

Foto: Napoleão Esberard de M. Beltrão



Comparação Entre Protocolos de Extração de DNA para Algodão

Márcia Soares Vidal¹
Taciana de Carvalho Coutinho²
Lúcia Vieira Hoffman³

Em plantas, o isolamento de DNA requer mecanismos que possam eliminar os problemas gerados durante a extração. Segundo Romano e Brasileiro (1999), o DNA vegetal deve ser puro suficiente para não interferir nos tratamentos enzimáticos ou causar problemas durante a eletroforese. O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), uma das principais culturas produtora de fibras do mundo, vem sendo bastante estudada ao nível de DNA com marcadores moleculares. Atualmente, vários são os métodos de extração utilizados na obtenção de DNA de algodão de alta qualidade, mas problemas com contaminação por compostos fenólicos como citado por Saha et al. (1997) ainda são fatores que geram oxidação das amostras e conseqüentemente degradação das mesmas. Desta forma, o presente trabalho teve como finalidade testar protocolos para a extração de DNA total de algodão, a fim de selecionar aquele que melhor resultado gerar para ser então empregado nos projetos da equipe de Biotecnologia com marcadores moleculares.

Para o desenvolvimento deste trabalho os genótipos: BRS IPÊ, CNPA ITA 90 II, CNPA GO 2000 1207 e

CNPA GO 2001 3072 foram cultivados em casa de vegetação da Embrapa Algodão, localizada em Campina Grande, PB no período de Janeiro a Junho. Para a extração do DNA total, folhas jovens foram coletadas e colocadas imediatamente na presença de nitrogênio líquido. As amostras foram submetidas a 6 tipos de extrações, descritas nos esquemas a seguir:

A avaliação da qualidade dos DNAs extraídos foi realizada através de migração de uma alíquota de 1 mL das amostras em gel de agarose 0,7% (P/V) em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato 0,045 mM, EDTA 0,001 M pH 8,0) corados com brometo de etídio (1,2 mL/100 mL de uma solução 10 mg/mL) (Figura 1). Após a avaliação da qualidade das amostras extraídas, as mesmas foram tratadas com RNase e então quantificadas em espectrofotômetro (Tabela 1).

