

**METODĂ ADECVATĂ PENTRU EXTRAȚIA DE ADN DIN
SEMINȚE ȘI FRUNZE PENTRU STUDII GENETICE LA GRÂU
(*Triticum aestivum* L.), TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
ȘI ARDEI (*Capsicum annuum*)**

**APPROPRIATE METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM SEEDS
AND LEAVES FOR GENETIC STUDIES IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.),
TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) AND PEPPER (*Capsicum annuum*)**

MATILDA CIUCĂ¹, ALINA-GABRIELATURCU¹,
ELENA-LAURA CONȚESCU¹, DANIEL CRISTINA¹

Abstract

Genomic DNA extraction from wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds, tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) leaves and peppers (*Capsicum annuum*) leaves, for PCR (Polymerase Chain Reaction) analyses and similar molecular technics is a challenging issue because of high concentrations of secondary metabolites, i.e., polyphenols compounds, polysaccharides, tannins and other contaminants. Isolation of high-quality genomic DNA is a crucial pre-requisite step for molecular biology applications.

In this study, two variants of DNA isolation method, based on CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), were tested. The common elements in the extraction buffer for the two variants were: CTAB (detergent), sodium chloride (NaCl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tris 2-amino-2 hydroxymethyl -1.3-propanediol (TRIS) and β mercaptoethanol.

The extraction buffer used in the first protocol except to the common elements also included sodium thiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -1%) and in the case of protocol II polyvinylpyrrolidone (PVP-2%) was used. Removal of proteins from the buffer/tissue mixture, for both protocols, was performed with a mixture of dichloromethane: isoamyl alcohol (24:1) instead of chloroform: isoamyl alcohol. Quantity and purity of extracted DNA were checked by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Our results showed that the modified protocol I takes less time, is reliable and gives good quality of DNA for all the three species and can be used in various marker systems such as SSR and ISSR.

Cuvinte cheie: extracție ADN, grâu, tomate, ardei, CTAB, diclormetan, tiosulfat de sodiu.

Keywords: DNA extraction, wheat, tomato plant, peppers plant, CTAB, dichloromethane, sodium thiosulfate.

¹ I.N.C.D.A. Fundulea. E-mail: mcincda@gmail.com; contescu_elena_laura@yahoo.com; danielcristina89@gmail.com

INTRODUCERE

Cercetarea agricolă are ca obiective principale creșterea producției, calitatea și îmbunătățirea rezistenței la boli și dăunători, astfel încât să răspundă cererilor din industrie. Toate aceste obiective reprezintă provocări actuale pentru amelioratori. Analiza diversității genetice, amprentarea de soiuri, clonarea de gene, studii asupra unor combinații (populații), transformarea genetică și selecția asistată de markeri au prezentat o popularitate crescândă în ultimele decenii în domeniul biologiei moleculare. La aceste analize, prima etapă este reprezentată de izolarea ADN (acid dezoxiribonucleic), etapă ce necesită timp și costuri destul de ridicate (Dilworth și Frey, 2000). Pentru a depăși această problemă, au fost raportate mai multe protocoale de extracție a acidului dezoxiribonucleic (ADN) din mai multe specii de plante (Dilworth și Frey, 2000; Dellaporta și colab., 1983; Doyle și Doyle, 1987; Doyle, 1991; Murray și Thompson, 1980; Ogunkani și colab., 2008), precum și disponibilitatea unui număr mare de kituri precum: DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN), Wizard Magnetic 96 ADN Plant System (Promega) etc. (Orega și colab., 2019).

Plantele, prezintă compoziție biochimică diferită/complexă, motiv pentru care nu există un protocol universal ce poate garanta obținerea unui ADN de calitate optimă la toate speciile, existând o multitudine de protocoale ce suferă modificări și standardizări continue în funcție de necesități (Heikruijama și colab., 2020).

În cadrul procesului de extracție, calitatea ADN-ului poate fi afectată de compoziția chimică a speciei, faza de creștere sau de partea plantei (semințe, embrioni, frunze, bucăți de tulpină, fructe, etc.) pe care dorim să o supunem procesului de extracție (Aboult-Maaty și Oraby, 2019).

Teoria care stă la baza protocoalelor de izolare ADN

Protocolul de extracție ADN este în general un protocol de extracție a acizilor nucleici. Prin urmare, extractele inițiale de ADN conțin adesea o cantitate mare de ARN, polizaharide, proteine și alți pigmenți ce sunt dificil de separat de ADN (Vind, 2004).

Celulele vegetale se remarcă prin prezența unui perete celular polizaharidic complex, iar dintre acestea celuloza este un constituent major (Cosgrove, 2005). Ruperea peretelui celular reprezintă primul pas într-o metodă de izolare a acidului dezoxiribonucleic (ADN) și se poate realiza mecanic. Membrana celulară se află lângă peretele celular și este compusă dintr-un set divers de molecule de fosfolipide și proteine.

Aceasta se dizolvă în agenți tensioactivi, detergenți, care sunt de natură amfipatică (coadă hidrofobă și cap hidrofîl), foarte asemănători cu membranele fosfolipidice.

