

Uso de Esferas de Inox na Maceração Aeração de Tecidos Foliares de Algodoeiro Destinados à Extração de DNA

Paulo Augusto Vianna Barroso¹
Lúcia Vieira Hoffmann¹
Carlos Eduardo de Araújo Batista²
Rafaela Lima Araújo³
Edina Regina Moresco⁴

Um dos mais promissores usos dos marcadores moleculares é a seleção assistida, processo no qual a seleção de caracteres de difícil mensuração é realizada, ao menos em parte, por meio de marcadores intimamente ligados aos genes que controlam a característica (BARROSO e HOFFMANN, 2003). Um laboratório que se propõe realizar este procedimento deve ser capaz de processar grande quantidade de amostras em tempo reduzido; para isto, deve contar com métodos eficientes e rápidos em todas as etapas do processo de genotipagem via marcadores.

Um dos principais gargalos encontrados na maioria dos laboratórios é a lentidão na purificação do DNA. Boa parte da lentidão se deve ao modo com que os tecidos foliares são triturados, passo fundamental para que o DNA contido no interior das células passe para a solução usada na purificação.

Equipamentos especialmente desenvolvidos para a maceração em maior escala de tecidos vegetais, podem ser adquiridos junto a diversos fabricantes; esses equipamentos, chamados *grinders*, permitem a

maceração simultânea de 96 ou mais genótipos usando 50 a 200 mg de tecidos; contudo, seu custo é elevado, tornando difícil a aquisição para a maioria dos laboratórios brasileiros.

Este trabalho descreve um método que permite realizar a maceração simultânea de 16 ou mais amostras.

Dois ensaios foram realizados; no primeiro, empregou-se cerca de 50 a 100 mg de tecidos foliares de algodoeiro, que foram colocados no interior de um microtubo de 2 ml; dentro do qual foi colocada uma esfera de aço inoxidável de 6 mm de diâmetro. Conjuntos de 16 tubos foram imersos em nitrogênio líquido e, a seguir, postos dentro de uma caixa plástica com tampa para armazenamento de microtubos. A caixa com os microtubos foi agitada manualmente, durante 30 segundos, para macerar as amostras (Figura 1). As esferas foram retiradas dos tubos e as amostras processadas para a purificação do DNA, metodologia usualmente utilizada no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, segundo Vidal et al. (2003). O

¹Drº Engº Agrº, Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário - CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: pbarroso@cnpa.embrapa.br; E-mail: hoff@cnpa.embrapa.br

²Biólogo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade São Paulo.

³Bióloga, Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N, Campus Universitário, CEP 58.109-753.

⁴Drª Engª Agrª, Fundação de Apoio a Cultura do Algodão - FACUAL.

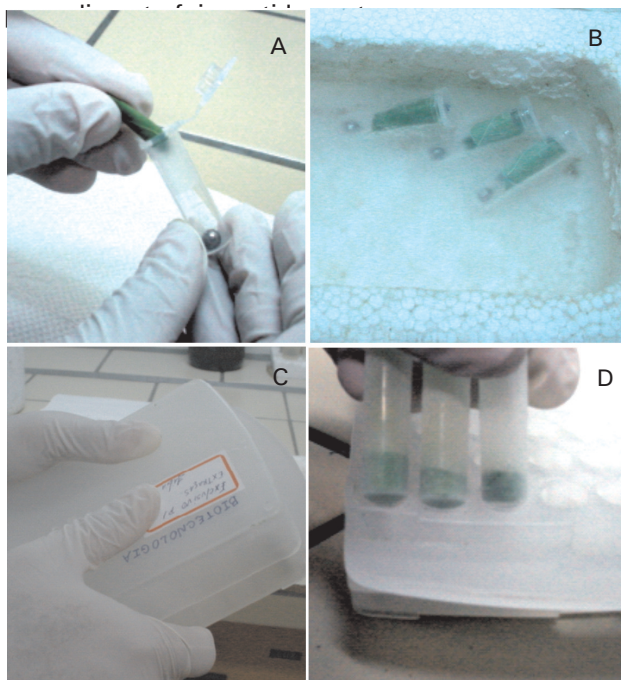


Fig. 1. Etapas do processo de maceração usando-se as esferas. A. Fragmentos de folhas sendo introduzidos nos microtubos com a esfera de inóx no interior; B. Microtubos imersos em nitrogênio líquido; C. Agitação dos tubos dentro do suporte; D. Tecido foliar macerado.

No segundo ensaio usaram-se tecidos da mesma planta e de mesma quantidade, para realizar a purificação de acordo com o procedimento descrito em Vidal et al. (2003) para um conjunto de 16 indivíduos de algodoeiro.

O DNA obtido na purificação foi quantificado por meio da comparação da intensidade de fluorescência de quantidades conhecidas do DNA do fago *lambda* (50, 100, 150 e 200 ng * ml⁻¹), em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Testou-se, para o primeiro ensaio, a capacidade do DNA purificado de ser digerido por *Eco RI* e amplificado por PCR e, para o segundo, apenas reações PCR foram realizadas.

