



## AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DO DNA DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR MICORRIZADAS

*Sabrina Pariz<sup>1</sup>, Fabiana Iurk de Souza<sup>2</sup>, Osvaldo Leite da Silva Junior<sup>3</sup>, Amanda Eustachio Pereira<sup>4</sup>, Edneia Aparecida de Souza Paccola<sup>5</sup>, Francielli Gasparotto<sup>6</sup>*

<sup>1</sup>Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Campus Maringá/PR, Bolsista ICETI-Fundação Araucária. [sabrinapariz000@gmail.com](mailto:sabrinapariz000@gmail.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Agronomia, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista ICETI-Fundação Araucária. [fabianayurk7@gmail.com](mailto:fabianayurk7@gmail.com)

<sup>3</sup>Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista ICETI-Fundação Araucária. [osvaldo.leite98@gmail.com](mailto:osvaldo.leite98@gmail.com)

<sup>4</sup>Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista ICETI-Fundação Araucária. [maeustachio1998@hotmail.com](mailto:maeustachio1998@hotmail.com)

<sup>5</sup>Coorientadora, Doutora, Docente do Curso de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR, Pesquisadora, Bolsista Produtividade do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. [edneia.paccola@unicesumar.edu.br](mailto:edneia.paccola@unicesumar.edu.br)

<sup>6</sup>Orientadora, Doutora, Docente do Curso de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR, Pesquisadora, Bolsista Produtividade do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. [francielli.gasparotto@unicesumar.edu.br](mailto: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 monitoramento é o acompanhamento da população de fungos micorrízicos arbusculares associados as raízes de cana. Mas, para isto, necessita-se de eficientes protocolos para extração total de DNA das raízes micorrizadas. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar um protocolo de extração do DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas. A pesquisa foi realizada no município de Castelo Branco-PR, em uma área onde se cultiva cana-de-açúcar. A área foi subdividida em duas megaparcels de 2,0 ha cada, onde uma foi submetida ao terraceamento e outra não. Foram coletadas amostras de raízes das plantas de cana-de-açúcar em 15 pontos distintos por megaparcela, distribuídos em grid e georreferenciados. Utilizou-se 50 mg de raízes para extração do DNA. Após a extração as amostras foram submetidas a diluições com soluções tampão, as mesmas foram colocadas na centrífuga e o sobrenadante foi descartado. Para a corrida eletroforética, foi preparado o gel de agarose a 1%. Os produtos obtidos foram submetidos a revelação em transiluminador LED. De acordo com os resultados obtidos na revelação em transiluminador LED, foi possível observar o DNA extraído em boa concentração, integridade e pureza. Desta forma, o protocolo avaliado mostrou-se eficiente para emprego no monitoramento de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas.

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

### 1 INTRODUÇÃO

O solo é um dos recursos naturais mais importantes para a produção de alimentos e matéria prima e é essencial para o funcionamento dos ecossistemas, por apresentar características químicas, físicas e biológicas em sua composição (BERTOLLO, 2019). Mendes *et al.* (2020) relatam que os processos biológicos são a base para obtenção de um solo saudável, produtivo e sustentável.

O emprego de tecnologias sustentáveis no manejo do solo contribui para sua conservação, assim o uso de práticas conservacionistas preserva a estrutura do solo, auxiliando na retenção de água, reduzindo o risco de erosão e oscilações de temperatura, conseqüentemente, melhorando 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, podem provocar aumento da



densidade, diminuição da macroporosidade, perda de sedimentos, compactação, processos erosivos, dentre outros danos (SOARES *et al.*, 2020).

Assim, o emprego de práticas de conservação biológica como a preservação da microbiota do solo é considerado 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 fungos micorrízicos arbusculares beneficiam o desenvolvimento da planta pela maior absorção de água e de nutrientes, principalmente o fósforo que possui baixa mobilidade no solo e também 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 (WELEMARIAM, 2018).

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, este trabalho teve como objetivo 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 foi realizado em uma área localizada na mesorregião Noroeste do Paraná, na cidade de Presidente Castelo Branco, 23°11'29.4"S e 52°05'59.0"W e clima subtropical úmido (KOPPEN; GEIGER, 1928). De acordo com o mapa de classificação de solos do Paraná, a área experimental é classificada como Argissolo Vermelho distrófico.

Neste local a cultura da cana-de-açúcar vem sendo explorada a cerca de 10 anos por um grupo sucroalcooleiro da região, o atual cultivo foi implantado de forma mecanizada a 3 anos com a variedade RB 867515, e a colheita vem sendo realizada de forma mecanizada sem queima. A área experimental foi dividida em duas megaparcelas, de 2,0 ha cada, a Megaparcela I foi implantada com terraços em nível, e a Megaparcela II foi constituída a partir da remoção dos terraços já existente previamente na área, ou seja, sem a presença de terraços em nível.