Principiul de bază al izolării ADN-ului genomic la plante presupune ruperea peretelui celular, a membranei celulare și a membranei nucleare pentru a elibera ADN intact în soluție, îndepărtarea moleculelor contaminante, cum ar fi proteinele, polizaharidele, lipidele, fenolii și alți metaboliți secundari prin metode enzimatică sau chimică, urmată de precipitarea ADN-ului (Sika și colab., 2015).

Rolul unor reactivi în extracția de ADN

CTAB (bromura de cetil-trimetil-amoniu) este un detergent cationic, iar în timpul extracției ADN-ului, în condiții apoase, intră în contact cu membrana biologică, captează lipidele și are ca rezultat eliberarea nucleului lipsit de membrană (V i n o d , 2004).

Țesutul vegetal, care este bogat în polizaharide complexe și metaboliți secundari, interferează și co-precipită cu ADN-ul, dar CTAB împreună cu alte substanțe chimice, cum ar fi PVP, este utilizat pentru a minimiza efectul acestor metaboliți.

CTAB funcționează diferit în funcție de puterea ionică a soluției. La o putere ionică scăzută, precipită acidul nucleic și polizaharidele acide (pectină, xilan și caragenan), în timp ce proteinele și polizaharidele neutre (dextran, gumă, amidon și inulină) rămân în soluție. La o concentrație ionică ridicată, se leagă de polizaharide și formează complexe care sunt îndepărtate în timpul etapei ulterioare a extracției cu cloroform. De asemenea, denaturează sau inhibă activitatea proteinelor și/sau a enzimelor (H e i k r u j a m și colab., 2020).

NaCl (clorura de sodiu) - ajută la eliminarea proteinelor care sunt legate de ADN. De asemenea, ajută la menținerea proteinelor dizolvate în mediul apos, astfel încât să nu precipite în alcool împreună cu ADN-ul prin neutralizarea sarcinilor negative de pe ADN. Dacă celulele sunt păstrate în soluție hipotonică, apa intră în interiorul celulei, ceea ce duce la umflături, creșterea presiunii interne și, în cele din urmă, la explozie. Pe de altă parte, într-o soluție hipertonică, apa tinde să se scurgă din celulă și, în cele din urmă, celulele plantelor se micșorează și se sfărâmă, ceea ce duce la plasmoliză. Prin urmare, concentrația de sare joacă un rol semnificativ și în liza celulară. Concentrația de sare de peste 0,5 M oferă puterea ionică necesară pentru ca CTAB să precipite polizaharidele (M u r r a y și T h o m p s o n , 1980). În mai multe protocoale, a fost sugerată concentrația de 1,4M de NaCl; cu toate acestea, în protocoalele dezvoltate pentru a scăpa de polizaharide, a fost recomandată o concentrație mai mare de NaCl și/sau CTAB.

TRIS [Tris (hidroximetil) aminometan sau Tris2-amino-2hydroxymethyl-1,3-propanediol] - atunci când pH-ul soluției de TRIS este ajustat la 8 cu HCl, acesta conține un amestec de bază slabă și acidul său conjugat slab, care poate acționa ca un tampon și crește și mai mult permeabilitatea peretelui celular. Când peretele celular și membranele sunt vătămate în timpul măcinării țesuturilor, se eliberează material citoplasmatic, din cauza căruia pH-ul se modifică și, în consecință, stabilitatea biomoleculilor, cum ar fi acizii nucleici este perturbată. Tamponul de extracție joacă un rol major în astfel de situații, iar tamponul Tris menține pH-ul soluției (H e i k r u j a m și colab., 2020).

EDTA (acid etilen-diamino-tetraacetic - $C_{10}H_{16}N_2O_8$) chelează cationii divalenți, cum ar fi Mg^{2+} și Ca^{2+} , care sunt prezenți ca și cofactori în enzime și, prin urmare, reduce activitatea enzimatică a dezoxiribonucleazei (DN-azei) și ribonucleazei (RN-azei).

De exemplu, enzima DN-ază necesită ioni Mg^{2+} ca și cofactor pentru activitatea sa. Chelarea ionilor Mg^{2+} cu EDTA face ca enzima DN-ază să fie nefuncțională și, astfel, protejează ADN-ul. Ionii Mg^{2+} sunt, de asemenea, necesari pentru agregarea acidului nucleic

cu proteina, întrucât ionii de Ca^{2+} sunt necesari pentru cimentarea stratului mijlociu al peretelui celular și a stabilității membranei. Astfel, valorificarea acestora prin EDTA are ca rezultat destabilizarea integrității enzimei (H e i k r u j a m și colab., 2020).

β -Mercaptoetanolul ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) este adăugat, de cele mai multe ori, în tampoane de extracție și este un puternic agent reducător pentru curățarea taninurilor și a altor compuși polifenolici prezenți în extractul brut de plante. De asemenea, proteinele globulare se dizolvă în apă. Pentru a le face insolubile, denaturarea lor este una dintre alternativele care se pot face la nivelul structurii terțiare și cuaternare a proteinei prin reducerea legăturilor disulfidice intermoleculare. Astfel, β -Mercaptoetanolul reduce legăturile disulfidice ale proteinei și, astfel, proteinele sunt denaturate (H e i k r u j a m și colab., 2020).