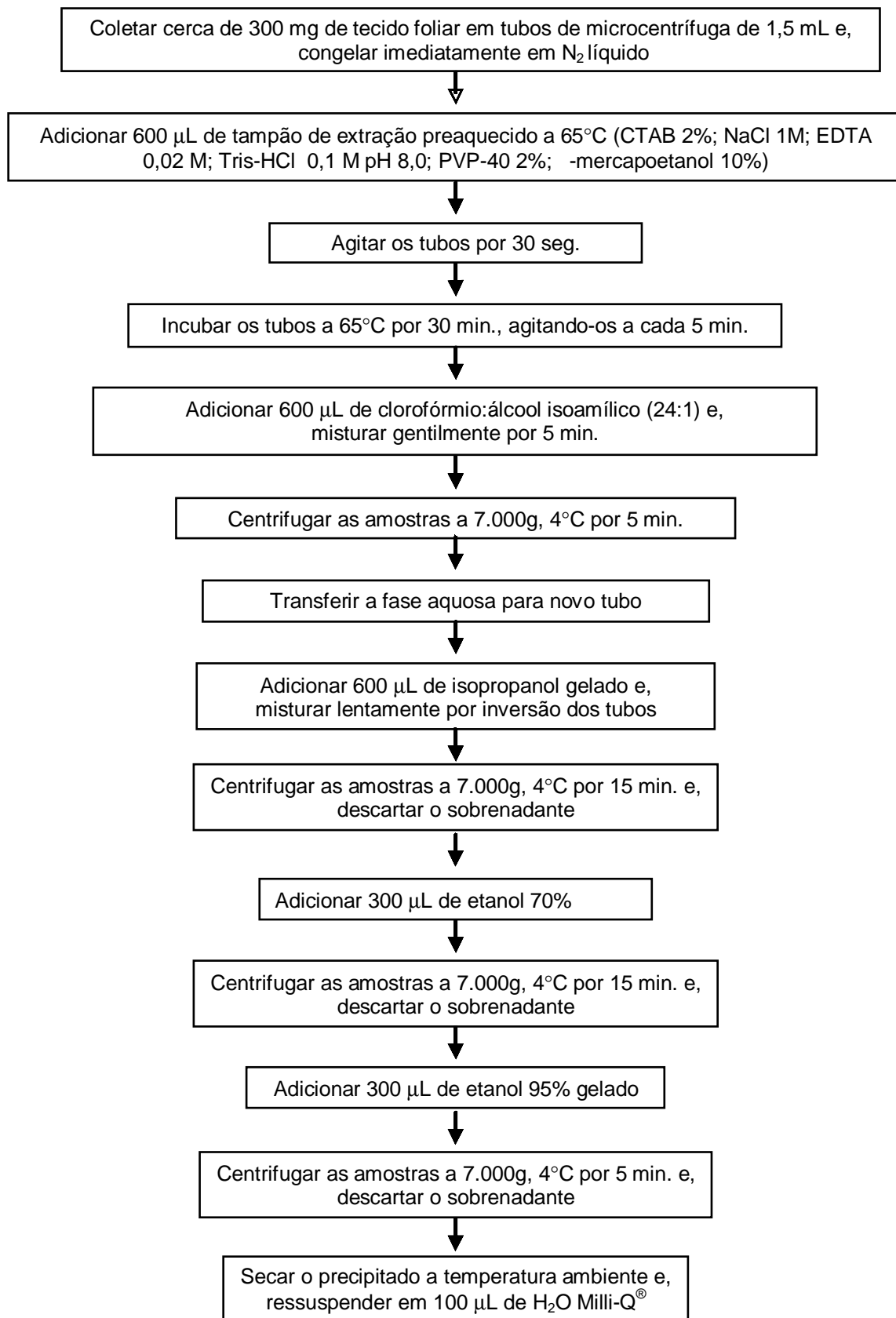
De acordo com os dados obtidos foi verificado que os protocolos de 1, 2 e 3 mostraram-se eficientes para extração do DNA do algodão. Enquanto que os protocolos de 4, 5 e 6 não mostraram bandas características de DNA íntegro, e sim, rastros de degradações e fragmentos de RNA.

¹Bióloga, DSc., Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. e-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

