

74

Circular
Técnica*Campina Grande, PB
Novembro, 2003*

Autores

Márcia Soares Vidal
Bióloga D.Sc. da Embrapa
Algodão, Rua Osvaldo Cruz,
1143, Centenário 58107-720,
Campina Grande, PB
e-mail:
mvidal@cnpa.embrapa.br

Taciana de Carvalho Coutinho
Estagiária da Universidade
Estadual da Paraíba,
Bodocongó, 58109-753,
Campina Grande, PB

Lúcia Vieira Hoffman
Eng. Agr. D.Sc. da
Embrapa Algodão

Comparação entre Protocolos de Extração de DNA de Algodão para Emprego em Ensaio com Marcadores Moleculares



O isolamento de DNA de plantas, sejam elas provenientes de cultura de tecidos ou de campo, é uma etapa importante para aqueles que trabalham com marcadores moleculares, visto que a quantidade e a qualidade das amostras vai influir num bom desenvolvimento dos trabalhos.

Diversos métodos são descritos, alguns deles aplicáveis para a maioria das culturas, outros, no entanto, não podem ser utilizados, uma vez que não conseguem a extração do DNA ou, então, a pureza das amostras é muito baixa. Vários autores citam problemas no isolamento do DNA vegetal, alguns dos quais relacionados principalmente ao co-isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários.

No que tange à cultura do algodão, esta espécie apresenta grandes quantidades de compostos fenólicos que acarretam problemas de degradação e interferência no isolamento do material genético, como rompimento de paredes e membranas celulares dificultando, muitas vezes, a precipitação de DNA. Tendo em vista esses problemas, a otimização de um método eficiente de extração de DNA de algodão torna-se ponto importante para pesquisas biotecnológicas nesta cultura. Sendo assim propõe-se, com presente trabalho, testar alguns protocolos de extração de DNA empregando-se folhas de algodão, de modo a se avaliar tanto a qualidade quanto a quantidade, uma vez que o mesmo deverá ser empregado em experimentos de marcadores moleculares.

1. Material vegetal e condições de crescimento

O material vegetal utilizado compõe-se genótipos de algodão obtidos no Programa de Melhoramento Vegetal do Estado de Goiás pertencentes aos Ensaio de Novas Linhagens II, Linhagens Avançadas e Ensaio Estadual de Goiás, do ano agrícola 2002/2003.

As sementes de algodão foram germinadas em solo e mantidas em casa-de-vegetação da Embrapa Algodão, localizada na cidade de Campina Grande, PB, no mês de março de 2003.

2. Isolamento de DNA total

O DNA total de algodão foi isolado a partir de folhas jovens, segundo os protocolos abaixo:

2.1. Método CTAB proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998) com modificações:

Ao tecido foliar macerado dentro de tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 600 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 0,2 M; Tris HCl 0,1 M pH 8,0; PVP 2% e -mercaptoetanol 0,2%) preaquecido a 65° C. Os tubos foram submetidos a agitação com auxílio de um agitador de tubos, durante 30 segundos e, posteriormente, incubados a 65° C em banho-maria com circulação por 30 minutos e, a cada 5 minutos, os tubos foram agitados. Ao homogeneizado, resfriado a temperatura ambiente, adicionaram-se 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, misturados gentilmente pelo tempo de 5 minutos; em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 5 minutos, a 7.000g e 4° C. À fase aquosa já transferida para tubos novos previamente rotulados foram adicionados 60 µL da solução de precipitação (CTAB 10% e NaCl 1,4M) preaquecida, visto que esta solução é muito viscosa. A solução de precipitação foi incorporada às amostras por mistura, através de inversão dos tubos aos quais foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado e misturados lentamente, por inversão dos tubos. As amostras foram submetidas a centrifugação a 7.000g, a 4° C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e depois lavado com etanol 95%; por fim, foi secado a temperatura ambiente e posteriormente ressuspensão em 100 µL de H₂O Milli-Q®.

2.2. Método CTAB proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998) sem tampão de precipitação:

Para este protocolo manteve-se a mesma sequência de extração do protocolo anterior, com eliminação da etapa de adição do tampão de precipitação.