PVP (polivinilpirolidona) este adăugată pentru a elimina compușii fenolici din extractele de ADN din plante.

Polifenolul este o componentă majoră a plantelor medicinale, a plantelor lemnoase și a părților de plante mature. Este prezent în vacuole, în timp ce enzima sa oxidativă, polifenol oxidaza (PPO) este localizată în plastide (H o l d e r b a u m și colab., 2010).

Amestecul de lizat celular cu tampon CTAB trebuie păstrat în baie de apă la 65°C , ceea ce inhibă ireversibil enzima DN-ază. După scoaterea probei din baia de apă, aceasta trebuie lăsată să se răcească la temperatura camerei, apoi se adaugă amestec cloroform: alcool izoamilic (24:1) sau fenol:cloroform:alcool izoamilic (25:24:1).

Cloroformul (CHCl_3) sau triclorometanul este un solvent nepolar (hidrofob), în care proteinele și lipidele nepolare se dizolvă și promovează împărțirea lipidelor și a resturilor celulare în faza organică, lăsând acidul dezoxiribonucleic (ADN) izolat protejat în faza apoasă. Cloroformul asigură separarea fazelor celor două lichide deoarece are o densitate mai mare ($1,47 \text{ g/cm}^3$) și forțează o separare mai clară a fazelor organice și apoase, ajutând astfel la îndepărtarea fazei apoase cu o contaminare minimă din faza organică.

Alcoolul izoamilic sau izo-pentanolul nu este miscibil în soluția apoasă, deoarece este un compus alifatic cu lanț lung, care conține cinci atomi de carbon și stabilizează interfaza dintre stratul organic și cel apos. Faza apoasă conține ADN, iar faza organică conține lipide, proteine și alte impurități. Alcoolul izo-amilic ajută la inhibarea activității RN-azei și la prevenirea solubilizării în faza fenolică a moleculelor lungi de ARN [cu porțiuni poli-(A) lungi]. Acest lucru va crește puritatea ADN-ului.

ADN-ul genomic trebuie tratat cu ribonuclează A (RN-aza A) pentru a elimina contaminarea cu ARN și purificarea ADN.

Izopropanolul/etanolul este utilizat în precipitarea ADN. Izopropanolul este o alegere bună pentru precipitarea ADN. Cantitatea necesară de izopropanol este mai mică (0,6-0,7 volume/volum de supernatant), deoarece are o capacitate mai mare de a reduce constanta dielectrică a apei decât etanolul (2-3 volume etanol la 1 volum de supernatant).

Izopropanolul dizolvă, de asemenea, solvenți nepolari, cum ar fi cloroformul, astfel impuritățile din etapa anterioară pot fi, de asemenea, eliminate.

Utilizarea izopropanolului rece (păstrat la 4°C) este practică în mod frecvent, dar mulți cercetători spun că ar trebui utilizat la temperatura camerei, altfel va precipita și polizaharide (Shepherd și McLaughlin, 2011). Deși randamentul ADN-ului va fi mai mare la temperaturi scăzute, acesta poate să conțină și o creștere a impurităților (Michiels și colab., 2003). În timpul măcinării țesutului, elementele de compartimentare se rup și PPO transformă polifenolii în chinonă, ceea ce dă o culoare maro. Polifenolii leagă ADN-ul și îngreunează procesarea în etapele următoare, deoarece sunt co-precipitați cu acidul nucleic. PVP elimină contaminarea polifenolică prin legarea acestuia prin legătura de hidrogen. Astfel, previne oxidarea polifenolului și, prin urmare, brunificarea probelor de ADN (Varma și colab., 2007). Când extractul este centrifugat cu cloroform, complexe PVP se acumulează la interfață.

Acetatul de sodiu/acetatul de amoniu/acetatul de potasiu - rolul acestor săruri în protocolul de extracție este de a neutraliza sarcina negativă la grupele PO_3^- de pe catenele acizilor nucleici reducând repulsia între moleculele ADN, făcând molecula ADN mult mai puțin hidrofilă și, prin urmare, mult mai puțin solubilă în apă.

Precipitatul de ADN este spălat din nou cu etanol 70% pentru a clăti excesul de sare care ar putea veni împreună cu tampoanele de extracție din pelet, centrifugat, iar etanolul este aruncat, lăsând ADN-ul în precipitat. Precipitatul este uscat la aer sau uscat sub vid. Uscarea excesivă trebuie evitată, deoarece ADN-ul transformă forma B în forma D, care este greu de dizolvat ulterior (Jadhav și colab., 2015).

