

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRECESSÃO PARA MACERAÇÃO DE AMOSTRAS DE FOLHAS DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP, *Jatropha curcas* L., *Orbignya phalerata* MARTIUS.

Raul Ferreira de Miranda Mendes¹, [Aline Teixeira Barbosa Lima](mailto:raul-mendes@hotmail.com)², Bruno Guedes Alcoforado Aguiar³, Francinalva de Moraes Sousa¹ e Paulo Sarmanho da Costa Lima⁴.

Resumo

A definição dos parâmetros de precessão para maceração de tecidos das diferentes espécies contribui na obtenção de DNA em concentração e pureza adequados para ser usado em ensaios com marcadores moleculares. Este trabalho teve como objetivo adequar os parâmetros velocidade e tempo de precessão para amostras de tecidos de feijão-caupi, pinhão-manso e babaçu. As amostras foliares das três espécies foram submetidas a variações na velocidade e no tempo de precessão. Os melhores resultados para a obtenção de um DNA mais íntegro foram obtidos com o aumento da velocidade e redução do tempo de precessão para o feijão-caupi e pinhão-manso. Já para o babaçu, reduzir a velocidade e o tempo proporcionaram um material mais íntegro. Obteve-se concentrações médias de 75, 100 e 105 ng/μl para o feijão-caupi, pinhão-manso e babaçu, respectivamente.

Introdução

Segundo Molinari, Crochemore (2001), a obtenção de DNA com boa concentração e sem a contaminação de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários que prejudicam o uso do DNA em reações de amplificação de restrição é o objetivo da otimização dos procedimentos de extração.

Em laboratórios de biologia molecular, que têm como rotina a realização de um grande número de extrações de DNA vegetal, é essencial o uso de equipamentos como homogeneizadores que trituram e lisam amostras de tecidos vegetais de maneira mais rápida do que os protocolos convencionais, proporcionando a homogeneização das amostras e evitando a degradação e a contaminação entre as amostras.

Para o uso mais eficiente destes equipamentos, faz-se necessário a definição dos seus parâmetros (velocidade, tempo, número de ciclos e intervalo entre os ciclos) de precessão, que é um movimento em cima do eixo de rotação de um corpo rotante ao redor de outra linha desenvolvendo uma trajetória semelhante a um cone. Este trabalho teve como objetivo adequar os parâmetros de precessão para amostras de tecidos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L) e babaçu (*Orbignya phalerata* Martius).

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, localizado em Teresina-PI. As amostras foliares de feijão-caupi e pinhão-manso foram coletadas e armazenadas até o momento da extração em sílica gel, já as folhas de babaçu foram mantidas em saquinhos plásticos individuais no freezer. Para a maceração, foram utilizadas 100 mg de material fresco (babaçu) e 25 mg do material desidratado (feijão-caupi e pinhão-manso), cinco esferas de vidro de 3 mm, tampão de lise e proteinase K do Kit de purificação Invitex (INVISORB, 2008) em tubos

1. Estagiário da EMBRAPA Meio-Norte e Estudante de Graduação na Universidade Estadual do Piauí, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. *e-mail: raul-mendes@hotmail.com, fransinhasousa@hotmail.com

2. Estagiária da EMBRAPA Meio-Norte e Estudante de Graduação na Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. *e-mail: alinetbl@hotmail.com

3. Estagiário da EMBRAPA Meio-Norte e Estudante de Graduação da NOVAFAP, Teresina, PI. Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. *e-mail: onurbguedes@hotmail.com

4. Pesquisador da EMBRAPA Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. E-mail: sarmanho@cpamn.embrapa.br

próprio para o equipamento de lise e homogeneização. As amostras de folhas de feijão-caupi foram submetidas às precessões de 5.200 e 5.700 rpm por dois ciclos de 8, 12, 16, 45 s. Para as amostras de pinhão-mansão às precessões de 5.000, 5.200 e 5.500 rpm por dois ciclos de 14, 16, 18, 35, 40, 45 s e as amostras de babaçu foram submetidas às precessões de 5000 e 5.200 rpm por dois ciclos de 10, 14, 18, 20, 25, 35 s. Para a extração do DNA foram adotados os procedimentos recomendados pelo o Kit de purificação Invitex. A visualização do material foi realizada através de corridas eletroforéticas em géis de agarose 0,8% a 80 V, corados com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000X (Invitrogen) e fotodocumentados sob luz ultravioleta. A quantificação foi realizada pela análise comparativa das amostras com o marcador fago lambda nas concentrações de 50, 100 e 150 ng/μL.

