



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE (*Ricinus communis* L.)

SILVA, S.C.³; MENESES, C.H.S.G.¹; BEZERRA, C.S.¹; TAVARES, A.C.¹; COUTINHO, T.C.²; SILVA, S.C.³; MILANI, M.³; VIDAL, M.S.³ 1- Estagiários da Embrapa Algodão e alunos de Graduação da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB. 2- Aluna de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN. 3 - Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande - PB. mvidal@cnpa.embrapa.br

RESUMO

O principal interesse pela ricinocultura, atualmente, reside na produção de biodiesel; no entanto, existem várias outras aplicações como: produção de plásticos, tintas e lubrificantes. Esta também assume um papel sócio-econômico importante em algumas regiões do Brasil. Uma das maneiras de se aumentar a produção desta cultura é através dos programas de melhoramento, para isso, não bastam apenas estudos de caracteres morfológicos, mas sim estes associados a caracterização a nível molecular. Para este tipo de análise se faz necessário extrair DNA em qualidade e quantidade adequadas de forma rápida e eficiente. O objetivo deste estudo foi testar protocolos de extração de DNA para mamoneira, visando uma boa quantificação e uma melhor qualidade do DNA extraído. Para tal, foram utilizados seis métodos de extração (Ferreira e Grattapaglia; Ferreira e Grattapaglia, sem tampão de precipitação; Ferreira e Grattapaglia, sem tampão de precipitação e com tratamento de RNase A no meio da extração; Murray e Thompson; Dellaporta; Romano) obtendo-se resultados positivos com todos os protocolos testados; no entanto, verificou-se que o protocolo de apresentou melhor concentração de DNA em relação aos outros.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies da família das Euforbiáceas, a mamoneira (*Ricinus communis* L.) tem se destacado como objeto de estudos devido sua vasta amplitude de utilização. Desde os tempos mais remotos o óleo extraído de suas sementes, apesar de impróprio para o consumo humano, é utilizado como matéria-prima para a produção de medicamentos. Atualmente, devido a sua versatilidade, uma gama de produtos industrializados e farmacêuticos atraem novos mercados consumidores além da perspectiva de sua utilização para a síntese de biodiesel (FREIRE, 2001).

As técnicas de biologia molecular vêm sendo amplamente utilizadas na caracterização de espécies vegetais e na identificação de polimorfismos intra-específicos. De acordo com FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1995) estes dados, quando combinados a métodos clássicos de genética e melhoramento, vem abrindo novas perspectivas para a ampliação do conhecimento e para a aceleração de programas destas áreas.

Para a aplicação destas técnicas moleculares, inicialmente se faz necessário isolar o DNA

Excluído: E



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

vegetal. Segundo ROMANO e BRASILEIRO (1999), independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese.

O presente trabalho teve por objetivo testar e comparar protocolos para a extração de DNA da mamoneira, visando identificar o que apresentou melhores resultados

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Embrapa Algodão, localizado na cidade de Campina Grande – PB, no período de junho a agosto de 2004. Foram utilizados quatro genótipos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da mamoneira (CM-2000, CSRN-142, CSRN-226 e CSRN-393), cultivados em câmara de crescimento, aclimatados a 25°C, exceto o acesso CM2000 que foi coletado a campo de uma planta adulta. Para a extração do DNA genômico, foram coletados aproximadamente 300mg de tecido foliar (folhas permanentes e jovens), em tubos de microcentrífuga de 1,5mL e submetidos imediatamente a nitrogênio líquido. Com o auxílio de um bastão de vidro, previamente resfriado em nitrogênio líquido, as amostras foram maceradas até a obtenção de um pó bem fino. A extração de DNA total das amostras seguiu as metodologias descritas por: (1) DELLAPORTA et al., 1993; (2) FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; (3) FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998 modificado (sem tampão de precipitação); (4) FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998 modificado (sem tampão de precipitação e com tratamento de RNase A no meio da extração); (5) MURRAY e THOMPSON, 1998 e (6) ROMANO, 1998)

O protocolo 4 foi baseado no descrito por Ferreira e Grattapaglia, 1998, sendo introduzida de uma etapa de tratamento com RNaseA durante o procedimento de extração, após os tubos terem sido retirados do banho-maria á 65°C, de modo a evitar perdas de DNA durante o processo de tratamento com RNase realizado anteriormente ao final da extração. Exceto as amostras ao qual foram extraído o DNA a partir do protocolo 4, por já ter ocorrido o tratamento com a RNase A, as demais amostras submetidas aos protocolos acima citados foram tratadas com RNase A, conforme descrito:

Tratamento com RNase: Foram aplicados 4µL de RNase A e deixada a 30 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se 100µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 e agitaram-se as amostras, por inversão, durante 5 minutos, ou até obter-se uma emulsão homogênea. Centrifugou-se a 7.000g, 4°C, durante 5 minutos. Transferiu-se a fase aquosa (superior) para novos tubos. Adicionou-se 0,1 do volume de NH₄OAc 3,5 M e misturou-se por inversão. Adicionaram-se 2,5 volumes de isopropanol (-20°C) e misturou-se por inversão dos tubos. Estes foram incubados a -20°C por 30 minutos. Centrifugaram-se as amostras a 7.000g, 4°C, por 10 minutos. Lavou-se duas vezes o



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

sedimento com 500µL de etanol 70%, gelado, centrifugando-o por 5 minutos. Lavou-se o sedimento com 300µL de etanol 95% (ou absoluto) gelado, centrifugando-o por 3 minutos. Por fim, desprezou-se o sobrenadante, deixando o sedimento secar ao ar livre. Em seguida, foi ressuspenso em 100µL de água MilliQ™.

A concentração das amostras de DNA foi realizada por espectrofotometria, onde:

$[DNA] = D.O._{260} \times 50ng/\mu L \times FD$, sendo FD igual a fator de diluição. Para cada amostra foram utilizados 2µL de DNA total, ajustando-se o volume para 500µL com água MilliQ™, obtendo-se então um fator de diluição de 250.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos pôde-se verificar que utilizando-se os protocolos descritos foi possível extrair DNA total de mamoneira; observou-se, através da quantificação por espectrofotometria (Tabela 1), que a metodologia que apresentou melhor resultado foi a descrita por FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998, no caso o protocolo 2, que gerou em média 1262,40ng/µL. Foi observado também, que apesar de terem sido empregados 300mg de tecido vegetal para o processo de extração, ocorreu uma variação entre cada acesso empregado. Esta variação pode estar relacionada com a idade da planta, tendo em vista que a amostra de tecido vegetal do acesso CM2000 foi coletada a campo de uma planta adulta e, as demais, coletadas de plantas em estágio inicial de desenvolvimento cultivadas em câmara de crescimento sob condições controladas.

Tabela 1. Quantificação de amostras de DNA de mamona extraídas com diferentes protocolos por espectrofotometria.

Acesso/Protocolo	D.O.			[DNA] ^a	Acesso/Protocolo	D.O.			[DNA] ^a
	260	280	320			260	280	320	
CM 2000 / 1	0,125	0,102	0,037	1562,5	CM 2000 / 4	0,183	0,107	0,022	2287,5
CSRN 393 / 1	0,026	0,020	0,010	325,0	CSRN 393 / 4	0,040	0,029	0,012	500,0
CSRN 226 / 1	0,069	0,045	0,017	862,5	CSRN 226 / 4	0,076	0,050	0,020	950,0
CSRN 142 / 1	0,056	0,036	0,012	700,0	CSRN 142 / 4	0,086	0,054	0,019	1075,0
CM 2000 / 2	0,108	0,064	0,015	1350,0	CM 2000 / 5	0,028	0,024	0,012	350,0
CSRN 393 / 2	0,035	0,026	0,014	437,5	CSRN 393 / 5	0,014	0,016	0,009	175,0
CSRN 226 / 2	0,212	0,116	0,017	2650,0	CSRN 226 / 5	0,017	0,017	0,011	212,5
CSRN 142 / 2	0,049	0,035	0,016	612,0	CSRN 142 / 5	0,011	0,016	0,013	137,5
CM 2000 / 3	0,098	0,057	0,011	1225,0	CM 2000 / 6	0,096	0,070	0,033	1200,0
CSRN 393 / 3	0,025	0,018	0,009	312,5	CSRN 393 / 6	0,004	0,011	0,011	50,0
CSRN 226 / 3	0,014	0,009	0,001	175,0	CSRN 226 / 6	0,006	0,012	0,011	75,0
CSRN 142 / 3	0,015	0,011	0,004	187,5	CSRN 142 / 6	0,017	0,021	0,018	212,5

^a Concentração de DNA em ng/µL

CONCLUSÕES



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

- O protocolo que apresentou melhor resultado com relação a massa de DNA obtida foi o de Ferreira e Grattapaglia, (1998).
- Novos ensaios devem ser realizados a fim de confirmar que a idade da planta realmente influencia na recuperação de uma massa maior de DNA durante o processo de extração.

REFERÊNCIAS

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.B. A plant minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reports** v. 1, p. 19-20, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p

FREIRE, R.M.M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001. 295-335

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p 40-43, 1999.