



## PROTOCOLO MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DO GÊNERO *Pestalotiopsis*

Joyce Solange Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>, Kenny Bonfim de Arruda Carvalho<sup>2</sup>, Eudes de Arruda Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, j.sfoli@gmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, kenny@cpatu.embrapa.br, eudes@cpatu.embrapa.br

**Resumo:** Objetivou-se com este trabalho modificar o protocolo de extração de DNA do gênero *Pestalotiopsis*. Foram obtidos 200 mg de micélio de 11 isolados de *Pestalotiopsis* sp. O protocolo de extração proposto por Joshi (2009) foi modificado e testado retirando-se o fenol no processo de desproteção do DNA. A quantidade de DNA genômico extraído foi quantificada em fotodocumentador e a qualidade do DNA final foi avaliada em gel 0,9% de agarose e em reações de marcadores RAPD. A metodologia sem o emprego do fenol proporcionou quantidade satisfatória (32,55 a 49,92 ng/ $\mu$ L) e pureza de DNA para caracterização molecular do fungo. O protocolo modificado, portanto, pode ser utilizado para extrair DNA do gênero *Pestalotiopsis* com eficiência do método e segurança para os usuários.

**Palavras-chave:** caracterização molecular, fenol, fungos

### Introdução

O gênero *Pestalotiopsis* compreende várias espécies de fungos, podendo ser encontrado como patógeno, endofítico ou saprófita. Este gênero apresenta grande complexidade morfológica, o que dificulta a classificação em nível de espécie. Características como estrutura de frutificação, comprimento e morfologia de conídios tendem a variar dentro das espécies e também sofre alterações com mudanças no ambiente (KARAKAYA, 2001).

A caracterização molecular surgiu como ferramenta complementar à taxonomia de fungos e tornou-se imprescindível a estudos filogenéticos. Os marcadores



moleculares destacam-se dentre as técnicas utilizadas para o estudo da variabilidade genética de patógenos (GOUVEIA et al., 2005; ZACCARO et al., 2007). A extração de DNA é o primeiro passo e antecede quaisquer empregos de técnicas de marcadores moleculares. Sabe-se que, dependendo da análise molecular que será utilizada, existe a necessidade de menor ou maior quantidade de DNA com pureza adequada aos estudos a que se destinam. Nas reações de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), normalmente são necessárias pequenas quantidade de DNA, sendo que a técnica tolera amostras de baixa qualidade. Entretanto, a otimização da obtenção de DNA íntegro é fundamental para que se obtenham ampliações reproduzíveis e confiáveis. Em se tratando disso, o próprio procedimento de extração poderá gerar DNA que induz a resultados contraditórios (MILACH, 1998). Modificações em protocolos visando aperfeiçoar a extração de DNA e reduzir riscos inerentes à técnica são comumente realizadas. Substâncias como o fenol, devem ser abstraídas de protocolos de extração uma vez que são caras, tóxicas e corrosivas, pode causar queimaduras se inalada ou absorvida pela pele, além de potencialmente fatal se ingerida.

Pelo exposto, este trabalho teve como objetivo modificar o protocolo de extração de DNA do gênero *Pestalotiopsis* com a remoção do fenol da metodologia.

### **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 seguindo o protocolo proposto por JOSHI et al. (2009) cuja modificação foi a não utilização de fenol no processo de remoção de proteínas. Os isolados de *Pestalotiopsis* 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 do micélio que foram moídos em nitrogênio líquido e transferido para tubo tipo 'ependorff' de 2,0 µL. Em seguida, adicionou-se 600 µL 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 desproteíntização ou remoção de proteínas, adicionando-se



apenas 480  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico gelado (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e a parte aquosa (superior) foi transferida para novo tubo tipo ‘*eppendorf*’ de 1,5  $\mu\text{L}$ .

Para a precipitação do DNA, foi adicionado 0,7 volume de isopropanol e centrifugado a 10.000 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  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-Hcl e 1 mM EDTA, pH 8), 2,5  $\mu\text{L}$  de Rnase (20 mg/mL) e incubados a 37 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), misturando suavemente e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo ‘*eppendorf*’ e finalmente o DNA foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol gelado, absoluto e incubados a -20 °C por 30 minutos. O ‘*pellet*’ de DNA foi coletado por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e lavado duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. O ‘*pellet*’ de DNA foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril e armazenado a -20 °C até o uso.

A quantidade de DNA genômico extraído foi quantificada em fotodocumentador L-PIX-Chemi Loccus Biotecnologia e a qualidade do DNA final foi avaliada em gel 0,9% de agarose e em reações de marcadores RAPD.

### **Resultados e discussão**

O protocolo modificado mostrou-se eficiente, visto que esta metodologia sem fenol proporcionou quantidade e qualidade satisfatórias de DNA. Foi obtida a quantidade mínima de 32,55 ng/ $\mu\text{L}$  e o máximo de 49,92 ng/ $\mu\text{L}$  a partir de 200 mg de micélio (Tabela 1). Embora, a desproteíntização, conforme proposta por JOSHI et al. (2009), com o tratamento fenol determine melhor pureza e, conseqüentemente, melhor qualidade do DNA extraído.

Tabela 1: Isolados de *Pestalotiopsis* sp. e seus respectivos DNA quantificados.



| Isolados                         | DNA Quantificado<br>(ng/μL) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 1     | 48,5                        |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 2     | 47,0                        |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 3     | 44,18                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 4     | 36,11                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 5     | 41,12                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 6     | 39,20                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 7     | 40,76                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 8     | 49,92                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp. 9     | 32,54                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp.<br>10 | 42,04                       |
| <i>Pestalotiopsis</i> spp.<br>12 | 34,08                       |

Estes resultados corroboraram com aqueles relatados por KURAMAE-IZIOKA (1997). O autor desenvolveu protocolo de extração de DNA genômico total de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, em que o rendimento de DNA total foi suficiente e apropriado para reações de RAPD.

### Conclusão

O protocolo modificado, utilizado para extrair DNA do gênero *Pestalotiopsis*, sem fenol, mostrou-se eficiente alcançando-se quantidade e qualidade de DNA para caracterização molecular do fungo, com maior segurança aos usuários da técnica.

### Referências Bibliográficas

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, p.377-383, 2009.



KARAKAYA, A. First report of Infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. In Turkey. **Plant Disease**. v.85, p.1028. 2001.

Kuramae-Izioka, E. E. A Rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR**,v.19, n.3, p. 683-689, 1997.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**, Porto Alegre, p.141,1998.

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.