2.3. Método CTAB proposto por Zhang e Stewart (2000) com modificações:

Ao tecido foliar macerado dentro de tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 600 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1 M; EDTA 0,02 M; Tris HCl 0,1 M pH 8,0; PVP-40

2% e -mercaptoetanol 10%) preaquecido a 65° C. Os tubos foram submetidos a agitação durante 30 segundos e incubados a 65° C, por 30 minutos, sendo que a cada 5 minutos os tubos foram agitados. Ao homogeneizado, resfriado a temperatura ambiente, adicionaram-se 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1 misturados, de forma lenta, por cerca de 5 minutos; em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação pelo tempo de 5 minutos, a 7.000g e a 4° C; só depois elas foram transferidas para tubos novos aos quais se adicionaram 600 µL de isopropanol gelado; a partir daí foram misturados lentamente por inversão dos tubos e as amostras submetidas a centrifugação a 7.000g, a 4° C, por 15 minutos e, o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e com etanol 95%, além de secado a temperatura ambiente e, posteriormente, ressuspensão em 100 µL de H₂O Milli-Q®.

2.4. Método proposto por Dellaporta et al. (1993)

Ao tecido foliar macerado dentro de tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 0,05 M; NaCl 0,5 M; -mercaptoetanol 0,2%) preaquecido a 65° C, e adicionados 50 µL de SDS 20% misturado por inversão, incubados a 65° C por 30 minutos; em seguida, foram adicionados 200 µL KOAc 5 M, incubados no gelo por 20 minutos e centrifugados a 7.000g durante 5 minutos, a 4° C; logo após, o sobrenadante foi transferido para tubo novo e acrescido de 0,7 volume de isopropanol gelado e incubados por 1 hora, a -20° C e centrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado com 0,1 volume de NaOAc 3 M e 0,7 volume de isopropanol gelado, enquanto as amostras foram misturadas por inversão e incubadas por 1 hora, a -20° C e depois submetidas a centrifugação e, o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e posteriormente com etanol 95%; enfim, o sedimento foi secado a temperatura ambiente e ressuspensão em 100 µL de H₂O Milli-Q®.

2.5. Método proposto por Murray e Thompson (1980)

Ao tecido foliar macerado dentro de tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 0,02 M; NaCl 1,4 M; -mercaptoetanol

1% e CTAB 2%) preaquecido a 65° C. Os tubos foram submetidos à agitação por cerca de 30 segundos e posteriormente incubados a 65° C. Ao homogeneizado, resfriado a temperatura ambiente, adicionaram-se 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, misturados de maneira lenta por cerca de 5 minutos, enquanto as amostras foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 7.000g e 4° C. À fase aquosa já transferida para tubos novos previamente rotulados, foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado e misturados lentamente, por inversão dos tubos, além de centrifugados pelo tempo de 5 minutos a 7000g e 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado com 0,1 volume de NaOAc 3 M, pH 5,2 e 1 volume de etanol 100% gelado, misturado por inversão e incubado durante 1 hora, a -20° C; em seguida, centrifugados por 10 minutos a 7000g e a 4° C; logo após, o sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com etanol 70% e depois lavado com etanol 95%; enfim, foi secado a temperatura ambiente e posteriormente ressuspensão em 100 µL de H₂O Milli-Q®.

2.6. Método proposto por Romano (1998)

Ao tecido foliar macerado dentro de tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; EDTA 0,022 M; NaCl 0,8 M; β-mercaptoetanol 0,2%; CTAB 0,8%; Sarcosil 1% e Sorbitol 0,14 M) e adicionado 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1; os tubos foram submetidos a agitação com auxílio de um agitador de tubos, cerca de 30 segundos e posteriormente incubados a 65° C em banho-maria com circulação por 30 minutos; a cada 5 minutos, os tubos foram agitados; em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação, por 5 minutos a 7.000g e 4° C. À fase aquosa, já transferida para tubos novos previamente rotulados, foi adicionado 1,2 volume de isopropanol gelado e centrifugado por 10 minutos, a 7.000g e 4° C; em seguida, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com etanol 70% e com etanol 95%, além de secado a temperatura ambiente e posteriormente ressuspensão em 100 µL de H₂O Milli-Q®.

3. Verificação da qualidade das amostras extraídas

Verificou-se a qualidade das amostras de DNA extraídas foi verificada por meio de migração de 1 µL das amostras em gel de agarose 0,7% em TBE 0,5X (Tris-Borato 0,045 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etila.

4. Quantificação das amostras

Os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro e em gel de agarose.

