

## APERFEIÇOAMENTO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Cyperus difformis*

Lílian Gonçalves Ribeiro Urbinati<sup>(1)</sup>, Marina Juliana Batista<sup>(1)</sup>, Maycon Eduardo Nicoletti<sup>(2)</sup>, Fernando Adami Tcacenco<sup>(3)</sup>. <sup>1</sup>UNIVALI, Curso de Ciências Biológicas, Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202, Itajaí, SC; Bolsistas de Pesquisa do Artigo 170/UNIVALI/Governo de Santa Catarina. Email: urbinati@univali.br. <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí, Bolsista do CNPq. <sup>3</sup>Eng. Agr., Ph. D., Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí.

*Cyperus difformis*, pertencente à família Cyperaceae, é uma planta daninha da orizicultura, infestando áreas de cultivo de arroz irrigado em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Segundo Noldin et al (1999), a infestação com esta espécie se intensificou a partir de 1990 devido ao surgimento de populações resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactatosintase (ALS). Trabalhos de caracterização molecular de plantas daninhas têm se destacado pela possibilidade de auxiliar na identificação dos ecótipos resistentes e de fornecer um panorama geral sobre a similaridade genética entre os diversos ecótipos. Rampelotti et al. (2005), utilizando a técnica RAPD, observaram uma tendência de diferenciação entre populações resistentes de *Sagittaria montevidensis*. Trabalhando com arroz-vermelho, Ferreira et al. (2005) aplicaram a mesma técnica em 16 ecótipos de diversas origens, separando-os em seis grupos distintos. Para *Cyperus difformis* existe escassez de informações acerca de sua variabilidade genética ao nível de DNA. Desta maneira, faz-se necessária a otimização de metodologias para a extração de DNA, que é um dos requisitos para a avaliação molecular de espécies vegetais. O presente trabalho teve como objetivo determinar o melhor método de extração e purificação de DNA de *C. difformis*.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Estação Experimental de Itajaí (Epagri). Folhas jovens de vários ecótipos crescidos em casa de vegetação foram coletadas, submetidas à assepsia com detergente e lavagem com água destilada; em seguida, 150 mg de folhas foram armazenadas a -20 °C em microtubos de 1,5 mL. Foram testados quatro protocolos de extração de DNA vegetal, com seis subamostras para cada protocolo, sendo que o primeiro passo em todos eles foi a maceração do material vegetal com N líquido. A seguir, são relatados os demais passos de cada protocolo.

**(1) Baseado em Doyle & Doyle (1990)** – foram adicionados 750 µL do tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0), seguido de incubação a 60 °C por 30 min. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo as amostras homogeneizadas em vórtex, e centrifugadas por 10 min a uma força centrífuga relativa (RCF) de 15.560 x g (equivalentes a 11.000 rpm no rotor F 40-6-38, centrífuga Eppendorf 5804R). O sobrenadante foi transferido para novo tubo com 2 volumes de isopropanol absoluto gelado e, após centrifugação por 10 min a 15.560 x g, o precipitado contendo os ácidos nucléicos foi lavado com etanol 70% e seco em câmara de fluxo laminar.

**(2) Baseado em Saghai-Marooof et al. (1984)** – foram adicionados 500 µL de CTAB 2%, feita incubação por 30 min a 60 °C, e acrescentado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram agitadas por inversão durante 15 min e, após, centrifugadas por 7 min a 15.560 x g, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos contendo 0,8 volume de isopropanol absoluto gelado. Posteriormente, centrifugou-se por 7 min a 15.560 x g, e o precipitado contendo os ácidos nucléicos foi processado como no método anterior.

**(3) Baseado em Ferreira et al. (2004)** – foram adicionados 750 µL do tampão de extração (0,5% SDS; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 200 mM Tris-HCl pH 8,0;) e feita nova maceração. Após, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), feita emulsão manual, e centrifugação por 7 min a 15.560 x g. A fase superior foi pipetada para

um tubo limpo, onde foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto, o que foi seguido por agitação suave por 2 min a temperatura ambiente e posterior centrifugação por 7 min a 15.560 x g. O precipitado resultante foi tratado como anteriormente.

(4) **Baseado em Scott (1993)** – foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  do tampão de extração (250 mM NaCl; 100 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) e 750  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, o que foi seguido de incubação a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio e incubou-se a -20  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Centrifugou-se por 15 min, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol absoluto e incubado a -20  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Após essa incubação, realizou-se uma centrifugação a 15.560 x g por 5 min, e o precipitado resultante foi tratado como anteriormente.

