



Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2003

Autores

Newton Portilho Carneiro
Ph.D Biotecnologia Vegetal
newtonc@cnpms.embrapa.br

Ana Luiza M. Castanheira
Doutoranda, Bolsista
CAPES

Isabel Regina P. de Souza
Ph.D Biotecnologia Vegetal
isabel@cnpms.embrapa.br

Charles Martins de Oliveira
Doutor Entomologia
Elizabeth de Oliveira

Ph.D Fitopatologia
beth@cnpms.embrapa.br

Ubiraci Gomes de P. Lana
Assistente de Pesquisa
ubiraci@cnpms.embrapa.br

Edilson Paiva
Ph.D Biotecnologia Vegetal



Extração de DNA de *Spiroplasma Kunkelii* Whitcomb Cultivado in Vitro

Introdução

Espiroplasmas são microrganismos procarióticos pertencentes ao reino Bactéria, Filo Firmicutes, classe Mollicutes, ordem Spiroplasmatales, família Spiroplasmataceae e gênero *Spiroplasma* (Gasparich, 2002). São conhecidas hoje diversas espécies de espiroplasma, mas apenas três são fitopatogênicas: *S. citri*, *S. kunkelii* e *S. phoenicium*. Esses microrganismos são transmitidos por insetos vetores sugadores de seiva e infectam o floema da planta hospedeira.

O *S. kunkelii* é patogênico ao milho, sendo transmitido pela cigarrinha *Dalbulus maidis*, e causa a doença conhecida como enfezamento pálido (Corn stunt spiroplasma). Os principais sintomas são estrias cloróticas, que se alongam da base ao ápice da folha, encurtamento dos internódios, proliferação de espigas com poucos grãos ou nenhum, levando a perdas expressivas na produção (Masola Júnior, 1999).

Para análises do genoma desse patógeno, tem sido utilizado um kit comercial para extração do DNA (Bai e Hogenhout 2002), de alto custo. O desenvolvimento de métodos alternativos e de menor custo para extração de DNA de espiroplasma pode contribuir para facilitar a realização de análises moleculares diversas, visando a geração de conhecimento aplicável ao controle do enfezamento pálido. Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo prático de extração de DNA de espiroplasma, com qualidade adequada para uso em análises de variabilidade desse patógeno através de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), utilizando reagentes de custo relativamente baixo.

Material e Métodos

Isolamento e multiplicação do espiroplasma

O espiroplasma foi isolado de plantas de milho apresentando sintomas típicos de enfezamento e multiplicado em meio de cultura líquido LD8A3 (Lee & Davis, 1989). Os isolados de espiroplasma foram obtidos de diferentes regiões produtoras de milho, Dourados-MS (D), Itumbiara - GO (I), Sete Lagoas-MG (S) e Uberlândia-MG (U)

Metodologia Desenvolvida para extração do DNA de espiroplasma

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido no Laboratório de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, descrito a seguir. Um volume de 40 ml do meio de cultura de espiroplasma, em tubo Nalgene com capacidade de 50 ml, foi centrifugado a 16.000 g por dez minutos. Após a centrifugação, 39 ml do sobrenadante foram descartados, cuidadosamente e com o auxílio de micropipeta, para não haver perda do pellet. Um ml restante do sobrenadante contendo o pellet foi submetido a agitação em vortex e transferido para um tubo de eppendorf de 1,5 ml, ao qual foram

adicionados 500 ml do tampão de lise composto de 300 mM de Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA pH 8.0, 3% SDS e 1,5 M NaCl. Esse volume final de 1,5 ml foi transferido para dois tubos de eppendorff, colocando-se 750 ml em cada um. A cada tubo foram adicionados 500 ml de fenol (equilibrado pH 8.0) mais 300 ml de clorofórmio e os tubos foram agitados em vortex por um minuto e centrifugados a 16.000g por dez minutos. Após a centrifugação e separação das fases, foi coletada a fase superior contendo o DNA e transferida para um novo tubo de eppendorff. Foram adicionados 500 ml de clorofórmio e os tubos agitados em vortex por 30 segundos e centrifugados a 16.000 g por cinco minutos e novamente coletada a fase superior contendo o DNA. Após a repetição da extração com clorofórmio, foi adicionado um volume de isopropanol -20°C e deixados no freezer -20°C por uma hora, para precipitação do DNA.

A solução contendo o DNA precipitado foi centrifugada a 16.000 g por dez minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% -20°C e secado a vácuo. Após secagem, o DNA foi ressuscitado em 30 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Para comparar a efetividade do protocolo desenvolvido, três procedimentos foram utilizados para a extração do DNA dos isolados de espiroplasma em meio de cultura: kits comerciais da Promega (A e B), respectivamente, Wizard[®] Genomic DNA Purification (cat.no. A1120) e Wizard[®] SV Genomic DNA Purification (cat.no. A2365) e o protocolo desenvolvido na Embrapa Milho e Sorgo (C).

Para a confirmação de que o DNA extraído era dos diferentes isolados de espiroplasma, realizou-se o teste de PCR, empregando-se par de primers específicos para a detecção do gene da espiralina CSSF2 e CSSR6 (Barros et al., 2001) e os fragmentos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 0,8% Isolados de espiroplasma obtidos em diferentes regiões produtoras de milho - Dourados-MS (D), Itumbiara-GO (I), Sete Lagoas-MG (S) e Uberlândia-MG (U) - foram cultivados em meio de cultura líquido e, após um mês, o DNA foi extraído conforme protocolo C. As concentrações dos DNAs obtidas desses isolados foram estimadas por meio de gel de

agarose 0,8%, utilizando-se como padrão lambda DNA.

Resultados

A quantificação do DNA, extraído através dos três diferentes procedimentos, encontra-se na Figura 1. A qualidade do DNA extraído pelos três procedimentos é semelhante; entretanto, devido ao fato de os DNAs terem sido ressuscitados nos mesmos volumes (40 ul) e o volume aplicado ter sido o mesmo, observa-se que maior quantidade de DNA tenha sido obtida com o procedimento C. Apenas a amostra de Sete Lagoas teve DNA detectável no gel pelos tres métodos.

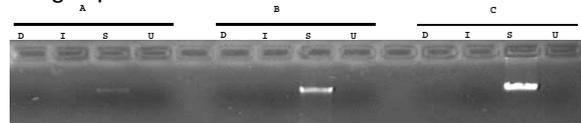


Figura 1. Quantificação do DNA extraído de isolados de espiroplasma (D, S, I, U) empregando-se os kits comerciais da Promega, A e B e o protocolo desenvolvido C. Gel de

Na Figura 2, são apresentados os resultados do teste de PCR, específico para espiroplasma, empregando-se o DNA extraído através dos três diferentes procedimentos. Com esse teste, verificou-se que, mesmo nas amostras que não apresentavam DNAs detectáveis em gel de agarose Dourados-MS (D), Itumbiara - GO (I) e Uberlândia-MG (U) -, foram obtidos produtos de PCR indicando a presença de DNA de espiroplasma nessas amostras. A análise semiquantitativa pelo PCR confirmou novamente a maior quantidade de DNA de espiroplasma na amostra de Sete Lagoas (S).

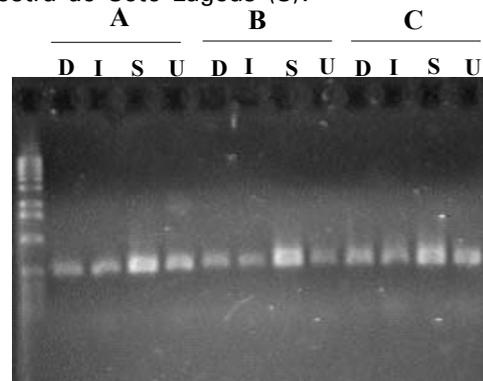


Figura 2 - Resultado dos testes de PCR com um par de primers específicos para detecção do gene da espiralina e DNAs extraídos dos meios de cultura dos diferentes isolados (D, I, S, U) de espiroplasma. A, B e C, procedimentos para extração de DNA, M = marcador de peso molecular, tamanho dos fragmentos em Kb.

Na Tabela 1, verifica-se a concentração de DNA extraído dos isolados de espiroplasma e estimados utilizando-se o padrão Lambda DNA.

Tabela 1 – Concentração aproximada dos DNAs dos isolados de espiroplasma estimada por comparação com DNA de fago lambda como padrão em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

Identificação dos Isolados	Concentração do DNA (ng / μ l)
D 1	100
D 2	100
D 3	50
I1	200
I2	50
I3	100
S1	100
S2	50
S3	100
U 1	200
U 2	50
U 3	50

Discussão

O protocolo desenvolvido para a extração de DNA de isolados de espiroplasma do milho, multiplicados em meio de cultura, apresentou resultados satisfatórios em termos de qualidade e principalmente de quantidade obtida em relação aos kits comerciais. Além disso, mostrou-se um procedimento rápido, versátil e de baixo custo. A versatilidade está no fato de poder ser utilizado em escalas reduzidas, como, por exemplo, com um volume inicial de 1 ml de meio de cultivo, desde que haja quantidade suficiente de células de espiroplasma. A maior ou menor concentração de células de espiroplasma depende do período de tempo de cultivo. Dessa forma, cultivos recentes, mínimo de um mês, dependem de quantidades iniciais maiores de espiroplasma para a extração de DNA. Cultivos com idade variando de 3 a 5 meses apresentam quantidades maiores de células, podendo ser utilizados volumes de meio de cultura menores (de até 1 ml) para a extração de DNA. Contudo, culturas com crescimento excessivo desse microrganismo podem não ser adequadas para a extração de DNA, pois a possível presença de células mortas poderia resultar na presença de DNA degradado. A quantificação de células no meio de cultivo é feita por meio de microscópio óptico de contraste de fase ou de campo escuro.

Para o procedimento em pequena escala, levando-se em consideração a idade do cultivo e a quantidade de células, a única modificação no protocolo é que pode-se utilizar diretamente 1 ml do meio de cultivo sem necessidade da primeira centrifugação, já iniciando-se na etapa de adição de 500 μ l do tampão de lise, seguindo-se o restante do protocolo. Devido ao volume inicial do meio de cultivo ser menor, recomenda-se que o DNA seja ressuspensão em um menor volume de TE (30 μ l).

A função do tampão de lise, além de destruir membranas plasmáticas, é manter o pH e quelar metais que porventura possam ativar endonucleases. O fenol e o clorofórmio, imediatamente após o rompimento da membrana do espiroplasma, auxiliam na desnaturação das proteínas e as centrifugações subsequentes têm o objetivo de remover não só as proteínas desnaturadas, mas também os carboidratos e os minerais (Sambrook et al., 1989).

A quantificação do DNA pode ser também determinada pela fórmula:

$$[DNA] = \frac{A_{260} \times 50 \times 100}{1000}$$

em que:

A_{260} é a leitura da absorbância a 260 nm, cujo comprimento de onda é da região ultravioleta;

50 é o fator de OD (valor de leitura ótica) para o DNA de fita dupla;

100 é o fator de diluição;

1000 é o fator de correção das unidades para o volume dado em ml.

A relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda A_{260} e A_{280} fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico.

O valor dessa relação (A_{260}/A_{280}) para DNA puro é de 1,8 a 2,0. No caso de contaminação com fenol ou proteína, a relação será significativamente menor e impedirá a quantificação correta da quantidade de DNA. Nesse caso, recomenda-se que repita-se a extração com fenol/clorofórmio pelo menos mais uma vez. Conforme Sambrook et al. (1989), leituras no

espectrofotômetro (A_{260}) utilizando concentrações de DNA abaixo de 250 ng/ul tornam-se imprecisas. Devido a esse motivo, as concentrações do DNA de espiroplasma foram estimadas em valores aproximados em gel de agarose, utilizando um DNA de concentração conhecida.

O gel de agarose 0,8% nesse experimento também foi usado para verificar se o DNA genômico estava fragmentado, o que não ocorreu. Quando ocorre fragmentação ou degradação excessiva do DNA, é possível ver um rastro no sentido de toda a canaleta. Quanto maior e mais intenso é o rastro, maior é o nível de degradação desse DNA. Dentre os fatores de degradação ou fragmentação do DNA, inclui-se a química por endonucleases e a física por manipulação excessiva. Nesse protocolo, não foi utilizada Rnase, sendo, então, provável que o RNA do espiroplasma esteja intacto na amostra, em pequenas quantidades.

Esse protocolo foi utilizado na extração de DNA, o qual foi posteriormente submetido à técnica de AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), permitindo confirmar a qualidade do DNA através das reações de restrição e ampliações pré-seletiva e seletiva via PCR dos fragmentos gerados (Dados não mostrados).

Literatura citada

- BAI, X.; HOGENHOUT, A. S. A genome sequence survey of the mollicute corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 210, n. 1, p. 7-17, 2002.
- BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 475-480, 2001.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas: Evolution, adaption and diversity. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 7, p. d619-d640, 2002.
- LEE, I.; DAVIS, R. E. Serum-free media for cultivation of spiroplasmas. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, p. 1092-1099, 1989.
- MASSOLA JUNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo Enfezamento Vermelho e Enfezamento Pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed.. New York: Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.

Circular Técnica, 34

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
 Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
 Fone: (31) 3779-1000
 Fax: (31) 3779-1088
 E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2003): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan M. Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Expediente

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa