

DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DA ESPÉCIE DANINHA *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL)

ROSO, A. C.¹; VIDAL, R. A.¹

¹Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

Resumo

A espécie daninha *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL), conhecida popularmente como leiteira ou amendoim-bravo é uma das espécies infestantes mais disseminadas no país. O uso exclusivo de herbicidas juntamente com o manejo inadequado das culturas levou a seleção de plantas daninhas resistentes. Atualmente foram descritos biótipos de EPHHL resistentes aos herbicidas inibidores das enzimas ALS, PROTOX e EPSPS. O uso da biotecnologia visando elucidar os mecanismos de resistência vem se tornando uma técnica cada vez mais utilizada dentro da ciência de plantas daninhas. O objetivo deste trabalho foi determinar protocolo de extração de DNA da espécie daninha EPHHL. Ressalta-se que por ser uma planta leitosa a extração de DNA se torna dificultada em função da contaminação por compostos polifenólicos. Foram avaliados diferentes protocolos: adaptado de Murray & Thompson (1980); Doyle & Doyle (1991) e adaptado de Haberer *et al.* (1996). Os resultados indicaram a necessidade de congelamento do material vegetal, em nitrogênio líquido, imediatamente após a coleta das folhas. Melhores resultados em relação à quantidade e qualidade de DNA extraído foram obtidos quando a extração realizou-se a partir de folhas mais jovens. O protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980) mostrou ser o único a não apresentar nenhuma contaminação nas amostras testadas. Os demais protocolos, apesar de serem mais expeditos, não foram satisfatórios. O pior resultado foi obtido com protocolo adaptado de Haberer *et al.* (1996).

Palavras-chave: biotecnologia, extração DNA, protocolos

Abstract

Euphorbia heterophylla L. (EPHHL), popularly known as wild poinsettia, is one of the most troublesome weed species in crops and it is widely disseminated in Brazil. The continuous use of herbicides and the wrong crop management led to the selection of resistance weeds. Currently, it has been described EPHHL resistant biotypes to inhibitors of ALS, PROTOX and EPSPS enzymes. The use of biotechnology to elucidate the mechanism of resistance has become a tool increasingly used in weed science. The objective of this work was to determine the protocol for DNA extraction in weed EPHHL. It is emphasized that because of the latex, the DNA extraction becomes difficult due to the contamination by polyphenol compounds. It was tested different protocols: adapted from Murray & Thompson (1980), Doyle & Doyle (1991) and Haberer *et al.* (1996). The results indicated the need to freeze the plant material in liquid nitrogen immediately after harvesting the leaves. Better results for the quantity and quality of extracted DNA were attained when the extraction was performed with young leaves. The protocol adapted from Murray & Thompson (1980) proved to be the only one that did not present any contamination in the samples tested. The other protocols, although quicker, were not satisfactory. The worst result was obtained with a protocol adapted from Haberer *et al.* (1996).

Key Words: biotechnology, DNA extraction, protocols

Introdução

Euphorbia heterophylla L. (EPHHL) está amplamente distribuída na região Centro-Sul do Brasil, infestando diversas culturas de interesse econômico. É uma planta de ciclo anual e com rápido crescimento e produção de grande número de sementes, sendo altamente competitiva com as culturas agrícolas (Kissmann & Groth, 1999).

O uso exclusivo de herbicidas juntamente com o manejo inadequado das culturas selecionou plantas daninhas resistentes. Atualmente estão descritos biótipos de EPHHL

resistentes aos herbicidas inibidores das enzimas ALS, PROTOX, EPSPS e com resistência múltipla a estes herbicidas (Trezzi *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2007).

Plantas daninhas apresentam resistência aos herbicidas através de diferentes mecanismos: absorção reduzida do produto, translocação reduzida ou compartimentalização do produto, metabolização acentuada, local de ação alterado, superexpressão de proteínas ligadas à enzima alvo (Powles & Shaner, 2001) e multicópias da enzima alvo (Gaines *et al.*, 2010).