Resultados e Discussão

A integridade e concentração do material extraído variaram conforme as modificações nos parâmetros de precessão do homogeneizador (Tabelas 1, 2 e 3). Na Figura 1 observa-se que para as três espécies estudadas à medida que houve uma redução no tempo de precessão houve também uma redução do “smear” (arraste) do material, proporcionando DNA mais íntegro. Com o aumento do parâmetro velocidade observou-se o inverso, obtendo-se melhores concentrações à medida que se aumentava este fator. Contudo, os melhores resultados só foram alcançados com a adequação desses dois parâmetros para cada espécie, ou seja, uma precessão com maior velocidade e menor tempo para o feijão-caupi (5.700 rpm e dois ciclos de 8s) e pinhão-mansão (5.500 rpm e dois ciclos de 14s) que obtiveram um material mais íntegro e concentrações médias de 75,0 ng/μl e 100,0 ng/μl, respectivamente, nessas condições. Já para o babaçu, com base na integridade do material, o parâmetro mais adequado para a espécie foi definido com uma menor velocidade e um menor tempo, obtendo-se concentrações médias de 105 ng/μl. Concentrações superiores foram obtidas, mas foram desconsideradas por apresentarem um “smear” mais acentuado, tornando o material menos adequado para uso como substrato em ensaios de ampliações de restrição, visto que o objetivo de uma extração é a obtenção de um material mais puro e íntegro.

Conclusões

Determinou-se para o feijão-caupi precessões de 5.700 rpm por dois ciclos de 8s, para o pinhão-mansão precessões de 5.500 rpm por dois ciclos de 14s e para o babaçu precessões de 5.000 rpm por dois ciclos de 10s.

Os parâmetros velocidade e tempo foram definidos conforme as espécies e as condições das amostras utilizadas quando proporcionaram extrações de boa qualidade.

Referências

INVISORB Spin Plant Mini Kit for DNA extractions, *Invitex*, 2008.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora spp.* para análises de PCR-RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v.23, n. 2, p. 447-450, 2001.

Tabela 1. Concentrações médias de DNA obtidas em diferentes condições de precessão para feijão-caupi.

Precessão		Concentração *
Velocidade	Tempo	(ng/ μ l)
5.200 rpm	2 X 45s	15,0
5.700 rpm	2 X 16s	54,2
5.700 rpm	2 X 12s	27,5
5.700 rpm	2 X 8s	75,0

* Concentrações obtidas através de análise comparativa com marcador fago lambda.

Tabela 2. Concentrações médias de DNA obtidas em diferentes condições de precessão para pinhão-manso.

Precessão		Concentração *
Velocidade	Tempo	(ng/ μ l)
5.000 rpm	2X45s	17,2
5.000 rpm	2X40s	17,1
5.200 rpm	2X35s	15,0
5.500 rpm	2X18s	120,0
5.500 rpm	2X16s	116,0
5.500 rpm	2X14s	100,0

* Concentrações obtidas através de análise comparativa com marcador fago lambda.

Tabela 3. Concentrações médias de DNA obtidas em diferentes condições de precessão para babaçu

Precessão		Concentração *
Velocidade	Tempo	(ng/ μ l)
5.200 rpm	2X45s	90,0
5.000 rpm	2X35s	125,0
5.000 rpm	2X25s	110,0
5.000 rpm	2X20s	100,0
5.000 rpm	2X18s	95,0
5.000 rpm	2X14s	79,0
5.000 rpm	2X10s	105,0

* Concentrações obtidas através de análise comparativa com marcador fago lambda.

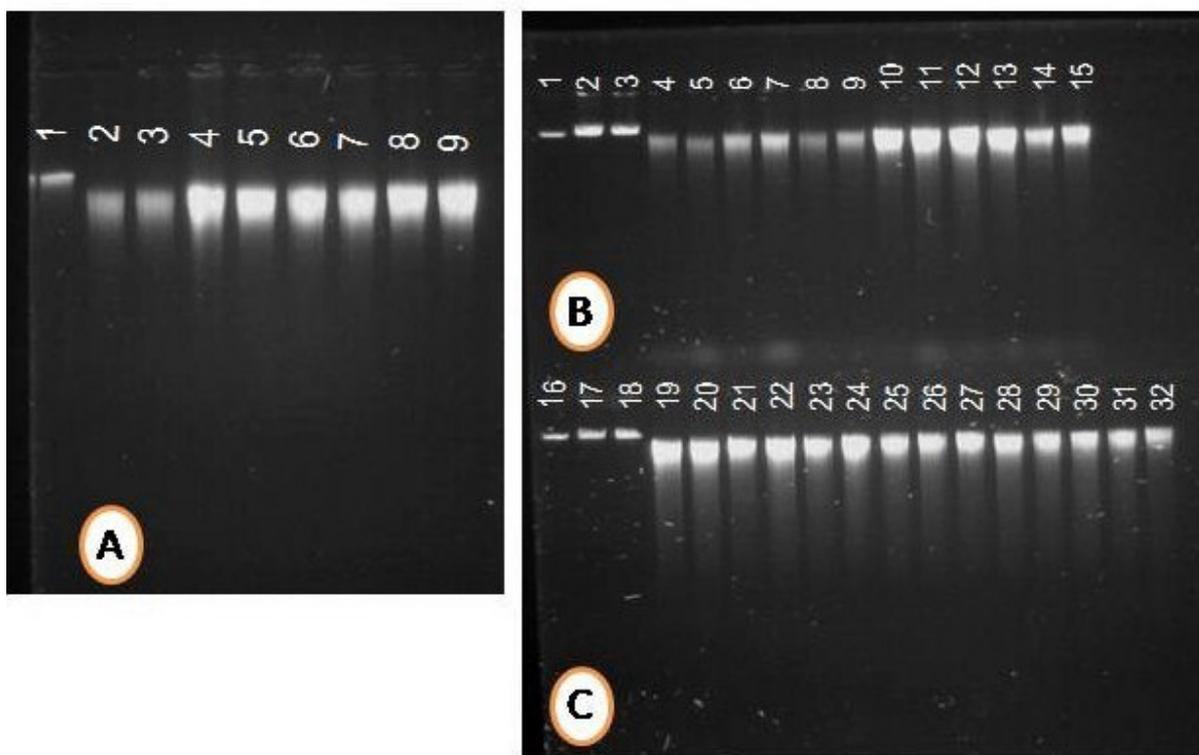


Figura 1. Perfis eletroforéticos de extração de DNA com variações nas precessões. (A) Feijão-caupi submetido à precessões de 5.200rpm por 2 X 45s (2 e 3), 5.700rpm por 2X 16s (4 e 5), 5.700rpm por 2 X 12s (6 e 7) e 5.700rpm por 2 X 8s (8 e 9); (B) Pinhão-manso submetido à precessões de 5.200rpm por 2 X 45s (4 e 5), 5.200rpm por 2 X 40s (6 e 7), 5.200rpm por 2 X 35s (8 e 9), 5.500 rpm por 2 X 18s (10 e 11), 5.500rpm por 2 X 16s (12 e 13), 5.500rpm por 2 X 14s (14 e 15); (C) Babaçu submetido à precessões de 5.200rpm por 2 X 45s (19 e 20), 5.200rpm por 2 X 35s (21 e 22), 5.000rpm por 2 X 25s (23 e 24), 5.000rpm por 2 X 20s (25 e 26), 5.000rpm por 2 X 18s (27 e 28), 5.000rpm por 2 X 14s (29 e 30) e 5.000rpm por 2 X 10s (31 e 32). As canaletas 1 (1A), 1, 2 e 3 (1B) e 16,17 e 18 (1C) correspondem a valores de 50, 100 e 150ng do marcador fago lambda, respectivamente.