

FONTE ALTERNATIVA DE URÉIA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA USADOS NA ELETROFORESE DE FRAGMENTOS DE DNA

Khadine Thatiane Appio¹, Juliana Vieira², Rubens Marschalek³, Moisés Basílio da Conceição⁴
¹Bolsistas do CNPq junto à Epagri no Projeto nº 50.7396/2004-9;
²Convênio ACAPSA/Fundagro/Epagri; ³Epagri - Estação Experimental de Itajaí,
⁴Univali. Caixa Postal 277, CEP 88301-970, Itajaí, SC. E-mail: vieiraj@epagri.rct-sc.br

Géis desnaturantes de poliacrilamida são comumente utilizados para marcadores moleculares AFLP e Microssatélites, pois proporcionam alta resolução para a detecção diferenças de até um par de bases. Estes géis são formados pela copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de APS (persulfato de amônio) e Temed (tetrametilelenodiamina). O diâmetro dos poros é controlado pela concentração de acrilamida e bis-acrilamida e pelo "cross link" (proporção de acrilamida e bis-acrilamida) (ALFENAS & BRUNE, 1998). O gel é polimerizado na presença de um agente desnaturante, uréia ultrapura (PA) (WEISING et al., 2005), comumente usada nos protocolos de biologia molecular.

A uréia agrícola apresenta no mínimo 44% de nitrogênio, na forma amídica, sendo que neste fertilizante um pequeno teor de biureto é tolerado (1,5 a 0,5%) (SBCS, 2004). Pesek et al. (1971) relatam que na fabricação da uréia destinada ao uso como fertilizante são acrescidos elementos como enxofre, carvão (ou hulha), argila e ceras. O custo da uréia agrícola é muito menor do que a uréia PA, ficando em torno de R\$ 0,89/kg, enquanto a uréia P.A. tem um custo de R\$ 125,86/kg.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar experimentalmente a viabilidade da substituição de uréia P. A. por uréia agrícola, através da comparação dos padrões de bandas dos géis de eletroforese para marcadores moleculares AFLPs.

Foram usados no estudo dois géis compostos de: 6% de bis-acrilamida (19:1), TBE 1x (Tris-Ácido bórico-EDTA), 0,1% de APS, 0,06% de Temed. Em um gel foi utilizado 7M de uréia P. A. (Serva) e em outro, esta foi substituída (em peso) por uréia agrícola (uréia granulada 46% N, Bunge Fertilizantes S.A.). Foi utilizado TBE 1x como tampão na eletroforese.

As eletroforeses foram realizadas numa cuba vertical de 38 x 50 cm (Sequi GenGT – Bio Rad) e as condições eletroforéticas controladas por uma fonte elétrica digital (Power Pac 3000 – Bio Rad) sendo mantidas a 1640 V, 60 mA, 100 W e 45°C, durante 3 horas.

Utilizaram-se as amplificações AFLP de 23 acessos do banco de germoplasma de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) da Epagri, com as seguintes combinações de iniciadores (*primers*): E40 x M62, E40 x M59 e E13 x M60 (KEYGENE, 2005).

Os fragmentos foram revelados corando-se o gel com nitrato de prata, onde são utilizadas seis soluções: fixadora (10% etanol, 1% ácido acético) por 10 min.; pré-tratamento (1,5% ácido nítrico) por 3 min.; impregnação (0,3% nitrato de prata por 1h); revelação (3% carbonato de sódio e 0,1% formaldeído) por 5 min; bloqueio (5% ácido acético) por 5 min; e hidratação (1,5% glicerol) por 15 min. Após a secagem dos géis ao ambiente, estes foram fotodocumentados com um scanner.

Os resultados foram analisados através de uma matriz binária e a partir desta, fez-se uma análise de agrupamento (UPGMA) usando-se o coeficiente de Jaccard, através do programa NTSYS.

Observou-se que não houve diferença quanto à resolução dos fragmentos nos dois tipos de géis (Figura 1). A análise das três combinações de iniciadores mostrou que houve coincidência total quanto ao número de fragmentos amplificados (monomórficos e polimórficos) nos dois tipos de gel. Também houve coincidência nas avaliações dos genótipos analisados, quanto à presença ou ausência dos marcadores (Tabela 1). Desta forma, verifica-se que os grupos formados para o gel com uréia P.A. são os mesmos formados para uréia agrícola (Figura 2).

A substituição de uréia P. A. por uréia agrícola é viável tecnicamente não havendo diferenças significativas nos padrões de polimorfismos em relação aos dois tipos de fonte de uréia empregados nos géis. Além da viabilidade técnica, economicamente a substituição permite uma significativa redução de custos, que é da ordem de 30% (R\$ 4,80 por gel) na confecção de géis de poliacrilamida, que de outro modo custariam em torno de R\$ 16,13/gel.