Tampon Tris-EDTA (TE)/apă sterilă

Stocarea pe termen lung a ADN-ului se realizează într-un tampon care îi menține pH-ul și îl împiedică să se degradeze. Tamponul TE conține Tris (10 mM) și EDTA (1 mM), unde Tris este componenta de tamponare și EDTA componenta de chelare. Pentru izolarea ADN, pH-ul este de obicei setat la 7,5-8,5, o ușoară alcalinitate a tamponului TE previne, de asemenea, șansele de hidroliză acidă care poate avea loc (afectarea stabilității ADN-ului) atunci când este stocat în apă.

Constituentul Tris al tamponului TE are capacitatea de a proteja catenele ADN de deteriorarea cauzată de radiații, atât în stare solidă, cât și în soluție. Deoarece radiația produce radicali liberi, aceasta poate rupe catena de ADN.

Astfel, în soluție la temperatura camerei Tris acționează prin eliminarea radicalilor hidroxil (Cullis și colab., 1993). Scopul EDTA este de a chela ionii Mg^{2+} , protejând astfel ADN de dezoxiribonucleaze (DN-aze) sau ribonucleaze (RN-aze).

Apa sterilă poate fi utilizată pentru stocarea pe termen scurt a ADN-ului.

Izolarea de ADN, din semințe comparativ cu cea din frunze permite efectuarea selecției asistată de markeri (MAS - „Markers Assisted Selection”) independent de sezonul de creștere, economisind timp și teren (spațiul de seră) necesar pentru creșterea plantelor.

În plus, este posibil să se trimită probe de semințe la nivel internațional pentru studii comparative, acest lucru fiind dificil pentru probele de frunze care trebuie să fie păstrate pe gheață sau liofilizate (V o n P o s t , 2003).

ADN-ul de înaltă calitate este caracterizat prin fragmente cu greutate moleculară mare, cu un raport A260/280 între 1,8 și 2,0 și lipsa substanțelor contaminante (A b d e l-L a t i f și O s m a n , 2017).

O metodă rapidă, simplă și fiabilă de izolare a ADN-ului, care nu necesită incubări lungi, pași multipli sau kituri comerciale costisitoare, care ar putea îndeplini cerințele diverselor tehnici moleculare (PCR - „Polymerase Chain Reaction”, secvențiere, clivare cu enzime de restricție etc.), va fi de neprețuit pentru cercetarea din domeniul plantelor.

Prin urmare, scopul acestui studiu a fost de a testa și stabili o metodă de izolare ADN, pe bază de CTAB, eficientă în cazul a trei specii de plante (grâu, tomate și ardei).

MATERIAL ȘI METODE

Material Biologic a constat din boabe de grâu (0,05-0,08 g) din 5 linii recombinante de grâu (4677, 4678, 4679, 4681 și 4682) și frunze congelate din 5 soiuri de tomate (T1-T5) și 5 de ardei (A1-A5). Cantitatea de material (frunză) folosită la extracția de ADN a variat între 0,08-0,1 g. Probele de grâu au fost furnizate de către Laboratorul de Ameliorare a Cerealelor de la INCDA Fundulea, iar probele (frunze) de tomate și ardei au fost furnizate de USAMV București.

Metode

Protocole de extracție ADN pe bază de CTAB

Izolarea ADN s-a realizat folosind două protocoale (tabelul 1). Protocolul I se bazează parțial pe protocolul descris de Z e i n a l z a d e h t a b r i z i și colab. (2015) pentru frunze de floarea-soarelui, iar protocolul II s-a bazat pe protocolul cu CTAB descris de C r i s t i n a și colab. (2017) pentru grâu, orz și triticale.

Pregătirea (măcinarea) probelor de grâu (boabe), tomate și ardei (frunze congelate) prin ruperea peretelui celular.

În acest studiu, ruperea peretelui celular s-a realizat prin aplicarea forței mecanice exercitate în timpul măcinării în mojară cu pistil pentru boabele de grâu și măcinării în mojară cu pistil împreună cu tamponul de extracție (protocol I) sau măcinării cu azot lichid (protocol II) pentru frunze congelate de tomate și ardei.

Compoziția tamponului de extracție, concentrațiile și cantitățile folosite, cât și etapele celor două protocoale sunt prezentate în tabelul 1.

Metodă adecvată pentru extracția de ADN din semințe și frunze pentru studii genetice la grâu (*Triticum aestivum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) și ardei (*Capsicum annuum*) 171

Tabelul 1

Protocoale de extracție ADN din grâu, tomate și ardei
(Protocols for DNA extraction from wheat, tomatoes and peppers)

