

Foto: Paula Wiethölter



Otimização do método de extração de DNA genômico de *Puccinia triticina*

Sandra Patussi Brammer¹; Paula Wiethölter²; Márcia Soares Chaves³; Andressa Tanise Vooss⁴

Puccinia triticina Erikss é o fungo causador da ferrugem da folha do trigo, principal doença que prejudica o cultivo da espécie, acarretando danos econômicos significativos, conforme as condições ambientais e o ano de cultivo. Este fungo é biotrófico, ou seja, é um parasita obrigatório que apresenta alta especialização fisiológica. Conforme Simons (1985), este fungo é capaz de colonizar a região intercelular dos tecidos vegetais e desenvolver haustórios. Estas estruturas retiram os nutrientes da célula viva da planta, resultando diretamente na diminuição da produtividade. Este patógeno tem grande habilidade em superar genes de resistência específicos (SINGH; HUERTA-SPINO, 2001), fato que contribui para que haja grande quantidade de inóculo disponível ao longo de todo o ano, facilitando a seleção e a fixação de isolados com novas combinações de virulência (CHAVES; BARCELLOS, 2006).

A população de *P. triticina* é extremamente dinâmica, sendo frequente o surgimento de novas raças, as quais podem se tornar importantes devido à sua extensa disseminação e/ou pela superação da resistência de uma cultivar amplamente cultivada. No Brasil, os prejuízos provocados pela ferrugem da folha ocorrem anualmente e, normalmente, entre uma e três raças novas do patógeno são detectadas a cada ano (CHAVES et al., 2005). Assim, análises genéticas destes materiais são fundamentais para compreender o mecanismo evolutivo e a diversidade genética da espécie.

A extração de DNA é o primeiro passo para a sua utilização em diferentes técnicas com marcadores moleculares. Existem diferentes protocolos de extração de DNA, com variações de acordo com a espécie e o tecido a ser utilizado para a extração. Em geral, utiliza-se a maceração do

¹ Pesquisadora da Embrapa Trigo. E-mail: sandra@cnpt.embrapa.br

² Pós-doc CNPq / Embrapa Trigo. E-mail: paulawiet@gmail.com

³ Pesquisadora da Embrapa Trigo. E-mail: mchaves@cnpt.embrapa.br

⁴ Acadêmica do curso de Farmácia da Universidade Regional do Alto Uruguai – URI Campus de Erechim, RS. E-mail: andressatanise@yahoo.com.br

organismo/tecido alvo em nitrogênio líquido para o rompimento da parede celular, um tampão com detergente para o rompimento da membrana celular (com pH 8,0 para impedir a ação das nucleases), reagentes como fenol e/ou clorofórmio para a desnaturação das proteínas, agentes antioxidantes para evitar a oxidação de polifenóis e inibição da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, proteinase K para facilitar a separação do DNA das proteínas da cromatina, etanol para limpeza e precipitação do DNA e enzima RNase para digestão e eliminação do RNA (BONATO, 2008).

Existem alguns métodos descritos para a extração de DNA de fungos, tais como os de Raeder; Broda (1985), Zolan; Pukkila (1986), Anikster et al. (1997) e Brake et al. (2001). Entretanto, estes protocolos não são específicos para a extração de DNA de *P. triticina*. Conforme Ferreira; Grattapaglia (1998), alterações em protocolos muitas vezes são necessárias devido as diferenças na constituição dos tecidos de cada espécie. Duan et al. (2003) descreveram um protocolo para a extração de DNA de *P. triticina*, porém a quantidade de DNA extraída com este protocolo foi muito reduzida.

A conservação do material a ser utilizado na extração de DNA também é um fator crítico que está diretamente relacionado com a qualidade do produto final da extração. Diferentemente do que ocorre com as folhas das plantas, que necessitam ser imediatamente congeladas após a sua coleta ou armazenadas em sílica para que o material genético seja mantido integralmente, os esporos dos fungos não precisam ser mantidos congelados. A conservação dos esporos pode ser realizada, a curto prazo a 4 °C ou, a longo prazo, em vácuo e, neste caso, também armazenados a 4 °C. Entretanto, se a pressão utilizada no vácuo não for realizada de modo correto, torna-se um fator limitante para a conservação do material. Quando os esporos mudam a sua coloração inicial (de amarelo-dourado para cinza-escuro), eles podem estar em processo de degradação, o que pode interferir na qualidade e quantidade de DNA extraído.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar

uma metodologia para a extração de DNA do fungo *P. triticina*.