Os precipitados obtidos em todos os protocolos, após secos, foram resuspendidos em 40  $\mu\text{L}$  do tampão TE pH 8,0 e mantidos a -20  $^{\circ}\text{C}$  até o momento da quantificação de DNA, que foi feita através de corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen) por 90 min a 70 V. Os fragmentos de  $\lambda$  DNA/*Hind* III foram utilizados como marcadores. Foi também feito a quantificação de DNA com o agente intercalante bisbenzimidaz (corante Hoechst 33258), que se liga a DNA fita-dupla.

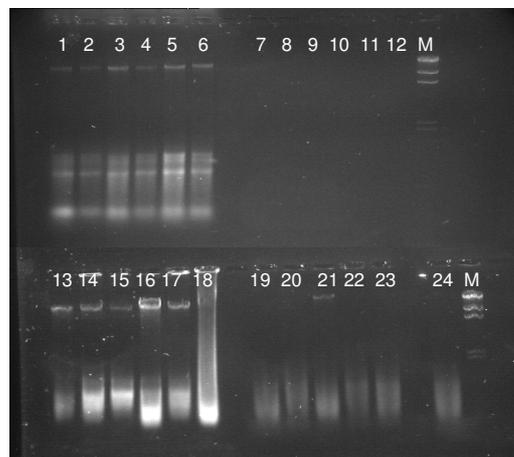
Os protocolos 1 e 3 foram eficientes, uma vez que possibilitaram a obtenção de DNA de boa qualidade (Figura 1) e em concentração suficiente para futuros trabalhos (média de 19,67 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  e 19,58 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente). No entanto, estes protocolos também apresentaram altas concentrações de ácidos nucléicos de baixo peso molecular, provavelmente correspondendo a DNA degradado ou a RNA; posterior tratamento com RNase A resultou na eliminação desses ácidos nucléicos (dados não mostrados), indicando que os mesmos se tratavam de RNA. Já os protocolos 2 e 4 não foram eficientes, pois não permitiram a obtenção de DNA quantificável; o protocolo 4 apresentou ácidos nucléicos de baixo peso molecular, os quais foram eficientemente eliminados com tratamento com RNase A.

Desta maneira, tanto o protocolo 1 quanto o protocolo 3 podem ser utilizados na obtenção de DNA de *Cyperus difformis*, pois apresentam resultados satisfatórios, não utilizam fenol em nenhuma de suas etapas, e ainda são de rápida execução. O protocolo Doyle & Doyle (1990) tem sido eficiente na extração de DNA de outra planta daninha da orizicultura, a *Sagittaria montevidensis* (Tcacenco e Ferreira, 2005), como também na extração de DNA de banana (Pauli *et al.*, 2006) e *Tibraca limbativentris* (Rampeloti *et al.*, 2005).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 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. Caracterização molecular de acessos de arroz-vermelho utilizando a técnica RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. **Anais...** Londrina, PR: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004, 1 CD (Trabalho 415). ISBN 85-98410-01-2
- NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; KNOBLAUCH, R. Resistência de *Sagittaria montevidensis* a herbicidas: primeiras evidências. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1., 1999. Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999, p.566-569.
- PAULI, K.S.; BORN, F.; NICOLETTI, M.E.; FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A. Otimização de protocolos de extração de DNA de bananeira para estudos de diversidade genética de bancos de germoplasma In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 58., 2006, Florianópolis, SC. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>.

- RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A.; NOLDIN, J.A. Coleta e extração de DNA de plantas de *Sagittaria montevidensis* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores de ALS In: SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE, 5., 2005, Montevideo, Uruguai. **Resúmenes...** Montevideo, Uruguai: Inst. Nac. Invest. Agropec. (INIA) / Fac. Agronomía, Univ. República / Comité Nac. Recurs. Fitogen., 2005. p.81 [Resumo 221].
- RAMPELOTTI, F.T.; NICOLETTI, M.E.; TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A. Análise genética de populações de *Sagittaria montevidensis* resistentes a herbicidas inibidores da ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52., 2006, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p.1029.
- RAMPELOTTI, F.T.; TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S. Condições ótimas para extração de DNA de *Tibraca limbativentris*, Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomídea). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., 2005; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26., 2005, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2005. v.2, p.46-48.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. 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.
- 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.
- TCACENCO, F. A.; FERREIRA, A. Procedimento em mini-escala para obtenção de DNA de *Sagittaria montevidensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., 2005; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26., 2005, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2005. v.2, p.257-259.



**Figura 1.** Resultados de extração de DNA utilizando o protocolo 1 (Doyle & Doyle, 1990): linhas 1 a 6; protocolo 2 (Saghai-Marooof, 1984): linhas 7 a 12; protocolo 3 (Ferreira): linhas 13 a 18; protocolo 4 (Scott): linhas 19 a 23; M = fragmentos de  $\lambda$  DNA/*Hind* III Invitrogen®, submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% por 90 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen).

Agradecimentos: ao Dr. José A. Noldin, pelo apoio à execução do trabalho.