Protocol I	Protocol II
Probe: grâu - două boabe măcinate (mojarate) peste care s-a adăugat tamponul de extracție; Tomate și ardei - frunze măcinate (mojarate) direct în tamponul de extracție.	Probe: frunze mojarate în azot lichid (tomate și ardei)
Conținut Tampon (concentrații finale) - CTAB - 2% - NaCl - 1,42M - EDTA - 200mM - TRIS-HCl - 100mM - Na ₂ S ₂ O ₃ - 1% - β-mercaptoetanol - 2% - apă deionizată sterilă	Conținut Tampon (concentrații finale) - CTAB - 2% - NaCl - 1,40M - EDTA - 200mM - TRIS-HCl - 100mM - PVP - 2% - β-mercaptoetanol - 1% - apă deionizată sterilă
Adăugare tampon de extracție - 1ml Incubare pe baie - 65°C, timp de 1h (agitare ușoară la 10 min) Răcire tuburi	
-	Adăugare amestec diclorometan: alcool izoamilic (24:1) - v/v
Centrifugare probe: 10 min, 12000 rpm (la temperatura camerei)	Centrifugare probe: 12 min, 10000 rpm (la temperatura camerei)
Reluare supernatant în tub de 2 ml	Reluare supernatant în tub de 1,5 ml
Adăugare amestec diclorometan : alcool izoamilic (24:1) - v/v	
Centrifugare probe: 10 min, 12000 rpm (la temperatura camerei)	Centrifugare probe: 12 min, 10000 rpm (la temperatura camerei)
Reluare supernatant în tub de 1,5 ml	Reluare supernatant în tub de 1,5 ml
Tratament cu RN-ază (10 mg/ml) -1-1,5 μl/100 μl probă, incubare 45 min	
Se adaugă 60 μl acetat de sodiu 3M (pH 5,5), 60 μl acetat de amoniu 10M și 0,7 vol. Izopropanol/la vol. amestec	Adăugare clorură de sodiu - 0,25M (con. finală) și precipitare cu etanol 2,5 vol./vol. probă
Incubare la -20°C timp de 2h (sau peste noapte)	Centrifugare probe: 8 min, 13000 rpm Se aruncă supernatantul
Centrifugare probe: 6 min, 14000 rpm (la temperatura camerei)	Spălare pelet cu tampon (alcool etilic 76%, acetat de amoniu 10 mM)
Se aruncă supernatantul, se usucă peletul și se adaugă TE în funcție de dimensiunea peletului (100-200 μl)	Centrifugare probe: 5 min, 14000 rpm
	Se usucă peletul și se adaugă TE în funcție de dimensiunea peletului (100-200 μl)

Electroforeză în gel de agaroză

Atât ADN genomic, cât și produșii PCR, au fost analizați prin electroforeză în gel de agaroză cu o concentrație de 0,8% pentru ADN genomic și 1,2-2% pentru produșii PCR. Vizualizarea benzilor s-a realizat sub lumina UV la Sistemul UVITEC-HD6.

Măsurători spectrofotometrice

Puritatea ADN (raportul A260/A280) și analiza cantității de ADN obținut au fost efectuate la un spectrofotometru Beckman Coulter Life Sciences DU 730.

Evaluarea ADN prin amplificare (PCR)

Pentru a evalua dacă ADN-ul extras este amplificabil, probele analizate au fost supuse amplificării PCR folosind markerul SSR-DuPw004 pentru probele de grâu și cu markeri ISSR pentru tomate și ardei.

Grâu (*Triticum aestivum* L.) - SSR DuPw004, 15 μL volum final de reacție, conținând tampon de reacție în concentrație finală 1X, primeri - 0,5 μM, 0,6 U de ADN polimerază (My Taq Red, BIOLINE) și 3 μL probă de ADN (60-80 ng). Programul de amplificare ADN: denaturarea inițială la 95°C timp de 2,30 min, urmată de 35 cicluri de (95°C - 15 s, 65°C - 15 s, 72°C - 15 s) și o extensie finală la 72°C timp de 5 min. Produșii PCR au fost analizați pe gel de agaroză 2%.

Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) - ISSR-UBC 855, 20 μL volum de reacție final, conținând tampon în concentrație finală 1X [Dream Taq Green PCR Master Mix (2x), Thermo Scientific], 0,5 μM primer, 1,5 μL probă de ADN (15-20 ng). Programul PCR: denaturarea inițială la 95°C timp de 3 min, urmată de 38 cicluri de (95°C - 45 s, 50°C - 1 min, 72°C - 2 min) și o extensie finală la 72°C timp de 10 min. Produsul PCR a fost analizat pe 1,2% gel de agaroză.

Ardei (*Capsicum annuum*) - ISSR-UBC810, 20 μL volum de reacție final, conținând tampon în concentrație finală 1X [Dream Taq Green PCR Master Mix (2x), Thermo Scientific], 0,5 μM primer, 1,5 μL probă de ADN (15-20 ng). Programul PCR: denaturarea inițială la 95°C timp de 3 min, urmată de 35 cicluri de (95°C - 45 s, 50°C - 1 min, 72°C - 2 min) și o extensie finală la 72°C timp de 10 min. Produsul PCR a fost analizat pe 1,2% gel de agaroză.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Izolarea ADN de înaltă calitate din țesuturile plantelor este consumatoare de timp, laborioasă și destul de costisitoare datorită etapelor multiple și costului ridicat al reactivilor folosiți.

Calitatea și cantitatea de ADN matriță sunt factori critici pentru succesul reacției de amplificare ADN (analizei PCR). Etapele parcurse pentru extracția ADN pot fi critice pentru succesul amplificării, deoarece există mulți compuși care inhibă amplificarea ADN-ului ce pot fi co-extrași împreună cu ADN-ul, cum ar fi polizaharidele, lipidele și polifenolii sau substanțele chimice de extracție.