Descrição do protocolo de extração de DNA de *Puccinia triticina*

Este protocolo foi desenvolvido a partir de Duan et al. (2003). As alterações foram necessárias, uma vez que o protocolo original não apresentou eficiência nos materiais testados, resultando na obtenção de quantidades insignificantes de DNA. Por esta razão, alguns testes foram desenvolvidos, resultando no protocolo descrito a seguir.

- 1) Pese 20 mg de esporos de cada amostra em tubos de 2 mL;
- 2) Adicione 600 µL de tampão de extração (Tabela 1) e 15 µL de Proteinase K (10 mg/mL);
- 3) Em seguida, incube a 65 °C por 2h em banho-maria;
- 4) Mantenha em temperatura ambiente durante 5 minutos;
- 5) Adicione 600 µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agite levemente invertendo por, aproximadamente, cinco minutos;
- 6) Centrifugue a 4 °C, durante 25 minutos, à 14000 rpm;
- 7) Transfira o sobrenadante para um tubo novo de 2 mL;
- 8) Adicione 400 µL de isopropanol gelado;
- 9) Armazene a – 20 °C durante 24 horas;
- 10) Centrifugue a 4 °C, durante 20 minutos, a 13000 rpm;
- 11) Descartar o sobrenadante;
- 12) Adicione 1 mL de etanol 70 % gelado;

- 13) Centrifugue durante um minuto, a 13000 rpm;
- 14) Elimine o sobrenadante e deixe o pellet de DNA secar em temperatura ambiente durante 60 minutos;
- 15) Adicione 30 µL de TE (Tris pH 8 10 mM + EDTA 1 mM) + RNase (10 mg/mL) e mantenha a 37 °C durante 90 minutos;
- 16) Armazene a 4 °C durante 24 horas e proceda a quantificação do DNA, que pode ser realizada em gel de agarose 0,8 % (Tabela 2).

Resultados

As alterações propostas, a partir do protocolo de Duan et al. (2003) estão descritas a seguir, bem como as principais etapas ilustradas na Figura 1:

a) Quantidade de esporos:

Duan et al. (2003) sugerem a utilização de 10 mg de esporos por amostra, entretanto, a quantidade indicada resultou na extração de quantidades insignificantes de DNA. Por esta razão, foram realizadas extrações de DNA com 10, 20 e 30 mg, para verificar a quantidade mais adequada. Nas amostras testadas com 10 mg de esporos não foi possível determinar a quantidade de DNA extraída e, nas amostras com 30 mg, não foram observadas diferenças significativas em relação às amostras com 20 mg. Por esta razão, determinou-se que 20 mg de esporos seria a quantidade ideal para a obtenção de, pelo menos, 50 ng de DNA/µL (Fig. 2). Entretanto, a qualidade do DNA permaneceu baixa. Por esta razão foram testadas outras alterações.

b) Tampão de extração:

A alteração na concentração de NaCl no tampão de extração, de 0,8 M para 5 M também melhorou a qualidade do DNA extraído. É importante ressaltar que o NaCl dissocia-se em solução, em íons Na⁺ e Cl⁻, os quais interagem com os grupamentos fosfatos do DNA, neutralizando e estabilizando as moléculas. Contudo, recomenda-se que o preparo

do tampão seja feito sempre no momento de seu uso.

c) Tempo de incubação a 65 °C:

A 65 °C, a parede celular dos fungos é degradada. Além disso, nesta temperatura, algumas enzimas tais como as DNases desnaturam-se, impedindo que danifiquem o DNA. O período de incubação proposto foi de 30 minutos a mais, ou seja, 2h ao invés de 1h e 30 min.

d) Volume de soluções e velocidade de rotação na centrífuga:

Volumes de soluções como clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), isopropanol e TE foram testados concluindo-se que, ao invés de 500 µL, 1 volume e 20 µL, respectivamente, a utilização de 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), 400 µL de isopropanol e 30 µL de TE eram mais adequadas.

Da mesma forma, a utilização de diferentes velocidades de centrifugação (rpm) resultaram na formação de um pellet de DNA maior e mais compacto.

Observações: A extração de DNA de esporos conservados há mais de um ano (à vácuo, a 4 °C e – 20 °C) que apresentavam alterações na sua coloração original (de dourado para acinzentado) não foi eficiente. Dessa forma, o protocolo descrito não é indicado para a extração de *P. triticina* com esporos com alteração na sua coloração original.

Referências bibliográficas

ANIKSTER, Y.; BUSHNELL, W. R.; ROELFS, A. P.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J. *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, n. 12, p. 2082–2096, 1997.

BONATO, A. L. V. Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11 p. html. (Embrapa

Trigo. Comunicado técnico online, 235). Disponível em:

<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm>. Acesso em: 05 ago. 2009.

