

## METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DO DNA DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR MICORRIZADAS SOB DIFERENTES FORMAS DE MANEJO

Sabrina Pariz<sup>1</sup>, Fabiana Iurk de Souza<sup>2</sup>, Raíssa Fernanda Matias<sup>3</sup>, Mariane Castardo Araujo<sup>4</sup>, Edneia Aparecida de Souza Paccola<sup>5</sup>, Francielli Gasparotto<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. sa\_pariz@hotmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Agronomia, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Programa Voluntário de Iniciação Científica (PVIC/UniCesumar). fabianayurk7@gmail.com

<sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. raissa.feernanda@hotmail.com

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. castardomari96@gmail.com

<sup>5</sup>Coorientadora, Doutora, Professora do Curso de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. edneia.paccola@unicesumar.edu.br

<sup>6</sup>Orientadora, Doutora, Professora do Curso de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br

### RESUMO

O monitoramento da saúde dos solos onde se cultiva cana-de-açúcar é de suma importância para a sustentabilidade deste agrossistema. E uma alternativa para este controle é o monitoramento da população de fungos micorrízicos arbusculares. Mas, para isto, necessita-se de eficientes protocolos para extração total de DNA das raízes micorrizadas. Desta forma, objetiva-se com este trabalho avaliar um protocolo de extração do DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas. A pesquisa será realizada no município de Castelo Branco-PR, em uma área onde se cultiva cana-de-açúcar. A área foi subdividida em duas megaparcelsas de 2,0 ha cada, onde uma foi submetida ao terraceamento e outra não. Serão coletadas amostras de raízes das plantas de cana-de-açúcar em 15 pontos distintos por megaparcelsa, distribuídos em grid e georreferenciados. Serão utilizadas 50 mg de raízes para extração do DNA. Após a extração as amostras serão submetidas a diluições com soluções tampão, as mesmas irão para centrifuga e o sobrenadante será descartado. Para a corrida eletroforética, será preparado o gel de agarose a 1%. Os produtos obtidos serão submetidos na revelação do transiluminador LED, para visualizar o DNA extraído, dos FMAs que colonizavam as raízes em áreas com terraço e sem terraço. Espera-se que o protocolo testado seja eficiente na extração do DNA total de raízes micorrizadas de cana-de-açúcar obtendo-se um produto de qualidade para posterior utilização em reações de polimerase em cadeia (PCR) e avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos presentes nas áreas de estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Manejo biológico; Simbiose; Sustentabilidade agrícola.

### 1 INTRODUÇÃO

O solo é um recurso natural limitado e multifuncional. É um sistema muito dinâmico que presta serviços vitais para as atividades humanas e a sobrevivência dos ecossistemas, alojando a quarta parte da biodiversidade do planeta (SCHOONOVER; CLIM, 2015). Segundo Mendes *et al.* (2020) um solo saudável é um solo biologicamente ativo, produtivo, capaz de armazenar água, sequestrar carbono e promover a degradação de pesticidas, entre outros importantes serviços ambientais.

O emprego de tecnologias sustentáveis no manejo do solo contribui para sua conservação, neste sentido, o uso de práticas conservacionistas preserva a estrutura do solo, auxilia na retenção de água no solo, reduz o risco de erosão e oscilações de temperatura e melhora a qualidade do solo (BUSARI *et al.*, 2015). Toda via, a utilização inadequada do solo com o revolvimento excessivo ou a falta de práticas conservacionistas, pode provocar aumento da densidade, diminuição da macroporosidade e porosidade total dentre outros danos (SOARES *et al.*, 2020).

Assim, o emprego de práticas de conservação biológica como a preservação da microbiota do solo é considerada como um fator vital para o funcionamento dos

ecossistemas. Segundo Ferreira *et al.* (2019), os microrganismos estão intimamente associados aos processos ecológicos do ambiente, recuperando formas de energia e nutrientes. Dentre as comunidades microbianas um importante grupo é o dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), estes formam associações simbióticas íntimas com a maioria das raízes das plantas terrestres atingindo mais de 80% das espécies.

Os FMA são fundamentais para o aumento da fertilidade, do conteúdo de carbono orgânico e da estabilidade do solo, e ainda aumentam a relação da água e nutrientes das plantas e a disponibilidade de fósforo. Ainda, segundo Welemariam *et al.* (2018) as micorrizas desempenham um papel importante na regulação do estresse abiótico e biótico nas plantas. Além de auxiliar no crescimento das plantas, no seu rendimento e no aumento da produção, estes organismos também podem ser utilizados para avaliar as alterações ocasionadas nos ecossistemas pelas atividades agrícolas.

Assim, estudos que objetivem avaliar as mudanças na população de fungos micorrízicos desencadeadas por alterações nas práticas de manejo do solo, como a retirada dos terraços, em áreas produtivas agrícolas são de suma importância, visando avaliar a qualidade dos solos e manter a sustentabilidade da produção agrícola e a saúde do solo. Mas, para isto, necessita-se de eficientes protocolos para extração total de DNA das raízes micorrizadas. Desta forma, objetiva-se com este trabalho avaliar um protocolo de extração do DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ÁREA DE ESTUDO

O trabalho será realizado no município de Castelo Branco-PR, em duas megaparcelas instaladas em uma propriedade onde se cultiva cana-de-açúcar. Cada megaparcela é composta por 2,0 ha, sendo a megaparcela I realizado o plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima e sem o emprego de práticas mecânicas de controle do escoamento (sem terraços) e a megaparcela II com plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima, associado a práticas mecânicas de controle do escoamento (com terraços em nível).

### 2.2 COLETA DAS RAÍZES E EXTRAÇÃO DO DNA

Inicialmente será realizada uma amostragem de raízes por meio da coleta de 15 pontos distintos por megaparcela, distribuídos em grid e georreferenciados. As amostras serão embaladas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de análises agronômicas (AgroLab). Para realizar a extração do DNA, serão selecionadas as raízes secundárias mais jovens e finas, pois as mesmas possuem um maior número de FMA por possuir uma maior facilidade de penetração, conseqüentemente, havendo uma maior população do fungo.

Após a seleção das raízes será realizado o processo de extração do DNA, segundo a metodologia proposta por Raeder e Broda (1985) com adaptações. Serão inseridos 50 mg de raízes em microtubos de 1,5 mL e adicionados 500 µL de tampão de lise (200 mM Tris-HCl; 250 mM nAcL; 25 mM EDTA; 0,5% SDS). Em seguida serão adicionadas 3 pérolas de vidro e os microtubos serão agitados rigorosamente em vórtex por 5 min para promover lise celular. Em seguida, os microtubos receberão 5 µL de RNase A (10 mg/mL) e então incubados em banho maria a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente será adicionado 500 µL de clorofane (fenol:clorofórmio:isopropanol; 24:24:1), homogeneizado levemente, e levado a centrífuga a 10.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante irá ser transferido para um novo microtubo, e será adicionado o mesmo volume de clorofane novamente. Esta

lavagem se repetirá por mais duas vezes e o sobrenadante obtido irá ser transferido para um novo microtubo. Então será adicionado o mesmo volume de isopropanol em temperatura ambiente e homogeneizar por leve inversão. As amostras serão incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida serão centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, para que ocorra a fixação do DNA no fundo do microtubo. O sobrenadante será descartado e serão adicionados 200 µL de álcool 70% e misturados por leve inversão e levados para centrífuga a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante será novamente descartado e os microtubos serão invertidos para secagem completa do DNA. Posteriormente será adicionado 50 µL de solução TE e então o DNA será armazenado sob refrigeração a -20°C.

Para verificação da qualidade do DNA extraído será realizada corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. As amostras serão coradas com Safer Dye (Kasvi) e será utilizado o Ladder de 1 Kb (Ludwig Biotec) para controle. Os produtos obtidos serão submetidos na revelação do transiluminador LED, para visualizar o DNA extraído.

### 3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que o protocolo testado seja eficiente na extração do DNA total de raízes micorrizadas de cana-de-açúcar obtendo-se um produto de qualidade para posterior utilização em reações de polimerase em cadeia (PCR) e avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos presentes nas áreas de estudo.

### REFERÊNCIAS

BUSARI, M.A.; KUKAL, S.S.; KAUR, A.; BHATT, R.; DULAZI, A. A. Conservation tillage impacts on soil, crop and the environment. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 2, p. 119-129, 2015. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.05.002>. Acesso em: 06 ago. 2021.

FERREIRA, A.; KAVASAKI, K. F. L.; PEREIRA, T. C. D.; ISERNHAGEN, I. Microbiologia de solos em modelos de restauração ecológica: biodiversidade e potencial biotecnológico. In: FARIAS NETO, A. L. *et al.* **Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 539-542. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1104080/1/2019cpamtagrossilvipastorilpart7cap5microbiologiasolomodelorestauracaoecologicabiodiversidadebiotecnologico p539542.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MENDES, I. C.; CHAER, G. M.; SOUSA, D. M. G. de; REIS JUNIOR, F. B. dos; SILVA, O. D. D. da; OLIVEIRA, M. I. L.; LOPES, A. A. C.; SOUZA, L. M. Bioanálise de solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. **INFORMAÇÕES AGRONÔMICAS NPCT**, nº 8, 020, 11 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/219731/1/IEDA-Bioanalise-do-solo-informacoes-agronomicas.pdf> Acesso em: 06 ago. 2021.

SCHOONOVER, J. E.; CRIM, J. F. An introduction to soil concepts and the role of soils in watershed management. **Journal of Contemporary Water Research & Education**, v. 154, n. 1, p. 21-47, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1936-704X.2015.03186.x> Acesso em: 06 ago. 2021.

SOARES, M. D. R.; CAMPOS, M. C. C.; OLIVEIRA, I. A.; CUNHA, J. M.; SANTOS, L. A. C.; FONSECA, J. S.; SOUZA, Z. M. Atributos físicos do solo em áreas sob diferentes sistemas de usos na região de Manicoré, AM. **Revista de Ciências Agrárias – Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 1, p. 9-15, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2020>. Acesso em: 06 ago. 2021.

WELEMARIAM, M.; KEBEDE, F.; BEDADI, B.; BIRHANE E. Effect of community-based soil and water conservation practices on arbuscular mycorrhizal fungi types, spore densities, root colonization, and soil nutrients in the northern highlands of Ethiopia. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0121-4>. Acesso em 06 ago. 2021.