În acest studiu au fost testate două variante ale unei metode de izolare ADN pe bază de CTAB. Elementele comune din tamponul de extracție pentru cele două variante au fost reprezentate de CTAB (detergent), clorură de sodiu (NaCl), acid etilen-diamino-tetraacetic

(EDTA), tris (hidroximetil) aminometan (TRIS) și β mercaptoetanol. Tamponul de extracție utilizat în primul protocol pe lângă elementele comune a mai inclus și tiosulfatul de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - 1%), iar în cazul protocolului II s-a folosit polivinilpirolidonă (PVP - 2%).

Eliminarea proteinelor din amestecul tampon/țesut, în cazul ambelor protocele, s-a realizat cu amestec diclorometan:alcool izoamilic (24:1) în loc de cloroform:alcool izoamilic.

Diclorometanul este un compus organo-clorurat cu formula CH_2Cl_2 . Acest lichid incolor, volatil cu un miros dulce asemănător cloroformului este utilizat pe scară largă ca solvent. Deși nu este miscibil cu apa, este polar și miscibil cu mulți solvenți organici. Diclorometanul, oferă o alternativă mai ieftină și mai puțin toxică la cloroform în protocelele de izolare a ADN-ului (C h a v e s și colab., 1995).

Precipitarea ADN s-a realizat cu izopropanol în cazul protocolului I și etanol în cazul protocolului II.

Analiza comparativă a profilelor electroforetice (figurile 1 și 2) a relevat benzi de ADN vizibile, distincte, pentru ambele protocele de izolare utilizate, la toate cele trei specii (grâu, tomate și ardei).

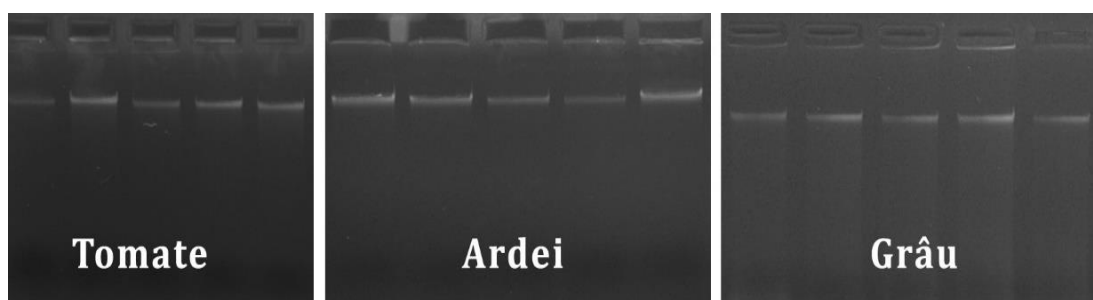


Figura 1 – Profile electroforetice de ADN genomic izolat din tomate, ardei și grâu cu Protocolul I (Electrophoretic patterns of genomic DNA isolated from tomatoes, peppers and wheat with the Protocol I)

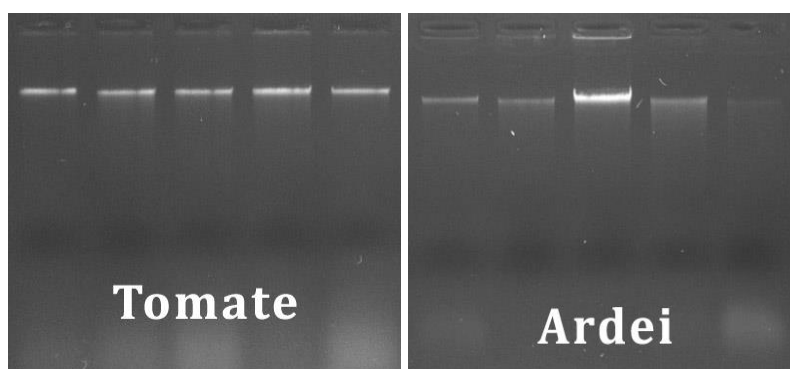


Figura 2 – Profile electroforetice de ADN genomic izolat din tomate și ardei cu Protocolul II (Electrophoretic patterns of genomic DNA isolated from tomatoes and peppers with the Protocol II)

Evaluarea spectrofotometrică a calității ADN-ului genomic izolat din ardei și grâu a evidențiat valori ale raportului A260/A280 > 1,8 și valori mai mici de 1,8 în cazul tomatelor pentru ambele protocoale. În cazul protocolului I, fără mojarare cu azot lichid, s-au observat valori mai apropiate de 1,8 (tabelul 2). Valorile raportului A260/A280 sub valoarea optimă s-ar putea datora compușilor polifenolici, taninuri, flavonoizi și alcaloizi prezenți în tomate (P e t e r s o n și colab., 1997; T u r c i și colab., 2010) ce au condus la apariția brunificării peletului de ADN mult mai vizibilă în cazul protocolului II față de protocolul I. În acest caz, sugerăm folosirea reactivului PVP în protocolul I pentru această specie sau măcinarea (mojararea frunzelor de tomate) cu soluție de 2% PVP, fără azot lichid.