BRAKE, V. M.; IRWIN, J. A. G.; PARK, R. F. Genetic variability in Australian isolates of *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* assessed with molecular markers and pathogenecity markers. **Australian Plant Pathology**, Queensland, v. 30, p. 259-266, 2001.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. ; GERMÁN, S.; SCHEEREN, P. L ; DEL DUCA, L. de J. A. ; SÓ E SILVA, M.; CAIERÃO, E. Population dynamics of *Puccinia triticina* in the South Cone region of South America from 1997 to 2004. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 7., 2005, Mar del Plata, Argentina. **Abstracts...** Mar del Plata: SAGPyA: INTA, 2005. p. 130.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 57-62, 2006.

DUAN, X. ; ENJALBERT, J.; VAUTRIN, D.; SOLIGNAC, M.; GIRAUD, T. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in

the phytopathogenic fungus "*Puccinia triticina*".

Molecular Ecology Notes, Oxford, v. 3, n. 1, p. 65-67, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

SIMONS, M. D. Crow rust. In: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. (Ed.). **The cereal rusts**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 132-172.

SINGH, R. P.; HUERTA-SPINO, J. **Global monitoring of wheat rusts, and assessment of genetic diversity and vulnerability of popular cultivars**. Mexico, DF: CIMMYT, 2001. Research Highlights of the CIMMYT Wheat Program, 1999-2000.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 6, p. 195-200, 1986.

Tabela 1. Tampão de extração de DNA de *Puccinia triticina* (preparo de 500 mL)

Componentes	Concentração inicial	Concentração final	Quantidade Volume (mL)
D-Sorbitol	-	25 g/L	12,5
N-Lauroylsarcosine	-	10 g/L	5
NaCl	5 M	0,8 M	80
EDTA	0,5 M	0,02 M	20
Tris (pH 8)	1 M	0,1 M	50
Água destilada	-	-	Completar para 500 mL

Tabela 2. Gel de agarose para quantificação de DNA total (200 mL)

Componentes	Concentração final	Quantidade/
Agarose	0,8 %	1,6 g
TBE 10 X	1 X	20 mL
Água destilada	-	completar para 200 mL



Fig. 1. Etapas do protocolo de extração de DNA de *P. tritici*. A) Esporos de *P. tritici* no fundo do tubo; B) Adição do tampão de extração sobre os esporos; C) Tubos contendo esporos e tampão de extração submetidos ao tratamento no banho-maria; D) Detalhe da coloração da solução após banho-maria; E) Adição de solução de clorofórmio-álcool isoamílico; F) Agitação leve após adicionada a solução de clorofórmio-álcool isoamílico; G) Retirada do sobrenadante após centrifugação; H) Adição do sobrenadante em um tubo limpo e estéril; I) Adição de isopropanol gelado sobre o sobrenadante recém coletado; J) Detalhe do pellet de DNA (marrom) após a centrifugação; K) Lavagem do pellet de DNA com álcool 70 % gelado; L) DNA secando após a lavagem com álcool 70 %; M) Adição de solução de TE + RNase.

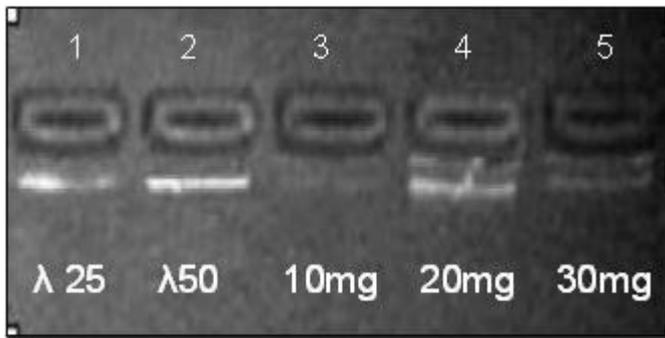


Fig. 2. Quantificação de DNA de *Puccinia triticina* em gel de agarose 0,8%. Amostras 1 e 2 com concentrações de DNA lambda (λ) padrão e amostras 3, 4 e 5 com diferentes quantidades de esporos.

**Comunicado
Técnico Online, 287**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sandra Maria Mansur Scagliusi
Membros: Anderson Santi, Douglas Lau (vice-presidente),
Flávio Martins Santana, Gisele Abigail M. Torres, Joseani
Mesquita Antunes, Maria Regina Cunha Martins, Martha Zavariz
de Miranda, Renato Serena Fontaneli

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Cunha Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel



BRAMMER, S. P.; WIETHÖLTER, P.; CHAVES, M. S.; VOOSS, A. T. **Otimização do método de extração de DNA genômico de *Puccinia triticina***. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 8 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 287). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co287.htm>.