

CONCENTRAÇÃO DE DNA E DMSO EM PROTOCOLO RAPD-PCR PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Fimbristylis miliacea*

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

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo componente básico na alimentação de grande parte da população. O Brasil ocupa a décima posição mundial, tanto em termos de consumo, quanto em produção de grãos do cereal. A utilização contínua de áreas com a cultura do arroz tem causado alguns problemas, especialmente o aumento da incidência de plantas daninhas. Em decorrência deste fato, a resistência de plantas invasoras a herbicidas tem sido um dos fatores limitantes da produção de arroz irrigado. A literatura propõe que a resistência aos herbicidas consiste na ocorrência de biótipo com habilidade de sobreviver à aplicação do composto químico ao qual a população original era suscetível (Lebaron & Gressel, 1982). A pressão causada pelo uso intensivo desses herbicidas tem selecionado ecótipos de cuminho [*Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl] resistentes (Noldin *et al.*, 2002), tornando-a uma espécie problemática no cultivo de arroz irrigado em Santa Catarina. Com isso, cresce a necessidade de determinação de protocolos para estudo de variabilidade genética existente entre as populações selvagens dessa planta invasora. Vários estudos objetivam otimizar a busca de marcadores ligados à resistência de ervas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), como evidencia Rampelotti *et al.* (2005) em sua pesquisa sobre coleta e extração de DNA de *Sagittaria montevidensis* suscetível e resistente aos inibidores da ALS.

Neste contexto, a técnica RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) tem sido muito utilizada. Ferreira *et al.* (2004) utilizaram com sucesso essa técnica para caracterização molecular de acessos de arroz-vermelho. Conforme resultados de pesquisa de Tcacenco *et al.* (2006), o uso de marcadores RAPD otimizou a obtenção de diversidade genética de germoplasma de *Musa* da Epagri – Estação experimental de Itajaí.

Ainda não há publicações que evidenciem a base genética da resistência do cuminho em cultivo de arroz irrigado. Desta forma, surgiu a necessidade de estudos da variabilidade genética de *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl, capazes de detectar biótipos resistentes e suscetíveis a herbicidas ALS.

A amplificação de DNA via RAPD-PCR se dá através da utilização de uma mistura de reagentes necessários para sintetizar novos segmentos da molécula, gerando assim um padrão de amplificação específico para cada reação em particular. Deste modo, as condições da reação são imprescindíveis para garantir resultados confiáveis (Freitas, 2005). Para tal, objetivou-se neste trabalho a determinação da concentração ótima de DNA e DMSO em protocolo RAPD.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Estação Experimental de Itajaí (EEI). As amostras foram obtidas na própria EEI, sendo coletadas folhas jovens de *F. miliacea*. O material vegetal foi levado ao laboratório onde foi processado e macerado em microtubos de 1,5 mL com N líquido para a extração de DNA. O protocolo utilizado para extração de DNA foi baseado em Doyle e Doyle (1990), seguindo testes de protocolos para RAPD-PCR. Utilizaram-se variantes de: quantidade de DNA e de DMSO (dimetilsulfóxido) como otimizador. Para tanto, foram conduzidos dois experimentos: **(i) teste de quantidade de DNA genômico** - o DNA genômico de três indivíduos de *F. miliacea* foi submetido RAPD nas quantidades de 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng e 125 ng por reação; e **(ii) teste de concentração do aditivo DMSO** - reações de RAPD foram realizadas

com 25 ng de DNA genômico e diferentes concentrações do aditivo DMSO (0%, 2,5%; 5%, 7,5% e 10%); ambos foram conduzidos com três repetições. As amplificações enzimáticas foram realizadas em reações de 25 µL com 2,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTP (10 mM), 1 U de Taq DNA polimerase Platinum, 5 µL de iniciador, tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, e 50 mM KCl) com concentrações variadas de DNA genômico e DMSO, conforme descrito acima, de acordo com a metodologia de cada experimento.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100™ (M.J. Research, Inc.), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 1 min a 94 °C; 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 35 °C, 2 min a 72 °C; e extensão final de 5 min a 72 °C. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE pH 8,4 (Tris 89 mM; ácido bórico 88,9 mM; Na₂EDTA 2 mM), sob voltagem constante de 70 V por 150 min. O gel foi corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

No experimento (i), no qual foram testadas diferentes quantidades de DNA genômico de *F. miliacea*, foram amplificados fragmentos nos cinco tratamentos. Observou-se diferença entre os tratamentos aplicados, porém a quantidade de DNA não foi inibitória à reação para os tratamentos testados. A melhor visualização dos fragmentos ocorreu para a menor concentração (25 ng). Para os demais tratamentos, apesar da melhor consistência do fragmento de 600 pb, nota-se a ausência de fragmentos de menor peso molecular (400 pb; Figura 1).