În ceea ce privește concentrația de ADN genomic izolat, analiza spectrofotometrică a evidențiat un interval de valori cuprinse între 136-280 ng/μl la grâu, pentru ardei 46-86 ng/μl (protocol I) și 57-335 ng/μl (protocol II), iar în cazul probelor de tomate concentrația a variat între 77-182 ng/μl pentru protocolul I și 105-964 ng/μl în cazul utilizării protocolului II (tabelul 2).

Tabelul 2

Puritatea și cantitatea de ADN izolat din grâu, tomate și ardei cu protocoalele studiate
(Purity and amount of DNA isolated from wheat, tomatoes and peppers with the studied protocols)

Probe	Protocol I		Protocol II	
	Raport A260/A280	Concentrație ADN (ng/μl)	Raport A260/A280	Concentrație ADN (ng/μl)
Tomate				
T1	1,658	76,532	1,291	411,13
T2	1,594	167,60	1,194	566,54
T3	1,628	175,54	1,201	964,90
T4	1,531	114,96	1,279	390,83
T5	1,545	181,65	1,191	105,24
Ardei				
A1	2,155	45,700	1,994	325,41
A2	2,118	66,240	1,883	57,497
A3	1,943	69,224	2,005	335,06
A4	2,233	85,571	1,923	105,45
A5	2,391	59,490	1,860	110,78
Grâu				
G1	1,819	223,33	-	-
G2	1,757	251,44	-	-
G3	1,863	280,07	-	-
G4	1,925	223,96	-	-
G5	1,812	136,48	-	-

Pe baza rezultatelor obținute în urma citirilor spectrofotometrice, în special a raportului A260/A280, s-a ales ca ADN genomic matriță pentru PCR cel obținut cu protocolul I. Astfel, în cazul grâului (*Triticum aestivum* L.), amplificarea cu markerul SSR-DuPw004 a condus la obținerea unor profile clare (figura 3) și, prin urmare, o bună amplificare.

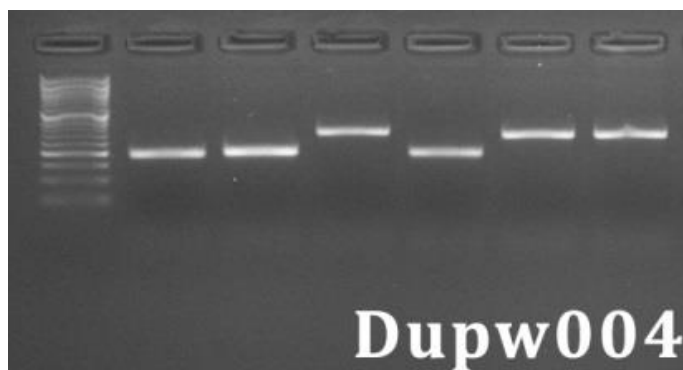


Figura 3 – Profile electroforetice obținute la probe de grâu cu markerul DuPw004
(Electrophoretic patterns obtained from wheat samples with DuPw004 marker)

În ceea ce privește amplificarea ADN-ului (obținut cu protocolul I) din tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cu markerul ISSR-UBC855, toate cele cinci probe au dat o bună amplificare, rezultate similare au fost obținute și în cazul probelor de ardei (*Capsicum annuum*) cu markerul ISSR-UBC810 (figura 4).

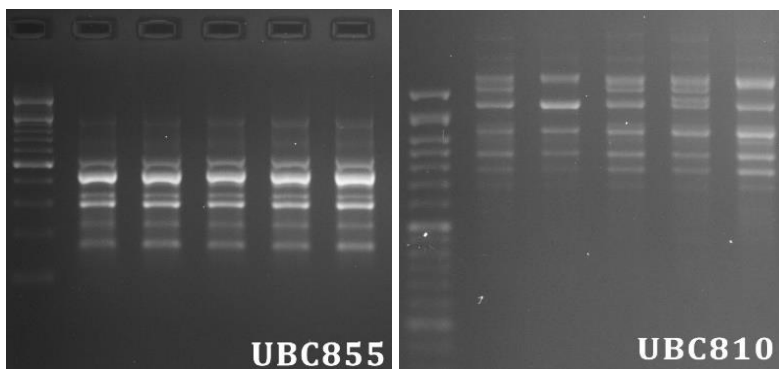


Figura 4 – Profile electroforetice obținute la probe de tomate cu markerul UBC855 și probe de ardei cu markerul UBC810
(Electrophoretic patterns obtained from tomatoes samples with UBC855 marker and pepper samples with UBC810 marker)

CONCLUZII

- Protocolul I pe bază de CTAB și tiosulfat de sodiu a condus la obținerea unui ADN adecvat studiilor genetice (cu puritate și concentrație optimă) pentru toate cele trei specii (grâu, tomate și ardei).

- Amplificarea ADN obținut cu protocolul I a evidențiat rezultate bune (profile electroforetice clare), atât în cazul utilizării de primeri specifici speciei-SSR, cât și a primerilor nespecifici ISSR.