Resultados e Discussão

A quantidade de DNA purificado por amostra no primeiro ensaio, realizando-se a maceração com as esferas de aço inóx, foi similar à geralmente obtida com o procedimento convencional usado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão (Tabela 1); os maiores valores alcançados foram 6mg por purificação e o menor 1 mg, com média de

4,8 mg e o desvio padrão de 0,97 mg. O tempo gasto para macerar conjuntos de 16 amostras foi menor que cinco minutos.

A qualidade do DNA obtido também foi semelhante à rotineiramente obtida com a metodologia convencional; não se observaram degradações visíveis nos géis de agarose e todas as digestões realizadas foram bem sucedidas. Os DNAs também se mostraram moldes eficientes para a amplificação de marcadores SSR.

Tabela 1. Quantidade de DNA (em mg) purificado das amostras maceradas segundo o método das esferas.

Amostra	Quant.	Amostra	Quant.	Amostra	Quant.	Amostra	Quant.
1	5	18	6	35	5	52	3
2	5	19	6	36	5	53	3
3	5	20	5	37	5	54	5
4	5	21	6	38	4	55	5
5	5	22	5	39	4	56	5
6	5	23	6	40	5	57	5
7	5	24	5	41	5	58	5
8	5	25	6	42	6	59	5
9	4	26	6	43	5	60	5
10	4	27	5	44	5	61	6
11	3	28	5	45	5	62	5
12	5	29	5	46	5	63	4
13	2	30	4	47	5	64	3
14	5	31	5	48	6	Média	4,8
15	4	32	1	49	6	DP.	0,97
16	5	33	5	50	5	Máximo	6
17	6	34	5	51	3	Mínimo	1

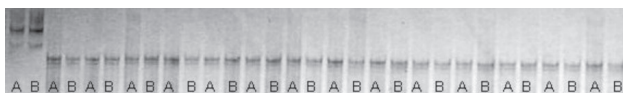
Tabela 2. Quantidade de DNA (em mg) purificado segundo o método das esferas e o método convencional, com a maceração com bastões de vidro

Indivíduo	Esfera	Convencional
1	3	3
2	4	5
3	4	3
4	3	6
5	8	5
6	6	4
7	4	8
8	10	8
9	5	7
10	7	5
11	6	3
12	4	6
13	3	7
14	3	4
15	5	5
16	7	6
Média	5,1	5,3

No segundo ensaio, as quantidades de DNA obtidas por ambos os métodos foram similares, segundo o

teste t ($p > 0,75$); todos os DNAs produzidos foram moldes adequados para a reação PCR, enfim, todos os 16 indivíduos amplificaram o mesmo alelo, independente do método de purificação usado. Oito minutos foi tempo necessário para colocar as esferas dentro dos tubos, imergí-los, colocá-los no interior do suporte, realizar a maceração, adicionar o tampão de extração, realizar a homogeneização e retirar as esferas; já no procedimento convencional, em que o tecido é macerado no interior dos tubos com pistilos de vidro, foram necessários quarenta e três minutos para realizar as mesmas operações.

Fig. 2. Alelos SSR amplificados com DNA, molde obtido pelo método das esferas e o método convencional. A – Método das esferas; B – método convencional



O método das esferas apresentou desempenho similar ao método convencional, quanto à qualidade e quantidade do DNA produzido; também reduziu o tempo de processamento das amostras; portanto, seu emprego permite maior eficiência da mão-de-obra.

As esferas podem ser reaproveitadas inúmeras vezes, desde que o DNA da amostra anterior seja adequadamente retirado. A descontaminação pode ser feita empregando-se os mesmos procedimentos usados nos pistilos. No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, a descontaminação é realizada pela lavagem com água e detergente seguida de imersão em etanol, por 30 minutos.

A implantação do método depende exclusivamente da compra das esferas de aço inoxidável, que podem ser adquiridas junto a empresas especializadas na comercialização de esferas. O custo das esferas é baixo, menos de R\$1,00 a unidade passível, portanto, de ser adquirida por qualquer laboratório.

Conclusão

O uso das esferas de aço inox permite macerar tecidos foliares de algodoeiro, de modo adequado, para a realização de purificações de DNA, reduzindo o tempo necessário para realizar a maceração gerando, assim, soluções de DNA com concentração e qualidade adequadas para a realização de reações PCR.

Agradecimentos

Trabalho desenvolvido com recursos do Banco do Nordeste.

Referências Bibliográficas

- BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V. **Métodos de predição do comportamento de populações de melhoramento.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 38p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 108)
- VIDAL, M.S.; COUTINHO, T. de C.; HOFFMANN, L.V. **Comparação entre protocolos de purificação de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 74).

Comunicado Técnico, 297

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

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

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

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa