



Conservação de Tecidos Foliares de Algodão Coletados a Campo para Purificação do DNA

Paulo Augusto Vianna Barroso¹
Carlos Eduardo de Araújo Batista²
Lúcia Vieira Hoffmann¹
Ana Yamaguishi Ciampi³
Edina Moresco⁴

Diferentes tipos de algodoeiro estão distribuídos nas diversas regiões do Brasil. São encontrados em ambientes naturais, cultivados em quintais com finalidades medicinais e plantados em lavouras de pequenos, médios e grandes produtores (BARROSO e FREIRE, 2003).

Devido às diferenças ambientais e agrícolas existentes nas regiões algodoeiras do país, é necessário manter programas de melhoramento genético específicos para cada região. A Embrapa Algodão realiza esses trabalhos de modo intensivo no Centro-Oeste e no Nordeste, as principais regiões produtoras de algodão. Busca-se genótipos que se adaptem melhor às condições edafoclimáticas e agrícolas, considerando-se a qualidade da fibra, a produtividade, alta estabilidade de produção e a resistência a pragas e a doenças.

Para que o trabalho de melhoramento genético se torne mais dinâmico, se acha em início a associação de métodos clássicos com o estudo do DNA. Tem sido realizados mapeamento de genes de interesse,

na caracterização de genótipos e em estudos filogenéticos. Nem sempre é possível realizar avaliações moleculares no mesmo local onde estão instalados os experimentos. Então, é necessário o transporte do material vegetal em condições adequadas para laboratórios que disponham de pessoal e equipamentos especializados para realizarem a extração de DNA. No caso do algodão, outro fator dificulta a obtenção do DNA para os estudos genéticos é a presença de compostos fenólicos, como taninos, quinonas, polifenóis e outras substâncias de metabolismo secundário. A oxidação destas substâncias durante a extração do DNA prejudica a qualidade final do material extraído. Caso a conservação dos tecidos a serem usados nas extrações seja inadequada, este problema se acentua, podendo impossibilitar a realização de reações do tipo PCR.

Este trabalho foi realizado para estudar métodos de conservação de tecido foliar para reduzir os danos durante o armazenamento e transporte, permitindo realizar extrações de DNA de boa qualidade.

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

²Graduando em Biologia - UEPB, Campina Grande, PB,

³Bióloga, D.Sc. Embrapa Cenargen, Av. W5 Norte-Final, Plano Piloto CEP 70770 Brasília, DF.

⁴Eng. Agr. D.Sc. Facual.

Material e Métodos

Material Vegetal

Os algodoeiros (*Gossypium hirsutum*) foram compostos de quatro genótipos, BRS-Ita 90, BRS Antares, BRS Facual e BRS Jatobá. Os tecidos foliares foram coletados com repetições de um genótipo cinco vezes para cada método de conservação. Os algodoeiros se encontravam em casa de vegetação da Embrapa Algodão.

Método de conservação dos tecidos coletados

Foram testados três tipos de métodos de conservação. Em todos utilizou-se tubos de 50ml armazenados em caixa de isopor com gelo. No primeiro foi usado 5ml de sílica gel; no segundo as amostras foram imersas em tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 0,1mM, pH 8,0); no terceiro os tubos continham apenas as amostras, sem nenhuma outra substância.

As extrações de DNA foram realizadas em intervalos de 24 horas, durante cinco dias. O protocolo utilizado para a extração foi o CTAB com modificações (VIDAL et al., 2003). O DNA obtido foi ressuspensão em 100uL de tampão TE. A estimativa da concentração, da qualidade e da integridade do DNA extraído foi realizada em eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. Quantidades conhecidas de DNA do fago lambda foram aplicadas no gel.

Amplificação do DNA

As reações de amplificação foram realizadas em solução contendo tampão PCR (10mM de Tris-HCl pH 8,3 e 50mM KCl), 4mM de cloreto de magnésio, 0,2mM de primer, 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, 0,2mM de dNTP e DNA genômico das linhagens. Cada um dos genótipos foi amplificado segundo a técnica RAPD com o primer OP9 (Operon Technology).

Após a desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 45 ciclos de amplificação foram realizados. Cada ciclo foi constituído por uma desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, um anelamento do primer a 35° por 1 minuto e uma amplificação do DNA a

72°C por 2 minutos. Ao final dos 45 ciclos, uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C foi realizada (BARROSO et al., 2003).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v), utilizando o tampão TBE (0,09M Tris, 0,09M ácido bórico e 2mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio e documentados sob luz UV.

