

**Comparação entre Protocolos para
Extração de DNA Total de *Ricinus
communis* L.**Márcia Soares Vidal¹Maira Milani²Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses³Cíntia de Sousa Bezerra³

Dentre as espécies da família das Euforbiáceas, a mamoneira (*Ricinus communis* L.) se tem destacado como objeto de estudos, devido à 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, em virtude da sua versatilidade, uma gama de produtos industrializados e farmacêuticos atrai 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) esses 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 dessas áreas.

Para a aplicação das técnicas moleculares, faz necessário, de início, isolar o DNA vegetal. Em plantas, este isolamento requer mecanismos que possam eliminar os problemas gerados durante a extração. 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 nem causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese.

Com o presente trabalho, objetivo-se testar e comparar protocolos para a extração de DNA da mamoneira, visando identificar o que apresentou melhores resultados.

¹ Bióloga, DSc., Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58.107-720, Campina Grande, PB. E-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

² Eng. Agr., MSc., Embrapa Algodão. E-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br

³ Estagiário(a) da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58.109-753, Campina Grande, PB.

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizaram-se genótipos provenientes do BAG (Banco Ativo de Germoplasma) da Embrapa Algodão: CM-2000, CSRN-142, CSRN-226 e CSRN-393, germinadas em copos plásticos de 500mL contendo substrato (30% de massame, 30% de esterco e 40% de areia) e mantidos em câmara de crescimento a 25°C, na Embrapa Algodão, localizada em Campina Grande, PB, no período de junho a agosto de 2004, exceto o acesso CM2000 que foi coletado a campo, de uma planta adulta. Para extração do DNA total, folhas jovens foram coletadas e colocadas imediatamente na presença de nitrogênio líquido, e as amostras submetidas a 6 tipos de extração, descritas nos esquemas a seguir:

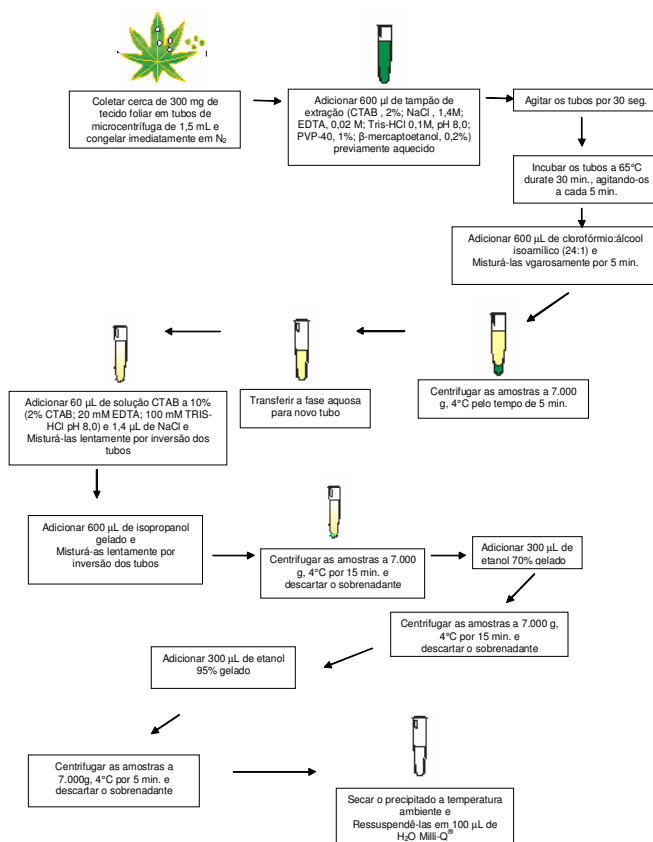


Fig. 1. Mamoneiras cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas, Campina Grande, 2004.

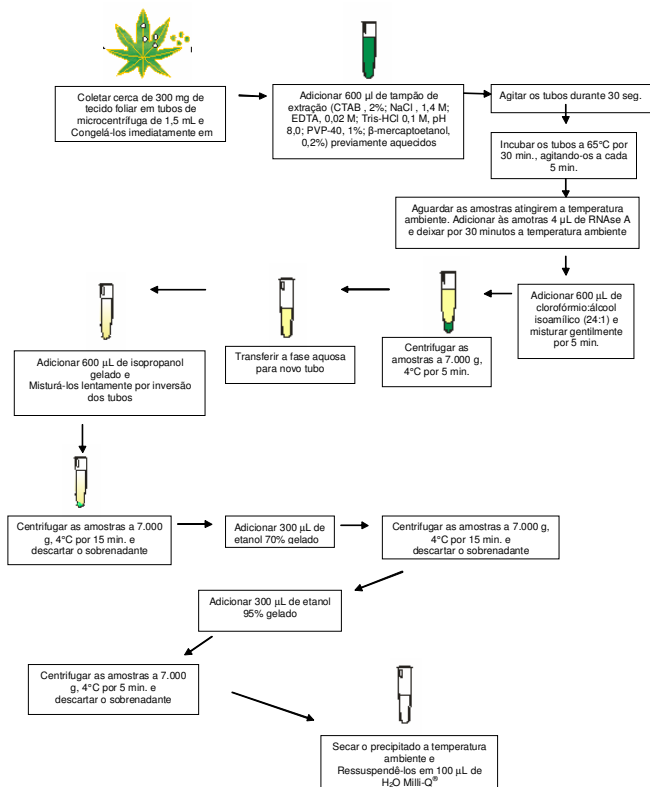


Fig. 2. Folha de mamoneira com área de tecido foliar retirado para extração, Campina Grande, 2004.

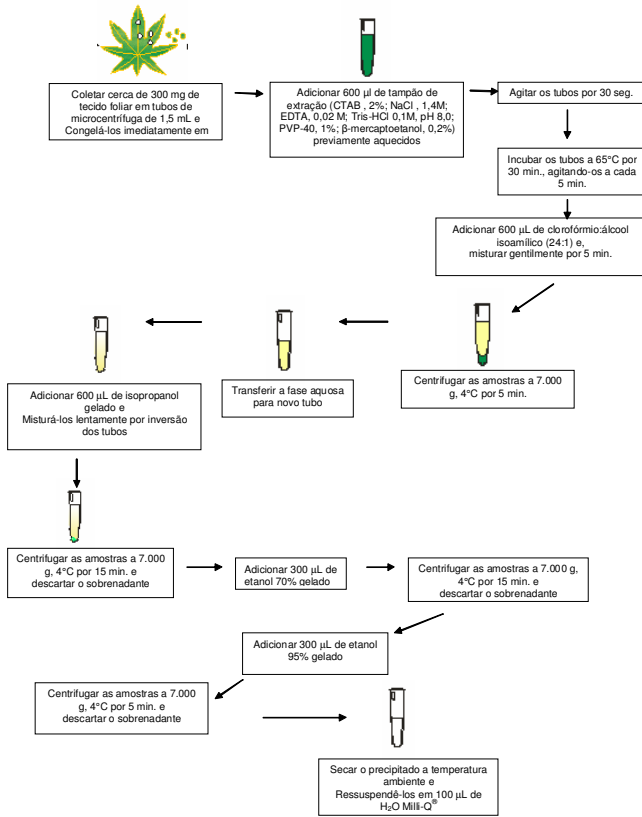
Esquema do protocolo 1 (Ferreira e Grattapaglia, 2001):



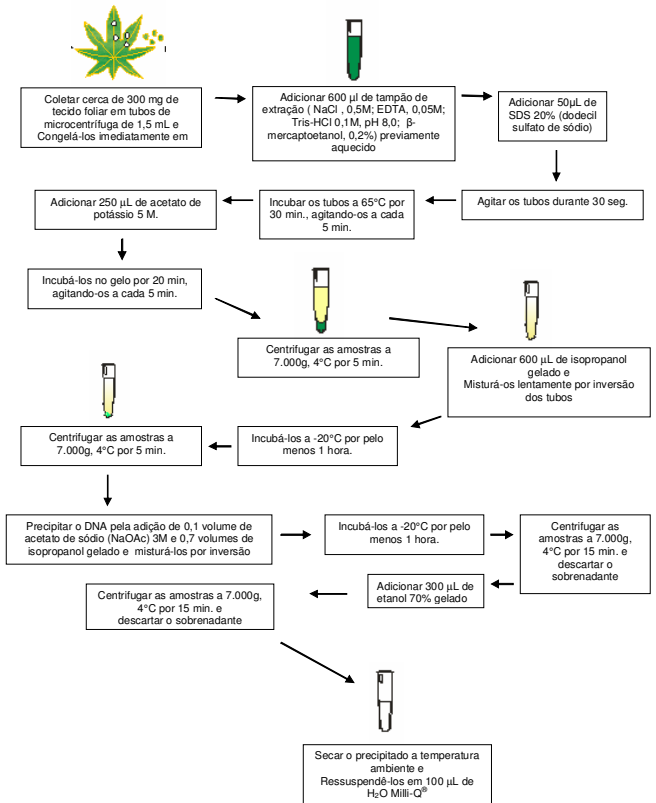
Esquema do protocolo 2 (Ferreira e Grattapaglia, 2001, modificado sem tampão de precipitação e tratado com RNase durante a extração):



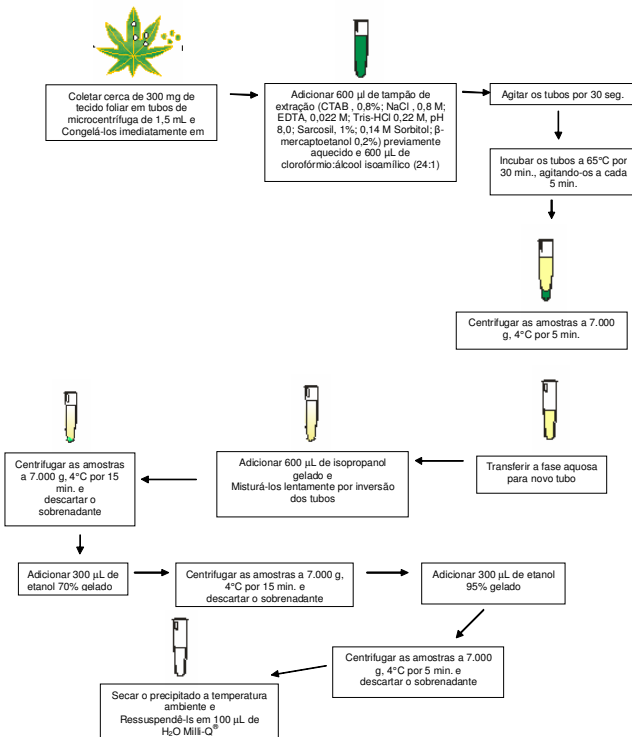
Esquema do protocolo 3 (Ferreira e Grattapaglia, 2001, modificado sem tampão de precipitação):



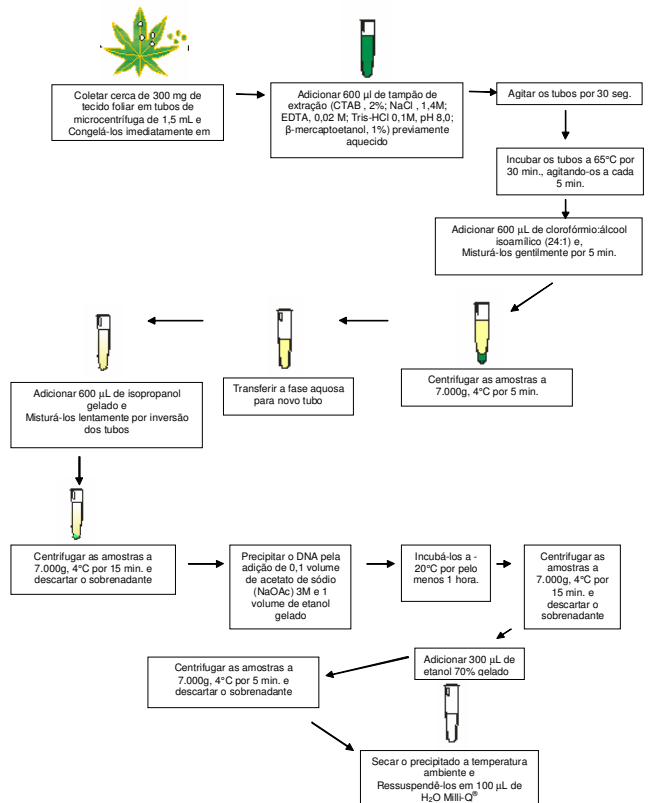
Esquema do protocolo 5 (Dellaporta *et al.*, 1993):



Esquema do protocolo 4 (Romano, 1998):



Esquema do protocolo 6 (Murray e Thompson, 1998):



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

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

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, onde se utilizou uma análise de variância e em seguida o teste de Tukey, para comparação de médias.

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos pôde-se verificar que se utilizando os protocolos descritos, foi possível extrair DNA total de mamoneira; observou-se, também, 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 1, que gerou em média 1262,40 ng/mL. Constatou-se, ainda, que apesar de terem sido empregados 300 mg de tecido vegetal para o processo de extração, ocorreu uma variação entre cada acesso

empregado, a qual pode estar relacionada à idade da planta, tendo em vista que a amostra de tecido vegetal do acesso CM 2000 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.

Os resultados obtidos a partir da análise estatística, não mostraram nenhuma significância sobre o teste F, para a concentração final de DNA, onde em decorrência disto não se pode separar nenhuma das médias dos valores observados, pelo teste de Tukey (Tabela 2).

Conclusões

Apesar da análise de variância não possuir resultados significativos para a concentração final de DNA, os protocolos podem ser diferenciados a partir de sua média final;

O coeficiente de variação mostrou-se alto durante a análise, em decorrência da alta discrepância mostrada entre os acessos estudados, onde o acesso CM 2000 apresentou a maior contração de DNA final e o acesso CSRN 393 mostrou com a menor concentração de DNA;

Tabela 1. Quantificação de amostras de DNA de mamona extraídas com diferentes protocolos por espectrofotometria, Campina Grande, 2004

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

Tabela 2. Análise da variância, para concentração final de DNA

F. V	G. L	Q.M	F
Tratamento	5	776456,88	1,92 ^{ns}
Resíduo	18	404571,71	
Total	23		
C.V. 86,61			

O protocolo que apresentou melhor resultado com relação à massa de DNA obtida, foi o de Ferreira e Grattapaglia, 1998, e 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 bibliográficas

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

minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reports**, v.1, 1993, p.19-20.

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. de; LIMA, E.F. **Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001, p.295-335.

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

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, 1999, p.40-43.

Comunicado Técnico, 252

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500



Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Cristina Schetino Bastos
Fábio Akiyoshi Suinaga
Francisco das Chagas Vidal Neto
Gilvan Barbosa Ferreira
José Américo Bordini do Amaral
José Wellington dos Santos
Nair Helena Arriel de Castro
Nelson Dias Suassuna

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