

## RESOLUÇÃO DE FRAGMENTOS DE REP-PCR EM GÉIS DE AGAROSE E POLIACRILAMIDA: ESTUDO COMPARATIVO

Fernando Adami Tcacenco<sup>(1)</sup>, Maycon Eduardo Nicoletti<sup>(2)</sup>, Khadine Thatiane Appio<sup>(3)</sup>, Gustavo Emygdio Halfen<sup>(4)</sup>. <sup>1</sup>Pesquisador, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri, Estação Experimental de Itajaí. Caixa Postal 277, 88301.970, Itajaí, SC. Email: tcacenco@epagri.sc.gov.br. <sup>2</sup>Biólogo Bacharel, bolsista do CNPq, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri. <sup>3</sup>Biólogo Bacharel, bolsista do CNPq. <sup>4</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Bolsista do CNPq.

O fungo *Pyricularia grisea* é o agente etiológico da brusone, principal doença da cultura do arroz e responsável por grandes prejuízos em todo o mundo. Esse fungo possui alta variabilidade genética. Kachroo *et al.* (1994) encontraram seqüências nucleotídicas repetidas em torno de 100 vezes ao longo do genoma de *P. grisea*, denominando Pot-2. Para a utilização desse elemento repetitivo como marcador molecular, é utilizada a amplificação por PCR de seqüências repetitivas do genoma (rep-PCR) (Louws *et al.*, 1994), uma das técnicas moleculares mais usadas no estudo de diversidade genética de patógenos. A rep-PCR, adaptada por George *et al.* (1998), para *P. grisea*, baseia-se na amplificação de regiões intermediárias aos elementos Pot-2, gerando fragmentos de tamanhos variados.

A visualização dos fragmentos gerados por rep-PCR é geralmente feita através de géis de agarose de 0,9 a 1,5%. No entanto, a separação de fragmentos com diferença de poucos pares de bases pode ser prejudicada, necessitando de otimizações quanto à concentração do gel e ao tempo de corrida. Porém, nem sempre esse problema torna-se perceptível e a análise pode ser comprometida. Por outro lado, é conhecida a propriedade de alta resolução dos géis de poliacrilamida (PAA) revelados por autoradiografia ou nitrato de prata (Stift *et al.*, 2003). O gel de PAA é muito utilizado em técnicas como o AFLP (Amplified Fragments Length Polimorphism) e microssatélites, destacando-se principalmente na qualidade da visualização e separação de pequenos fragmentos. A adequação desta técnica para a visualização dos fragmentos gerados nas reações de rep-PCR torna-se promissora.

O objetivo deste trabalho foi verificar a diferença entre os padrões de bandas amplificadas por rep-PCR de *P. grisea* visualizadas em géis de poliacrilamida (4%) e agarose (0,9%).

Para a obtenção das amostras de DNA, foram coletados fragmentos de papel-filtro com sobreposição de micélio provenientes de cepas de *P. grisea* cultivadas em placas de Petri com 20 mL de meio BDA sólido, conforme metodologia proposta por Scoz *et al.* (2006). As amostras foram armazenadas em tubos de 2 mL e maceradas com nitrogênio líquido, e a extração do material genético foi baseada no protocolo descrito por Scott, *et al.* (1993). Foram adicionados 750 µL do tampão de extração (NaCl 250 mM, Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0) e 750 µL de SDS 10%. Após incubação de 30 min a 65°C, adicionaram-se 300 µL de acetato de potássio e incubou-se a -20 °C por 10 min. Centrifugou-se a 15.560 x g por 15 min, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de 750 µL de isopropanol, e incubado a -20 °C por 10 min. Realizou-se, então uma centrifugação a 15.560 x g por 15 min. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em câmara de fluxo e diluído em 40 µL de tampão TE (Tris-HCl 100mM ; EDTA 1mM). Posteriormente foi realizado tratamento com RNase A. A quantificação e a qualificação do DNA foi feita através de Fluorômetro (Bio-Rad VersaFluor™) com corante Hoechst 33258 e corrida eletroforética por 90 min em géis de agarose 0,8% corados com SYBR® Safe (Invitrogen).

O DNA genômico de *P. grisea* foi submetido à técnica de rep-PCR, nas condições descritas por George *et al.* (1998), em reações de 25 µL, com 75 ng de DNA genômico de *P. grisea*, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 600 µM de dNTPs, 2 U de *Taq* DNA polimerase Platinum, 0,5

µM de cada iniciador (Pot2-1 e Pot2-2) e 5% de DMSO, sendo o volume completado com tampão de PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM).

A ciclagem se deu em um termociclador PTC-100 (M.J. Research, Inc.), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 2 min 30 seg a 95 °C; quatro ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 62 °C e 10 min a 65 °C; 26 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1 min a 62 °C e 10 min a 65 °C; e extensão final de 15 min a 65 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos a dois processos de separação: (i) eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 4%; e (ii) eletroforese horizontal em gel de agarose 0,9%. Para estimativa do tamanho dos fragmentos em ambos os processos, foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).

No procedimento (i), a visualização e leitura do produto da rep-PCR foram realizadas a partir de uma alíquota de 10 µL de cada amostra, que misturadas ao corante foram submetidas à eletroforese vertical em gel não desnaturante de poliacrilamida (4%), utilizando TEB na composição do gel e como tampão de cuba. A voltagem foi de 150 V por aproximadamente seis horas. Após a eletroforese, iniciou-se o procedimento de revelação do gel, incubando-o em solução fixadora (20 mL de etanol absoluto e 1 mL de ácido acético glacial, completando o volume para 200 mL com água destilada) por 20 min. Em seguida, retirou-se a solução fixadora acrescentando uma solução de nitrato de prata (0,5 g de AgNO<sub>3</sub>, 50 mL de solução fixadora, completando o volume para 150 mL) por 25 minutos. Lavou-se o gel com água destilada e posteriormente adicionou-se solução reveladora (6g de NaOH, 600 µL de formaldeído P.A., completando o volume para 200 mL), até a visualização dos fragmentos (aproximadamente 20 a 30 min). Após lavagem do gel com água destilada, o mesmo foi imerso na solução fixadora por 10 min, sendo posteriormente embrulhado com celofane e escaneado.

No procedimento (ii), os fragmentos foram submetidos a uma corrida eletroforética em cuba horizontal 15 x 13 cm em gel de agarose de 0,9% por 3 horas e tampão de corrida TBE, corado com SYBR® Safe (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados em um transluminador com lâmpada ultravioleta (UV), os quais foram fotodocumentados em um aparelho Vilbert-Loumart acoplado a uma câmara CCD e impressos em papel termossensível em impressora Sony.

Os géis foram avaliados quanto à resolução, consistência e número de fragmentos visíveis em ambas as técnicas. Pode-se observar, pela Figura 1, a melhor resolução de bandas obtida pela corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, comparada com a resolução obtida em gel de agarose. Neste último, apenas seis bandas são visualizadas, enquanto que no gel de poliacrilamida, pelo menos dez bandas são visualizadas, nas condições em que os géis foram corridos. A poliacrilamida proporcionou também uma melhor separação das bandas. Resultados semelhantes são relatados por Stiff *et al.* (2003).

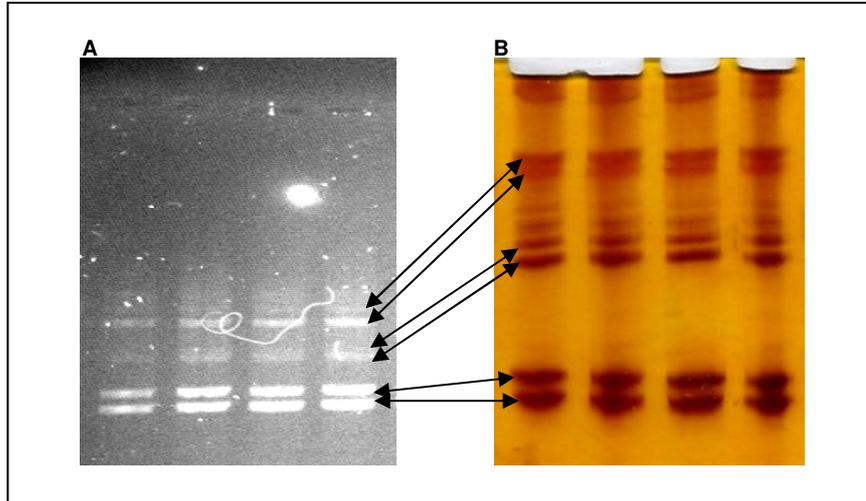
Conclui-se, portanto, que a utilização de géis de poliacrilamida leva a vantagens com relação a número, separação e visualização de bandas de produtos de rep-PCR de *Pyricularia grisea*, comparada à utilização de géis de agarose. Além disso, os custos de géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata são menores do que os custos de géis de agarose corados com SYBR® Safe.

Agradecimentos: ao CNPq, pelas bolsas concedidas a M.E.N.,K.T.A. e G.E.H., e à equipe do Prof. Geraldo Moretto (FURB, Blumenau) pelo apoio técnico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GEORGE, M.L.C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, 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**, Berlin, v.245, p.339-348, 1994.

- LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. de Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v.60, n 07, p. 2286-2295, 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.
- STIFT, G.; PACHNER, M.; LELLEY, T. Comparison of RAPD Fragment Separation in Agarose and Polyacrylamide Gel by Studying *Cucurbita* Species. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v.26, p.62-65, 2003.



**Figura 1.** Seções correspondentes de um gel de agarose corado com SYBR<sup>®</sup> Safe (A) e de um gel de poliácridamida corado com nitrato de prata (B). Os mesmos produtos de amplificação de DNA de *Pyricularia grisea* por rep-PCR foram corridos em ambos os géis, sendo que as setas indicam bandas correspondentes em cada um dos géis. Itajaí, SC, 2007.