



FACULDADE
ALFREDO NASSER

4º SEMINÁRIO
Pesquisar

VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DO FUNGO *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS* PARA DETECÇÃO ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

Luciana Oliveira Barateli; Regina Melo Sartori Coelho; Abmael Monteiro de Lima Junior; Rodrigo da Silva Santos.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO – LANAGRO-GO

lucianabaratelli@hotmail.com

RESUMO: O cultivo de Banana no Brasil tem um relevante papel socioeconômico considerando que constitui parte importante da renda dos pequenos produtores. Porém, doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides são responsáveis por elevados prejuízos na cultura da Banana, sendo assim, torna-se de fundamental importância saber identificar essas doenças assim como as formas de combatê-las. Sendo assim, sabendo-se que as técnicas moleculares possuem alta sensibilidade no diagnóstico de fitopatógenos e reduzem, significativamente, o tempo necessário para realizar a diagnose, o objetivo deste trabalho deste trabalho foi avaliar a eficácia da metodologia de extração de DNA da matriz fungo pelo método *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) modificado nas condições do Laboratório de Biotecnologia do LANAGRO-GO. A metodologia consiste nos passos de rompimento de paredes celulares, digestão de proteínas, precipitação do DNA, lavagem e secagem do DNA, eluição do DNA e degradação do RNA. Para a verificação da eficácia da metodologia utilizou-se um espectrofotômetro para determinação da quantidade e pureza da amostra de DNA e também técnicas de eletroforese e PCR em tempo real.

PALAVRAS-CHAVE: Fitopatologia. CTAB. Extração de DNA. Sigatoka Negra. *Mycosphaerella fijiensis*.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de Banana no Brasil tem um relevante papel socioeconômico considerando que constitui parte importante da renda dos pequenos produtores. Porém, doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides são responsáveis por elevados prejuízos na cultura da Banana, sendo assim, torna-se de fundamental importância saber identificar essas doenças assim como as formas de combatê-las. Sendo assim, sabendo-se que as técnicas moleculares possuem alta sensibilidade no diagnóstico de fitopatógenos e reduzem, significativamente, o tempo necessário para realizar a diagnose, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da metodologia de extração de DNA da matriz fungo pelo método *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) modificado nas condições do Laboratório de Biotecnologia do LANAGRO-GO.

O método CTAB modificado consiste na utilização de um detergente específico para o rompimento das membranas celulares e posteriormente em etapas de limpeza e purificação do DNA, visto que a metodologia de PCR em tempo real é altamente sensível e pode ser prejudicada por restos de reagentes que ficam na amostra.

2. METODOLOGIA

As extrações foram repetidas em três dias diferentes. Foram reservadas 6 tubo de teste para cada dia de extração (3 dias), perfazendo um total de 18 amostras (ENGL, 2008; Thompson et al., 2002). Cada amostra teste foi constituída de uma colônia do isolado, sendo acondicionadas em microtubos de 2 mL e armazenadas em freezer (-20°C) para posterior extração de DNA.

Todos os passos para extração de DNA foram realizados em ambiente segregado da área de homogeneização da amostra, da área dedicada às reações de amplificação/PCR e da área subsequente ao processo de amplificação, que inclui análise e identificação da banda de DNA amplificado.

Durante o processo de extração, foram realizados os passos de rompimento de paredes celulares, digestão de proteínas, precipitação do DNA, lavagem e secagem do DNA, eluição do DNA e degradação do RNA.

Para a quantificação do DNA, foi utilizado espectrofotômetro (Nanodrop Thermo Scientific modelo 2000) com a determinação da absorbância a 230 nm, 260 nm e 280 nm.

Para avaliar a integridade estrutural do DNA extraído, o produto das 18 repetições de extração de DNA foram separados por eletroforese, utilizando-se gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) por 20 minutos e visualizados em translaminador com luz ultravioleta (320 nm), utilizando-se o DNA Ladder (Promega®) de 1Kb como marcador de peso molecular.

Pela técnica PCR em tempo real, o teste de inibição foi realizado por meio das amostras extraídas nos 3 dias subsequentes. Todas as amostras foram diluídas em 1×10^4 (1:4, 1:16, 1:64, 1:256). Foram adicionadas a microplaca as amostras concentradas (20 ng/ μL) e suas respectivas diluições juntamente com o Mix de reagentes para reação PCR em tempo real.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de DNA extraídas de fungo apresentaram o CV superior a 30% e isto se deveu ao fato de existirem três outliers (alta concentração do DNA extraído). Eliminando esses três outliers o valor de coeficiente de variação fica em 20,93%. A quantidade de DNA extraída pode ser considerada satisfatória, visto que os métodos de detecção utilizados no laboratório necessitam de uma concentração de DNA de 20 ng/ μL . Os resultados também apresentam boa relação 260:280, indicadora da qualidade do DNA, demonstrando baixa concentração de proteínas na solução de DNA.

Com o objetivo de verificar a pureza da solução de DNA e confirmar a ausência de compostos inibidores de PCR nas amostras, as soluções de DNA foram ajustadas a uma concentração de 20 ng/ μ (amostra original não diluída). Diluições seriais de cada extrato foram preparadas com tampão TE (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) e

analisadas usando PCR em tempo real para detectar a sequência alvo do gene. Para medir a inibição nas amostras os valores de Ct das quatro diluições seriadas foram plotados contra o logaritmo da diluição e o valor de Ct da amostra original (não-diluída) foi calculado com base na equação de regressão linear obtida. Posteriormente, o Ct calculado da amostra original foi comparado com o Ct medido (obtido pelo equipamento de PCR em tempo real). Adotou-se como critério de aceitabilidade que o valor de Ct medido para a amostra original deve ser menor que 0,5 ciclos do valor de Ct calculado pela regressão linear (ENGL, 2009).

4. CONCLUSÕES

Os dados apresentados no presente trabalho confirmam que o método CTAB modificado para extração de DNA, proporciona extração de DNA na quantidade e qualidade necessárias para aplicação nos métodos de PCR e produz DNA que se adequa aos critérios de aceitação expressos nos documentos internos do Laboratório de Biotecnologia do LANAGRO-GO (ITs LDV 230 - Método CTAB modificado para extração de DNA, LDV 175 - Quantificação de DNA através de Absorbância em Ultravioleta, LDV 203 - Método Qualitativo para Detecção de Sequência específica de DNA).

REFERÊNCIAS

TEIXEIRA, E. A. **Avanços da Agrodefesa na Área de Sanidade Vegetal**. 2009. Disponível em: <<http://www.agrodefesa.go.gov.br/publicacoes/sanidade-vegetal/195-avancos-na-area-de-sanidade-vegetal/file>>. Acesso em: 28. mai. 2015.

ENGL. European Network of GMO Laboratories. **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing**. 2008. 8 p. Disponível em : http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008**. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Ro de Janeiro: INMETRO, 2003.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. ISO **17025:2005**. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. Geneva, Switzerland: ISO, 2005.

MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Manag Sci.**, v 59, n. 2, p.129-142, feb. 2003.

WATERWORTH, H. E.; WHITE, G. A. Plant introduction and quarantine: the need for both. **Plant Dis**, v. 66, p. 87-90, jan. 1982.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/doencas.htm> > Acesso em: 19. mar. 2015.

GASPAROTTO, L; PEREIRA, J. C.R; HANADA, R.E; MONTARROYOS, A. V. V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Embrapa Ocidental. Manaus, AM, 2006.