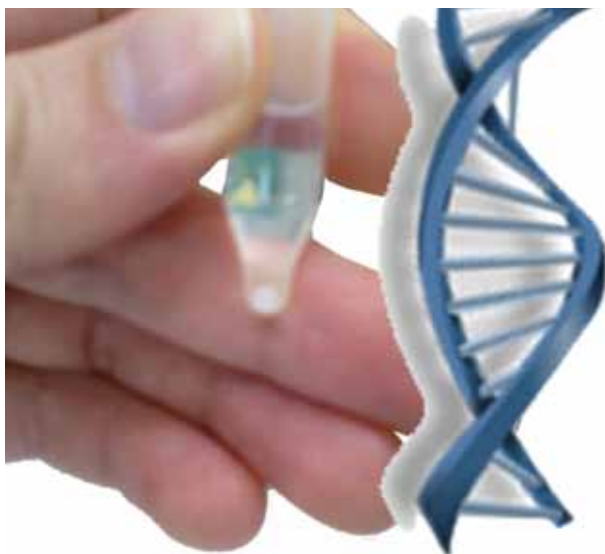


Imagem: Fátima Maria De Marchi



Otimização do método de extração de DNA de *Magnaporthe oryzae* de trigo

Ana Lídia Variani Bonato¹
Jordalan Buffet Muniz²
João Leodato Nunes Maciel³
Janaína C. Ortiz⁴

Introdução

A extração de DNA é o primeiro passo para a utilização em diferentes técnicas com marcadores moleculares. Os marcadores moleculares são provenientes do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente e têm sido usados basicamente no estudo da diversidade genética, associação com caracteres de interesse agrônômico ou biológico e estudos

de proveniência genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998a, 1998b).

Existem diferentes métodos de extração de DNA, com variações de acordo com a espécie e o tecido a ser utilizado para a extração. Em geral, utiliza-se a maceração do organismo/tecido alvo em nitrogênio líquido para o rompimento da parede celular, um tampão com detergente para o rompimento da membrana celular, contendo também proteinase K para facilitar a separação

¹ Pesquisadora Embrapa Trigo e Supervisora do Estágio Profissional, Rodovia BR 285, km 294, 99001-970. Passo Fundo, RS. E-mail: analidia.bonato@embrapa.br

² Estagiário da disciplina Estágio Profissional do Curso de Química Bacharelado da Universidade de Passo Fundo, BR 285, São José, 99052-900. Passo Fundo, RS. E-mail: jordalan.muniz@embrapa.br

³ Pesquisador Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, 99001-970. Passo Fundo, RS. joao.maciel@embrapa.br

⁴ Professora e orientadora do Estágio Profissional do Curso de Química Bacharelado da Universidade de Passo Fundo, BR 285, São José, 99052-900. Passo Fundo, RS. jchaves@upf.br

do DNA das proteínas da cromatina, reagentes como fenol e/ou clorofórmio para a desnaturação das proteínas, agentes antioxidantes (ex. β -mercaptoetanol) para evitar a oxidação de polifenóis e inibição da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, etanol para limpeza e precipitação do DNA e enzima RNase para digestão e eliminação do RNA (BONATO, 2008).

Uma importante doença que afeta o trigo, principalmente nas regiões quentes e úmidas dos cerrados do Brasil, é a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, provocando lesões tanto na folha quanto na espiga de trigo, impedindo o desenvolvimento adequado do grão e causando grandes perdas na produção das lavouras. Um estudo de cinco anos no estado do Mato Grosso do Sul registrou perdas médias no rendimento de grãos do trigo na ordem de 32% e dependendo da época de infecção, perdas em peso por espiga, de até 74% (GOULART et al., 2007). Existem trabalhos utilizando marcadores moleculares de *M. oryzae* em arroz, de interação patógeno-hospedeiro, visando à identificação dos genes da planta relacionados com os diferentes níveis de resistência à doença (FAIVRE-RAMPANT et al., 2008; ZHENG et al., 2011). Entretanto, com trigo ainda há poucos estudos utilizando essa ferramenta, tal como de diversidade da espécie e da interação *M. oryzae*/trigo (CRUZ et al., 2009). Assim, é de suma validade a exploração dessas linhas de pesquisa com este patossistema.

Para a extração de DNA de *Magnaporthe* spp. têm sido desenvolvidos ou adaptados vários métodos. A técnica mais comumente usada se deriva do método de Specht et al. (1982), mas sempre tendo o crescimento do micélio em meio líquido (BRONDANI et al., 2000; CRUZ et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011). Sweigard et al., (1990) desenvolveram um procedimento para isolamento de DNA genômico de *M. grisea*. Esse método se caracteriza pela remoção enzimática da parede celular e a lise de protoplastos, eliminando a necessidade de maceração do micélio com nitrogênio líquido para a extração do DNA. Outro método simples, reportado por Tendulkar et al., (2003) é baseado no tratamento da biomassa seca de *M. grisea* pela radiação de micro-ondas. Conforme os autores, a quantidade de DNA obtida foi suficiente para a análise de PCR e hibridização dot blot. O DNA obtido pode

ser usado na obtenção de dados de marcadores moleculares visando diferentes estudos, tais como fingerprinting de DNA, para estudar a estrutura da população do fitopatógeno em diferentes regiões e para uma triagem rápida de *M. grisea* geneticamente modificado.

O método de extração usando o crescimento do fungo em meio líquido também vinha sendo utilizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo. Entretanto, tal método, quando aplicado a um número elevado de amostras, torna o tempo de execução extremamente extenso, devido a diversas condições como: tempo necessário para preparo do meio de crescimento e esterilização de vidrarias, ocorrência de contaminações durante os repiques (retirada do fungo da placa de crescimento inicial para o meio líquido de crescimento), o tempo de crescimento do fungo em meio líquido podendo variar entre cinco e dez dias; necessidade de filtragem, lavagem e secagem da massa micelial obtida, podendo, demandar um dia inteiro de trabalho para um número de 24 amostras somente para essa etapa.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos otimizar, comparar e validar um método que demande um tempo menor para a obtenção do micélio e disponibilizar um método que forneça DNA de *M. oryzae* de qualidade, adequado para aplicação em técnicas de PCR para marcadores moleculares de microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeat), comumente usados para a avaliação da variabilidade entre isolados de fungos, bem como para outros marcadores de DNA.

Material e Métodos

Amostragem

Foram selecionadas seis amostras entre uma população de 576 isolados do fungo *Magnaporthe oryzae*, coletados em diferentes estados e Distrito Federal do Brasil:

- Py 12.1.050 - Goiás
- Py 12.1.212 - Mato Grosso do Sul
- Py 12.1.179 - Rio Grande do Sul
- Py 12.1.109 - Brasília
- Py 12.1.094 - Minas Gerais
- Py 5002 - Rio Grande do Sul

Os isolados foram repassados pela equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo, estando eles em placas de Petri, tendo sido crescidos em meio de crescimento de aveia e ágar (Anexo 1), em estufa a 25 °C durante sete dias.

Obtenção do micélio de *M. oryzae* para extração de DNA

A partir das placas contendo os isolados em meio sólido, foi desenvolvido o trabalho de obtenção de DNA via repique do fungo para meio líquido, denominado nesse trabalho como “método Convencional” e a obtenção do DNA a partir do fracionamento do fungo direto da placa, denominado nesse trabalho como “método Otimizado”.

Obtenção de micélio do fungo para extração de DNA através de crescimento em meio líquido (método Convencional)

Condições de crescimento

A obtenção da massa micelial foi feita pelo crescimento do fungo em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio completo líquido e incubação em shaker a 25 °C e 125 rpm (rotações por minuto) por cinco a dez dias.

Preparo do meio completo

O meio foi preparado segundo Pontecorvo et al. (1953), modificado por Azevedo et al. (1973), conforme apresentado na Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 6,8.

Tabela 1. Preparo do meio de crescimento para 350 mL de solução.

Substância	Concentração (g L ⁻¹)
NaNO ₃	6
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
NH ₄ Cl	3
FeSO ₄	0,01
ZnSO ₄	0,01
Glicose	10

Substância	Concentração (g L ⁻¹)
Sacarose	5
Peptona	2
Extrato de Levedura	0,5
Caseína Hidrolisada	1,5
Água Destilada	qsp*

* quantidade suficiente para.

Esterilização do meio

Após preparado o meio e transferido para o frasco Erlenmeyer, os mesmos foram fechados com bucha de algodão, envolvendo a boca do frasco com papel alumínio e autoclavou-se a 120 °C e a 1 atm durante 15 minutos, conforme ilustrado na Fig. 1.



Fig. 1. Autoclave com meio de crescimento a ser esterilizado.

Repique do fungo contido nas placas para meio líquido e crescimento

Em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) foi realizado o repique do fungo contido nas placas de Petri para o frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo o meio líquido (Fig. 2).

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Adicionou-se 50 μL de ampicilina a 100 mg/ml no volume de 50 mL do meio de crescimento, a fim de se prevenir contaminação cruzada com bactérias.

Com um palito de madeira, previamente autoclavado, foram cortados em média seis discos do fungo, com cuidado para não coletar o meio de crescimento sólido da placa, conforme etapas descritas na Fig. 3.

Fig. 2. Capela de fluxo laminar utilizado para o repique de *Magnaporthe oryzae*.

