

## **ADEQUAÇÃO DE PROCEDIMENTOS EM MINI ESCALA PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Digitaria insularis* e *Conyza* spp.**

SILVA, A. F. (EMBRAPA – CNPMS, SETE LAGOAS/MG – afsagro@gmail.com), SINDÔ, J. C. (FASIPE – CPAMT/MT – jessicasindo.bm@gmail.com), ZANATO, T. M. R. (FASIPE – CPAMT, SINOP/MT – talytazanato@hotmail.com), FERREIRA, A. (EMBRAPA – CPAMT, SINOP/MT – anderson.ferreira@embrapa.br)

**RESUMO:** Estudos de identificação e caracterização da diversidade genética de plantas por meio de técnicas moleculares envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, exigindo a utilização de métodos rápidos e robustos de extração de DNA. Este trabalho teve como objetivo determinar o procedimento de extração de DNA que melhor se adéqua para as espécies *Digitaria insularis* (capim-amargoso) e *Conyza* spp. (buva). Foram avaliados seis diferentes protocolos: 1) baseado em Saghai – Maroof et al (1984); 2) Baseado em Sambrooke Fritsch (1989); 3) Baseado em Doylee Doyle (1990); 4) Baseado em Ferreira et al. (2004); 5) Baseado em Scheuermann (2002); e 6) Baseado em Scott (1993). Os resultados indicaram que o protocolo 3 e 4 foram os que melhor se adequaram tanto para a extração de DNA de buva quanto do capim-amargoso.

**Palavras-chave:** diversidade genética, extração de DNA, planta daninha

### **INTRODUÇÃO**

Com a liberação das culturas tolerantes ao glyphosate, tecnologia Roundup Ready, atenção especial tem sido dada às plantas daninhas que apresentam biótipos resistentes a esse princípio ativo. Dentre essas espécies, a buva (*Conyza* spp.) e o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), merecem destaque por se encontrarem espalhadas, praticamente, por todo o território nacional.

Devido à grande diversidade de ambientes ocupados por essas plantas daninhas e as distâncias geográficas em que essas populações se encontram no território nacional, é provável que apresentem alta variabilidade genética. Essa variabilidade genética dentro e entre populações de plantas daninhas pode ser um indicativo das possibilidades de surgimento de biótipos resistentes em determinado local ou região. (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Diante deste cenário, a biotecnologia vem se tornando uma ferramenta cada vez mais utilizada dentro da ciência de plantas daninhas, auxiliando na identificação de espécies, avaliação de variabilidade genética populacional e na elucidação de mecanismos

de resistência.

A extração de DNA de plantas é uma das etapas de maior importância nas análises moleculares. O DNA vegetal é comumente utilizado em reações de PCR, estudos filogenéticos e/ou no desenvolvimento de marcadores moleculares. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de amostras de DNA devem produzir amostras puras o suficiente para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO; BRASILEIRO, 2001). Sendo assim, torna-se necessário a realização de testes para obtenção de DNA de boa qualidade que possa ser usado em técnicas de marcadores moleculares.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e adequar procedimentos em mini-escala para a extração de DNA das espécies *Digitaria insularis* e *Conyza* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

A condução dos procedimentos de extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agrossilvipastoril. Amostras de folhas jovens de diferentes plantas de capim-amargoso e buva foram coletadas no campo experimental da Unidade. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi conduzido ao laboratório, lavado em água ultra pura e armazenado a -20°C até execução dos procedimentos de extração do DNA. Para cada procedimento testado foram utilizadas duas subamostras de 200mg, além de dois controles negativo, sem material vegetal. Foram testados seis protocolos, sendo que, o primeiro passo em todos eles foi a maceração do material vegetal com nitrogênio líquido, em almofariz de porcelana. Após a maceração as amostras foram transferidas para um microtubo de 2,0mL.

A seguir são descritos os demais passos de cada procedimento.

**(1)** Baseado em Saghai – Maroof et al (1984) – Adiciona 500µL de CTAB 2% e incuba por 30min a 60°C; acrescenta 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agita por inversão por 15min; centrifuga por 7min a 9.000g; transfere o sobrenadante para tubo novo contendo 0,8 volumes de isopropanol absoluto gelado; centrifuga por 7min; descarta o sobrenadante, lava o *pellet* em etanol 70% e seca em câmara de fluxo laminar.