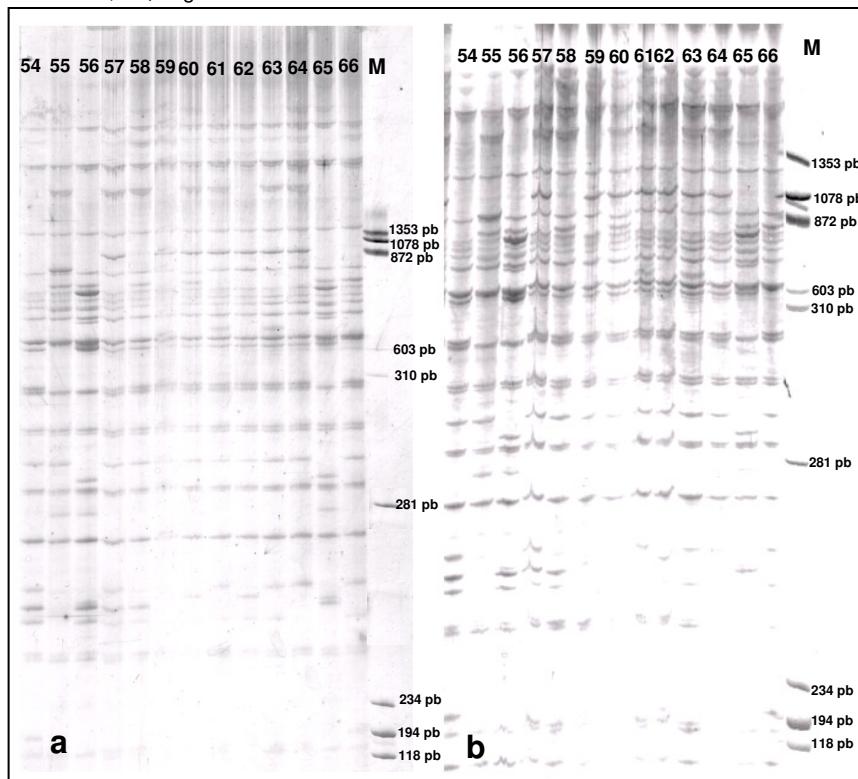


Figura 1. Gel de poliacrilamida 6% com uréia PA (a) e com uréia agrícola (b). Acessos de arroz irrigado (54-66) provenientes do banco de germoplasma; Marcador de peso molecular (M) “ Φ X174 RF DNA/Hae III fragments”.

Tabela 01. Número de marcadores, percentagem de marcadores polimórficos e percentagem de coincidência quanto à presença ou ausência (1 ou 0) dos fragmentos em gel de poliacrilamida 6% preparado com uréia uréia PA e uréia agrícola.

Iniciadores	Nº de marcadores	Marcadores	Coincidência das avaliações
		polimórficos (%)	entre os dois tipos de gel (%)
E 40 x M 59	17	59	100
E 13 x M 60	22	46	100
E 40 x M 62	14	43	100

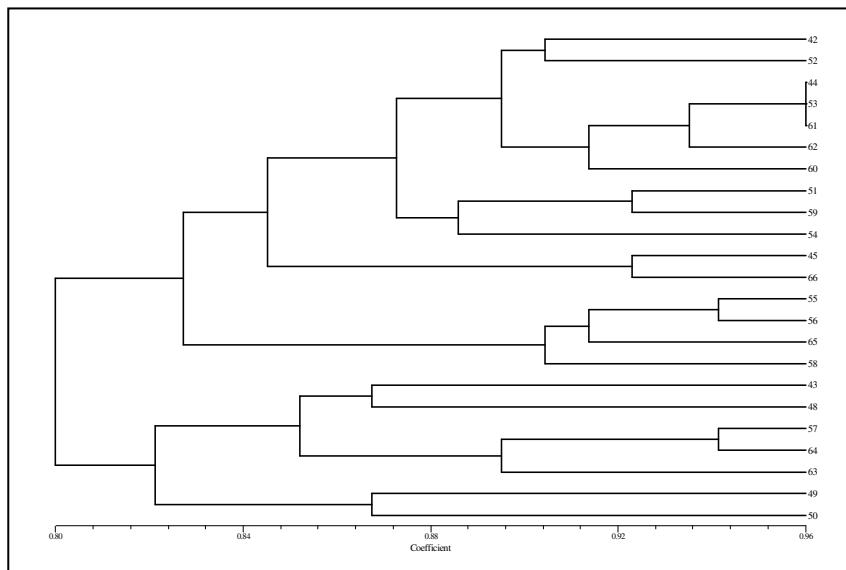


Figura 2. Dendrograma de similaridade genética de acessos de arroz irrigado (42-66) para gel de poliacrilamida 6% com uréia agrícola, idêntico ao dendrograma do mesmo gel com uréia P.A (não mostrado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998.
- KEYGENE. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>>. Acesso em: 10 ago. 2005.
- PESEK, J.; STANFORD, G.; CASE, N.L. **Nitrogen production and use.** In: OLSON, R.A.; ARMY, T.J.; HANWAY, J.J.; KILMER, V.J. **Fertilizer Technology & Use.** 2nd Edition. Madison: Soil Science Society of America, 1971. p.217-269.
- SBCS - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** 10. ed. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. 400p.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA Fingerprints in plants: principles, methods and applications.** Boca Raton: CRC Press, 2005. 444p.

Agradecimentos:

Ao WUS – Germany (World University Service - Projeto APA 1525); CNPq; Eng. Agr. MSc. Robert Harri Hinz e Eng. Agr. Dr. José Ângelo Rebelo, pela cessão de área física laboratorial para a execução deste trabalho.