Surse de finanțare

Acest studiu s-a realizat cu surse din bugetul proiectelor PN19.25.01.01 (Ministerul Educației și Cercetării) și ADER 726 (Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- ABDEL-LATIF, A., OSMAN, G., 2017 – *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize*. Plant Methods, 13(1): 1.
- ABOUL-MAATY, N.A.F., ORABY, H.A.S., 2019 – *Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method*. Bull. Natl. Res. Cent., 43: 25.
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- CHAVES, A.L., VERGARA, C.E., MAYER, J.E., 1995 – *Dichloromethane as an economic alternative to chloroform in the extraction of DNA from plant tissues*. Plant Molecular Biology Reporter, 13(1): 18-25.
- COSGROVE, D.J., 2005 – *Growth of the plant cell wall*. Nature reviews molecular cell biology, 6(11): 850.
- CRISTINA, D., CIUCĂ, M., CORNEA, C.P., 2017 – *Comparison of four genomic DNA isolation methods from single dry seed of wheat, barley and rye*. AgroLife Scientific Journal, 6(1): 84-91.
- CULLIS, P.M., ELSY, D., FAN, S., SYMONS, M.C.R., 1993 – *Marked effect of buffers on yield of single- and double-strand breaks in DNA irradiated at room temperature and at 77K*. International Journal of Radiation Biology, 63(2): 161-165.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B., 1983 – *A plant DNA miniprep: version II*. Plant molecular biology reporter, 1(4): 19-21.
- DILWORTH, E., FREY, J.E., 2000 – *A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification*. Plant Molecular Biology Reporter, 18(1): 61-64.
- DOYLE, J., 1991 – *DNA protocols for plants*. Molecular techniques in taxonomy, Springer, Berlin, Heidelberg: 283-293.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., 1987 – *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochem. Bull., 19: 11-15.
- HEIKRUJAM, J., KISHOR, R., MAZUMDER, P.B., 2020 – *The chemistry behind plant DNA isolation protocols*. Biochemical Analysis Tools-Methods for Bio-molecules Studies, cap. 8, IntechOpen.
DOI: 10.5772/intechopen.92206.
- HOLDERBAUM, D.F., KON, T., KUDO, T., GUERRA, M.P., 2010 – *Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development*. Hort Science, 45(8): 1150-1154.
- JADHAV, K.P., RANJANI, R.V., SENTHIL, N., 2015 – *Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol*. Bioinfolet, 12(3A): 543-548.
- MICHIELS, A.N., VAN DEN ENDE, W., TUCKER, M., VAN RIET, L., VAN LAERE, A., 2003 – *Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants*. Analytical biochemistry, 315(1): 85-89.
- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F., 1980 – *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic acids research, 8(19): 4321-4326.

- OGUNKANMI, A.L., OBOH, B., ONIFADE, B., ADEWALE, A., OGUNJOBI, I.A.T., OGUNDIPE, O.T., 2008 – *An improved method of extracting genomic DNA from preserved tissues of Capsicum annuum for PCR amplification*. EurAsian Journal of BioSciences: 115.
- ORTEGA, F.A., HAYANO-KANASHIRO, A.C., BOSLAND, P.W., 2019 – *An improved extraction that increases DNA yield in chile pepper (Capsicum sp.)*. J. Adv. Plant Sci., 2: 106.
- PETERSON, D.G., BOEHM, K.S.; STACK, S.M., 1997 – *Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (Lycopersicon esculentum), a plant containing high levels of polyphenolic compounds*. Plant Molecular Biology Reporter, 15(2): 148-153.
- SHEPHERD, L.D., MCLAY, T.G., 2011 – *Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue*. Journal of Plant Research, 124(2): 311-314.
- SIKA, K.C., KEFELA, T., ADOUKONOU-SAGBADJA, H., AHOTON, L., SAIDOU, A., BABA-MOUSSA, L., BAPTISTE, L.J., KOTKONI, O.S., GACHOMO, E.W., 2015 – *A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems*. Plant Gene, 1: 43-45.
- TURCI, M., SARDARO, M.L.S., VISIOLI, G., MAESTRI, E., MARMIROLI, M., MARMIROLI, N., 2010 – *Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products*. Food control, 21(2): 143-149.
- VARMA, A., PADH, H., SHRIVASTAVA, N., 2007 – *Plant genomic DNA isolation: An art or a science*. Biotechnology, 2: 386-392.
- VINOD, K.K., 2004 – *Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation*. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore: 109-121.
- VON POST, R., VON POST, L., DAYTEG, C., NILSSON, M., FORSTER, B.P., TUVESON, S., 2003 – *A high-throughput DNA extraction method for barley seed*. Euphytica, 130(2): 255-260.
- ZEINALZADEHTABRIZI, H., HOSSEINPOUR, A., AYDIN, M., HALILOGLU, K., 2015 – *A modified genomic DNA extraction method from leaves of sunflower for PCR based analyzes*. J. Biol. Env. Sci., 7: 222-225.