**(2)** Baseado em Sambrooke Fritsch (1989) – Adiciona 750µL do tampão de extração (125mM EDTA; 500mM Tris-HCl pH8,0; 2,3% SDS) e incuba por 1ha 37°C; adiciona 1 volume de fenol e agita por inversão (15min); centrifuga a 9.000g por 7min; transfere o sobrenadante para novo tubo e adiciona o mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1); mistura por 15 min e centrifuga por 7min; repete os passos a partir do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico; adiciona 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e

2 volumes de isopropanol absoluto gelado ao *pellet*, incuba durante a noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ . centrifuga por 7min e descarta o sobrenadante; adiciona  $500\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto e centrifuga por 7 min; seca o *pellet* em câmara de fluxo laminar.

**(3)** Baseado em Doylee Doyle (1990) – Adiciona  $750\mu\text{L}$  do tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl pH 8,0) e incuba a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30min; adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e mistura em vórtex; centrifuga por 10 min a  $9.000\text{g}$ ; transfere sobrenadante para tubo com 2 volumes de isopropanol absoluto gelado e centrifuga por 10 min; lava o *pellet* com etanol 70% e seca em câmara de fluxo laminar.

**(4)** Baseado em Ferreira et al. (2004) – Adiciona  $750\mu\text{L}$  do tampão de extração (250 mM NaCl, 200mM Tris-HCl, 25mM EDTA pH8,0; 0,5% SDS) e macera; adiciona  $800\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e mistura por inversão; centrifuga por 7 min a  $9.000\text{g}$ ; transfere sobrenadante para um tubo com  $800\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto; agita suavemente por 2min, à temperatura ambiente; centrifuga por 7min; descarta sobrenadante lava o *pellet* com etanol 70%; seca em câmara de fluxo laminar.

**(5)** Baseado em Scheuermann (2002) – Adicionados  $750\mu\text{L}$  do tampão de extração (700 mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH8,0; 55 mM CTAB) e incuba a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30min; adiciona 1 volume de 24:24:1 de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico; agita por inversão e centrifuga a  $9.000\text{g}$  por 5min; transfere sobrenadante para novo tubo; adiciona o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:24); mistura e centrifuga por 7min; transfere o sobrenadante para novo tubo com  $800\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto; incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min; centrifuga por 5min e lava o *pellet* com etanol 70%; seca em câmara de fluxo laminar.

**(6)** Baseado em Scott (1993) – Adiciona  $750\mu\text{L}$  do tampão de extração (250 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH8,0) e  $750\mu\text{L}$  de SDS 10%; incuba a  $60^{\circ}\text{C}$  por 30min; adiciona  $400\mu\text{L}$  de cloreto de sódio 5 M e incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10min; centrifuga por 15min e transfere o sobrenadante para tubo com  $800\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto; incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10min; centrifuga  $9.000\text{g}$  por 5min; lava o *pellet* com etanol 70% e seca em câmara de fluxo.

O *pellet* obtido com todos os procedimentos foi diluído em  $50\mu\text{L}$  água ultra pura e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da quantificação de DNA, que foi feita através de corridas eletroforéticas em géis de agarose 0,8% por 60 min a 80V. Os géis foram corados com Gel Red e fotodocumentados. O marcador de 1 Kb foi usado indicador de migração nos géis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco procedimentos testados forneceram DNA em quantidade e qualidade variáveis (Figura 1), enquanto que um procedimento, procedimento 1, não possibilitou a extração de

DNA de nenhuma das espécies vegetais estudadas. Os controles negativos utilizados nas avaliações não apresentaram DNA em nenhum dos procedimentos de extração.

