

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE DNA DE *Fimbristylis miliacea* (L.) VAHL

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, 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 cuminho [*Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl] é uma erva daninha infestante do cultivo de arroz irrigado. O sistema de cultivo de arroz propicia um habitat especial para a infestação de plantas daninhas, pois oferece níveis satisfatórios dos recursos do ambiente, favorecendo o estabelecimento e o crescimento de plantas invasoras (Fleck, 2000). O controle químico pelo emprego de herbicidas tem sido um dos métodos mais utilizados para o controle de plantas daninhas na cultura do arroz. Conseqüentemente, surgem as plantas daninhas resistentes, como o cuminho, sobre a qual Noldin *et al.* (2002) relata a resistência a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. Este fato se deve a aplicações repetidas de um único e efetivo herbicida, ou de herbicidas de mesmo mecanismo de ação, aplicados por vários anos, causando mudanças na flora infestante (Maxwell *et al.*, 1990; Blair, 1991). Uma das características inerentes às plantas daninhas é a diversidade genética, porque elas se desenvolvem e evoluem em ambiente hostil (Vidal e Merotto Jr., 2001; Winkler *et al.*, 2002). A caracterização molecular de plantas daninhas vem sendo realizada em todo o mundo, e essa linha de pesquisa vem ganhando força e despertando o interesse de pesquisadores de áreas afins. A utilização do marcador molecular RAPD-PCR para avaliar a diversidade genética foi utilizada com sucesso por Ferreira *et al.* (2004), na caracterização molecular de acessos de arroz-vermelho. Conforme resultados obtidos por Tcacenco *et al.* (2006), o uso de marcadores RAPD viabilizou a avaliação da diversidade genética de germoplasma de *Musa* na Epagri – Estação Experimental de Itajaí.

Existe uma escassez de informações quanto à resistência de *F. miliacea* na literatura consultada. Portanto, pesquisas como esta se mostram essenciais, pois permitem aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção e ainda contribuem para mitigar as questões relacionadas à poluição ambiental decorrentes da excessiva utilização de herbicidas. A partir desses fatos, surgiu a necessidade de metodologias rápidas e precisas, capazes de detectar biótipos de plantas daninhas resistentes. Sendo assim, torna-se necessário a realização de testes para obtenção de DNA de boa qualidade e que possa ser usado em técnicas de marcadores moleculares. Considerando essas limitações, realizou-se o presente trabalho, que visou adaptar protocolos para extração de DNA de *F. miliacea*.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Estação Experimental de Itajaí. As amostras foram obtidas na própria Estação Experimental, sendo coletadas folhas jovens de *F. miliacea*. O material vegetal foi levado ao laboratório e macerado em microtubos de 1,5 mL com N líquido para a extração de DNA, sendo que e para cada protocolo testado foram utilizadas seis subamostras de 150 mg. Foram testados quatro protocolos:

(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), feita incubação a 60 °C por 30 min e posteriormente 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

sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% e seco em câmara de fluxo laminar.

(2) Baseado em Saghai-Marroof *et al.* (1984) – foram adicionados 500 μL de CTAB 2% e feita incubação por 30 min a 60 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, acrescentou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitaram-se as amostras por inversão durante 15 min. Após isso, elas foram centrifugadas por 7 min a 15.560 x g e 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, desprezando-se o sobrenadante, lavou-se o precipitado em etanol 70%, sendo o mesmo seco em câmara de fluxo laminar.

(3) Baseado em Ferreira *et al.* (2004) – foram adicionados 750 μL do tampão de extração (250 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS) e feita nova maceração. Posteriormente, foram adicionados 800 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo a mistura emulsionada manualmente e centrifugada por 7 min a 15.560 x g. A fase superior foi pipetada para um tubo limpo, onde foram adicionados 800 μL de isopropanol absoluto, o que foi seguido por agitação suave por 2 min, à temperatura ambiente, e centrifugação por 7 min a 15.560 x g. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado resultante lavado com etanol 70% e seco em câmara de fluxo laminar.

(4) Baseado em Scott (1993) – foram adicionados 750 μL do tampão de extração (250 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH 8,0) e 750 μL de SDS 10%, o que foi seguido de incubação a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 400 μL de acetato de potássio e incubou-se a -20°C por 10 min. Centrifugou-se por 15 min, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de 800 μL de isopropanol absoluto e incubado a -20°C por 10 min. Após essa incubação realizou-se uma centrifugação a 15.560 x g por 5 min, e o precipitado resultante foi lavado com etanol 70% e seco em câmara de fluxo laminar.

Os precipitados obtidos em todos os protocolos, após secos, foram resuspenso em 40 μL do tampão TE pH 8,0 e mantidos a -20°C até o momento da quantificação de DNA, que foi feita através de corrida eletroforética em gel de agarose (0,8%) corado com SYBR[®] Safe (Invitrogen) por 90 min, utilizando-se uma fonte Consort E143 com 70 V. Após, o gel foi documentado em aparelho Vilber-Lourmat acoplado a câmara CCD e impressora térmica Sony UP-890CE. Os fragmentos de λ DNA/*Hind* III foram utilizados como marcadores. Foi também feita a quantificação de DNA obtido nas extrações em fluorômetro VersaFluor Fluorometer System (BioRad) com o agente intercalante bisbenzimidaz (corante Hoechst 33258), que se liga a DNA fita-dupla.

Dois dos quatro protocolos (1 e 3) apresentaram DNA em quantidade e qualidade variáveis, enquanto que dois protocolos (2 e 4) não produziram DNA quantificável (Figura 1). Este último é um protocolo eficiente para a extração de DNA do fungo *Pyricularia grisea*, causador da brusone do arroz, porém ineficiente para a extração de DNA de cuminho. Os protocolos 1 e 3 têm procedimentos semelhantes e se mostraram mais eficientes, pois o DNA obtido em ambos foi de boa qualidade, mas apresentou altas concentrações de RNA, sugerindo a necessidade de um tratamento posterior com RNase A. O protocolo 3 apresentou a maior média de DNA quantificado, sendo de 74,5 ng μL^{-1} . Quando comparado a este, o DNA quantificado do protocolo 1 se torna inferior, tendo média de 63,8 ng μL^{-1} . Além disso, o protocolo 3 requer menor tempo de centrifugação.

Portanto, este último protocolo, baseado em Ferreira *et al.* (2004), destaca-se por sua aplicação ser extremamente rápida, já que o tempo entre a maceração inicial e a obtenção do precipitado de DNA pode ser de apenas 90 min, e por apresentar maior média de DNA quantificável. Assim, este protocolo é o mais indicado para a extração de DNA de *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAIR, W. **Herbicide resistance in weeds: an overview**. New Jersey: American Cyanamid, Agricultural Division. Princeton, 1991. 16p.
- 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...** Ciência das Plantas Daninhas, Suplemento. Londrina, PR: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004. v.10, p.223-224.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15. 1990.
- FLECK, N.G. **Controle de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado através da aplicação de herbicidas com ação seletiva**. Porto Alegre: FLECK, N.G., 2000. 32p.
- MAXWELL, B.D.; ROUSH, M.L.; RADOSEVICH, S.R. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. **Weed Technology**, v.4, p.2-13, 1990.
- 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., 2002, Gramado. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002. p. 199.
- 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.; 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., 2006, Joinville, Santa Catarina. Brasil. Bananicultura: um negócio sustentável. **Anais...** Itajaí, Santa Catarina: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v.2, p.464-467.
- VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152p.
- WINKLER, L. M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v.70, n.4, p.21-24, 2002.

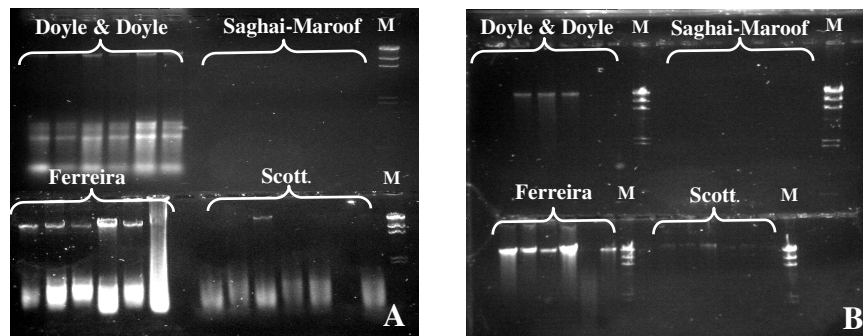


Figura 1. DNA total de *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl, extraído com quatro diferentes protocolos, submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% por 120 min e corados com corado com SYBR® Safe (Invitrogen). M = marcador λ - Hind III. (A) Protocolos sem tratamento de RNase A. (B) Protocolos com tratamento de RNase A.

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