### 2.2 COLETA DAS RAÍZES E EXTRAÇÃO DO DNA

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

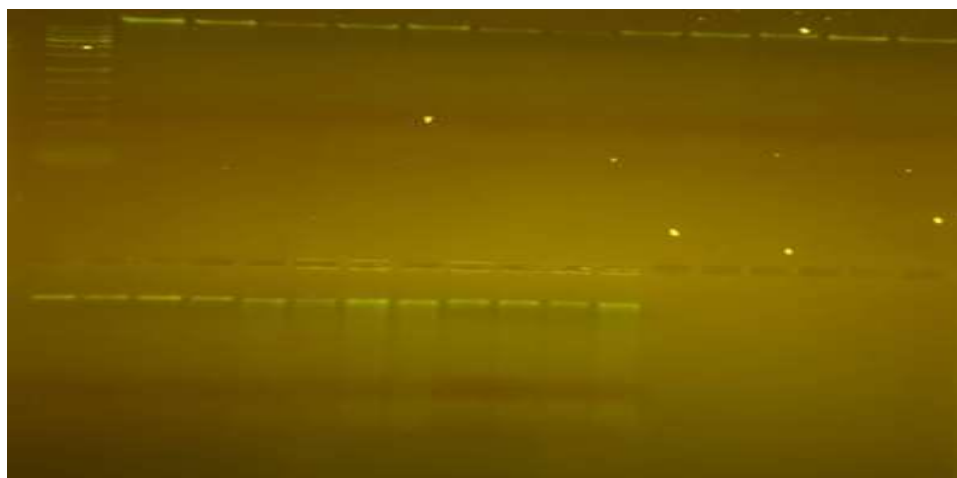


Após a seleção das raízes foi realizado o processo de extração do DNA, segundo a metodologia proposta por Raeder e Broda (1985) com adaptações. Foram inseridos 50 mg de raízes em microtubos de 1,5 mL e adicionados 500  $\mu$ L de tampão de lise (200 mM Tris-HCl; 250 mM nAcl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS). Em seguida colocou-se 3 pérolas de vidro em cada microtubo e então foram agitados rigorosamente em vórtex por 5 min para promover lise celular. Em seguida, os microtubos receberam 5  $\mu$ L de RNase A (10 mg/mL) e foram incubados em banho maria a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 500  $\mu$ L de clorofane (fenol:clorofórmio:isopropanol; 24:24:1), homogeneizado levemente, e levado a centrífuga a 10.000 RPM por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, e adicionou-se o mesmo volume de clorofane novamente. Esta lavagem se repetiu por mais duas vezes e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo. Então foi adicionado o mesmo volume de isopropanol em temperatura ambiente e homogeneizar por leve inversão. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, para que ocorresse a fixação do DNA no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200  $\mu$ L de álcool 70%, sendo misturados por leve inversão e levados para centrífuga a 10.000 rpm por 5 min. Descartou-se novamente o sobrenadante e inverteu-se os microtubos para secagem completa do DNA. Posteriormente foi adicionado 50  $\mu$ L de solução TE e então o DNA foi armazenado sob refrigeração a -20°C.

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

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 01 pode-se visualizar as amostras após corrida em gel de agarose a 1% na revelação em transluminador LED, verificou-se que o protocolo baseado na metodologia de Raeder e Broda (1985) possibilitou a extração do DNA em boa concentração, integridade e pureza.



**Figura 1:** Gel de agarose contendo amostras de DNA extraídas de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas empregando o protocolo de Raeder e Broda (1985) linha 1 (superior).



De acordo com Faleiro (2003), a integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR), Oliveira et al. (2007) destacam que esta é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a PCR.

Ainda segundo os autores, a extração de DNA deve incluir de forma básica dois procedimentos principais: a quebra das células presentes nas amostras e a purificação do DNA. Em seguida ao rompimento das células, o DNA deve ser separado dos resíduos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas, no protocolo testado o DNA total extraídos das amostras foi suspenso em solução tampão TE.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo avaliado foi eficiente para ser utilizado na obtenção de DNA total contendo DNA das raízes de cana-de-açúcar e DNA dos fungos micorrizicos arbusculares associados as raízes, promovendo a obtenção de um DNA de qualidade.

#### REFERÊNCIAS

BERTOLLO, A. M.; LEVIEN, R. Compactação do solo em sistema de plantio direto na palha. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 3, p. 208-218, 4 dez. 2019.

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.

FALEIRO, F., G., *et al.* **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares**. Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2003.

FERREIRA, A. *et al.* **Microbiologia de solos em modelos de restauração ecológica: biodiversidade e potencial biotecnológico**. Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 539-542.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**, Justus Perthes, Gotha. 1928.

MENDES, I. de C.; CHAER, G. M.; SOUSA, D. M. G. de; REIS JUNIOR, F. B. dos; SILVA, O. D. D. da; OLIVEIRA, M. I. L. de; LOPES, A. A. de C.; SOUZA, L. M. de. Bioanálise de solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. **Informações Agrônomicas npct**, nº 8, 020, 11 p.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2007. 43p.



RAEDER, U.; BRODA, P. Preparação rápida de DNA de fungos filamentosos. **Cartas em Microbiologia Aplicada**, v. 1, n. 1, pág. 17-20, 1985.

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.

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.