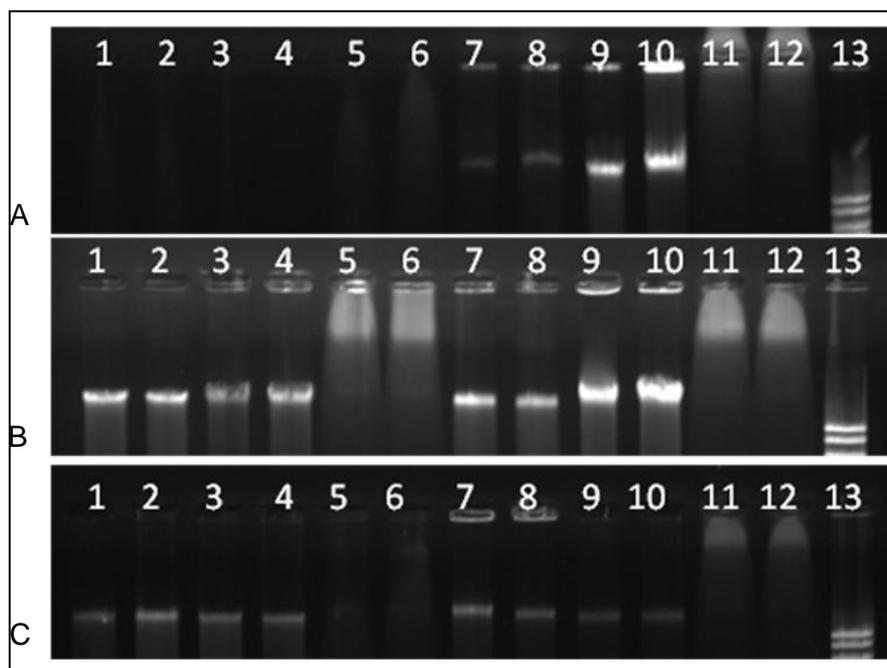


Figura 1. *Conyza*: 1, 2, 7 e 8; *Digitaria*: 3, 4, 9 e 10; controles: 5, 6, 11 e 12; marcador 1 Kb: 13. A) procedimento 1: do 1 ao 6; procedimento 2: do 7 ao 12. B) procedimento 3: do 1 ao 6; procedimento 4: do 7 ao 12. C) procedimento 5: do 1 ao 6; procedimento 6: do 7 ao 12.

O procedimento 1 não possui tampão de extração, sendo usado somente o detergente CTAB como principal rompedor de estruturas celulares. A falta de um tampão de extração reflete em uma condição química menos adequada para as reações e favorece a degradação do DNA por DNases durante o processo de extração.

O procedimento 6 que forneceu DNA em grande quantidade, indica o sal para precipitação de proteínas, não utilizando solventes orgânicos, o que é vantajoso, porém resíduos de sal podem inviabilizar o uso para algumas técnicas de biologia molecular.

Para a buva, destacaram-se os procedimentos 3, 4 e 5 que possibilitaram a obtenção de DNA de alto peso molecular em grande quantidade. Já para o capim-amargoso, os procedimentos 3 e 4 foram os que apresentaram as maiores quantidades de DNA. Em termos práticos, seria interessante o uso de um procedimento eficaz para as duas espécies no laboratório. Nesse sentido, os procedimentos 3 e 4 seriam os mais indicados. Quando se analisa cada um dos procedimentos as principais diferenças são: um deles usa SDS e o outro usa CTAB como detergente; o procedimento 3 apresenta uma incubação de 30 minutos o que o torna menos atrativo do que o procedimento 4. Um ponto positivo para os procedimentos 3 e 4, em relação aos demais é que não fazem uso de fenol, reagente tóxico

e que pode ser um problema no tocante ao descarte correto dos resíduos. Portanto o procedimento, baseado em Ferreira et al. (2004), destaca-se por não requerer incubação do tecido vegetal em nenhuma fase, o que torna sua aplicação extremamente rápida, já que o tempo entre a maceração inicial e a obtenção do *pellet* pode ser de apenas 90 min. Assim, para aplicações do tipo RAPD, e possivelmente também para AFLP, este procedimento é o mais indicado para a extração de DNA de buva e capim-amargoso.

Para as duas espécies vegetais praticamente não foi observado contaminação com DNA degradado, mas observou-se a presença de grande quantidade de RNA em todos os procedimentos, sugerindo a necessidade de um tratamento posterior com RNase.

### CONCLUSÕES

Os procedimentos 3 e 4 são os mais adequados para a extração de DNA para as espécies *Digitaria insularis* e *Conyza* spp.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation an the genetics of populations**. Blackwell Publishing Maden, Massachusetts, 642 p., 2007
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15.1990.
- FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A.; NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S. Caracterização de acessos de arroz-vermelho utilizando a técnica RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004, digital.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. **Extração de DNA de Plantas**. Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento, 2001.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. 2. ed., New York: Cold Spring Laboratory, v.9, p.16-9.23, 1989.
- SCHERUERMANN, K.S. Análise da variabilidade de *Magnaporthe grisea* no estado de Santa Catarina. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for mini-scale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. **International Rice Research Notes**, v.18, n.1, p.47-48, 1993.