



PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR MICORRIZADAS

Fabiana Iurk de Souza¹, Sabrina Pariz², Edneia Aparecida de Souza Paccola³, Francielli Gasparotto⁴

¹ Acadêmica do Curso de Agronomia, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista PIBIC¹²/ICETI- UniCesumar. fabianayurk7@gmail.com

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. sabrinapariz000@gmail.com

³ 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

⁴ 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

RESUMO

O emprego de práticas conservacionistas auxilia na manutenção da estrutura do solo, conserva a água, reduz os riscos de erosão e flutuações na temperatura, além de melhorar a qualidade do solo. Mudanças nas práticas de manejo podem acarretar alterações na população de fungos micorrízicos arbusculares, influenciar na saúde do solo e na produção agrícola. Desta forma, objetivou-se avaliar um protocolo para extração de DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas. A pesquisa foi desenvolvida em megaparcels instaladas no município de Atalaia, onde está sendo cultivada cana-de-açúcar. Foram coletadas amostras de raízes das plantas de cana-de-açúcar em 15 pontos distintos por megaparcels, distribuídos em grid e georreferenciados. Foram utilizadas 50 mg de raízes para extração do DNA. O protocolo testado é baseado no detergente SDS, onde 50 gr de raízes micorrizadas foram colocadas em um cadinho e procedeu-se a maceração com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose a 1% e revelação em transiluminador LED, para visualizar o DNA extraído. O protocolo testado mostrou-se pouco eficiente para extração de DNA total de plantas de cana, pois verificou-se muitos contaminantes em todas as amostras extraídas, contaminantes estes que podem interferir no emprego do DNA extraído para outras aplicações. Conclui-se que o protocolo avaliado não foi eficiente para ser utilizado na obtenção de DNA total contendo DNA das raízes de cana e DNA dos FMA, não promovendo a obtenção de um DNA de qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: Sustentabilidade agrícola; Simbiose; Terraços.

1 INTRODUÇÃO

O solo é um recurso natural complexo e heterogêneo, essencial à manutenção do meio ambiente e ecossistemas, é formado a partir de um material semiconsolidado oriundo do processo de intemperismo físico, químico e biológico sofrido pelas rochas. Este desempenha funções ecológicas, como por exemplo o acúmulo da energia solar na forma de matéria orgânica, reciclagem da água e nutrientes, suporte para o crescimento de inúmeras espécies da fauna e flora, regulador dos ciclos de elementos químicos, como carbono, nitrogênio, potássio, enxofre e fósforo, e matéria-prima para artefatos humanos (AHLAWAT *et al.*, 2020).

Sarkar *et al.* (2020) apontam que um terço do solo da Terra apresenta condições severas de degradação relacionada a vários processos, por exemplo: a intensificação agrícola, a poluição do solo, a erosão do solo, e a má gestão de recursos e desertificação. Uma alternativa para monitorar estas alterações se dá por meio do acompanhamento da variação da população microbiana do solo,



entre os organismos que podem ser avaliados destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Estes organismos apresentam simbiose essencial para o crescimento das plantas, dando a planta acesso a nutrientes pouco solúveis e baixa difusão por meio de redes de hifas (FERROL *et al.*, 2019). Quando associados as raízes das plantas, esses fungos proporcionam benefícios contribuindo com a nutrição de plantas, diminuindo o consumo de fertilizantes, promovendo maximização do equilíbrio ecológico, maior crescimento, aumento de produção, preservação ambiental, maior tolerância a estresses abióticos, melhor potencial hídrico, respostas positivas a déficit hídrico (DURAZZINI *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018). Estudos com esses microrganismos tem demonstrado seu uso na recuperação de áreas degradadas pela mineralização e recuperação de solos com fortes erosões (CHAER *et al.*, 2011), além do seu papel já conhecido em disponibilizar compostos nitrogenados às plantas em troca de fotoassimilados (DALL'AGNOL *et al.*, 2017).

Desta forma, pesquisas que visem 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 verificar a qualidade dos solos e manter a sustentabilidade da produção agrícola e a saúde do solo. Assim, objetivou-se avaliar um protocolo para extração de DNA total de raízes de cana-de-açúcar micorrizadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDOS E AMOSTRAS

O projeto foi desenvolvido em duas megaparcelas instaladas no município de Atalaia, onde está sendo cultivada cana-de-açúcar. A área experimental é composta por 2 megaparcelas de 2,0 ha cada sendo: Megaparcela I: Plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima e sem o emprego de práticas mecânicas de controle do escoamento (sem terraços) e Megaparcela II: Plantio e colheita mecanizada da cana-de-açúcar sem queima, associado a práticas mecânicas de controle do escoamento (com terraços em nível).

Foi realizada uma amostragem de raízes 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 processamento.

2.2 SELEÇÃO DAS RAÍZES E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram selecionadas raízes de plantas, para, por meio da extração do DNA e amplificação com primers ITS, tentar obter correspondência entre o padrão de bandeamento de DNA dos FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) que colonizavam as raízes em áreas com terraço e sem terraço.

Para isso foram utilizadas 50 mg de raízes colonizadas selecionadas em microscópio, sendo a colonização evidenciada pela presença de arbúsculos ou vesículas coradas em azul de tripano. Na seleção amostrou-se diferentes tipos de micélio interno (fino e grosso) e a presença de vesículas.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

O protocolo testado foi adaptado de Souza *et al.* (2002) com detergente SDS, onde 50 gr de



raízes micorrizadas foram colocadas em um cadinho e procedeu-se a maceração com nitrogênio líquido até obter a consistência de um fino pó. Cerca de 300 μ L do macerado foram transferidos para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 400 μ L de tampão SET (NaCl 0,15M, Tris 0,02M, EDTA 1mM pH 8,0) + 14,5 μ L de proteinase K (10mg/mL) + 18 μ L de SDS (25%). O material foi então incubado por 1 hora à 55°C. Após este período adicionou-se 400 μ L de NaCl 5M e procedeu-se a homogeneização em vórtex.

Então, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde adicionou-se 150 μ L de Tris (0,01M pH 8,0). Procedeu-se então outra centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado em um novo microtubo e adicionou-se 6 μ L de RNase (10mg/mL), o material foi então incubado por meia hora a 37°C. Após a incubação adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio ao sobrenadante coletado e centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se o mesmo volume de etanol 100%. Os microtubos foram então incubados à -20°C overnight.

Após o período, procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se etanol 70%. Centrifugou-se, novamente, por 20 minutos a 12.000 rpm e o etanol foi descartado. Os tubos foram então invertidos e mantidos abertos sob papel absorvente esterilizado por 10 a 15 minutos até o etanol evaporar. O DNA foi então ressuspendido adicionando-se 100 μ L de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA) e as amostras foram armazenadas a 4°C.

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo baseado no uso do detergente SDS mostrou-se pouco eficiente, pois verificou-se muitos contaminantes em todas as amostras extraídas por este protocolo, interferindo em uma leitura limpa do DNA, o que pode alterar os resultados de posteriores reações de polimerase em cadeia (PCR) visando a determinação da diversidade genética dos fungos micorrízicos associados as raízes de cana-de-açúcar.

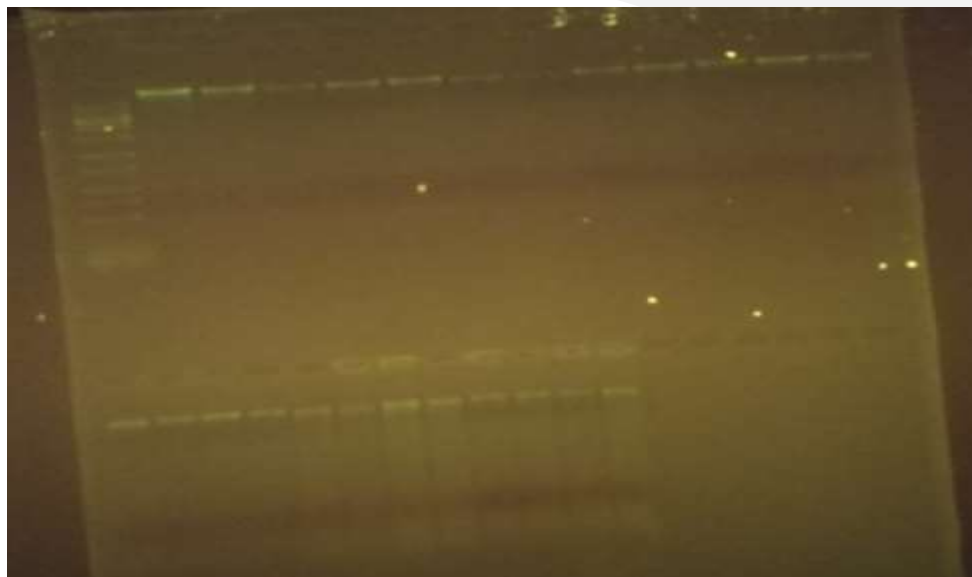


Figura 1: Gel de agarose contendo amostras de DNA extraídas de raízes de cana-de-açúcar empregando o protocolo Souza *et al.* (2002) linha 2 (inferior).

Segundo Oliveira *et al.* (2007) 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, verificou-se que o protocolo testado não foi eficiente para separar o DNA total extraído das raízes e os contaminantes, o que pode ser verificado pelos arrastes apresentados na figura 01.

Ressalta-se que a integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) (FALEIRO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o protocolo avaliado não foi eficiente para ser utilizado na obtenção de DNA total contendo DNA das raízes de cana e DNA dos FMA, não promovendo a obtenção de um DNA de qualidade.

REFERÊNCIAS

AHLAWAT, U.; ANU; SINGH, V. K.; SHARMA, V.; SHEKHAWAT, N.; RAI, R. K. Soil organic matter and its importance for soil health. **Food and Scientific reports**, v. 1, issue 10, 2020.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers Microbiology**, v. 6, p.1-13, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>. Acesso em: 19 jul. 2021.

BONITO, R.D.; ELLIOT M.L.; DES JARDINS, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61,



p.2809-2810, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2809-2810.1995>. Acesso em: 18 jul. 2021.

CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq116>. Acesso em: 10 jul. 2021.

DURAZZINI, A. M. S.; TEIXEIRA, M. A.; ADAMI, A. A. V. Quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo sob diferentes cultivos de cafeeiros. **Revista Agrogeoambiental**, v. 8, n. 4, p. 83-91, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v8n42016923>. Acesso em: 19 jul. 2021.

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.

FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>. Acesso em: 19 jul. 2021.

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.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. de A. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/31572>. Acesso em: 17 Jul. 2021.

SARKAR, D.; KAR, S. K.; CHATTOPADHYAY, A.; SHIKHA; RAKSHIT, A.; TRIPATHI, V. K.; DUBEY, P. K.; ABHILASH, P. C. Low input sustainable agriculture: A viable climate-smart option for boosting food production in a warming world. **Ecological Indicators**, v. 115, 106412, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106412>. Acesso em: 19 jul. 2021.

SOUZA, C. S.; PEREIRA, C. D.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; KERR, W. R. Extração de DNA genômico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) para análises AFLP. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, 2002.