

Extração de DNA Genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum*

Ana Lídia Variani Bonato¹
Cacilda Borges do Valle²
Liana Jank³
Rosângela Maria Simeão Resende⁴
Gisele Olivas de C. Leguizamon⁵

Introdução

As pastagens cultivadas de gramíneas são a base da produção de carne e leite no Brasil, mas o número reduzido de cultivares disponíveis faz dessa baixa diversidade o maior fator de risco para o sistema de produção. A exemplo disso, duas cultivares de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* respondem por cerca de 50% das áreas de pastagens estabelecidas no Brasil e 85% das sementes forrageiras comercializadas no Brasil Central, representando um extenso monocultivo.

As braquiárias alcançaram grande importância econômica no Brasil nos últimos trinta anos por viabilizar a atividade pecuária nos solos fracos e ácidos dos cerrados, criando novos pólos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central.

Na Embrapa Gado de Corte, os trabalhos com *Brachiaria* foram intensificados a partir de 1987 quando uma grande coleção introduzida da África, via Centro Internacional de

Agricultura Tropical – CIAT – foi disponibilizada à Embrapa. A coleção conta com 446 acessos em 13 espécies diferentes (Valle & Savidan, 1996). A avaliação dessa coleção incluiu tanto características básicas – como níveis de ploidia e determinação do modo de reprodução – quanto características agronômicas de produtividade e resistência ao principal inseto praga que é a cigarrinha-das-pastagens. Acessos superiores foram identificados e encontram-se em fase final de avaliação. Híbridos foram gerados no programa de melhoramento, envolvendo cruzamentos interespecíficos, e estão sob avaliações genéticas e agronômicas. O uso de marcadores moleculares para a detecção da natureza híbrida das progênes, do modo de reprodução e também para o estudo da diversidade genética existente na coleção deve tornar o programa de melhoramento mais eficiente.

A espécie *Panicum maximum* Jacq. ocupa posição de destaque na pecuária brasileira por incluir gramíneas de elevada produção e qualidade, ser de fácil propagação por sementes e ser altamente palatável ao gado.

¹ Enga.-Agra., Ph.D., CREA Nº 78.233, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: analidia@cnpqg.embrapa.br

² Enga.-Agra., Ph.D., CREA Nº 35.409/D-Visto 1.542/MS, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: cacilda@cnpqg.embrapa.br

³ Enga.-Agra., Ph.D., CREA Nº 100.219/D-Visto 2.733/MS, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: liana@cnpqg.embrapa.br

⁴ Biol., D.Sc., CRBio 17.718-03D 3ª Região, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: rosangela@cnpqg.embrapa.br

⁵ Laboratorista, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: gisele@cnpqg.embrapa.br

Desde 1984, a Embrapa Gado de Corte vem desenvolvendo trabalhos de seleção e melhoramento da espécie, tendo lançado três cultivares no mercado até o momento, com grande aceitação pelos pecuaristas. A partir da coleção introduzida, de mais de 400 acessos apomíticos da espécie, vários foram selecionados por suas características agrônômicas e morfológicas e são considerados promissores, entre os quais, 25 foram avaliados em 7 regiões do País em uma rede nacional de ensaios (Savidan et al., 1990; Jank et al., 1993). Dos resultados desta avaliação, sete acessos foram escolhidos e avaliados em pequenas parcelas sob pastejo (Euclides et al., 1995), e posteriormente os melhores em ensaios de desempenho animal. O conjunto destas e de outras avaliações, como de resistência às cigarrinhas-das-pastagens e resposta à fertilidade dos solos, levou ao lançamento das cultivares Tanzânia-1 em 1990, Mombaça em 1993 e Massai em 2001. Apesar destas explorações, o germoplasma de *P. maximum* ainda dispõe de vários acessos promissores e não avaliados em rede nacional. Além disso, pode servir de fonte de genes no melhoramento genético da espécie. Por este motivo, o germoplasma necessita ser bem caracterizado e conservado.

Atualmente várias técnicas que geram marcadores moleculares estão disponíveis e estão sendo empregadas para a caracterização de germoplasma. Aliadas à identificação de acessos superiores do ponto de vista agrônômico, elas contribuem para os programas de melhoramento genético.

O produto utilizado nas análises genéticas realizadas com base em marcadores moleculares é o DNA (ácido desoxirribonucléico). Sendo assim, a eficiência destas análises é essencialmente dependente da qualidade e da quantidade do DNA extraído. Em plantas, vários fatores podem influenciar estas características, incluindo desde os procedimentos para a coleta e armazenamento do tecido vegetal até o processo de extração de DNA e de armazenamento do DNA extraído.

Vários métodos de extração de DNA de plantas têm sido descritos na literatura. A maior parte deles, entretanto, é uma variação de dois protocolos básicos, dentre eles o fundamentado na utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB (Doyle & Doyle, 1987, citados por Romano, 1998) é citado como o mais utilizado para a extração de diferentes espécies vegetais (Romano, 1998). Basicamente, os protocolos são utilizados com algumas modificações visando solucionar problemas intrínsecos da espécie analisada (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os objetivos deste documento são descrever a metodologia de extração de DNA genômico, ajustada para *Brachiaria* e *P. maximum*, a partir do protocolo utilizado por Saghai-Marrof et al. (1984) baseado na utilização de CTAB e tecer

considerações sobre as etapas do processo, observadas especificamente para essas gramíneas forrageiras.

Metodologia

- Pesar aproximadamente 300 mg de tecido foliar fresco.
- Macerar com nitrogênio líquido, cuidando para o tecido não descongelar.
- Adicionar às amostras 900 µL de tampão de extração CTAB (Tabela 1) pré-aquecido a 65°C e misturar bem.
- Incubar as amostras a 65°C em banho-maria por 60-90 minutos, invertendo os tubos, gentilmente, a cada 10 minutos.
- Retirar do banho-maria e deixar esfriar em temperatura ambiente por 5 minutos.
- Adicionar 450 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter gentilmente por 10 minutos.
- Centrifugar a 4.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos. Repetir os passos 6 e 7.
- Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos e adicionar 600 µL de isopropanol (-20°C). Homogeneizar para precipitar o DNA, e/ou,
- Incubar a -20°C por 30 minutos.
- Centrifugar a 10.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Retirar o sobrenadante e deixar o *pellet*.
- Suspende em 400 µL do tampão TE (Tris-EDTA).
Obs: Pode-se interromper o processo nessa etapa, armazenando a amostra a 4°C durante a noite.
- Precipitar o DNA adicionando primeiro: 20 µL de NaCl 5M (p/ 400 µL) e, em seguida, 800 µL de etanol absoluto.
- Inverter gentilmente os tubos até precipitar o DNA.
- Centrifugar a 10.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Lavar o *pellet* com 400 µL de etanol 70% (-20°C).
- Descartar o etanol 70% e deixar secar à temperatura ambiente.
- Suspende o *pellet* em TE: 50 ou 100 µL.
- Adicionar 3 µL de RNase (10 mg/mL). Misturar e incubar por 30 minutos a 37°C.
- Armazenar as amostras a -20°C.

Tabela 1. Tampão de extração CTAB.

Componentes	Volume final (10 mL)
CTAB 5%	4,0 mL
NaCl 5 M	2,8 mL
Tris-HCl 1M pH 8,0	1,0 mL
EDTA 0,5 M	0,4 mL
Água destilada	1,6 mL
2-mercaptoetanol	0,04 mL
Polivinilpirrolidone (PVP)	0,1 g

Considerações gerais

Para o procedimento de amostragem do tecido foliar, indica-se preferencialmente a coleta de tecido novo, onde ocorre a fase ativa de crescimento das plantas. No entanto, para *Brachiaria* e *P. maximum*, pode-se também coletar material foliar adulto, pois é possível realizar a extração do DNA normalmente sem comprometimento da qualidade. Nestes casos, o DNA é de boa qualidade, sem oxidação que pode significar contaminação com polifenóis que se oxidam em compostos quinônicos e sem degradação causada por contaminação com DNAses endógenas.

É possível extrair DNA de qualidade dessas espécies tanto a partir de material foliar fresco, processadas logo após a coleta, quanto a partir de tecidos armazenados a -20°C por aproximadamente um mês.

Considerando que para a técnica de RAPD somente alguns miligramas de tecido fresco são suficientes para gerar a quantidade necessária de DNA, o protocolo foi adaptado para realização em microtubos (2,0 e 1,5 mL) o que reduz o gasto de reagentes e o custo por amostra.

Na maceração mecânica, onde há o rompimento das paredes e membranas celulares do tecido, deve-se cuidar para manter as folhas congeladas pela adição de nitrogênio líquido. Em etapa seguinte, o tecido macerado é ressuspenso em um tampão de extração, contendo o detergente catiônico CTAB, para solubilizar as membranas protéicas. Para a solubilização e ação do CTAB, é adicionada uma concentração de 1,4M NaCl e é utilizado um sistema Tris-HCl pH 8,0 para manutenção do pH constante. Outros componentes desse tampão visam proteger o DNA da ação de enzimas nativas ou compostos secundários liberados com o rompimento das células. O EDTA (etilenodiaminotetracetato) quelata cátions divalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} . O PVP (polivinilpirrolidone) tem um efeito antioxidante. O 2-mercaptoetanol é um agente redutor

que desnatura proteínas como peroxidases e polifenoloxidasas.

Após o processamento com o tampão de extração, o material é submetido a uma extração com solvente orgânico, clorofórmio-álcool isoamílico, seguida de centrifugação para separação da fase orgânica da fase aquosa. Na fase orgânica, que fica na parte inferior da solução, são retidos e descartados os lipídeos, proteínas e alguns polissacarídeos. Na fase aquosa, ficam o DNA e alguns contaminantes como RNA e alguns polissacarídeos. Esta etapa é repetida para purificar o DNA dos contaminantes, diferente do protocolo original que faz esta purificação apenas uma vez. Posteriormente, na presença de um sal e de um álcool, o DNA é rapidamente precipitado e, então, sedimentado por centrifugação. Seguem-se a lavagem do DNA com etanol 70% e a secagem à temperatura ambiente.

Finalmente, o DNA é suspenso em um tampão TE (Tris-EDTA), onde permanecerá armazenado na forma concentrada. A diluição para uma solução de trabalho é feita com água miliQ.

Esses procedimentos foram realizados com sucesso para as duas gramíneas forrageiras, *Brachiaria* e *P. maximum*, e, possivelmente, podem ser testadas às demais espécies e gêneros de gramíneas forrageiras tropicais.

Referências bibliográficas

- EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; OLIVEIRA, M. P. de. Avaliação de ecotipos de *Panicum maximum* sob pastejo em pequenas parcelas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p. 97-99.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- JANK, L.; COSTA, J. C. G.; SAVIDAN, Y. H.; VALLE, C. B. do. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North: New Zealand Grassland Association, 1993. p. 509-511.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 163-189.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SLOMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics.

Proceedings of National Academy of Science of USA, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAVIDAN, Y. H.; JANK, L.; COSTA, J. C. G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande, EMBRAPA-CNPQC, 1990. 68 p. (EMBRAPA-CNPQC. Documentos, 44).

VALLE, C. B.; SAVIDAN Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE C. B. (Ed.). ***Brachiaria: biology, agronomy, and improvement***. Cali: CIAT/Brasília:EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163.

Comunicado Técnico, 79

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, km 4, Caixa Postal 154
79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 368 2083
Fax: (67) 368 2180
E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

1ª edição

1ª impressão (2002): 500 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: *Cacilda Borges do Valle*
Secretário-Executivo: *Liana Jank*
Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Arnildo Pott, Ecila Carolina N. Z. Lima, Ezequiel R. do Valle, José Raul Valério, Maria Antonia M. de U. Cintra, Rosângela Maria S. Resende, Tênisson W. de Souza*

Expediente

Supervisor editorial: *Ecila Carolina N. Z. Lima*
Revisão de texto: *Sylvia Odinei Cesco*
Editoração eletrônica: *Ecila Carolina N. Z. Lima*