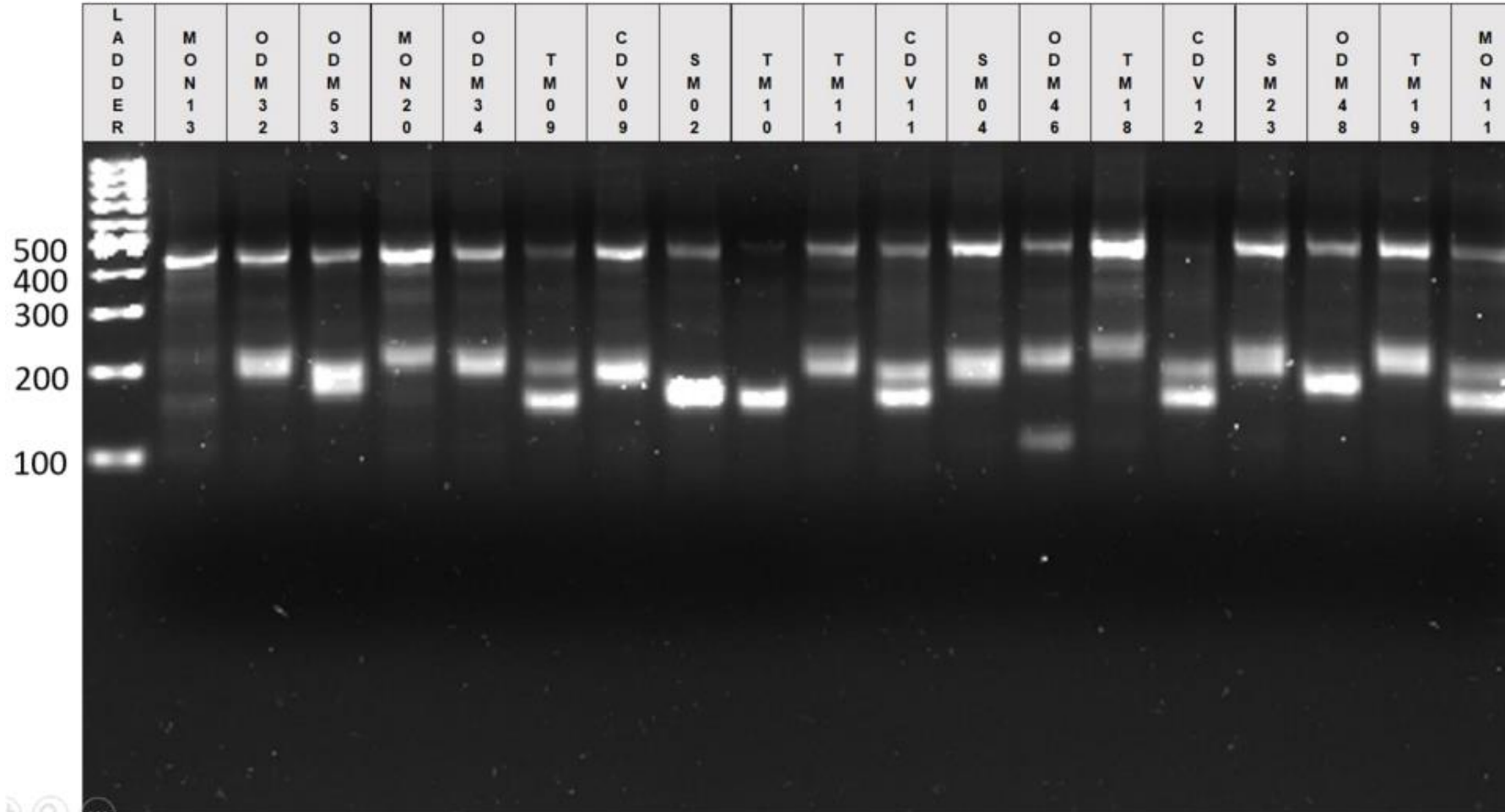


Figura 17 - Gel de agarose 3% contendo produtos de amplificação, após corrida de 80V durante 2 horas e corado com GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium), diluído diretamente na agarose, registo obtido sistema de documentação de géis ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)



ENCONTRO
COM A CIÊNCIA
E TECNOLOGIA
EM PORTUGAL
16 a 18 MAIO 2022
#ciencia2022PT



CERNAS
Centro de Estudos
de Recursos Naturais,
Ambiente e Sociedade

Lisboa, 18 de maio, 2022

CONCLUSÃO

O protocolo de extração de DNA proposto neste trabalho, mostrou que:

- a maceração do material vegetal numa solução tampão a 4 °C contendo sorbitol, elimina com sucesso a maior parte dos metabolitos secundários acumulados em folhas outonais
- após a pré-lavagem do material vegetal, a extração de DNA pelo método CTAB a uma temperatura e concentração de BME mais elevados permitiu o acréscimo de 60% na quantidade de DNA isolado
- a qualidade do DNA foi comprovada através do rácio espectralométrico A_{260}/A_{280} , indicando níveis baixos de contaminações e por gel de agarose após a sua amplificação por PCR



Obrigada / Thank you

Projeto: PDR2020-784-042742 RG-PCMG-Medronheiro



<http://www.esac.pt/medronho/>