Resultados e Discussão

Aspecto visual das folhas após armazenagem

A aparência geral das folhas durante o armazenamento variou bastante com os métodos (Figura 1). As folhas mantidas em tampão TE permaneceram com aparência similar à de quando foram coletadas, não sofrendo alterações significativas. Permaneceu com turgidez semelhante a folhas frescas, sua coloração foi ligeiramente acentuada e sua consistência um pouco mais rígida do que folhas frescas.



Fig. 1. Aparência das folhas no 4º e 5º dias após a coleta, segundo o tipo de armazenagem.

As folhas mantidas em sílica gel sofreram gradual desidratação. A perda de água foi mais acentuada nos três primeiros dias. Também se verificou um escurecimento gradual das folhas, que ocorreu de modo relativamente uniforme. A quantidade de água que permaneceu nos tecidos foi grande o suficiente para que fosse necessário congelar as amostras em nitrogênio líquido antes de realizar a maceração. Foi necessário substituir a sílica gel no terceiro dia após a coleta.

A manutenção das amostras em tubos vazios, apenas resfriados em gelo, ocasionou uma lenta desidratação das folhas. A partir do terceiro dia, as amostras apresentaram escurecimento nas regiões periféricas, principalmente na porção próxima à

inserção do pecíolo. No quinto dia, as folhas tinham perdido parcialmente a turgidez e o escurecimento evoluiu, avançando para o interior da folha na região em que primeiro havia sido observado e para a extremidade dos lóbulos.

Estimativa da quantidade de DNA extraído

As quantidades de DNA purificado foram similares entre os tratamentos e genótipos, segundo o teste F (Tabela 1). Também não se verificou efeito significativo do tempo em que as plantas permaneceram armazenadas. As quantidades médias de DNA extraídas por cada método, e em cada variedade e em todas as datas foram sempre superiores a 100ng/uL (Tabela 2, Tabela 3, Figura 2 respectivamente) e o DNA obtido não apresentou degradações (dados não mostrados).

Tabela 1. Resumo da análise de variância

	GL	QM	F	p
DAC	4	16604,17	2,67	0,06
Tratamento	2	3500,00	0,56	0,58
Genótipo	3	2111,11	0,34	0,80
DAC x Tratamento	8	8291,67	1,33	0,28
DAC X Genótipo	12	9576,39	1,54	0,18
Tratamento x genótipo	6	4277,78	0,69	0,66
Resíduo	24	6222,22		

Tabela 2. Quantidade de DNA extraído de acordo com o método de armazenamento

Tratamento	Concentração de DNA (ng/uL)*
Sílica gel	167,5
Tampão TE	192,5
Tubo vazio	175

* DNA ressuspensão em 100ul

Tabela 3. Quadro de análise de variância para a quantidade de DNA estimada em gel de agarose (0,8%)

Genótipo	Concentração de DNA (ng/uL)*
CNPA Ita 90	180
Brs Facual	186,6667
Brs Antares	163,3333
Brs Jatobá	183,3333

* DNA ressuspensão em 100ul de TE

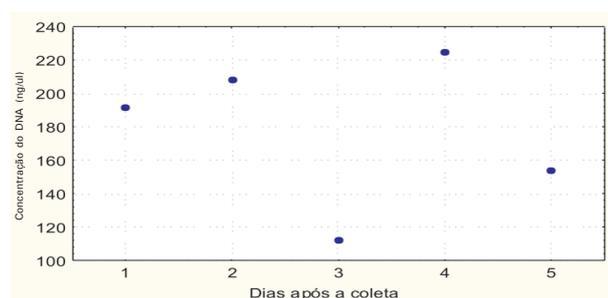


Fig. 2. Concentrações médias das soluções de DNA, segundo o número de dias após a coleta das folhas.

Amplificação por PCR do DNA purificado

Todas as reações RAPD (*Random Amplified Primer Polymorphic DNA*) realizadas com os DNAs purificados amplificaram e apresentaram padrão idêntico (Figura 3). O mesmo padrão de amplificação observado foi obtido com DNA extraído de tecidos recém colhidos. Também não se contataram diferenças com DNA extraído em tecidos com um a cinco dias após a coleta. Portanto, todos os métodos permitiram obter DNA de qualidade adequada para a realização de reações PCR.