A quantificação das amostras de DNA total extraídas por meio de espectrofotometria, foi realizada segundo Sambrook et al. (1989), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (DO₂₆₀) como sendo igual a 50 µg de DNA/mL.

A concentração das amostras de DNA total purificadas foi realizada por meio da sua migração em gel de agarose 0,7% (P/V) em TBE 0,5X contendo brometo de etila e, comparação com a fluorescência de padrões de DNA do bacteriófago lambda com massa conhecida (50 ng, 100 ng, 150 ng e 250 ng).

5. Digestão com enzimas de restrição

Amostras de DNA total foram submetidas a reação de digestão, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, fornecidas pela empresa Amersham-Bioscience. Para a digestão de 1 µg de DNA total foram utilizadas 5U de cada enzima de restrição. O tampão empregado nos ensaios de digestão foi o recomendado pela empresa fornecedora da enzima, na concentração e condições ideais para cada enzima usada. As reações foram incubadas a 37° C durante 2 horas e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% (TBE 0,5X).

6. Reação de RAPD

As reações de RAPD foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo cerca de 50 ng de DNA total, 5 µM de oligonucleotídeos, 2 µM de dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 4,5 µM de MgCl₂, mM de KCl, mM de Tris-HCl, pH 8,3 e 1 µL de *Taq* polimerase purificada em laboratório previamente diluída 10X. As reações foram processadas em termociclador (Eppendorf-Mastercycler Gradient) a uma temperatura de desnaturação de 94° C por 1 minuto, seguidas de 45 ciclos de desnaturação, anelamento e polimerização, a uma temperatura de 94° C por 1 minuto, 35° C por 1 minuto e 72° C por minutos, respectivamente, seguidos de uma etapa de polimerização a 72° C por 5 minutos. O produto da amplificação foi submetido à separação em gel de agarose 1,4% e corado com brometo de etila. Os oligonucleotídeos utilizados foram os A1, P12 e P15 (OPERON Technologies, Inc. Alameda, CA).

Testaram-se seis protocolos diferentes de extração

de DNA total para verificação da qualidade e o rendimento frente às amostras, encontrando-se os seguintes resultados:

Os protocolos: Ferreira e Grattapaglia (1998) com e sem tampão de precipitação (T.P.) e Zhang e Stewart (2000), mostraram-se eficientes para extração do DNA total do algodão, enquanto, os protocolos de Murray e Thompson (1980), Dellaporta *et al.* (1993) e Romano e Brasileiro (1999) não apresentaram indícios de extração de DNA e, sim, rastros de degradação e fragmentos de RNA (Figura 1).



Fig. 1. Fotografia Polaroid da quantificação das amostras de DNA total obtidos 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/μL, respectivamente.

Depois da extração do material genético fez-se a análise da quantidade e do grau de pureza das quatro amostras, para: 1) BRS IPÊ; 2) CNPA ITA 90 II; 3) CNPA GO 2000 1207, e 4) CNPA GO 2001 3072, através da leitura em géis de agarose e em espectrofotômetro. De acordo com os resultados observados na Figura 2, as amostras de DNA extraídas, tanto através do protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998) com e sem tampão de precipitação, quanto de Zhang e Stewart (2000), apresentaram, em média, a mesma massa de DNA quando avaliadas por espectrofotometria, porém ao se observar os valores obtidos pela quantificação em gel de agarose, notou-se claramente uma massa maior de DNA nas amostras extraídas pelo método de Ferreira e Grattapaglia (1998); no entanto, a análise realizada em gel de agarose pode ser menos precisa que a com o espectrofotômetro, pois depende da observação de fragmentos e comparação com marcadores de peso molecular conhecido, fato que, pode ocasionar desigualdade nos resultados das concentrações em relação às medidas no espectrofotômetro.



Fig 2. Comparação das concentrações das amostras de DNA através da leitura em espectrofotômetro e em gel de agarose

Com relação à pureza das amostras extraídas, observar-se, na Figura 3, que as amostras apresentaram padrão de pureza abaixo do esperado. O valor ideal da razão deveria ser (1,8 - 2,0) indicando que as amostras não possuem grau satisfatório de pureza. Os três protocolos testados exibiram valores abaixo deste índice.

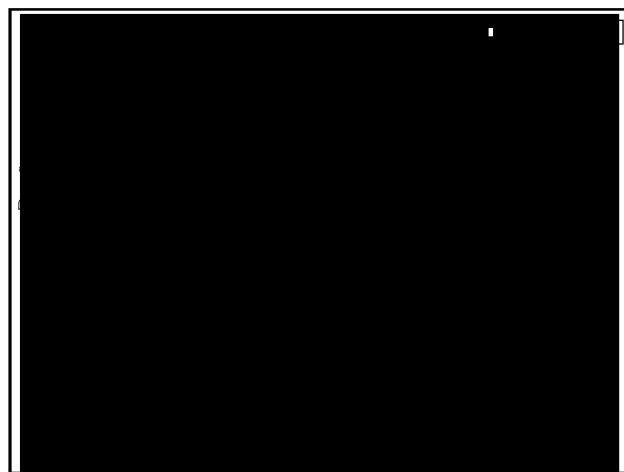


Fig. 3. Razão entre as densidades óticas de 260/280 para avaliação do grau de pureza em leitura em espectrofotômetro.

A contaminação verificada nas amostras a partir de inspeção visual e da leitura em espectrofotômetro, não ocasionou problemas quando foram feitas as digestões das mesmas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, apresentando rastros, devido aos cortes realizados em pequenos sítios de DNA (Figura 4). Desta forma, constata-se que as amostras se apresentaram puras o suficiente para estudos com marcadores moleculares.

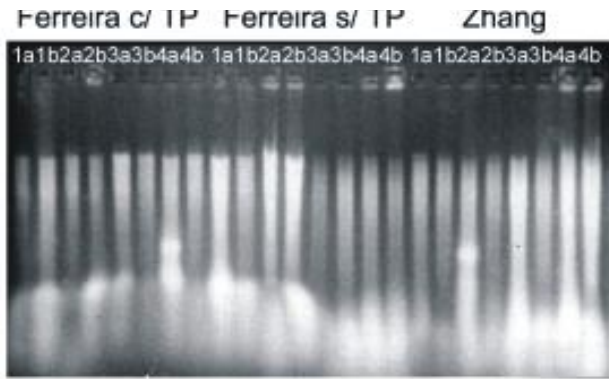


Fig. 4. Fotografia Polaroid da digestão em gel de agarose mostrando as enzimas de restrição (a *EcoRI* e (b) *HindIII*. e amostras avaliadas: (1) BRS IPÊ, (2) CNPA ITA II, (3) CNPA GO 2000 1207 e (4) CNPA GO 2001 3072

De acordo com os resultados, as amostras de DNA extraídas com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998) foram empregadas em ensaios de RAPD, visto que apresentaram as menores taxas de contaminação, como se pode observar na Figura 5.

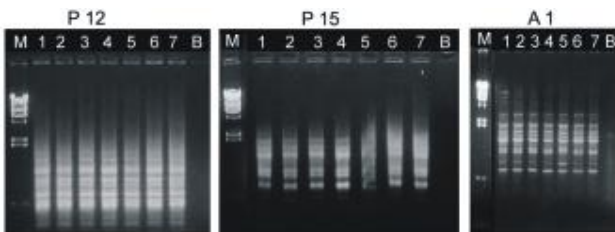


Fig. 5. Fotografia Polaroid do teste de oligonucleotídeos nas amostras de algodão

Conclusão

Os protocolos de Ferreira e Grattapaglia (1998) com e sem TP, e Zhang e Stewart (2000), para extração de DNA de folhas de algodão, apresentaram bom nível de quantidade e qualidade de DNA, em relação aos de Murray e Thompson (1980), Dellaporta et al. (1993) e Romano e Brasileiro (1999), nos quais se verificou que não houve presença de DNA e, sim, degradação e algumas bandas de RNA.

O grau de pureza das amostras de DNA com os protocolos de Ferreira e Grattapaglia com e sem TP e Zhang e Stewart, avaliados em espectrofotômetro, mostrou grau satisfatório de pureza; no entanto, este fato não ocasiona nenhuma interferência nos estudos com marcadores moleculares, pois o tratamento com enzimas de restrição foi eficiente.

Os DNAs extraídos mostraram-se puros o suficiente para serem empregados em ensaios de RAPD, uma vez que foi possível realizar as ampliações por PCR possibilitando, desta forma, trabalhos com marcadores moleculares que venham direcionar programas de melhoramento nesta cultura.

Referências Bibliográficas

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, 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.

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.

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

Circular Técnica, 74
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



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

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