O uso da biotecnologia visando elucidar os mecanismos de resistência vem se tornando uma técnica cada vez mais utilizada dentro da ciência de plantas daninhas. Recentemente, em *Bidens subalternans* DC foi elucidado o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS por intermédio do uso destas tecnologias (Lamego *et al.*, 2009).

O isolamento de DNA de plantas é uma etapa importante na análise da estrutura e organização do genoma de plantas. Preparações de DNA vegetal são, comumente, utilizadas como substratos em reações de PCR, estudos filogenéticos ou no desenvolvimento de marcadores moleculares. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não causar interferências. Na espécie EPHHL a produção de látex é considerada um problema para a extração de DNA de boa qualidade devido à contaminação por compostos polifenólicos. O objetivo deste trabalho foi determinar protocolo de extração de DNA da espécie *E. heterophylla* L.

Material e Métodos

Plantas de EPHHL foram cultivadas no Laboratório da Flora Ruderal da Faculdade de Agronomia da UFRGS. As coletas ocorreram no estágio inicial do desenvolvimento das plantas, com quatro folhas expandidas. Foram coletadas de três a cinco folhas jovens. Duas formas de coleta foram testadas. Na primeira, o material vegetal foi coletado em tubos ependorfes de 2,0 ml sendo imediatamente congelado e acondicionado em nitrogênio líquido. No segundo tipo, as amostras foram coletadas em tubos ependorfes de 2,0 ml e imediatamente acondicionadas em gelo.

A condução dos procedimentos de extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. Em todos os protocolos as amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido diretamente nos tubos ependorfes de 2,0 ml. Após a maceração seguiram-se os procedimentos de acordo com cada tipo de protocolo utilizado (Tabela 1). No total foram testados três diferentes protocolos: adaptado de Murray & Thompson (1980); de Doyle & Doyle (1991) e de Haberer *et al.* (1996).

A quantificação das amostras de DNA foi realizada através de leitura espectrofotométrica, medindo a absorbância da solução no comprimento de onda de 260 nm. A concentração de DNA da amostra será dada pela seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = 50 \text{ mg/ml} \times D \times A_{260};$$

onde: D é o fator de diluição usado para fazer a leitura espectrofotométrica e A₂₆₀ é a leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm. O fator de diluição usado foi 100. A concentração de DNA dada em mg/ml equivale a concentração em ng/μl. Outra forma atribuída de quantificação e qualificação das amostras de DNA foi realizada por meio de gel de agarose concentrado a 1%, através da comparação com padrões de DNAs lambda.

A qualidade de DNA extraído das amostras foi aferida de acordo com a razão medida pelo espectrofotômetro entre DNA e proteína. Outros parâmetros qualitativos foram analisados como: amostra de DNA (pelet) marrom ou muito escuro; amostra de DNA com aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso; DNA apresenta arraste vertical no gel de quantificação; DNA apresenta forma cônica no gel, em direção ao pólo positivo; após a corrida, muito DNA retido no poço do gel; DNA no gel apresenta contaminação com RNA.

Tabela 1. Diferenças entre etapas dos protocolos de extração utilizados para extração de DNA de EPHHL. Porto Alegre, 2009.

ETAPAS	Protocolos adaptados de		
	Murray & Thompson (1980)	Doyle & Doyle (1991)	Haberer <i>et al.</i> (1996)
Rompimento de paredes celulares	Maceração com N ₂ líquido em ependorfe de 2,0 ml com auxílio de bastão de alumínio.	Idem anterior	Idem anterior
Rompimento de membranas celulares e exposição do conteúdo celular	Tampão de extração (50 ml): 1M Tris pH 8,0 0,5 M EDTA 5 M NaCl 2 % CTAB H ₂ O para completar	Tampão de extração (50 ml): 1 M Tris pH 8,0 0,5 M EDTA 5 M NaCl 2 % CTAB 1 % PVP H ₂ O para completar	Tampão de extração (50 ml): 1M Tris pH 8,0 0,5 M EDTA 5 M NaCl 1 % CTAB H ₂ O para completar
Digestão de proteínas	Incubar o tecido macerado a 65°C por uma hora mexendo de 20 em 20 minutos em 620 µl da solução tampão + 1,56 µl de proteinase K + 69 µl SDS 20 %. Após, esfriar por 5 minutos na bancada e adicionar 315 µl de fenol e imediatamente 315 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter até formar emulsão. Centrifugar 5 minutos para separação de fases. Remover o máximo de sobrenadante possível para novo tubo.	Incubar o tecido macerado a 65°C por 90 minutos mexendo de eventualmente em 650 µl da solução tampão + 0,1 mg/ml de proteinase K + 13 µl de 2-βmercaptoetanol (2 %). Após, esfriar por 5 minutos na bancada e adicionar 650 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter até formar emulsão. Centrifugar 10 minutos para separação de fases. Remover o máximo de sobrenadante possível para novo tubo.	Incubar o tecido macerado a 65°C por 30 minutos mexendo de 10 em 10 minutos em 650 µl da solução tampão. Após, esfriar por 5 minutos na bancada e adicionar 550 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Mexer por 5 minutos. Centrifugar por 5 minutos. Transferir o máximo de sobrenadante para um novo tubo.
Precipitação do DNA	Adicionar 2/3 do volume da amostra de isopropanol gelado e mexer vagarosamente (nesta etapa é possível visualizar uma nuvem de DNA). Centrifugar por seis minutos para peletizar o DNA.	Adicionar igual volume da amostra de isopropanol gelado e mexer vagarosamente (nesta etapa é possível visualizar uma nuvem de DNA). Levar no freezer no mínimo 2 horas até 24 horas.	As etapas de precipitação, lavagem do DNA e degradação de RNA são diferentes dos protocolos anteriores. Estes seguem os seguintes passos: Após a transferência do sobrenadante para novo tubo, adicionar 17% do volume de sobrenadante em RNase (10mg/mL). Incubar por 60min a 37°C. Precipitar o DNA adicionando 67% do volume do sobrenadante de isopropanol, mexendo levemente. Possível colocar na geladeira durante a noite, ou freezer por 15 minutos. 13. Centrifugar por 30 minutos. Lavar o pelet com 500 µl de etanol 70 %.
Lavagem do DNA	Lave o pelet com 500 µl de etanol 70 % gelado. Centrifugar por três minutos. Desprezar o sobrenadante e secar o DNA (37°C por 2 horas).	Centrifugar 10 minutos para formação do pelet. Descartar. Secar. Lavar com 500 µl de solução de lavagem (76 % etanol + 10 mM de acetato de amônia) durante 20 minutos. Centrifugar. Descartar. Secar. Adicionar 100 µl de TE 0,1X.	
Degradação RNA	Adicionar 50 µl de TE 0,1X com RNase. Incubar em banho maria por 30 minutos a 37°C.	Precipitar o DNA com 50 µl de acetato de amônia (7,5 M) e 375 µl de etanol. Centrifugar 15 minutos. Descartar. Secar. Resuspender com 10 µg/ml TE RNase. Incubar em banho maria por 30 minutos a 37°C.	
Re-precipitação DNA	Precipite o DNA com 5 µl acetato de sódio (3 M) e 100 µl de etanol 95 %, ambos gelados. Manter a -20°C por 10 minutos.	Manter em câmara fria por 24 horas no mínimo.	Secar pelet até desaparecer odor de álcool.
Preparo da solução estoque	Centrifugar por 5 minutos. Descartar cuidando para não perder o pelet. Lavar novamente com 300 µl de etanol 70 %. Descarte e seque bem o pelet até desaparecer odor de álcool. Re-suspender com 50 µl de TE 0,1X.	Manter em câmara fria por 24 horas no mínimo.	Re-suspender o DNA em 30 uL de TE pH 8 0, 1x ou em água mili Q.

Resultados e discussão

A primeira etapa de extração envolve a forma como o tecido foi coletado bem como o tipo de material. Nesta etapa as paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares. Melhores resultados em relação à quantidade e qualidade de DNA extraído foram obtidos quando a extração realizou-se a partir de folhas mais jovens. A maceração em pequena escala utilizando um bastão de alumínio e um tubo ependorfe, mostrou ser mais eficiente quando o material coletado foi imediatamente congelado. Nas amostras mantidas no gelo ocorreu degradação do DNA que pode ser observada pelo pelet com a coloração marrom (Figura 1). Por ser uma espécie que produz um látex, especula-se que o tempo em que as plantas ficam descongeladas, embora mantidas em gelo, seja suficiente para contaminar o DNA com compostos polifenólicos. Para solucionar este problema deve-se congelar as plantas imediatamente em N₂ líquido após a coleta ou adicionar PVP e/ou BSA no tampão de extração, a concentração de 1 a 2%. Aumento da concentração de β-mercaptoetanol para até 5% também ajudam a solucionar problemas associados aos compostos polifenólicos.

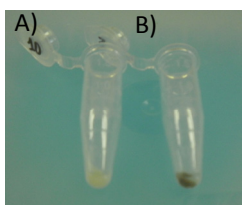


Figura 1. Tubos ependorfes de 1,5 ml mostrando pelet de DNA com contaminação por polifenóis. A) DNA de EPHHL extraído a partir de amostras imediatamente congeladas após coleta; B) DNA de EPHHL extraído a partir de amostras mantidas em gelo após coleta.

O protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980) mostrou ser o único a não apresentar nenhum tipo de problema de contaminação nas amostras testadas e a quantidade de DNA extraída também foi superior aos demais protocolos (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação das amostras de DNA extraídas de EPHHL, principais problemas encontrados e possíveis soluções. Porto Alegre, 2009.

Protocolo	Amostras	Concentração (ng/μl)	Principais problemas	Possíveis soluções
Murray & Thompson (1980)	1	3650	Não foram observados problemas com a utilização deste protocolo.	
	2	5013		
	3	2660		
	4	5108		
Doyle & Doyle (1991)	1	633	Arraste vertical no gel e retenção do DNA no poço do gel.	Verificar o pH do tampão de extração. Este deve estar por volta de 8,0. Se o pH estiver por volta de 7,0 facilitará a ação de DNases. Mistura das fases aquosa e de clorofórmio menos vigorosamente. DNA retido no poço pode ser solucionado com purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio.
	2	2272		
	3	1134		
	4	2329		
Haberer (1996)	1	0	Pouco DNA extraído.	Utilizar fenol.
	2	63		
	3	10		
	4	0		

No protocolo Doyle & Doyle (1991) os problemas observados foram principalmente amostras com arraste vertical no gel e retenção do DNA no poço do gel. O arraste vertical no gel pode ser porque o DNA foi degradado por DNAses ou ocorreu quebra mecânica durante a extração com o clorofórmio. A causa da retenção no poço pode ser explicada pela contaminação das amostras com polissacarídeos. O pior resultado foi obtido com protocolo adaptado de Haberer *et al.* (1996) e especula-se que o motivo seja a não utilização de fenol. Deste modo, conclui-se que para a extração de DNA da espécie EPHHL o protocolo de extração recomendado é o adaptado de Murray & Thompson (1980).

Literatura citada

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.
- LAMEGO, F.P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C.A.; BURGOS, N.R.; VIDAL, R.A. Molecular basis of resistance to ALS-inhibitor herbicides in greater beggarticks. **Weed Science**, v.57, p.474-481, 2009.
- GAINES, T.A.; ZHANG, W.L.; WANG, D.F. et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **PNAS**, v.107, n.3, p.1029-1034, 2010.
- HABERER, G.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A. Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, v. 250, n.1, p.123-128, 1996.
- KISSMAN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1999.
- MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. **Nucleic acid research**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- POWLES, S.B.; SHANER, D.L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 308p.
- TREZZI, M.M. et al. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v.40, n.1, p.101-109, 2005.
- VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; DE PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; VILAAIUB, M. M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v.5, n.2, p.265-269, 2007.