Foto: Jordalan Buffet Muniz

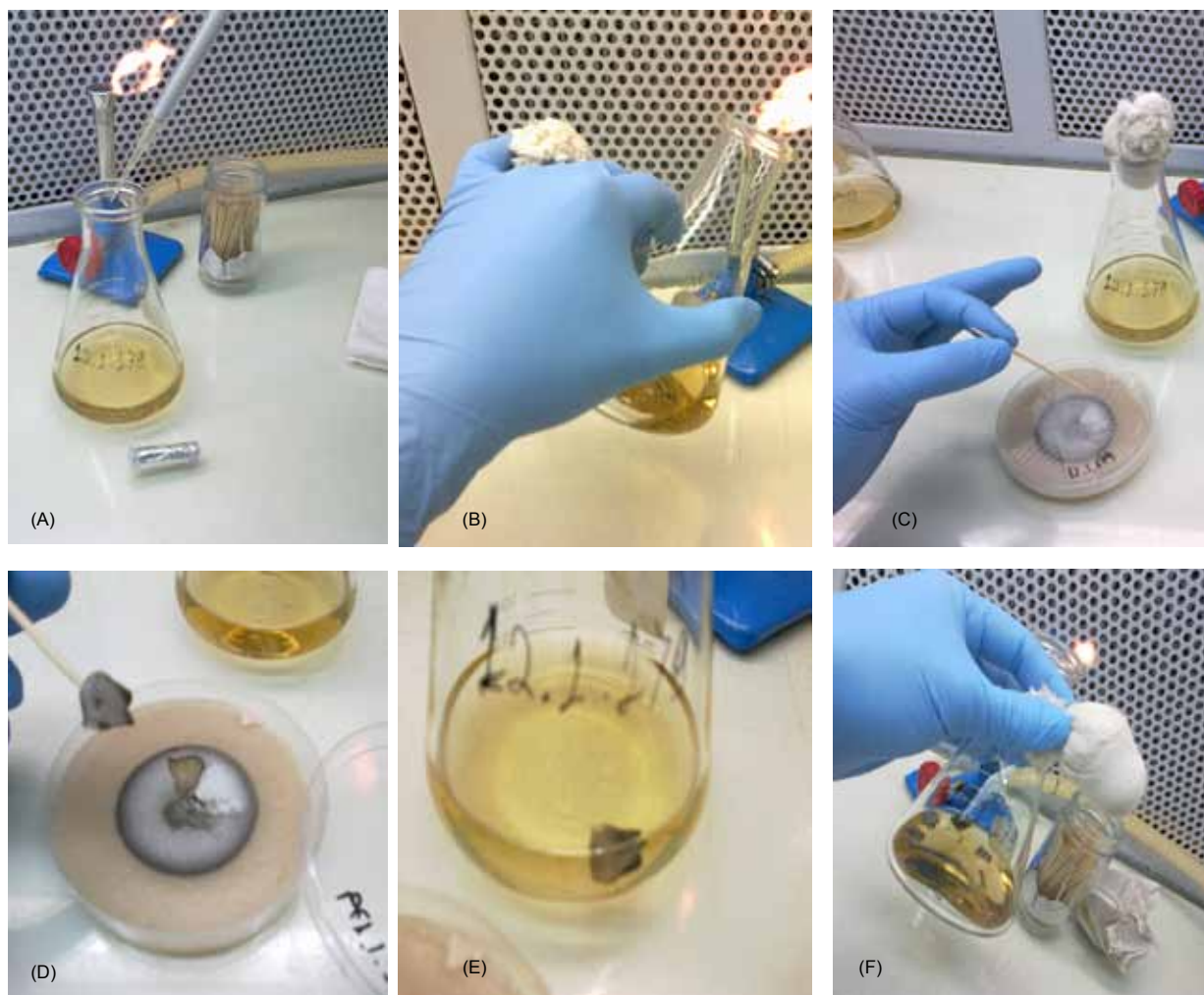


Fig. 3. Etapas do repique do fungo para o meio líquido. (A) Adição de ampicilina no meio de crescimento. (B) Flambagem do frasco Erlenmeyer. (C) e (D) Retirada de discos do fungo com palito estéril. (E) Colocação do disco do fungo no meio de crescimento. (F) Meio de crescimento com vários discos.

Flambou-se a boca do frasco Erlenmeyer que foi fechado com a bucha de algodão (Fig. 4).

Foto: Jordalan Buffet Muniz

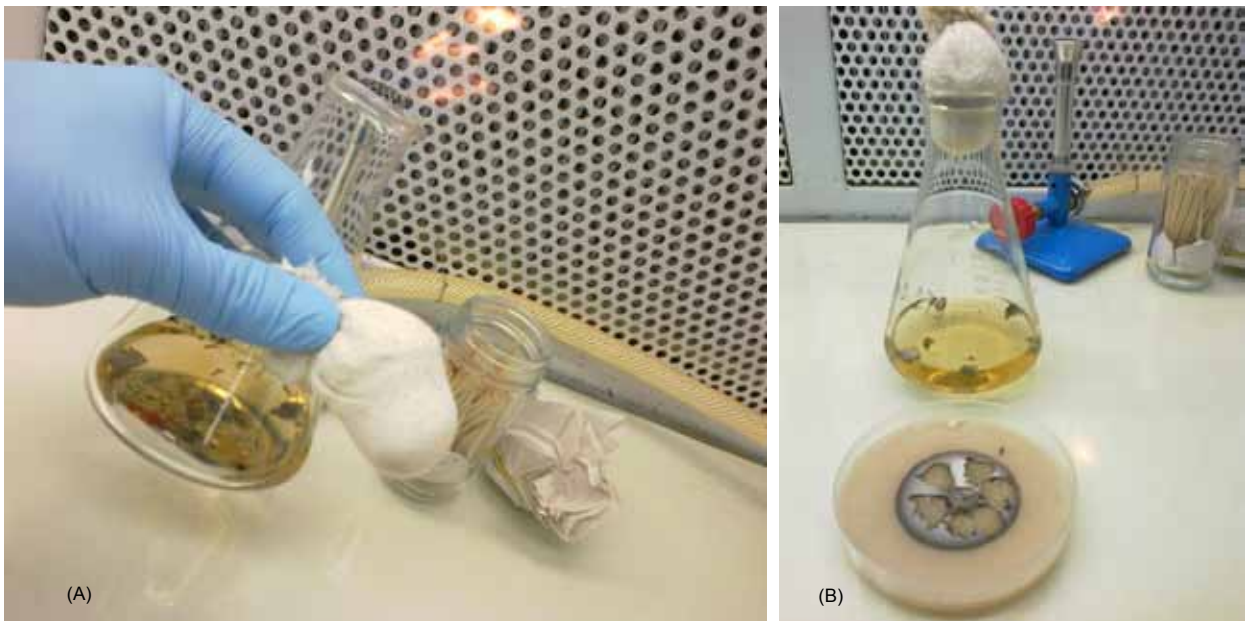


Fig. 4. Flambagem (A) e fechamento (B) do Erlenmeyer.

À medida que os fungos foram repicados, os frascos Erlenmeyer foram identificados (Fig. 5).

extração, prosseguindo-se então, com a filtração e lavagem dos micélios.

Foto: Jordalan Buffet Muniz

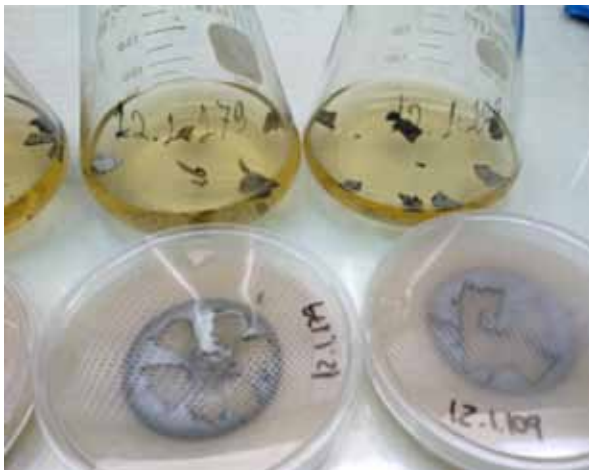


Fig. 5. Identificação dos Erlenmeyer com o código do isolado.

Após concluído o repique, os Erlenmeyer foram mantidos em shaker (Fig. 6) com agitação ajustada para 120 rpm e temperatura mantida em 25 °C. O desenvolvimento da massa micelial foi verificado no decorrer dos dias (Fig. 7). A partir de dez dias de incubação (Fig. 7c), foi obtida a quantidade de massa micelial necessária para a

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 6. Shaker com frascos Erlenmeyer contendo cultura de *Magnaporthe oryzae* em meio líquido.



Fig. 7. Crescimento de *Magnaporthe oryzae* em meio líquido. (A) Terceiro dia de incubação. (B) Sexto dia de incubação. (C) Décimo dia de incubação.

Filtragem e lavagem da massa micelial

Em pano de algodão (gaze) e com o auxílio de funil foi feita a filtragem da massa micelial (Fig. 8).



Fig. 8. Filtragem da massa micelial de *Magnaporthe oryzae* em frasco Erlenmeyer com gaze.

Foram feitas três lavagens, utilizando-se água destilada, para remoção do o meio líquido de crescimento para o frasco Erlenmeyer (Fig. 9).

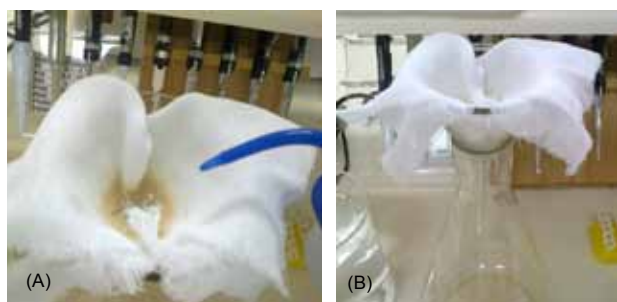


Fig. 9. Lavagem da massa micelial (A) Borrifamento com água destilada. (B) Remoção do líquido.

O pano de filtragem foi dobrado e foi realizada

pressão mecânica a fim de remover a maior quantidade de água possível (Fig. 10).

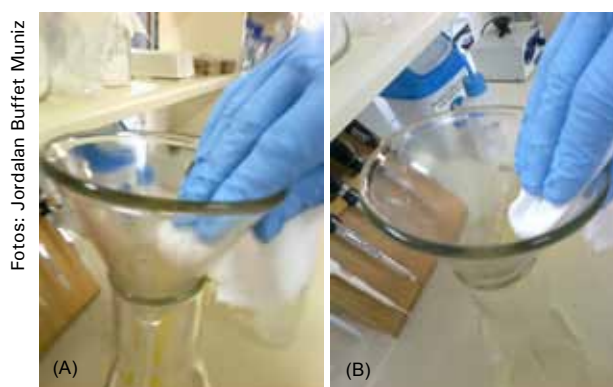


Fig. 10. Remoção do excesso de líquido. (A) Dobra da gaze. (B) Pressão mecânica.

Secagem e retirada da massa micelial seca para tubos de maceração

Utilizando papel absorvente de folha tripla, realizou-se a secagem da massa micelial até o desprendimento da mesma do pano (Fig. 11).

Com uma espátula, foi realizado o corte de frações da massa micelial, em forma de tiras, transferindo-se para tubos de polipropileno 2,0 mL, contendo três esferas de aço inox, de 2,3 mm de diâmetro, utilizados para maceração (Fig. 12). As massas dos conjuntos tubo/esferas foram previamente medidas a fim de se calcular, posteriormente, a massa micelial contida em cada tubo.

