



Protocolo Modificado para Extração de DNA de Fungos do Gênero *Pestalotiopsis*

Joyce Solange Ferreira de Oliveira¹
Kenny Bonfim de Arruda Carvalho²
Eudes de Arruda Carvalho³

Introdução

O gênero *Pestalotiopsis* compreende várias espécies de fungos, podendo ser encontrados patógenos, endofíticos ou saprófitas. Esse gênero apresenta grande complexidade morfológica, o que dificulta a classificação no taxa espécie. Características como estrutura de frutificação, comprimento e morfologia de conídios tendem a variar dentro das espécies e também sofrem alterações com mudanças no ambiente (KARAKAYA, 2001).

A caracterização molecular surgiu como uma ferramenta complementar à taxonomia de fungos e tornou-se imprescindível em estudos filogenéticos. Dessa forma, os marcadores moleculares destacam-se dentre as técnicas utilizadas para o estudo da variabilidade genética de patógenos (GOUVEIA et al., 2005; ZACCARO et al., 2000). A extração de DNA, entretanto, é o primeiro passo e antecede qualquer emprego de técnicas moleculares. Sabe-se que, dependendo da análise molecular que será utilizada,

há a necessidade de menor ou maior quantidade de DNA com pureza compatível aos estudos a que se destinam. Nas reações de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e sequenciamento, por exemplo, são necessárias pequenas quantidades de DNA, sendo toleradas amostras de qualidade inferior, quando comparadas à técnica de reação de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP). Entretanto, a otimização da obtenção de DNA íntegro é fundamental para que se obtenham ampliações reprodutíveis e confiáveis. Assim sendo, o próprio procedimento de extração poderá gerar DNA que induz a resultados contraditórios (MILACH, 1998).

Além disso, modificações em protocolos visando aperfeiçoar a extração de DNA e reduzir riscos inerentes à técnica são importantes e necessárias. Substâncias como o fenol devem ser abstraídas de protocolos de extração, pois são caras, tóxicas e corrosivas, podem causar queimaduras se inaladas ou absorvidas pela pele, além de serem potencialmente fatais, se ingeridas.

¹Graduanda em Agronomia, estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, jsfoli@gmail.com.

²Bióloga, doutora em Biologia Molecular, analista da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, kenny.bonfim@embrapa.br.

³Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Fitopatologia), pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, eudes.carvalho@embrapa.br.

Pelo exposto, este trabalho teve como objetivo modificar o protocolo de extração de DNA de fungos do gênero *Pestalotiopsis* proposto por Joshi et al. (2009), remover o fenol e garantir a quantidade necessária e a qualidade do DNA extraído.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Utilizou-se 11 isolados do gênero *Pestalotiopsis* preservados pelo método de Castellani. Foi realizada a extração de DNA de uma amostra seguindo o protocolo proposto por Joshi et al. (2009) e extrações com o protocolo adaptado, cuja modificação foi a não utilização de fenol no processo de remoção de proteínas.

Os isolados de *Pestalotiopsis* sp. foram cultivados em meio BDA por 5 dias e os micélios foram raspados da superfície do meio para a extração de DNA. Pesou-se 200 mg a 300 mg do micélio, que foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubo tipo *ependorf* de 2 μ L.

A modificação do protocolo se deu conforme descrito a seguir. Adicionou-se 600 μ L de tampão de extração (CTAB 2% w/v 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0). Os tubos foram incubados por 40 minutos em banho-maria a 65 °C, sob agitação intermitente. Após a incubação, foi realizada a desproteinização ou remoção de proteínas, adicionando-se apenas 480 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico gelado (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12 mil rpm por 10 minutos a 4 °C e a parte aquosa (superior) foi transferida para novo tubo tipo *ependorf* de 1,5 μ L.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado 0,7 volume de isopropanol, centrifugado a 10 mil rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado ficando somente o *pellet* seco ao ar. Posteriormente, o DNA foi ressuscitado com adição de 200 μ L de tampão TE (10 mM Tris-Hcl e 1 mM EDTA, pH 8), 2,5 μ L de Rnase (20 mg/mL) e incubado a 37 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se igual volume de clorofórmio:isoamílico (24:1 v/v), misturando suavemente e centrifugando a 12 mil rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo *ependorf*

de 1,5 μ L e finalmente o DNA foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e incubado a -20 °C por 30 minutos. O *pellet* de DNA foi coletado por centrifugação a 12 mil rpm por 10 minutos a 4 °C, lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 100 μ L de água ultrapura estéril e armazenado a -20 °C até o uso.

O DNA genômico extraído foi quantificado em fotodocumentador L-PIX-Chemi Locus Biotecnologia e a pureza do DNA final foi avaliada no espectrofotômetro 3S Biomate da marca Thermo Scientific.