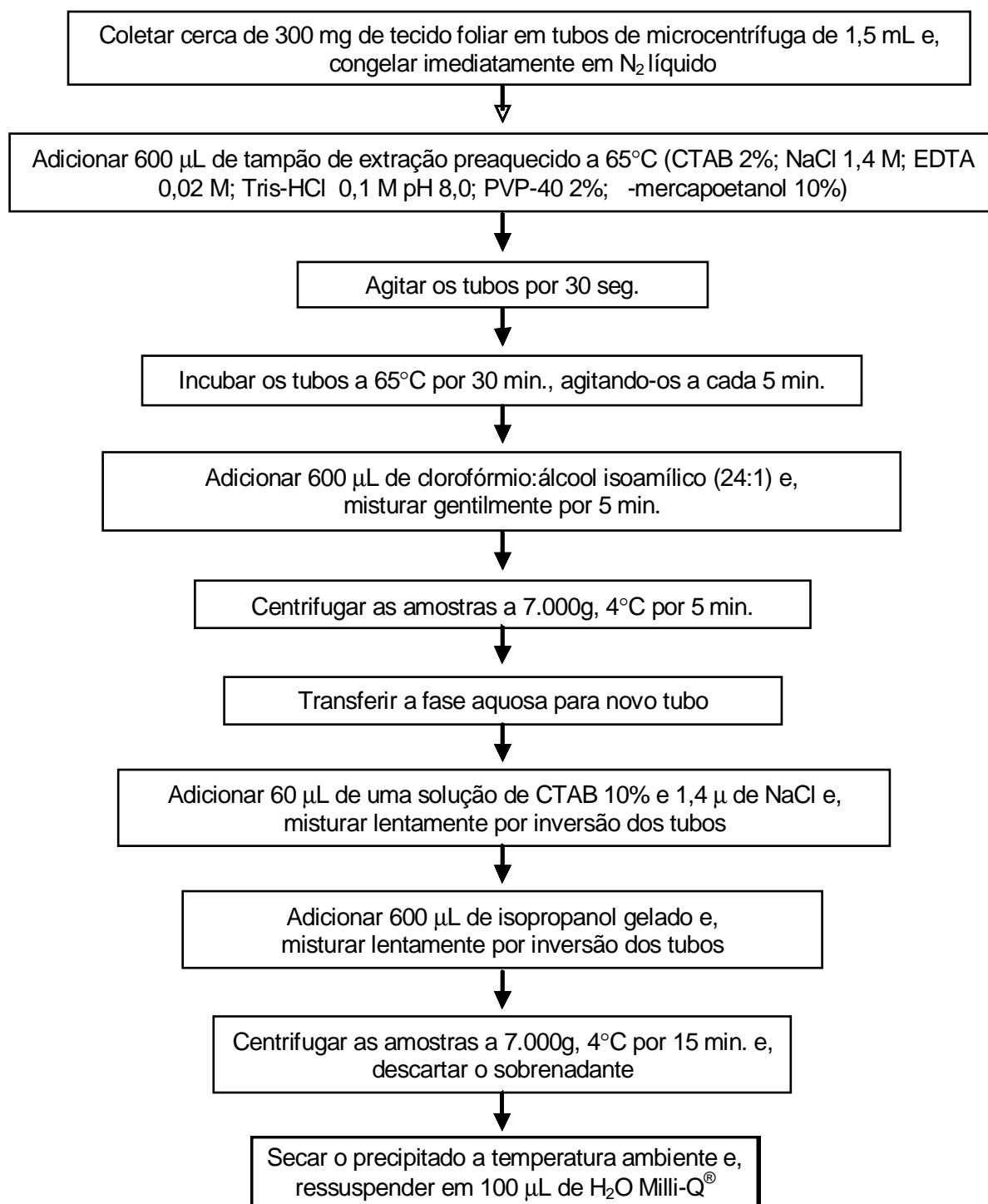
²Estagiária da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753, Campina Grande, PB.

³Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão. e-mail: hoff@cnpa.embrapa.br

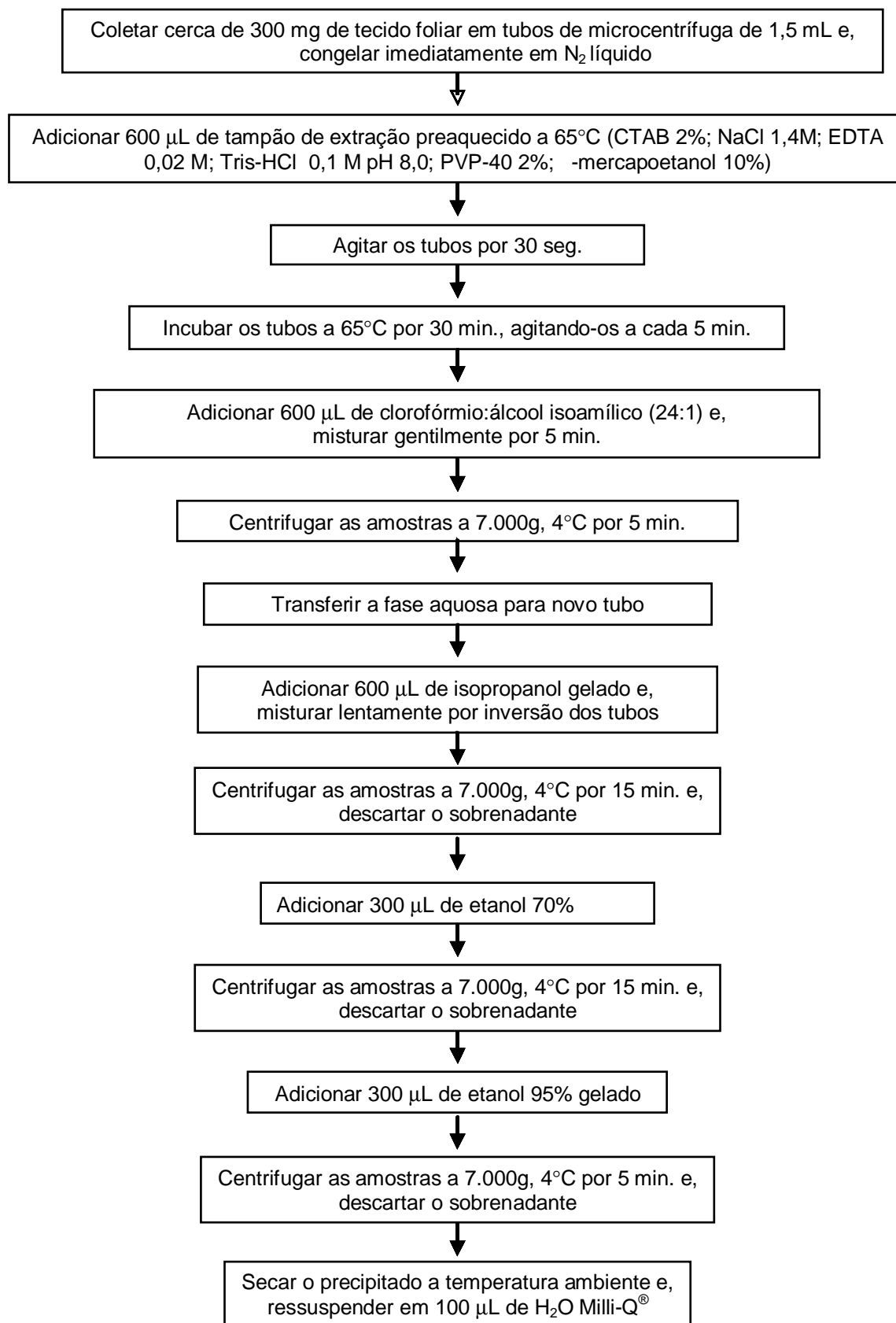
Esquema do protocolo 1 de extração de DNA de algodão (Zhang e Stewart, 2000):