Os seis isolados foram preparados em quintuplicata, sendo que a massa micelial remanescente foi acondicionada em papel alumínio e identificada como contra-amostra (Fig. 13).

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 11. Etapas de secagem da massa micelial. (A) Massa micelial no pano de filtragem sobre o papel absorvente. (B) Envolvimento do pano junto à massa micelial com o papel absorvente. (C) pressionamento do papel para secagem da massa micelial. (D) Desprendimento da massa micelial do pano.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz

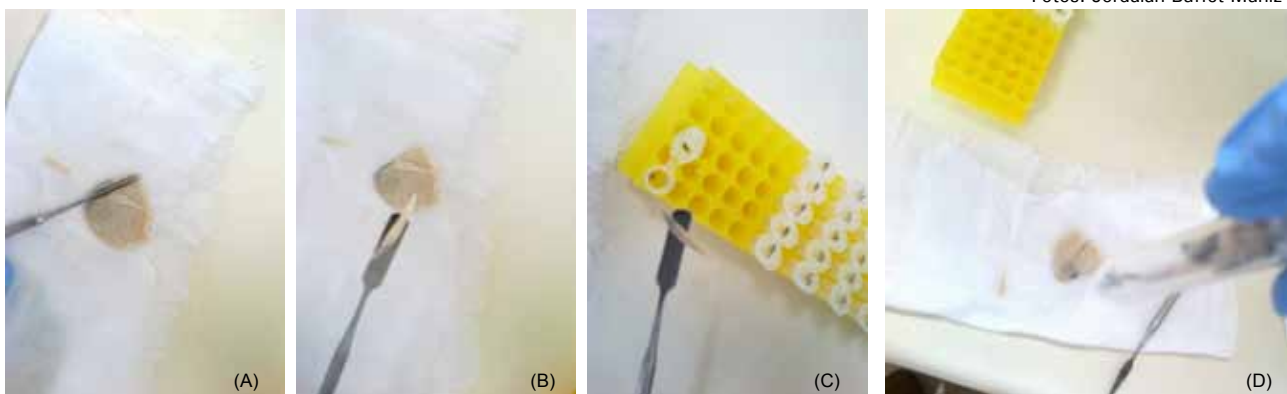


Fig. 12. Etapas de fracionamento da massa micelial e transferência para tubos de maceração. (A) e (B) Corte da fração micelial em tiras. (C) e (D) Transferência para tubos com três esferas de aço inox.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 13. Preparo de contra-amostras. (A) Contra-amostras acondicionadas em papel alumínio, (B) identificadas e (C) armazenadas.

Medida da massa micelial contida em cada tubo

A massa micelial transferida para cada tubo foi medida em balança analítica (Tabela 2).

Armazenamento das amostras para posterior extração

Congelou-se as amostras contidas na caixa de armazenamento utilizando-se nitrogênio líquido e, após, armazenou-se as amostras em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 14).

Realizou-se autoclavagem da vidraria e do meio de crescimento filtrado e posteriormente a lavagem da vidraria utilizada.

Retirada de micélio direto da placa para extração do DNA (método Otimizado).

Em tubos contendo esferas de maceração, previamente pesados e autoclavados, foram adicionadas três frações em forma de tiras da massa micelial contidas nas placas repassadas pelo Laboratório de Fitopatologia.

Tabela 2. Massa de micélio/tubo (mg) - método Convencional.

Identificação	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
I 01 Py 12.1.212	213,9	232,3	262,7	349,0	291,6
I 02 Py 12.1.050	186,7	186,7	257,3	193,7	186,4
I 03 Py 12.1.109	247,0	211,5	194,9	130,0	99,6
I 04 Py 12.1.179	244,6	242,2	210,6	222,6	195,7
I 05 Py 12.1.094	205,2	248,7	270,2	213,4	247,4
I 06 Py 5002	282,4	214,5	237,8	184,5	201,8

Fotos: Jordalan Buffet Muniz

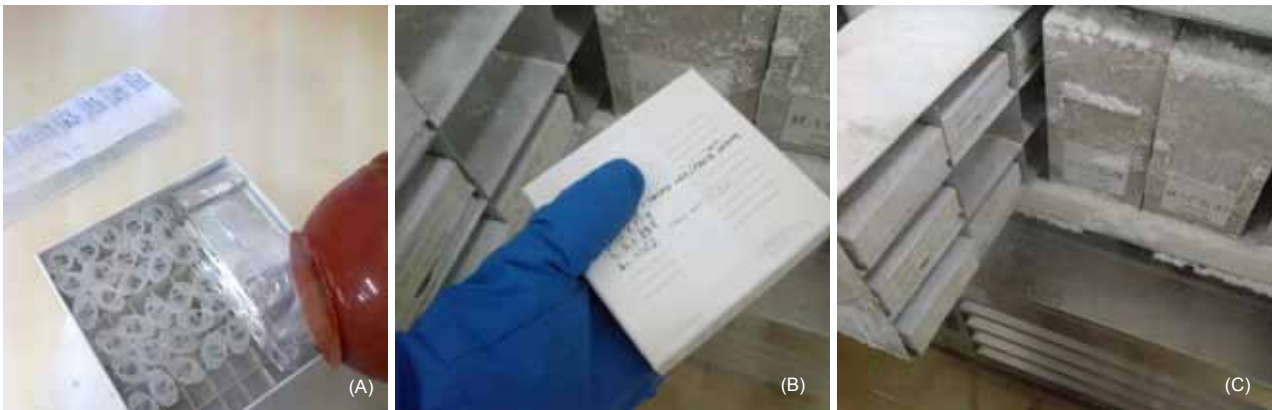


Fig. 14. (A) Congelamento das amostras com nitrogênio líquido e (B), (C) armazenamento das amostras em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foram utilizados palitos de madeira, previamente autoclavados, para realizar a tarefa. Tomou-se o cuidado de retirar o meio de crescimento quando o mesmo ficava aderido à massa micelial, de forma a se transferir apenas os micélios para os tubos. O procedimento foi realizado em câmara

de fluxo laminar (Fig. 15).

Da mesma forma que para o procedimento convencional, as amostras foram fracionadas em cinco repetições.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz

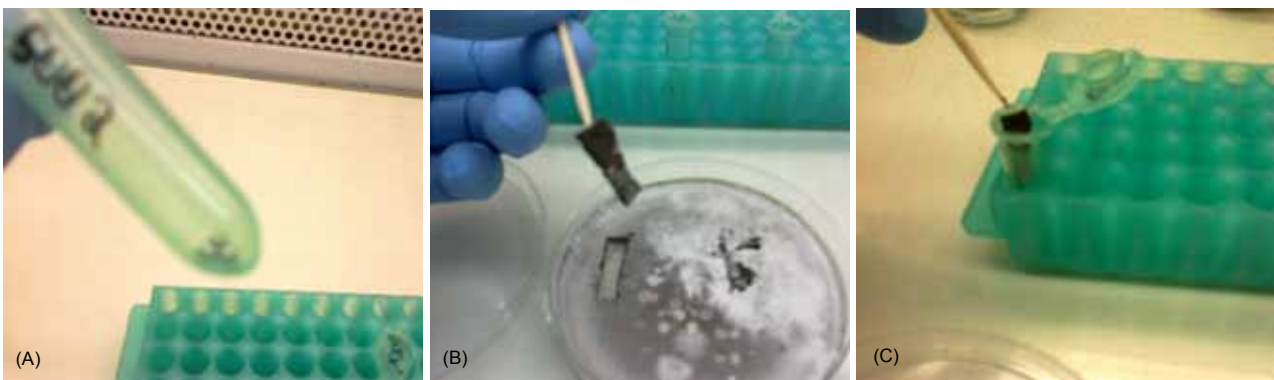


Fig. 15. Etapas do fracionamento direto da placa de crescimento para os tubos de maceração. (A) Tubo contendo três esferas de maceração de 2,3 mm de diâmetro. (B) Retirada do fungo da placa utilizando-se palito de madeira. (C) Acondicionamento de fungo no tubo.

Mediu-se a massa micelial transferida para cada tubo em balança analítica (Tabela 3), acondicionou-se os tubos em caixa devidamente

identificada e estocou-se o material em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração do DNA.

Tabela 3. Massa de micélio/tubo (mg) - método Otimizado.

Identificação	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
I 01 Py 12.1.212	239,9	383,5	294,3	280,5	258,3
I 02 Py 12.1.050	348,1	396,9	394,7	412,7	417,7
I 03 Py 12.1.109	349,8	375,0	329,3	351,0	300,4
I 04 Py 12.1.179	352,5	381,1	319,4	315,8	333,4
I 05 Py 12.1.094	351,9	417,0	361,4	367,5	365,9
I 06 Py 5002	369,9	323,2	282,6	282,6	367,8

Extração de DNA

Após obtida a massa micelial através dos dois procedimentos, realizou-se a extração do DNA através do método já implantado no laboratório (Anexo II), sendo que foram necessárias adaptações (alterações grafadas em **negrito**), que fizeram parte da otimização do processo de extração. Foram realizadas duas extrações para cada procedimento, sendo que a primeira foi composta por 12 amostras e a segunda de 18

amostras restantes.

Protocolo de extração de DNA ajustado

1- As amostras contidas nos tubos com esferas foram **maceradas no equipamento *Mini-BeadBeater*[®] marca *Biospec Products*[®]**, durante dois minutos, utilizando-se como suporte dos tubos o bloco de aço inoxidável congelado em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 16).

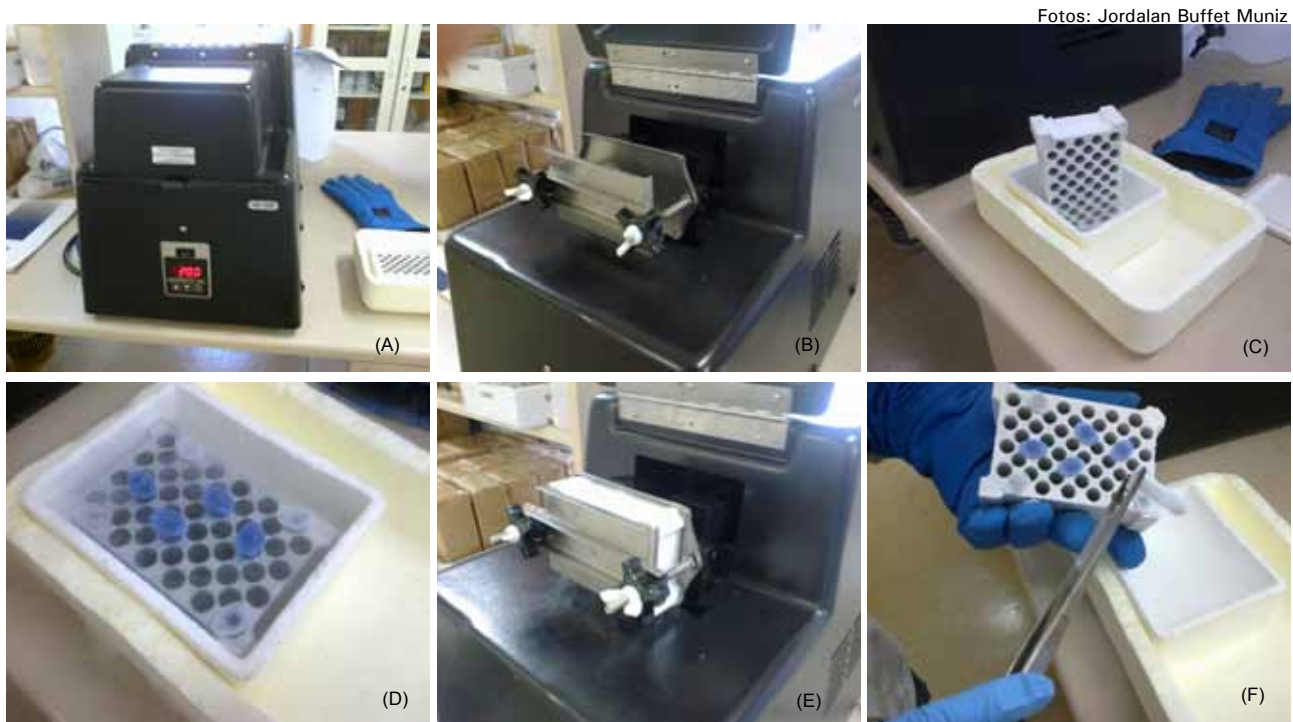


Fig. 16. Etapas de maceração em equipamento *Mini-BeadBeater*[®]. (A) Equipamento para maceração, (B) Parte interna do equipamento, (C) Suporte dos tubos, congelados com nitrogênio líquido, (D) Tubos com amostras inseridas no suporte de aço, (E) Suporte com amostras preso ao equipamento, (F) Tubos com amostras retiradas do suporte e mantidas congeladas no nitrogênio líquido.

2- A cada amostra, ainda congelada, foi adicionado **1000 μL de tampão de extração** (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; SDS 2%) = (5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 + 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 + 10 mL de SDS 20% ou 2

g de SDS em pó + água ultra pura (Milli-Q[®]) em quantidade suficiente para 100 mL de solução) e 10 μL de proteinase K (20 mg mL⁻¹), aplicou-se vortex para mistura do tampão com a massa micelial, conforme Fig. 17.

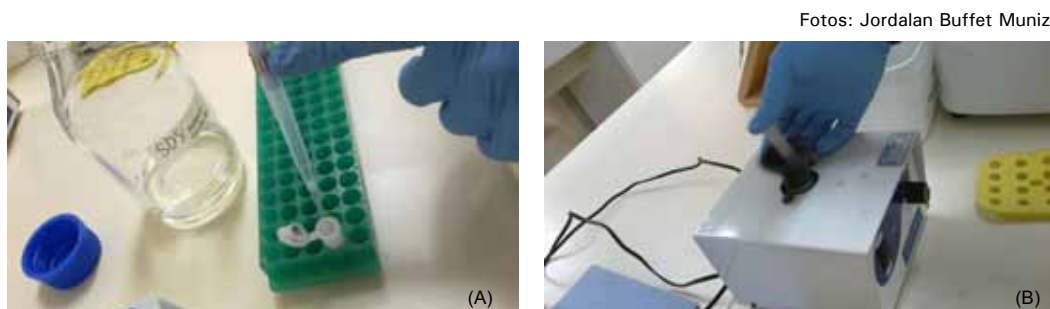


Fig. 17. (A) Adição de tampão de extração com Proteinase K e (B) mistura da solução com vortex.

3- As amostras ficaram incubadas por 30 minutos a temperatura entre 65 - 70°C (Fig. 18).

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 18. Incubação das amostras em banho-maria a 65 °C por 30 min. Obs: Agitou-se o tubo com a amostra a cada 5 minutos para homogeneizar a solução.

4- Adicionou-se **400 µL de acetato de potássio 5,0 M** (29,44 g de acetato de potássio + 11,5 mL de ácido acético glacial + água ultra pura em quantidade suficiente para 100 mL), conforme Fig. 19.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 19. Adição de 400 µL de acetato de potássio 5,0 M.

5- Incubou-se em gelo por 30 minutos, conforme Fig. 20.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 20. Incubação em gelo por 30 minutos.

6- Centrifugou-se a **12.000 rpm por 10 minutos**, conforme Fig. 21.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 21. (A) Centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e (B) formação de duas fases.

7- O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Eppendorf de 2 mL, conforme Fig. 22.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 22. Transferência do sobrenadante para novo tubo.

8– Adicionou-se **500 μ L de fenol-clorofórmio (1:1)** e os tubos foram invertidos suavemente por cinco minutos alternando entre temperatura ambiente e gelo (Fig. 23). (obs.: pode-se usar clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 ao invés do fenol, no entanto o fenol é mais eficiente na limpeza do DNA).

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 23. (A) Adição de 500 μ L de fenol-clorofórmio e (B) homogeneização da solução.

9– Centrifugou-se a **12.000 rpm por 10 minutos a 4°C**.

10– A fase aquosa (volume máximo de **1000 μ L**, evitando-se a fração branca contendo proteínas) foi transferida para um novo tubo tipo de polipropileno de 2 mL, conforme Fig. 24.

11– Adicionou-se **300 μ L de acetato de amônio 7,5 M** e **700 μ L de isopropanol gelado a -20 °C**.

12– Inverteu-se o tubo suavemente até para a precipitação do DNA.

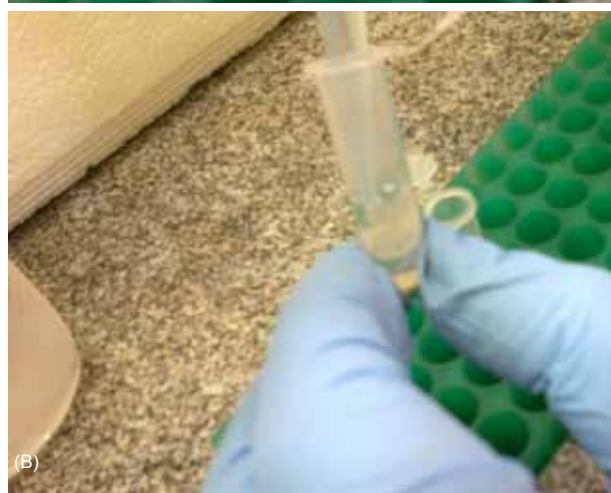


Fig. 24. (A) Retirada do sobrenadante e (B) transferência para novo tubo.

13– Incubou-se a **-80°C por 3 minutos** para aceleração da precipitação do DNA, conforme Fig. 25.

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 25. Aceleração da precipitação do DNA a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos.

14– Centrifugou-se a **12.000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$** , com formação do pellet de DNA (Fig. 26).

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 26. Pellet de DNA.

15– Descartou-se o sobrenadante e adição de **$500\text{ }\mu\text{L}$ de etanol 70% gelado $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$** .

16– Centrifugou-se a **12.000 rpm por cinco minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$** , descartou-se o sobrenadante e o excesso de etanol foi escorrido deixando o tubo invertido em papel absorvente, conforme Fig. 27.

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 27. Descarte do etanol 70%.

17– Secou-se o pellet de DNA em equipamento *Speedvac Concentrator*[®], modelo *Savant SPD121P*, Marca *Thermo Scientific*[®] (Fig. 28), à temperatura ambiente durante **15 minutos**.

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 28. Secagem do pellet de DNA em equipamento *Speedvac Concentrator*[®].

18– Adicionou-se $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução de TE 10-1 mM (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0) contendo $1\text{ }\mu\text{L}$ de RNase A ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), para cada amostra.

19– Incubou-se em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

20– Manteve-se as amostras em geladeira a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a quantificação.

Quantificação do DNA

Quantificação do DNA total extraído

Uma alíquota de 5 μL da solução de DNA, foi retirada e misturada 10 μL de stop solution (solução de carregamento - 40% de Sacarose, 25 mg de Xilenocyanol, 25 mg de Azul de bromofenol e 40 mg de Orange G, em um volume de 100 mL) e aplicou-se em gel de agarose 0,8% (p/v) para quantificação visual da concentração do DNA, extraído pelos métodos Convencional e Otimizado. Em cada canaleta foram adicionados marcadores de quantificação de 25 ng, 50 ng, 100 ng e 150 ng para a extração I, composta por 12 amostras, e marcadores de 50 ng, 100 ng e 200 ng para a extração II, composta por 18 amostras. A fonte de eletroforese foi mantida a 120 V por 1 hora (Fig. 29).

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 29. Cubas e fontes de eletroforese.

Os registros fotográficos foram obtidos no equipamento *ChemiDoc™ XRS + System* (Fig. 30), marca *Biorad™*, expondo-se os mesmos à luz ultravioleta e capturando-se a imagem utilizando o *software GelDoc XR™*.

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 30. Equipamento Fotodocumentador *ChemiDoc™ XRS + System*, Marca *Biorad™*.

Foi calculada a estimativa do rendimento teórico da extração nos métodos Convencional e Otimizado. Considerou-se rendimento teórico como sendo a massa de DNA total extraído / Massa dos micélios.

Foi selecionado um tubo de cada isolado, extraído pelos dois métodos, e realizou-se a diluição para a concentração de 5 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, que é a diluição padrão utilizada nos testes de PCR.

Verificação via PCR da qualidade do DNA obtido

Marcadores Moleculares

Para a realização da PCR foram utilizados quatro pares de primers que amplificam os marcadores microssatélites, desenvolvidos especificamente para *M. oryzae* do trigo (PEREIRA et al., 2014) e cada marcador é associado a um fluoróforo diferente:

- P11_cnpt_mg_C060 combinado com o fluoróforo VIC (verde);
- P12_cnpt_mg_C065 combinado com o fluoróforo FAM (azul);

- P18_cnpt_mg_C129 combinado com o fluoróforo PET (vermelho);
- P25_cnpt_mg_C211 combinado com o fluoróforo NED (amarelo).

Um exemplo de planilha com os reagentes e respectivas concentrações utilizados para preparo da PCR é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Reagentes e respectivas concentrações utilizados nas PCR.

Componentes da Reação	Solução Estoque	Concentração final na reação	Volume na reação de 10 μL	Volume para 20 reações
H ₂ O ultra pura			2,2 μL	44 μL
Tampão PCR	10 x	1 x	1,0 μL	20 μL
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	0,5 μL	10 μL
dNTPs	2,5 mM ¹	0,2 mM	0,8 μL	16 μL
Primer – Reverse	10 μM	0,2 μM	0,2 μL	4 μL
Primer – Forward – M13 ²	1 μM	0,02 μM		
Primer M13 – Dye ³	10 μM	0,2 μM	0,2 μL	4 μL
Taq Polimerase	5 U. μL^{-1}	0,5 U	0,1 μL	2 μL
DNA	5 ng. μL^{-1}	25 ng	5,0 μL	
TOTAL Mix			5 μL	

¹ Concentração de cada nucleotídeo (A, T, C, G).

² Primer Forward do marcador, adicionado de cauda com sequência idêntica ao primer M13 marcado com fluoróforo.

³ Primer M13 contendo fluoróforo (VIC, FAM, PET ou NED).

Condições de termociclagem

Após preparada a placa de reação (Fig. 31), a mesma foi vedada e colocada no equipamento *Termociclador GeneAmp® PCR System 9700* marca Applied Biosystems® (Fig. 32), seguindo o programa descrito na Tabela 5.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 31. (A) Tubos e placas para PCR e (B) Material para montagem da placa de reação.

Foto: Jordalan Buffet Muniz



Fig. 32. Termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* marca *Applied Biosystems®*.

Tabela 5. Programa de termociclagem.

Programa <i>TouchDown</i> 60-56		
95 °C	3 min	
94 °C	25 s	} 5 vezes (-1 °C por vez)
60 °C	25 s	
72 °C	25 s	
94 °C	25 s	} 29 vezes
56 °C	25 s	
72 °C	25 s	
72 °C	10 min	
10 °C	∞	

Retirou-se uma alíquota de 3 μL de cada reação de PCR (P11_npt_mg_C060-VIC, P12_cnpt_mg_C065-FAM, P18_cnpt_mg_C129-PET, P25_cnpt_mg_C211-NED) versus Isolado Py12.1.212 (Py...) e foram misturadas, totalizando 12 μL .

Dessa mistura, uma alíquota de 3 μL foi misturada a 57 μL de água ultra pura (Milli-Q®), totalizando 60 μL .

Posteriormente, retirou-se 3 μL e transferiu-se para uma placa contendo 7 μL da solução contendo marcador de peso molecular Liz 500 : formamida (10 μL : 660 μL), totalizando um fator de diluição de 267X.

Eletroforese Capilar

Multiplex

O multiplex para verificar a amplificação dos marcadores microssatélites foi realizado da seguinte forma:

Corrida de eletroforese em sequenciador automático

A corrida de eletroforese no sequenciador automático ABI3130XL, marca Applied Biosystems® seguiram as recomendações do fabricante e são detalhados na Fig. 33.

Fotos: Jordalan Buffet Muniz

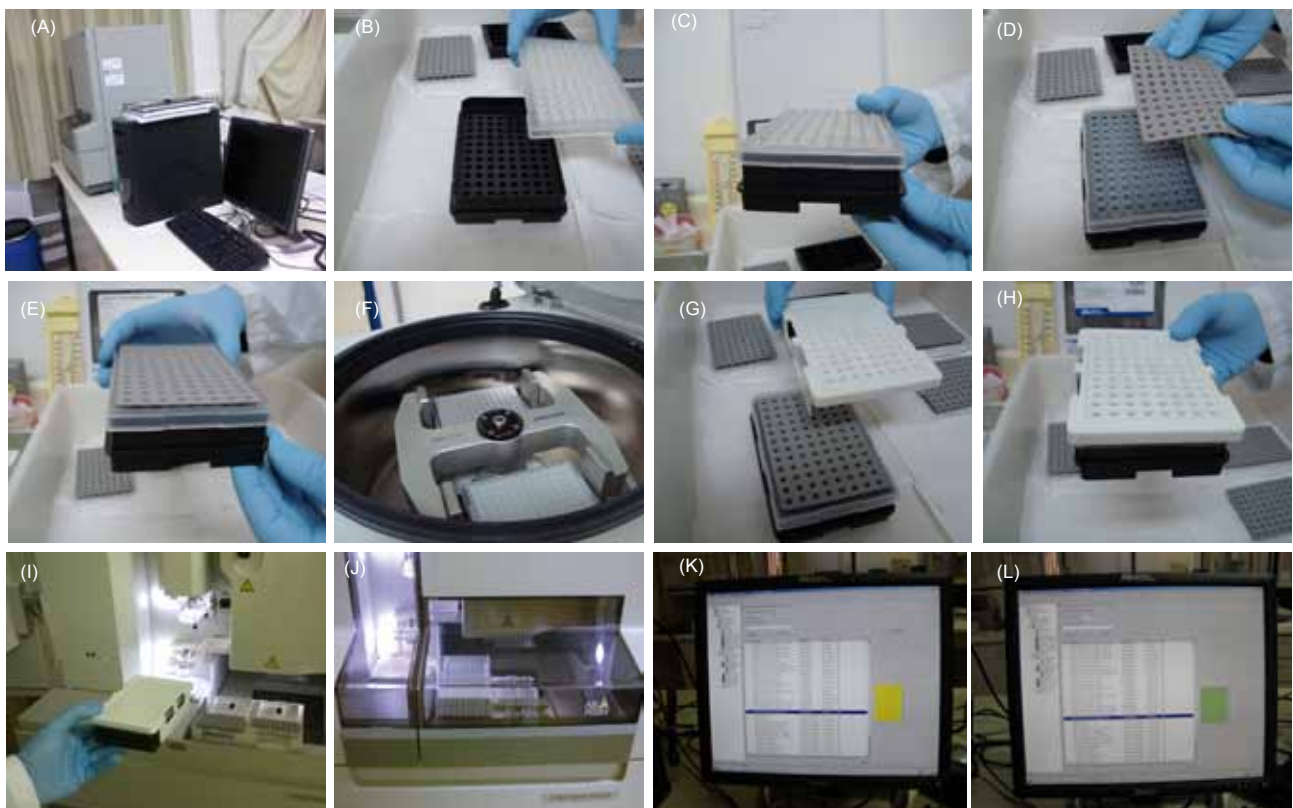


Fig. 33. Procedimentos para corrida de eletroforese capilar no sequenciador. (A) SEQ ABI3130XL. (B) e (C) Encaixe da placa de PCR na PLATE BASE. (D) Substituição da borracha de vedação pela SEPTA. (E) Colocação da SEPTA. (F) Centrifugação breve para eliminação de bolhas. (G) e (H) Colocação da PLATE RETAINER. (I) Colocação da placa no sequenciador. (J) Placa colocada no sequenciador. (K) e (L) Ligação da placa pendente no programa.

Resultados

Teste de Extração I: Comparação entre os métodos Convencional e Otimizado

O DNA de isolados de *M. oryzae*, extraído pelos métodos Convencional (Fig. 34) e Otimizado (Fig. 35), foram visualizadas e quantificadas em gel de agarose. Foram quantificadas 12 amostras de DNA na extrações I.

Imagem: Jordalan Buffet Muniz

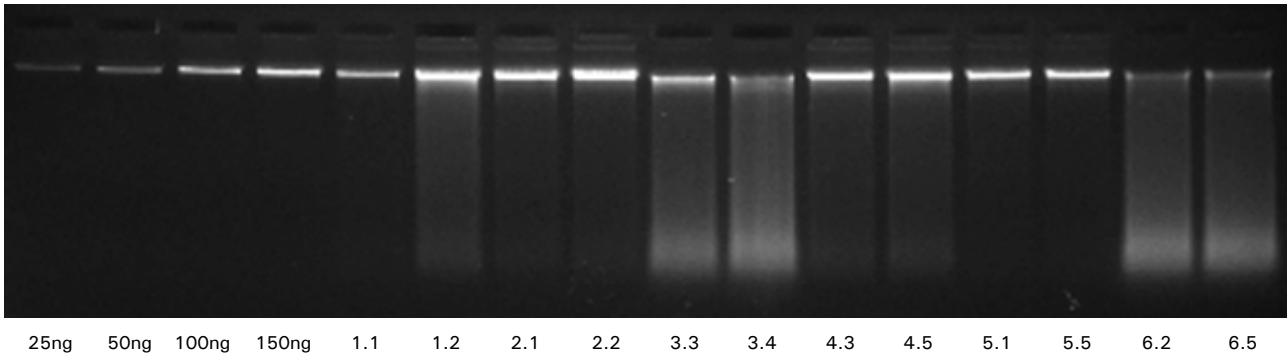


Fig. 34. Teste de Extração I: Quantificação de DNA de isolados crescidos em meio líquido (método Convencional).

Imagem: Jordalan Buffet Muniz

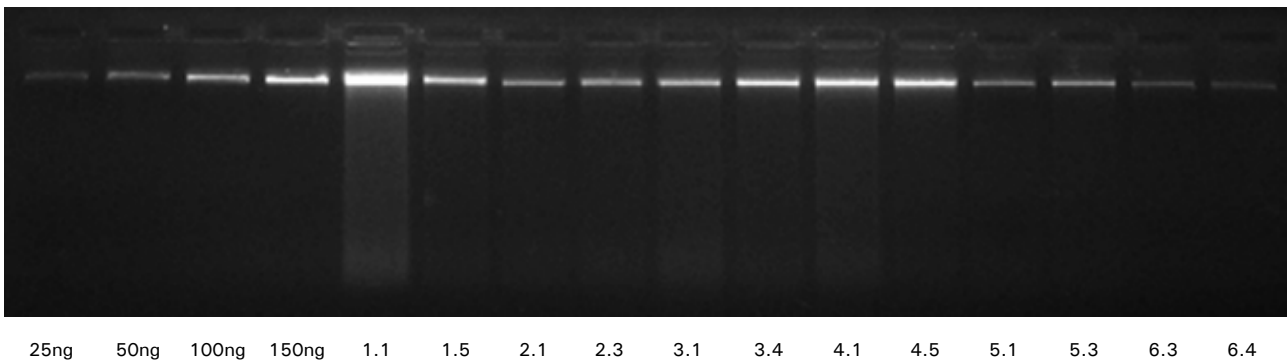


Fig. 35. Teste de Extração I: Quantificação de DNA de isolados retirados direto da placa (método Otimizado).

Teste de Extração II: Comparação entre os métodos Convencional e Otimizado

O DNA de isolados de *M. oryzae*, extraído pelos

métodos Convencional (Fig. 36) e Otimizado (Fig. 37), foram visualizadas e quantificadas em gel de agarose. Foram quantificadas 18 amostras de DNA nas extrações II.

Imagem: Jordalan Buffet Muniz

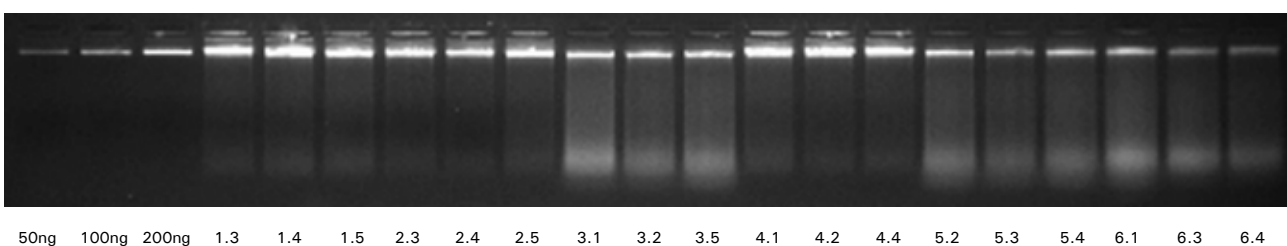


Fig. 36. Teste de Extração II: Quantificação de DNA de isolados crescidos em meio líquido (método Convencional).

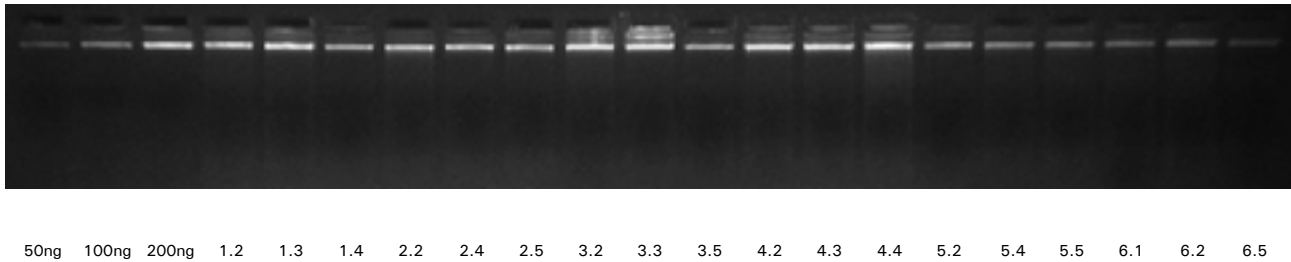


Fig. 37. Teste de Extração II: Quantificação de DNA de isolados retirados direto da placa (método otimizado).

A massa de micélio utilizada no método Convencional variou de 0,1 a 0,35 g e no método Otimizado variou de 0,24 a 0,42 g e o valor estimado pelos géis de quantificação variaram de 1 a 12 μg nos dois métodos. Embora não tenha sido verificado em equipamentos que avaliem este parâmetro, sugere-se que a qualidade do DNA obtido no Otimizado seja melhor, visto que há menos amostras com rastro de possível degradação do DNA do que no Convencional.

O rendimento teórico das extrações entre os métodos está representado na Fig. 38. Foi obtido, aproximadamente, o dobro do rendimento para o método Convencional (Média = 33,28 $\mu\text{g.g}^{-1}$), em relação ao método Otimizado (Média = 15,75 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Entretanto, mesmo com o rendimento teórico menor, o método Otimizado é viável,

pois, mesmo para os tubos 6.4 e 6.5, que apresentaram o menor rendimento teórico, com 3,54 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 2,72 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, obteve-se 1 μg de DNA total extraído. Essa quantidade de DNA é suficiente para, por exemplo, a execução de um projeto no qual se necessita 25 ng para cada reação de PCR e se o projeto propõe a análise de 32 marcadores moleculares frente uma população de 576 isolados, totalizando, portanto, 32 reações de PCR a serem executadas, consumindo assim, 0,8 μg de DNA.

Conforme demonstrado nos Fluxogramas (Fig. 39 e 40) verifica-se a principal vantagem do método Otimizado sobre o método Convencional: "menor tempo necessário até a obtenção do DNA".

Para exemplificar, tendo em vista a necessidade de extrair, por exemplo, 576 isolados para execução de um projeto, utilizando o método

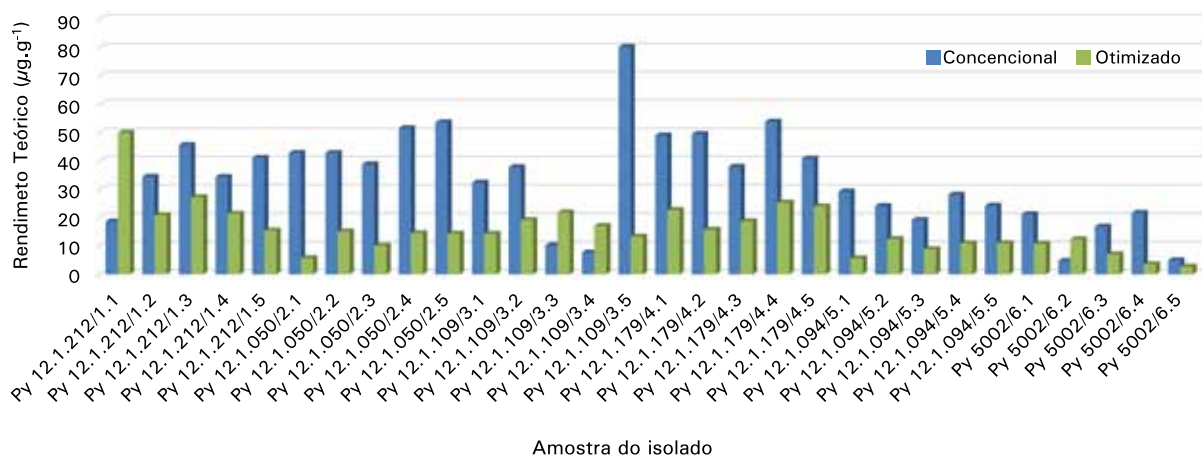


Fig. 38. Rendimento teórico das extrações de DNA dos isolados de *M. oryzae* nos métodos Convencional e Otimizado.

Convencional, o tempo demandado seria de 312 dias (576 isolados/24 isolados a cada 13 dias), enquanto que, para o método Otimizado o tempo necessário para extrair o mesmo número de isolados é de 36 dias (576 isolados/24 isolados a cada um dia e meio).

- Tempo total necessário para obtenção do DNA utilizando-se o Método Convencional:

o 240 horas de incubação (dez dias) + 24 horas de atividades

o Total de 13 dias (para 24 amostras).

- Tempo total necessário para obtenção do DNA utilizando-se o Método Otimizado:

o 11 horas, aproximadamente um dia e meio (para 24 amostras).

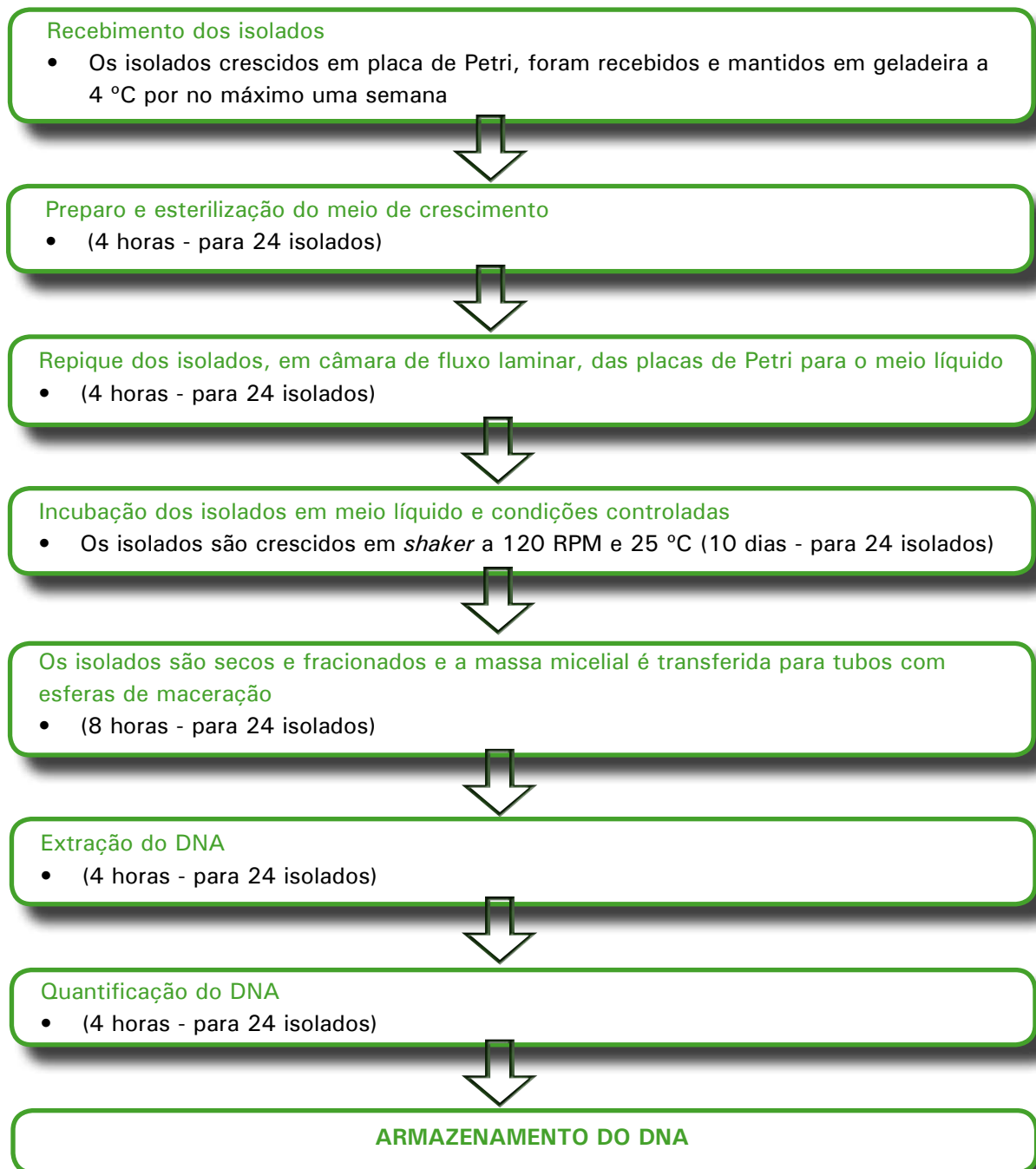


Fig. 39. Fluxograma da obtenção do DNA pelo método Convencional.

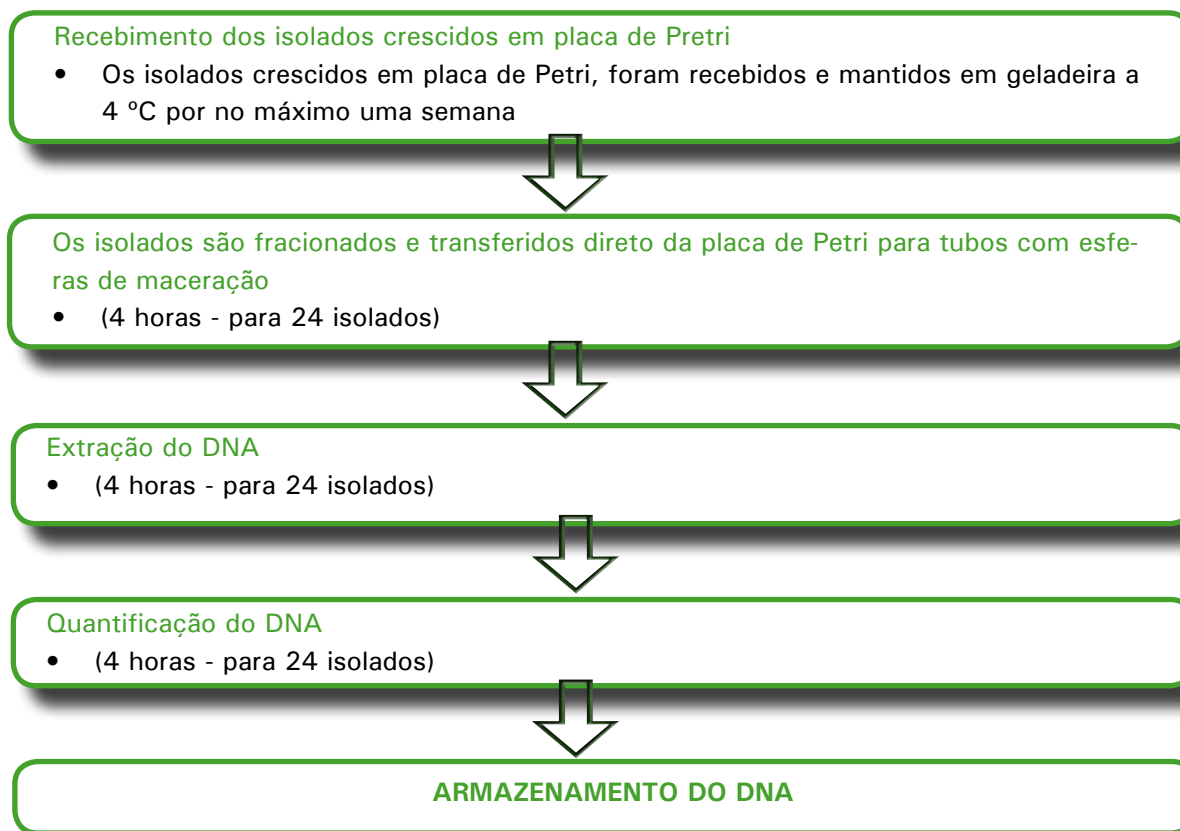


Fig. 40. Fluxograma da obtenção do DNA pelo método Otimizado.

Gel de quantificação da diluição de trabalho

A partir da quantificação do DNA concentrado, foram realizadas as diluições para se obter a concentração de trabalho ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Tabela 6).

Conferiu-se a obtenção deste valor nas amostras através de quantificação em gel de agarose 0,8%, voltagem de 120 V, com marcadores de concentração (λ) de 15 ng, 30 ng, 60 ng e 120 ng e aplicados $5 \mu\text{L}$ de DNA (Fig. 41).

Imagem: Jordalan Buffet Muniz

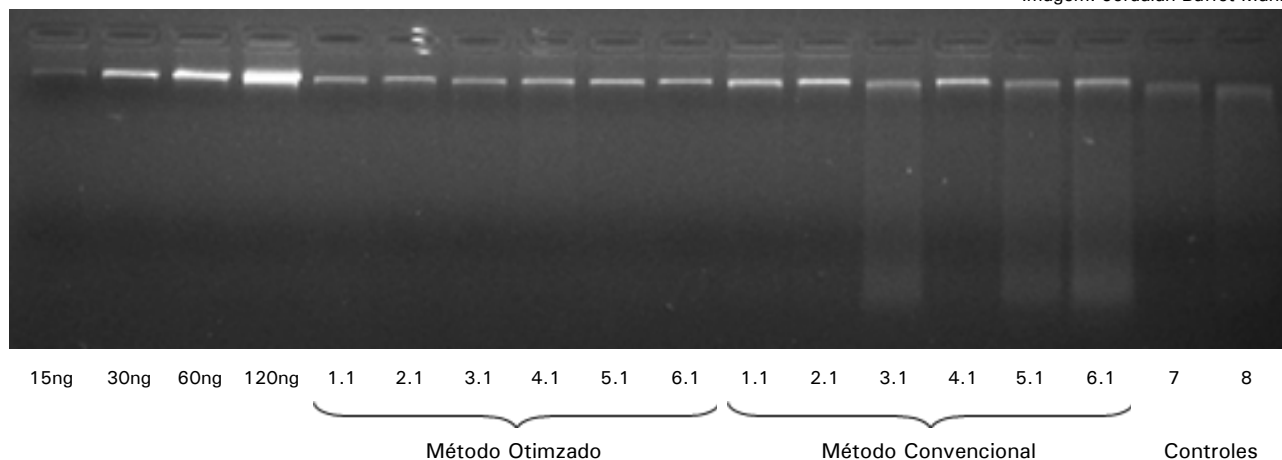


Fig. 41. Gel de quantificação – Diluição de trabalho $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 1.1 – Py12,1,212; 2.1 – Py12,1,050; 3.1 – Py12,1,109; 4.1 – Py1,01,179; 5.1 – Py12,1,094; 6.1 – Py5002; 7 – Py936,1 e 8 – Py0913 – Controle (DNA existente no laboratório, extraído através Método Convencional o qual se tem conhecimento da eficiência da amplificação).

Tabela 6. Cálculo para diluição do DNA para concentração de 5 ng. μL^{-1} .

Método Convencional						
Identificação	Isolado	Tubo	Quantidade de DNA Visualizado em Gel (ng)	Concentração de DNA ¹ (ng μL^{-1})	DNA ² (μL)	TE10-0,2 ³ (μL)
I 01	Py 12.1.212	1.1	100	20	50	150
I 02	Py 12.1.050	2.1	200	40	25	175
I 03	Py 12.1.109	3.1	200	40	25	175
I 04	Py 12.1.179	4.1	300	60	17	183
I 05	Py 12.1.094	5.1	150	30	33	167
I 06	Py 5002	6.1	150	30	33	167

Método Otimizado						
Identificação	Isolado	Tubo	Quantidade de DNA Visualizado em Gel (ng)	Concentração de DNA ¹ (ng μL^{-1})	DNA ² (μL)	TE10-0,2 ³ (μL)
I 01	Py 12.1.212	1.1	300	60	17	183
I 02	Py 12.1.050	2.1	50	10	100	100
I 03	Py 12.1.109	3.1	125	25	40	160
I 04	Py 12.1.179	4.1	200	40	25	175
I 05	Py 12.1.094	5.1	50	10	100	100
I 06	Py 5002	6.1	100	20	50	150

¹ (Quantidade de DNA visualizado no gel) / 5 onde 5 corresponde ao volume de solução de DNA (μL) aplicado ao gel para quantificação;

² Volume da solução de DNA (μL) a ser utilizado para que ao final da diluição se obtenha 5 ng. μL^{-1} e um volume total de 200 μL ;

³ Solução de Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,2 mM, adicionada à solução de DNA para a diluição do mesmo, de modo a ter uma concentração de 5 ng. μL^{-1} em um volume total de 200 μL .

Análises dos eletroferogramas

Verificou-se a eficiência da amplificação dos DNA extraídos através de PCR em sistema de eletroforese capilar.

Na eletroforese capilar a fluorescência emitida pela passagem de um fragmento de DNA marcado pela janela de detecção é registrada por um sistema de microcâmaras sensoras. Os picos (representação do tamanho dos fragmentos) são representados em um eletroferograma.

Os dados foram avaliados através do software *GENEMAPPER® ID - Versão 3.7*, obtendo-se os eletroferogramas. Para fins de ilustração, na Fig. 42 são apresentados exemplos dos resultados com o isolado Py 12.1.094 e os primers *cnpt_mg_c211* e *cnpt_mg_c129*, comparando

os métodos Otimizado e Convencional. Na interpretação, as faixas cinzas dispostas na figura do eletroferograma são marcações de onde pode haver um alelo para aquele primer.

Após análise dos eletroferogramas para os quatro (4) marcadores testados constatou-se que:

As reações entre os DNA extraídos dos dois modos foram eficientes, não havendo nenhuma falha de amplificação para todos os marcadores;

Obteve-se exatamente o mesmo perfil ao comparar o mesmo DNA extraído das duas formas, indicando que o modo de extração não interfere no resultado obtido na corrida de eletroforese.

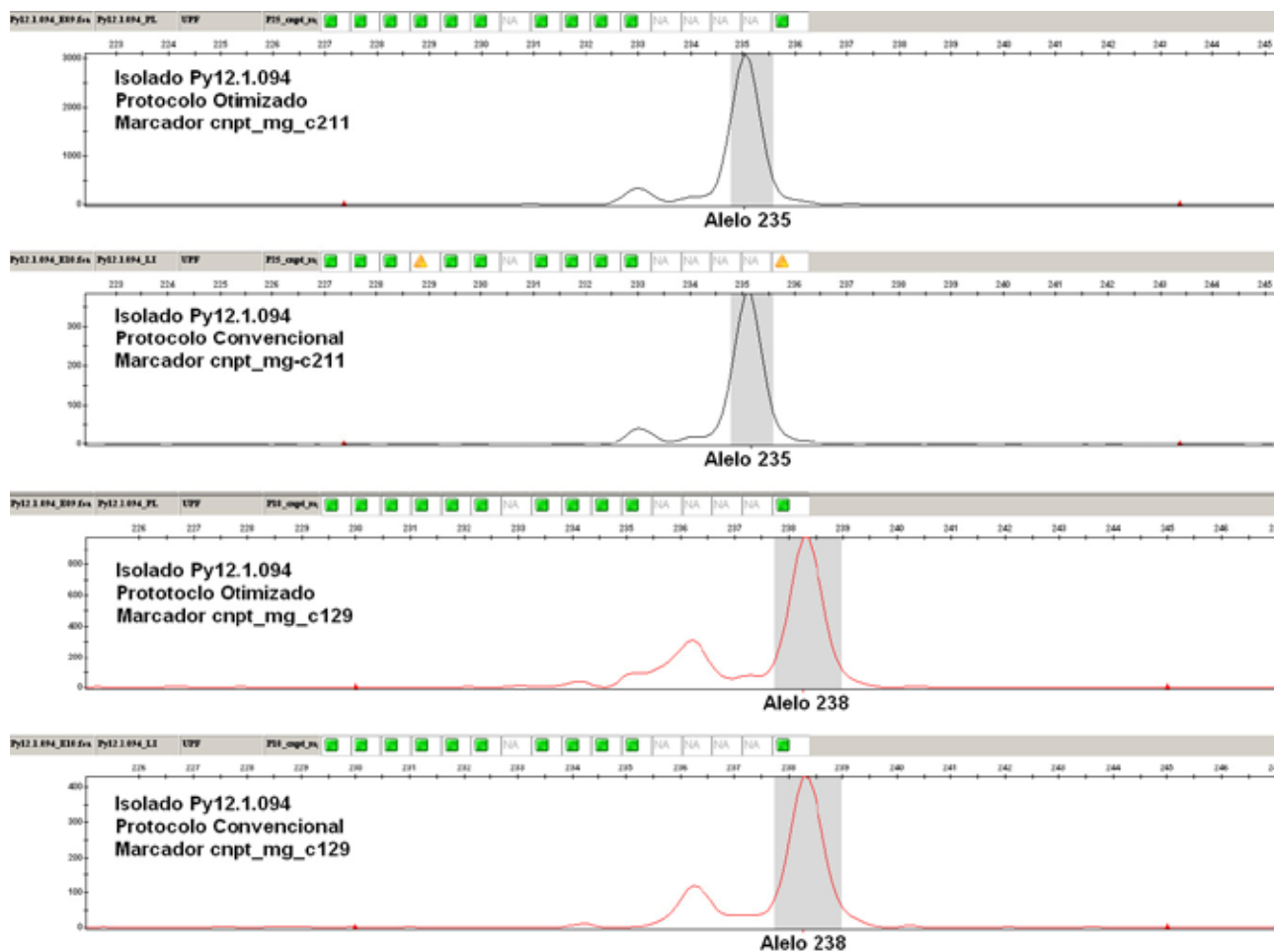


Fig. 42. Perfil comparativo dos métodos Otimizado e Convencional gerado nos eletroferogramas.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o método Otimizado é a melhor alternativa quando comparado ao método Convencional para a extração de DNA de *Magnaporthe oryzae*, tendo em vista que:

Apresenta qualidade superior, demonstrando pouca ou nenhuma degradação;

Possibilita boa eficiência de amplificação via PCR, não havendo modificação entre o perfil apresentado nos eletroferogramas quando comparado com o método Convencional;

Reduz o tempo necessário para a obtenção do DNA dos isolados, reduzindo o período estimado de 13 dias para um dia e meio, considerando 24 amostras.

Referências

- AZEVEDO, J. L. de; COSTA, S. O. P. da (Org.). **Exercícios práticos de genética**: para cursos de graduação e pós-graduação. São Paulo: Companhia Editora Nacional; EDUSP, 1973. 288 p. (Biblioteca Universitária. Série 3, Ciências Puras, 18).
- BONATO, A. L. V. **Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 235). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; GARRIDO, L. R.; FERREIRA, M. E. Development of 431 microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. **Genetics and Molecular**

- Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 753-62, 2000.
- CRUZ, M. F. A.; MACIEL, J. L. N.; PRESTES, A. M.; BOMBONATTO, E. A. S.; PEREIRA, J. F.; CONSOLI, L. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, n. 6, p. 393-401, 2009.
- FAIVRE-RAMPANT, O.; THOMAS, J.; ALLÈGRE, M.; MOREL, J.; THAREAU, D.; NOTTÉGHM, J.; LEBRUN, M.; SCHARRARTH, U.; PIFFANELLI, P. Charaterization of the model system *rice-Magnaporthe* for the study of nonhost resistance in celeals. **New Phytologist**, Oxford, v. 180, n. 4, p. 899-910, 2008.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GONÇALVES, F. J.; MAGALHÃES, M. S.; SILVA-LOBO, V. L.; PRABHU, A. S.; FILIPI, M. C. Comparação entre marcadores moleculares no estudo da variabilidade de *Magnaporthe oryzae*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, p. 539, 2011. 1 CD-ROM. Suplemento. Edição dos resumos do 44º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2011, Bento Gonçalves.
- GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Danos em Trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.
- MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Ed. S. C. K. Milach, 1998a. p. 17-28.
- MILACH, S. C. K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A.; DEL GIUDICE, M. P.; SAKIYAMA, N. S.; SEDIYAMA, T.; MOREIRA, M. A.; PORTUGAL, R. S. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa: UFV, 1998b. p. 43-58.
- PEREIRA, J. F.; CONSOLI, L.; BOMBONATTO, E. A. de S.; BONATO, A. L. V.; MACIEL, J. L. N. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* isolates from wheat from Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v. 52, n. 1/2, p. 52-70, 2014.
- PONTECORVO, G.; ROPER J.; HEMMONS L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. E. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141-238, 1953.
- SPECHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, R. C. A method for extracting high-molecular-weght deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.
- SWEIGARD, J. A.; ORBACH, M. J.; VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. A miniprep procedure for isolating genomic DNA from *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, n. 37, p. 4, 1990.
- TENDULKAR, S. R.; GUPTA, A.; CHATTOO, B. B. A simple protocol for isolation of fungal DNA. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 25, n. 22, p. 1941-1944, 2003.
- ZHENG, Y.; ZHENG, W.; LIN, F.; ZHANG, Y.; YI, Y.; WANG, B. AVR1-CO39 is a predominant locus governing the broad avirulence of *Magnaporthe oryzae* 2539 in cultivated rice *Oryza sativa* L.). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2011.

Anexos

Anexo 1. Meio de Aveia para manutenção e produção de esporos de *Magnaporthe oryzae*.

Ingredientes: Farinha Aveia (Quaker) - 60 g; Ágar - 12 a 15 g; Água destilada - 1000 mL.

Modo preparo: Cozinhar a farinha na água destilada por aproximadamente 1 hora em fogo brando, usar tela de amianto, após completar volume para 1000 mL e autoclavar por 15 minutos a 127 °C, deixar baixar a temperatura/ pressão autoclave naturalmente, para não derramar o meio.

Anexo 2. Protocolo para Extração de DNA Total de *Magnaporthe oryzae* do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo.

1 - Triturar o micélio do fungo em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino tomando-se o cuidado para que não haja descongelamento;

Obs: utilizar cadinho e pistilo de porcelana previamente autoclavados.

2 - Transferir o micélio triturado para tubos eppendorf de 2 mL até encher cerca de 1/3 do tubo. Adicionar 800 μ L de tampão de extração (Tris-HCL 50 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; SDS 2% = 5 mL de Tris-HCL 1 M pH 8,0 + 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 + 10 mL de SDS 20% ou 2 g de SDS em pó + 81 mL de água milli-Q) e 5 à 10 μ L de proteinase K a 20 mg.mL⁻¹;

3 - Incubar a amostra por 30 minutos a 65 °C ou 70 °C;

Obs: Agitar o tubo a cada 10 minutos para homogeneizar a solução.

4 - Adicionar 400 μ L de acetato de potássio 5 M (29,44 g de acetato de potássio + 11,5 mL de ácido acético glacial + completar o volume para 100 mL com água milli-Q);

5 - Incubar em gelo por 30 minutos;

6 - Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos;

7 - Transferir o sobrenadante (volume máximo de 1 mL) para um tubo de polipropileno de 1,5 mL;

8 - Adicionar 500 μ L de fenol-clorofórmio e inverter o tubo suavemente por 5 minutos alternando temperatura ambiente e gelo. (obs.: pode-se usar clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 ao invés do fenol);

9 - Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C;

10 - Transferir a fase aquosa em um volume máximo de 900 μ L (evitando a linha branca contendo proteínas) para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL;

11 - Adicionar 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e inverter o tubo suavemente por 5 minutos alternando temperatura ambiente e gelo;

12 - Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C;

13 - Transferir a fase aquosa em um volume máximo de 700 μ L (evitando a linha branca contendo proteínas) para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL;

14 - Adicionar 250 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 550 μ L de isopropanol;

15 - Inverter o tubo suavemente até a formação do grumo de DNA;

16 - Incubar a -20°C por 2 horas;

17 - Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C;

18 - Descartar o sobrenadante e adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado;

19 - Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C;

20 - Descartar o sobrenadante e secar o precipitado a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos ou secar em *speedvac* à temperatura ambiente durante 15 minutos;

21 - Adicionar 50 μ L de solução de TE (Tris-HCL 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0) + RNase A (46 μ L de TE + 4 μ L de RNaseA 10 mg.mL⁻¹) e incubar a 37 °C por 30 minutos;

22 - Checar em gel de agarose 0,8%.

Comunicado Técnico, 343

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo
Endereço: Rodovia BR 285, km 294
Caixa Postal, 3081
99001-970 Passo Fundo, RS
Fone: 54 3316-5800
Fax: 54 3316-5802
Home page: www.embrapa.br/trigo

1ª Edição
Versão online (2014)

Comitê de Publicações

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi
Vice-presidente: João Carlos Haas
Membros: Douglas Lau, Elene Yamazaki Lau, Flávio Martins Santana, Joseani Mesquita Antunes, Leandro Vargas, Maria Regina Cunha Martins, Renato Serena Fontaneli

Expediente

Tratamento das ilustrações: Fátima Maria De Marchi
Editoreção Eletrônica: Fátima Maria De Marchi
Normalização bibliográfica: Maria Regina Martins