Comparando-se os diferentes métodos, verifica-se que todos forneceram resultados similares. Logo, critérios de cunho prático podem ser usados para determinar qual o método a ser empregado. O tratamento em que as folhas foram desidratadas em sílica gel pode ser preterido em função do maior trabalho associado à sua realização. Devido à umidade liberada pelas folhas e pelo gelo, foi necessário trocar a sílica gel a cada dois dias.

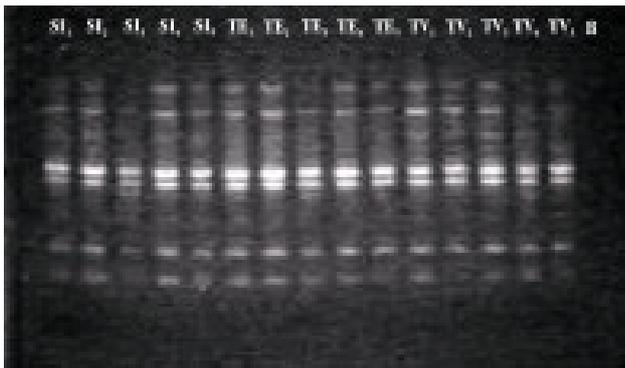


Fig. 3. Padrão de amplificação obtido com DNAs extraídos de amostras com um a cinco dias após a coleta e armazenadas segundo os três métodos estudados. SI – Amostras armazenadas em sílica gel; TE – amostras armazenadas em tampão TE; TV – amostras armazenadas em tubos vazios. Números subscritos nas abreviaturas correspondem à quantidade de dias que as amostras permaneceram armazenadas

Quando se trabalha a campo e se coleta um grande número de amostras, a troca constante da sílica até o processamento da amostra representa um esforço adicional e, em função dos resultados verificados, desnecessário para a conservação dentro do período de tempo em que foram realizadas as avaliações.

No caso do tratamento em que as folhas foram imersas em tampão TE, a umidade que permanece nas folhas dificulta a maceração caso seja utilizado nitrogênio líquido, o que se deve ao congelamento do resíduo do tampão, formando um bloco de tampão e tecido foliar de difícil maceração. Pode-se contornar este problema secando-se as folhas em papel absorvente. O principal inconveniente do uso do tampão durante o armazenamento é que ele nem sempre está disponível, sendo necessário um planejamento prévio para que possa ser enviado para o local em que a coleta será realizada. Contudo, tal método se mostrou bastante eficaz na manutenção dos tecidos, visto que amostras mantidas em tampão TE a -20°C por um período superior a 7 meses permitiram extrações que resultaram em DNA purificado de excelente qualidade, sendo utilizados sem qualquer problema em digestões com enzimas de restrição e em reações PCR.

O armazenamento apenas em gelo também possibilitou boas extrações de DNA. A alteração da aparência verificada deve indicar que a conservação em prazo mais longo do que o estudado pode não ser adequada. Contudo, caso o intervalo entre a coleta e o processamento não seja prolongado, o armazenamento das folhas em gelo pode ser realizado sem maiores problemas.

Conclusão

Todos os métodos podem ser usados para realizar uma boa conservação de tecidos foliares de algodoeiro. O método mais simples, acondicionamento em tubos e resfriamento em gelo, pode ser recomendado quando as amostras tiverem que permanecer sem processamento por períodos não superiores a cinco dias. A conservação em sílica gel apresenta o grande inconveniente prático de necessitar de trocas periódicas da sílica. Por fim, a manutenção dos tecidos em TE pode ser usado sempre que houver um planejamento prévio das coletas, aparentemente com melhor conservação das amostras em relação aos demais métodos.

Referências Bibliográficas

- BARROSO, P.A.V.; FREIRE, E.C. Fluxo gênico em algodão no Brasil. *In*: PIRES, C.S.S; FONTES, E.M.G.; SUJII, E.R. Impacto de plantas geneticamente modificadas. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2003. p.163-193
- BARROSO, P.A.V.; GERALDI, I.O.; VIEIRA, M.L.C; PULCINELLI, C.E.; VENCOSKY, R.; DIAS, C.T.S. Predicting performance of soybean populations using genetic distances estimated with RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.3, p.343-348, 2003.
- VIDAL, M.S.; COUTINHO, T. de C.; HOFFMANN, L.V. Comparação entre protocolos de extração de DNA de algodão para emprego em ensaios com marcadores moleculares. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Circular técnica, 74).

**Comunicado
Técnico, 245**

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: 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