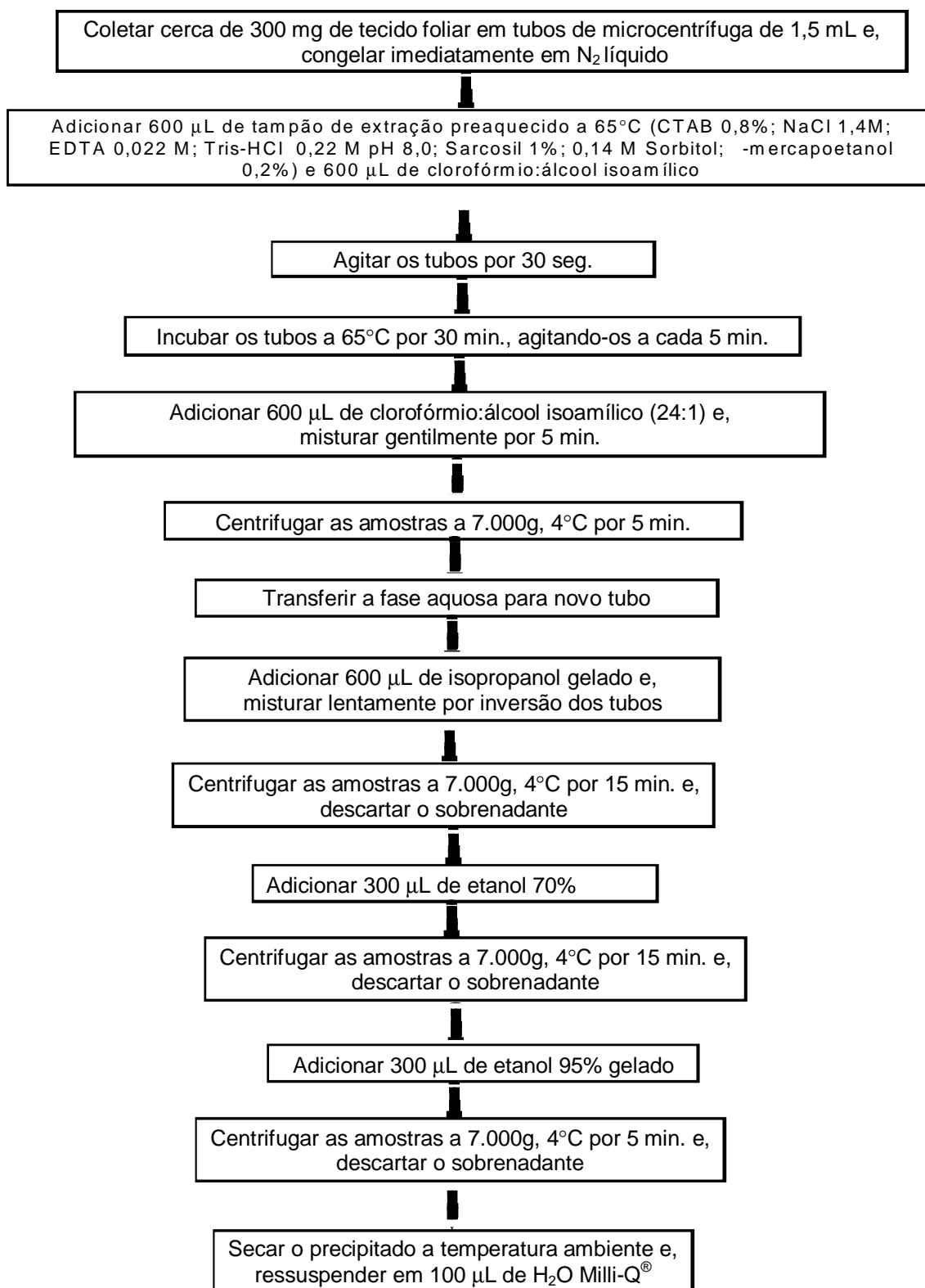
Esquema do protocolo 2 de extração de DNA de algodão (Ferreira e Grattapaglia, 2001):



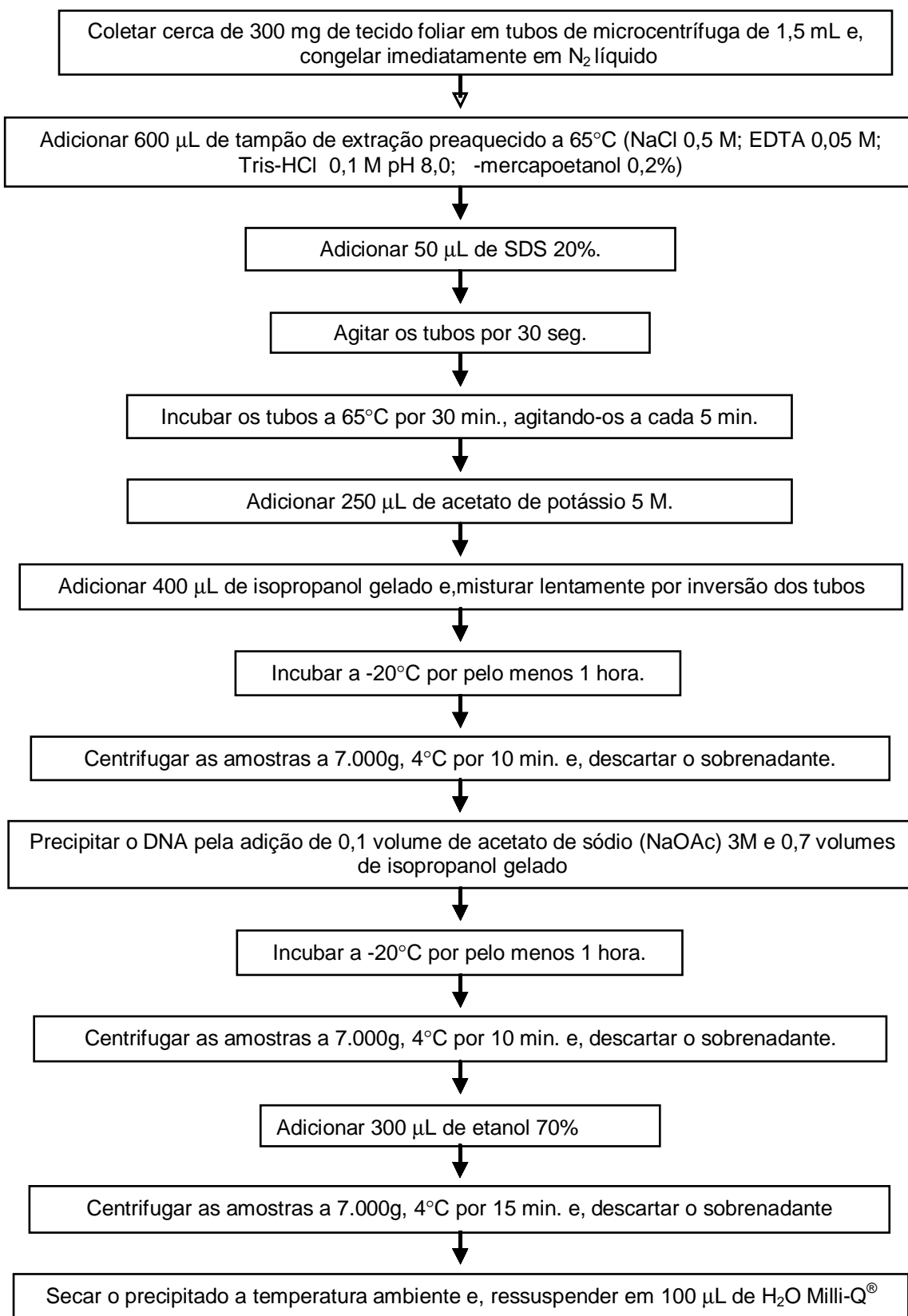
Esquema do protocolo 3 de extração de DNA de algodão (Ferreira e Grattapaglia, 2001 modificado):