Resultados e discussão

O protocolo modificado mostrou-se eficiente, visto que essa metodologia sem fenol proporcionou quantidade satisfatória de DNA com qualidade para uso em técnicas moleculares. Foi obtida a quantidade mínima de 32,55 ng/ μ L e máxima de 49,92 ng/ μ L (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Pestalotiopsis* sp., respectivas quantidades de DNA e relação de Absorbância a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

Isolados	DNA Quantificado (ng/ μ L)	Absorbância (A_{260}/A_{280})
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	48,5	1,73
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	47,0	1,72
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 3	44,18	2,00
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 4	36,11	1,82
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 5	41,12	1,77
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 6	39,20	1,82
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 7	40,76	1,76
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 8	49,92	1,92
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 9	32,54	1,74
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 10	42,04	1,73
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 11	34,08	1,85
Testemunha com fenol	37,20	1,87

A razão 260/280 nm de absorvância (A_{260}/A_{280}) reflete a quantidade e a pureza de uma amostra de DNA. Segundo Teare et al. (1997), a amostra é considerada pura, ou seja, com menor contaminação de proteínas, quando A_{260}/A_{280} estiver entre 1,7 e 2,0. As extrações realizadas apresentaram nível de pureza dentro do recomendado, conforme leituras de espectrofotometria (Tabela 1). Estes resultados corroboraram com aqueles relatados por Faleiro et al. (2004) que obtiveram DNA genômico total de *Crinipellis pernicioso* com pureza sem a utilização de fenol. Os mesmos autores verificaram que a partir das 250 mg de micélio liofilizado foram obtidos em média 25 μ g de DNA, quantidade suficiente para análises moleculares.

A qualidade ou pureza das amostras obtidas foi evidenciada pela eletroforese em gel de agarose (Figura 1). A integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

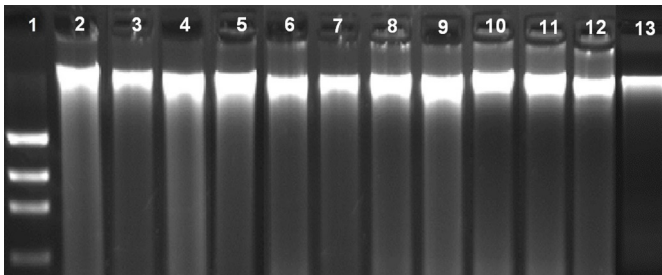


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose das amostras de DNA de fungos do gênero *Pestalotiopsis*. (1) Marcador Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); (2 a 12) amostras de DNA extraídas pelo protocolo modificado, sem fenol; (13) testemunha com fenol, ou seja, amostra de DNA extraída de acordo com Joshi et al. (2009).

Embora, o fenol utilizado na desproteíntização determine pureza e qualidade do DNA extraído, conforme proposto por Joshi et al. (2009), os resultados obtidos com o protocolo modificado, no presente trabalho, não apresentaram reduções em quantidade (Figura 1) e mantém a qualidade e pureza, quando comparados à amostra de DNA extraída com fenol (Tabela 1).

Conclusão

O protocolo modificado, utilizado para extrair DNA do gênero *Pestalotiopsis*, sem fenol, mostrou-se eficiente, por alcançar quantidade e qualidade de DNA para caracterização molecular do fungo, com

maior segurança aos usuários da técnica, sendo este um procedimento importante para as boas práticas laboratoriais.

Referências

- FALEIRO, F. G.; NIELLA, G. R.; CERQUEIRA, A. R. R. N.; DAMACENO, V. O.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, S. G. Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro meios de cultura, visando extração de DNA. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, n. 3, p. 312-315, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- GOUVEIA, M. M. C.; RIBEIRO, A.; VARZEA, V. M. P.; RODRIGUES JUNIOR, C. J. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, New York, v. 97, n. 2, p. 396-404, 2005.
- JOSHI, S. D.; SANJAY, D.; BABY, U. I.; ANDAL, A. K. A. Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 4, p. 377-383, 2009.
- KARAKAYA, A. First report of Infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. *Plant Disease*, v. 85, n. 9, p. 1028, 2001.
- MILACH, S. C. K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, 1998. 141 p.
- TEARE, J. M.; ISLAM, R.; FLANAGAN, R.; GALLADHER, S.; DAVIES, M. G.; GRABAU, C. Measurement of Nucleic Acid Concentrations using the DyNA Quant™ and the GeneQuant™. *BioTechniques*, v. 22, n. 6, p. 1170-1174, 1997.
- ZACCARO, R. P.; CARARETO-ALVES, L. M.; TRAVENSOLO, R. F.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M. Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, agente causal da malformação da mangueira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 563-570, 2000.

Comunicado Técnico, 239

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n,
Caixa Postal 48, CEP 66095-100, Belém, PA.

Fone: (91) 3204-1000

Fax: (91) 3276-9845

E-mail: sac@cpatu.embrapa.br

1ª edição

Versão eletrônica (2013)

**CGPE 10739****Comitê Local de Editoração:**

Presidente: *Michell Olívio Xavier da Costa*

Secretário-Executivo: *Moacyr Bernardino Dias-Filho*

Membros: *Orlando dos Santos Watrin, Márcia Mascarenhas Grise, José Edmar Urano de Carvalho, Regina Alves Rodrigues, Rosana Cavalcante de Oliveira*

Revisão Técnica: *Maria Rosa Travassos da Rosa Costa* - Embrapa Amazônia Oriental
Mirella Pupo Santos - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Expediente: **Supervisão editorial e revisão de texto:** *Narjara de Fátima G. da S. Pastana*
Normalização bibliográfica: *Andréa Liliâne Pereira da Silva*
Editoração eletrônica: *Euclides Pereira dos Santos Filho*