No experimento (ii), no qual foram testadas diferentes concentrações do aditivo DMSO, obteve-se diferença de resultados quando comparados com a testemunha. Pela presença de um fragmento de 580 pb, não obtido na testemunha, é demonstrada a efetividade do produto na técnica utilizada (Figura 2). Segundo Kovárová & Dráber (2000), DMSO, assim como outros aditivos, são conhecidos por incrementar, sob determinadas condições, a especificidade e eficiência da PCR. As concentrações de 2,5 e 5% tiveram bons resultados, pois os fragmentos de maior peso molecular (a partir de 2072 pb) podem ser mais bem visualizadas nesses tratamentos. Porém, a 5% torna-se mais satisfatória pela visualização do fragmento de 1000 pb não visualizado na concentração de 2,5%. As maiores concentrações (7,5% e 10%) não apresentaram resultados positivos pela ausência de fragmentos obtidos na testemunha e demais concentrações do produto, pois se sabe que a concentração em torno de 10% de DMSO por volume de reação pode diminuir pela metade a atividade da enzima Taq DNA polimerase (Innis & Gelfand, 1990; Gelfand & White, 1990), o que justifica a inexistência de fragmentos amplificados nesta concentração. O DMSO e a formamida são tolerados a baixas concentrações na PCR e podem auxiliar a amplificar seqüências ricas em C-G, pois facilitam a separação das fitas de DNA, melhorando a acessibilidade para a Taq polimerase, assim como para os iniciadores.

Portanto, conclui-se que o melhor protocolo de RAPD-PCR para o estudo de diversidade genética da espécie *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl é o que inclui, nas reações, 25 ng de DNA genômico e 5% de DMSO.

REFERÊNCIAS 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., São Pedro, SP. **Boletim Informativo**, Ciência das Plantas Daninhas, Suplemento. Londrina, PR: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004. v. 10, p. 223-224.
- FREITAS, P.D. Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares. **Manual Prático**. Marcadores de RAPD. v.1, p.1-37. São Carlos, São Paulo, 2005. Disponível em <http://www.shrimp.ufscar.br>. Acesso em 17/05/2007.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. in: **PCR Protocols** (Innis, Gelfand, Sninsky and white, eds.) Academic Press: New York. p.3-12, 1990.

- KOVÁROVÁ, M.; DRÁBER, P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.13, e70, 3p, 2000.
- LEBARON, H.M.; GRESSEL, J. **Herbicide resistance in plants**. New York: Wiley-Interscience Publications, 401p., 1982.
- NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; RAMPELOTTI, F.T. *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl resistente a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., Gramado. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2000. p.199.
- 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 GENETICOS PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE, 5., Montevideo, Uruguai. **Resúmenes...** Montevideo, Uruguai: Inst. Nac. Invest. Agropec. (INIA) / Fac. Agronomía, Univ. República / Comité Nac. Recurs. Fitogen., 2005. p.81 [Resumo 221].
- TCACENCO, F.A.; PAULI, K.S.; NICOLETTI, M.E.; RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; LICHTENBERG, L.A. Diversidade genética de germoplasma de Musa da Epagri usando marcadores RAPD In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., Joinville, Santa Catarina. Brasil. Bananicultura: um negócio sustentável. **Anais...** Itajaí, Santa Catarina: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v.2., p.464-467.

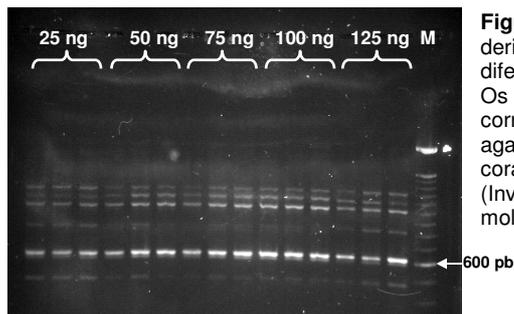
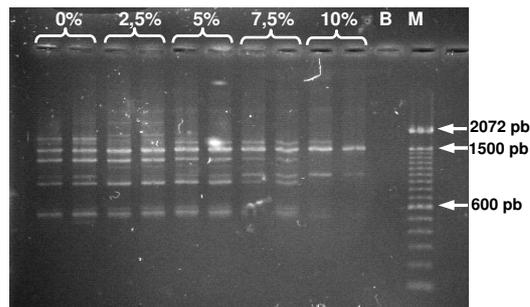


Figura 1: Produtos de RAPD-PCR derivados de reações com diferentes concentrações de DNA. Os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética em géis de agarose 1,5% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). M = marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 2: Produtos de RAPD-PCR derivados de reações com diferentes concentrações de DMSO. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). B = branco; M = marcador de peso molecular de 100 pb.



Agradecimentos: ao Dr. José A. Noldin (Epagri, Itajaí), pelo apoio à execução do trabalho.