Esquema do protocolo 4 de extração de DNA de algodão (Romano, 1998):



Esquema do protocolo 5 de extração de DNA de algodão (Dellaporta *et al.*, 1993):



Esquema do protocolo 6 de extração de DNA de algodão (Murray e Thompson, 1998):

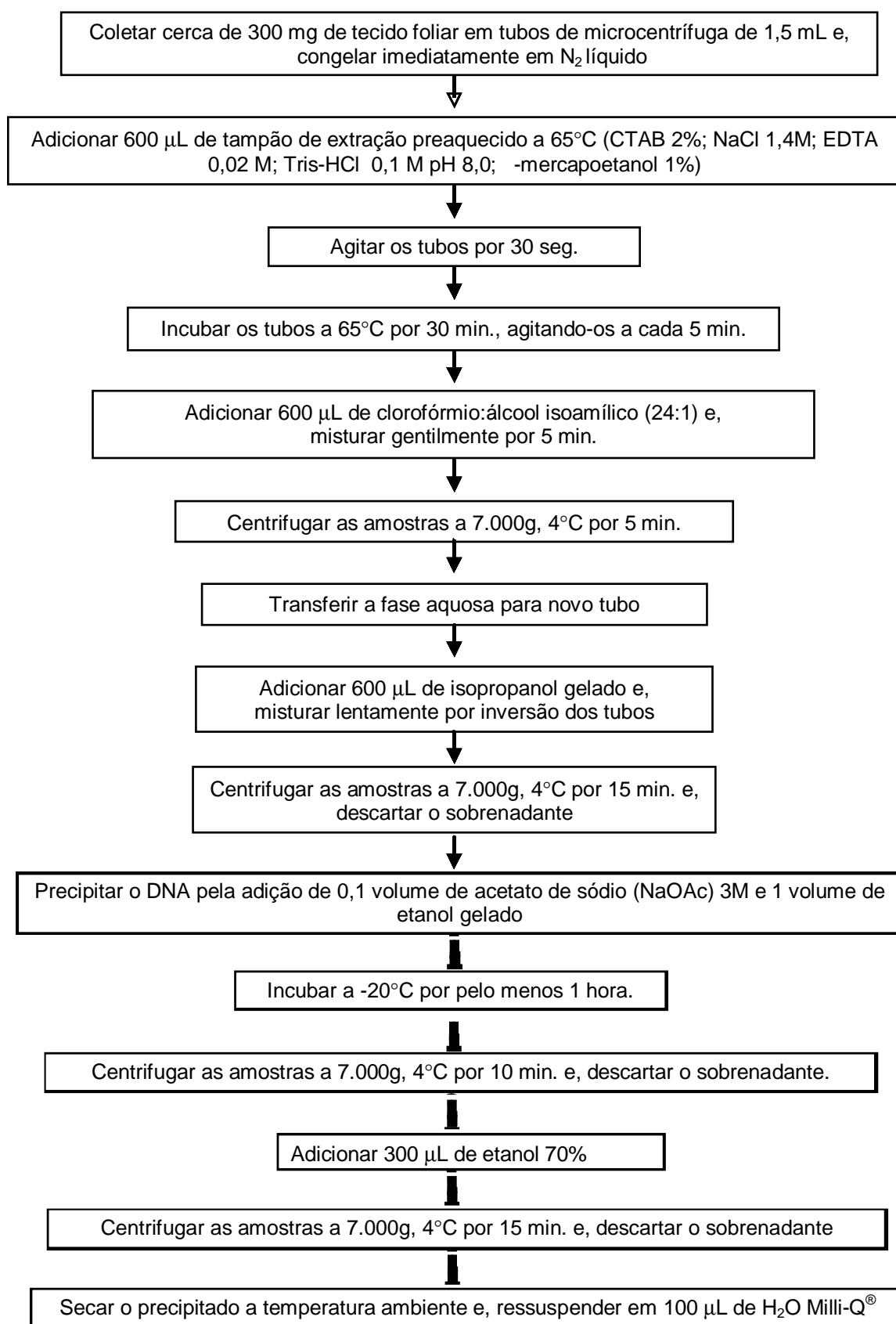




Fig. 1. Fotografia Polaroid da quantificação das amostras de DNA total obtido nos testes de protocolos: Ferreira e Grattapaglia com TP (1 a 4), Ferreira e Grattapaglia sem TP (5 a 8), Romano e Brasileiro (9 a 12), Dellaporta et al (13 a 16), Murray e Thompson (17 a 20) e Zhang e Stewart (21 a 24). Os números de (I a IV) são os marcadores moleculares do bacteriófago lambda nas concentrações 50, 100, 150 e 200 ng / mL, respectivamente.

Tabela 1. Avaliação do grau de pureza por espectrofotometria das amostras de DNA extraídas.

A m o s t r a s	D . O .		R a z ã o 2 6 0 / 2 8 0
	2 6 0 n m	2 8 0 n m	
1 a *	0 , 2 0 2	0 , 1 2 3	1 , 6 4
1 b	0 , 5 0 1	0 , 4 2 2	1 , 1 8
1 c	0 , 1 1 5	0 , 0 9 2	1 , 2 5
2 a	0 , 1 6 6	0 , 1 0 9	1 , 5 2
2 b	0 , 2 1 1	0 , 1 7 0	1 , 2 4
2 c	0 , 1 4 7	0 , 1 0 0	1 , 4 7
3 a	0 , 2 4 1	0 , 1 5 9	1 , 5 1
3 b	0 , 2 0 8	0 , 1 4 7	1 , 4 1
3 c	0 , 3 1 5	0 , 2 6 0	1 , 2 1
4 a	0 , 2 3 5	0 , 1 4 1	1 , 6 6
4 b	0 , 2 1 4	0 , 1 5 8	1 , 3 5
4 c	0 , 2 1 0	0 , 1 8 6	1 , 1 2

Referências Bibliográficas

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant miniprep: 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.

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. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed). Manual de transformação genética de plantas.

Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p. 163-177.

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.

SAHA, S.; CALLAHAN, F.E.; CREECH, J.B. Cotton improvement effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein. The Journal of Cotton Science, v.1, p. 10-14, 1997.

ZHANG, J.; STEWART, J. M. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. Journal of Cotton Science, v. 4, p. 193-201, 2000.

Comunicado Técnico, 187

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 315 4300 Fax: (83) 315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nívia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena A. Araujo
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes:

Supervisor Editorial: Nívia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nísia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho