

QUALIDADE E AMPLIFICABILIDADE DO DNA DE *PYRICULARIA GRISEA* OBTIDO PELO MÉTODO DE SOBREPOSIÇÃO DE PAPEL (MSP)

Maycon Eduardo Nicoletti⁽¹⁾, Leonardo Bitencour Scoz⁽²⁾, Fernando Adami Tcacenco⁽³⁾.
¹Biólogo, Bacharel, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, e-mail: maycon_bio@hotmail.com. Bolsista do CNPq. ²Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (Univali), Bolsista do CNPq. ³Eng. Agr., Ph. D., Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri.

O fungo *Pyricularia grisea* é o agente etiológico da brusone, doença de maior importância econômica na cultura do arroz. Esse fungo possui alta variabilidade genética, consequência de mutações, deleções, trocas genéticas entre cepas e inserções de elementos transponíveis, e o estudo dessa variabilidade é tradicionalmente realizado através da inoculação em genótipos de arroz com diferentes genes de resistência à brusone. Alternativamente, muitos trabalhos vêm utilizando marcadores moleculares e, nesse contexto, o elemento repetitivo Pot-2 tem recebido grande atenção. Para obtenção de DNA para estes trabalhos, o cultivo do fungo é feito através de várias repicagens em diferentes meios de cultivo, levando em torno de 30 dias para que sejam possíveis as análises genéticas. Além de laboriosa, essa metodologia pode comprometer os resultados, pois cada repicagem pode induzir ao aparecimento de formas diferentes de virulência (Bedendo *et al.*, 1979). Para ser possível a comparação entre os dois métodos de avaliação, a cepa estudada deve ser livre de variação em laboratório e o DNA deve ser extraído diretamente do isolado usado como inóculo no método convencional, e para isso a otimização do cultivo do fungo *in vitro* torna-se necessária. Recentemente, foi proposta uma nova metodologia de cultivo, na qual o DNA do fungo é extraído diretamente de fragmentos de papel filtro com sobreposição de micélios (Scoz *et al.*, 2006). Essa metodologia, doravante referida como “Método de Sobreposição de Papel” (MSP), reduz sobremaneira o tempo de cultivo e a probabilidade de variação genética durante o cultivo *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi comparar a metodologia tradicional de cultivo do fungo em meio de cultura BDE líquido com a metodologia MSP, tomando-se como parâmetros a qualidade do DNA extraído e a amplificabilidade do mesmo através de Rep-PCR. Para tanto, lesões características de brusone de folhas de arroz Epagri 108 foram coletadas e incubadas em câmara úmida por 24 h a 28 °C e fotoperíodo de 12 h, para que ocorresse a produção de conídios, os quais foram identificados por microscopia óptica. Os conídios foram transferidos para placas de petri contendo 20 mL de meio AA (ágar 15 g L⁻¹). Após 24 h a temperatura ambiente, conídios com crescimento de hifas foram transferidos individualmente para placas com meio BDA (caldo de batata 400 mL L⁻¹; dextrose 20 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹). Após dez dias de crescimento a 28 °C e fotoperíodo de 12 h, foram selecionados aleatoriamente cinco isolados monospóricos com colônias bem desenvolvidas, e dez amostras de cada um deles foram repicadas e cultivadas sob duas condições distintas: (i) cinco amostras em placas de petri com meio CF sólido (centeio fino 15 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹), contendo quatro segmentos de papel-filtro com 1,0 cm x 1,5 cm cada (Figura 1); e (ii) cinco amostras em frascos erlenmeyers com meio BDE líquido (caldo de batata 100 mL L⁻¹; dextrose 20 g L⁻¹; extrato de levedura 15 g L⁻¹) mantidos sob agitação contínua a temperatura ambiente. Após sete dias na condição (i), os segmentos de papel-filtro, já com colônias sobre os mesmos, com uma média de 150 mg por segmento, foram coletados e armazenados individualmente em tubos de 2 mL. Da mesma forma, após 15 dias na condição (ii), a massa micelial foi filtrada através de bomba de vácuo em frascos Kitassato de 2 L com funil de vidro e papel-filtro, sendo que 150 mg da massa micelial de cada filtrado foram armazenados em tubos de 2 mL.

A extração do material genético foi baseada no protocolo descrito por Scott *et al.* (1993), sendo a quantificação do DNA feita através de fluorômetro (Bio-Rad VersaFluorTM) com o agente intercalante bisbenzimidaz (corante Hoescht 33258), e a qualificação através

de corrida eletroforética por 90 min em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio. Com o DNA extraído, aplicou-se a técnica de Rep-PCR, baseada no elemento repetitivo Pot-2 (Kachroo *et al.*, 1994). A amplificação enzimática e a visualização dos fragmentos foram realizadas nas condições descritas por George *et al.* (1998).

Os resultados demonstram que foi possível extrair DNA de todas as cepas testadas nas duas metodologias (Figura 2), sendo que micélios cultivados em meio BDE líquido geraram maior quantidade de DNA por amostra, com média de 52,3 ng μL^{-1} . A extração de DNA de micélio crescido sobre papel filtro forneceu, em média, 36,0 ng μL^{-1} de DNA, quantidade suficiente para a realização de Rep-PCR. Já os tubos-controle, contendo apenas papel-filtro estéril, não apresentaram vestígios de DNA. A ausência de DNA nos controles comprova que todo o DNA obtido nos tratamentos provém do fungo.

Os isolados apresentaram bom crescimento micelial em meio CF, o que tornou possível a coleta de material para análise molecular com apenas 15 dias de cultivo, ao contrário dos 30 ou mais dias normalmente requeridos pelo método tradicional, que utiliza o meio líquido BDE para obtenção de massa micelial. Mesmo tendo gerado uma quantidade menor de material, quando comparado com o cultivo em meio líquido, o método proposto por Scoz *et al.* (2006) forneceu DNA suficiente para utilização em metodologias moleculares, fato esse confirmado através da técnica Rep-PCR (Figura 3). Além disso, por reduzir o número de repicagens, a metodologia MSP provavelmente diminuiu a ocorrência de variação *in vitro* dos isolados, trazendo, portanto, maior credibilidade nos resultados gerados e facilitando os estudos de diversidade genética de *P. grisea*. Outro aspecto a ser considerado é o tempo de trabalho envolvido nas metodologias. Uma pessoa bem treinada pode levar mais de duas horas para retirar e filtrar 30 isolados cultivados em BDE, sendo que a mesma quantidade de amostras pode ser processada em 30 minutos pela metodologia alternativa aqui testada.

Além disso, a maceração do micélio cultivado em BDE é trabalhosa, pois envolve uma grande quantidade de almofarizes e pistilos autoclavados, já que não se pode utilizar o mesmo material para isolados diferentes, para evitar contaminação cruzada de material genético. Outra vantagem do método é a padronização do material a ser empregado em experimentos, já que os fragmentos de papel filtro possuem sempre as mesmas dimensões, e conseqüentemente a mesma quantidade de material, sendo desnecessária a pesagem do mesmo. Há ainda economia de nitrogênio líquido, pois uma quantidade para encher um tubo de apenas 2 mL por amostra é suficiente.

Através deste estudo, ficou demonstrada a possibilidade de extração de DNA diretamente de isolados de *P. grisea* crescidos em meio de centeio fino, sem a necessidade de repicagens para o meio líquido BDE, como tradicionalmente feito. Das duas metodologias testadas, a metodologia de cultivo em meio BDE forneceu maior quantidade de DNA, porém a metodologia MSP proposta por Scoz *et al.* (2006) fornece quantidade de DNA suficiente para análises moleculares. Portanto, essa nova metodologia torna-se eficiente, por proporcionar rapidez na obtenção de DNA para análise genética de *P. grisea*, eliminando várias etapas da cultura do fungo, e por diminuir os riscos de variação genética do patógeno durante o cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDENDO, I.P.; RIBEIRO, A.S.; CARDOSO, C.N. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone no arroz. **Summa Phytopathologica**, v.5, p.106-109, 1979.
- GEORGE, M.L.C. et al. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, v.88, n.3, p.223-229, 1998.
- KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATTOO, B.B. Pot-2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, v.245, p.339-348, 1994.

SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for miniscale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. **International Rice Research Notes**, v.18, n.1, p.47-48, 1993.

SCOZ, L.B.; NICOLETTI, M.E.; MIURA, L.; TCACENCO, F.A. Nova metodologia para obtenção de material genético para estudos de biodiversidade de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>. Acesso em: 27/03/07.

Figura 1. Obtenção de amostras de *P. grisea* cultivadas através da metodologia de sobreposição de micélio em papel filtro (MSP).

(A) aplicação de fragmentos de papel filtro sobre o meio de cultura CF e inoculação do isolado;

(B) sobreposição do micélio ao papel filtro após 10 dias de cultivo;

(C) retirada do papel filtro com sobreposição de micélio;

(D) armazenamento em tubos, para posterior extração de DNA.

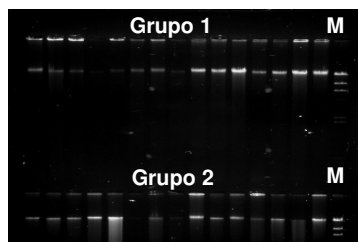
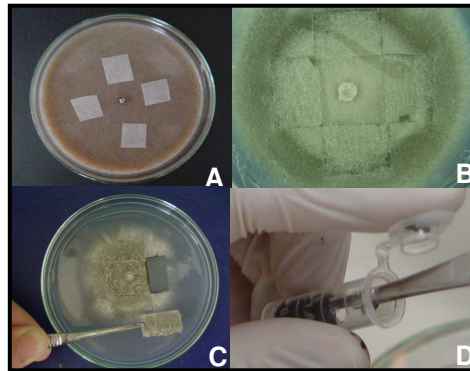
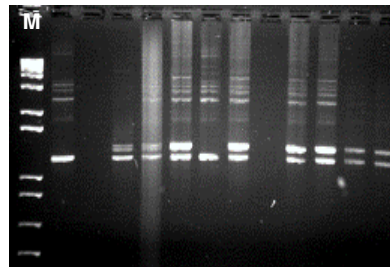


Figura 2. DNA genômico de *P. grisea* extraído pela aplicação do protocolo descrito por Scott *et al.* (1993). O primeiro grupo de amostras foi cultivado através da metodologia de sobreposição de micélio em papel filtro (MSP) e o segundo grupo cultivado em meio BDE. O material genético foi submetido a quantificação por fluorimetria, e a qualificação foi feita através de corridas eletroforéticas por 90 min em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídio. M= Marcador de peso molecular λ -Hind III, Invitrogen.

Figura 3. Foto representativa de ampliações geradas pela técnica de Rep-PCR, baseada no elemento repetitivo Pot-2, conforme George (1998). O fungo *P. grisea* foi cultivado através da metodologia de sobreposição de micélio em papel filtro (MSP) e o DNA genômico foi extraído pela aplicação do protocolo descrito por Scott *et al.* (1993). Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com brometo de etídio. M= Marcador de peso molecular 1Kb Plus Invitrogen.



Agradecimentos: Ao CNPq, pelas bolsas concedidas a M.E.N. e L.B.S. (Projeto 507096/2004-5).