

Produção de Micélio de *Crinipellis pernicioso* em Quatro Meios de Cultura, Visando Extração de DNA*

Fábio G. Faleiro**^{1,3}, Givaldo R. Niella², Ana Rosa R.N. Cerqueira², Virgínia O. Damaceno², Luana M.C. Gomes¹ & Alessandra S.G. Faleiro¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Seção de Genética, ²Seção de Fitopatologia, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-000, Itabuna, BA; ³Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, CEP 73301-970, Planaltina, DF, e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

(Aceito para publicação em 27/01/2003)

Autor para correspondência: Fábio Gelape Faleiro

FALEIRO, F.G., NIELLA, G.R., CERQUEIRA, A.R.R.N., DAMACENO, V.O., GOMES, L.M.C. & FALEIRO, A.S.G. Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro diferentes meios de cultura, visando extração de DNA. Fitopatologia Brasileira 29:312-315. 2004.

RESUMO

A produção de massa micelial é o primeiro passo para obter amostras de DNA de qualidade e quantidade suficiente para análises moleculares. Neste trabalho, objetivou-se analisar a quantidade e a qualidade do DNA de *Crinipellis pernicioso* extraído a partir de massa micelial obtida em quatro meios de cultura. Foi avaliado o peso de micélio liofilizado produzido nos seguintes meios de cultura: 1. extrato de levedura (2,5%); 2. extrato de malte (2,5%); 3. BD (batata 20% e dextrose 2%) e 4. extrato de malte + BD (50% de cada meio). O crescimento micelial foi iniciado a partir de um disco de micélio colocado no centro de placas de Petri de 90 mm contendo o meio testado e mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por dez dias. Foi utilizado o DIC com dez repetições. O micélio produzido foi liofilizado e o DNA extraído

utilizando-se o método do SDS com a desproteíntização feita com ou sem fenol. A pureza do DNA baseada na relação A_{260}/A_{280} e a integridade em gel de agarose 0,8% foram analisadas. A quantidade de micélio produzida nos meios de cultura 1 e 4 foi maior do que nos meios 2 e 3. O DNA extraído a partir de micélio produzido nos meios 2 e 3 apresentou maior integridade, obtendo-se produtos de amplificação mais nítidos. A desproteíntização com fenol possibilitou a extração de DNA mais puro. Porém, DNA de ótima qualidade e em quantidade suficiente pode ser extraído a partir de micélio produzido em meios baratos como o BD, sem a necessidade da desproteíntização com fenol.

Palavras-chave adicionais: vassoura-de-bruxa, cacau, metodologia.

ABSTRACT

Mycelial production of *Crinipellis pernicioso* on four culture media for DNA extraction

Mycelial production is the first step in getting good quality and quantity of DNA samples for molecular analysis. The objective of this work was to analyse the quantity and quality of DNA extracted from *Crinipellis pernicioso* mycelial mass obtained on four culture media. The lyophilized mycelial mass weight was evaluated in the following culture media: 1. yeast extract (2.5%); 2. Malt extract (2.5%); 3. PD (potato 20% and dextrose 2%) and 4. malt extract + PD (50% of each culture media 2 and 3). Mycelial growth was produced by depositing of a mycelial disk in the center of 90 mm Petri dishes containing each culture medium. The dishes were kept in a BOD incubator at 25 °C under a photoperiod of 12 h, for ten

days. The experiment was organized in complete random design with ten repetitions. The DNA was extracted from 250mg of lyophilized mycelial mass using the SDS method with desproteinization carried out either with or without phenol. The DNA purity based on the absorbance A_{260}/A_{280} and the DNA integrity in agarose gel 0,8% were analyzed. The quantity of mycelial mass-produced on culture media 1 and 4 was larger than on culture media 2 and 3. The DNA extracted from the mycelial mass produced in culture media 2 and 3 demonstrated greater integrity, yielding good amplification products. The DNA purity was higher after desproteinization with phenol. However, good quality and abundant DNA could be extracted from the mycelial mass produced in PD, even without desproteinization with phenol.

Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer é o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), a qual se constitui na principal limitação para a produção de cacau na América do Sul, Panamá e nas ilhas do Caribe (Thorold, 1975). No Brasil, esta doença tem causado sérios problemas econômicos, sociais e ecológicos, principalmente na região sul da Bahia, onde perdas ocasionadas pelo fungo chegam a atingir 100% em algumas fazendas.

O conhecimento da variabilidade genética do patógeno

tem grande importância em estudos de patogenicidade e relacionados ao melhoramento genético do cacauero visando a sua resistência à doença. Diferentes tipos de marcadores moleculares e análises de seqüências do DNA vêm sendo utilizados com sucesso na caracterização da variabilidade genética de diferentes fitopatógenos, incluindo-se *C. pernicioso* (Anderbrhan *et al.*, 1994, 1999; Gomes *et al.*; 2000a, b). A obtenção de massa micelial para extração de DNA de qualidade e em quantidade suficiente para as análises moleculares é fundamental para a realização de tais estudos.

A quantidade e a qualidade do DNA depende da

* Auxílio financeiro: CFC/ICCO/CEPLAC-BIOMOL e FUNDECAU

** Bolsista do IBECAU

quantidade e qualidade da massa micelial produzida. Diferentes meios de cultura (Dhingra & Sinclair, 1995) podem ser utilizados para a produção de massa micelial de *C. pernicioso*. No entanto, vários critérios devem ser considerados na escolha do meio de cultura para produção de massa micelial para extração de DNA, tais como o grau de pureza da massa micelial produzida, a facilidade de separação da massa micelial do meio de cultura, a velocidade do crescimento micelial, o custo do meio de cultura e a qualidade e quantidade do DNA extraído a partir da massa micelial obtida.

Os protocolos de extração e purificação do DNA também influenciam a qualidade e quantidade do DNA isolado. Diferentes métodos têm sido utilizados para a extração de DNA de *C. pernicioso*, a partir de massa micelial, incluindo-se aqueles que utilizam o detergente catiônico CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Anderbrham *et al.*, 1999) ou o detergente aniônico SDS (sodium dodecyl sulfate) (Gomes *et al.*, 2000a) no tampão de extração. Pequenas variações nos métodos de extração de DNA são relatadas na literatura tais como a mudança de concentração de um ou outro componente do tampão de extração, tempos e força gravitacional das centrifugações e a utilização ou não de fenol no processo de desproteíntização.

Neste trabalho, objetivou-se analisar a produção de massa micelial de *C. pernicioso* em quatro diferentes meios de cultura, analisar a quantidade e a qualidade do DNA extraído a partir de massa micelial obtida em cada meio e analisar a pureza do DNA extraído, utilizando-se o processo de desproteíntização com e sem o uso de fenol.

Foram utilizados quatro meios de cultura líquidos: 1. extrato de levedura (2,5%); 2. extrato de malte (2,5%); 3. BD (20% de batata e 2% de dextrose) e 4. extrato de malte + BD (50% do meio 1 e 50% do meio 3). Não foi feito ajuste de pH nos respectivos meios. O crescimento do micélio em cada meio de cultura foi iniciado a partir de um único disco de cultura monospórica, cultivada em BDA (20% de batata, 2% de dextrose e 2% de ágar em água), o qual foi colocado no centro de cada placa de Petri de 90 mm, contendo 10 ml do meio de cultura avaliado. Para cada meio de cultura, foram utilizadas dez placas de Petri, as quais, após o semeio, foram mantidas em incubadora BOD com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 12 h, durante dez dias. Após esse período, o micélio produzido em cada placa de Petri foi separado do meio de cultura e, em seguida, liofilizado. Foi avaliado o peso do micélio liofilizado. Análises de variância foram feitas segundo um delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

O micélio liofilizado produzido em cada um dos meios de cultura foi utilizado para a extração do DNA. Foram feitas quatro extrações de DNA a partir de massa micelial obtida em cada meio de cultura. O DNA foi isolado utilizando-se o método do SDS utilizado por Gomes *et al.* (2000a) como segue: 250 mg de micélio liofilizado foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N₂ líquido. Em seguida, o micélio macerado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 700 µl de tampão de extração constituído por Tris-

HCl 200 mM (pH 8,0), EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sódio 1%, NaCl 250 mM e 2-mercaptoetanol 1%. O micélio macerado foi misturado ao tampão de extração e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por 1 h, sendo agitados, a cada 10 min. Após a incubação, foram realizados dois procedimentos para a desproteíntização (com e sem fenol), sendo que cada procedimento foi realizado em duas amostras de massa micelial obtida de cada meio de cultura. No procedimento com fenol, foi adicionado em cada amostra 300 µl da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e 300 µl de fenol e no procedimento sem fenol foi adicionado 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugadas a 4 °C, a 18.845 g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 ml, devidamente limpos, e o processo de desproteíntização foi repetido.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado (4 °C). Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspendidos em 150 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e colocados em banho-maria a 37 °C por 60 min. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 100 µl de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). A relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. O perfil eletroforético de 10 µl de cada amostra de DNA em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio 0,00002% foi usado como indicador da integridade do DNA. Após esse processo, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/µl e amplificadas utilizando-se "primers" decâmeros para obtenção de marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") (Williams *et al.*, 1990), de acordo com Gomes *et al.* (2000a).

Foram observadas diferenças significativas entre os meios de cultura quanto à quantidade de micélio produzida, pelo teste Tukey a 1% de probabilidade. Após dez dias de crescimento, os meios de cultura 4 (Malte + BD) e 1 (Extrato de levedura) produziram maior quantidade de micélio que os meios 2 (Malte) e 3 (BD) (Figura 1). As diferenças na composição química ou no pH desses meios podem explicar as diferenças observadas.

No processo de extração, verificou-se que a partir das 250 mg de micélio foram obtidos, em média, 25 µg de DNA, não havendo diferenças significativas entre a quantidade de DNA obtida a partir das 250 mg de micélio produzidas nos quatro meios de cultura. Observou-se também que a utilização de fenol na etapa de desproteíntização possibilitou a obtenção de amostras de DNA mais puro, o que foi observado pela espectrofotometria, com base na relação de absorbância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}). Tal relação foi mais próxima de 1,8 nas amostras extraídas com a utilização de fenol (dados não apresen-

tados). Faleiro *et al.* (1996) mostraram que a utilização de fenol no processo de extração foi fundamental para obtenção de DNA de qualidade a partir de uredósporos pré-germinados de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, agente causador da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Contudo, no caso do *C. pernicioso*, observou-se que foi possível a extração de DNA de qualidade e boa pureza (relação A_{260}/A_{280} igual a 1,56) a partir de micélio produzido no meio 3 (BD) sem a utilização de fenol, que é um reagente altamente tóxico.

Quanto à integridade do DNA, verifica-se que o DNA extraído a partir de micélio produzido nos meios 2 e 3 apresentaram melhor qualidade (Figura 2). A utilização de fenol (Figura 2A) também contribuiu para o aumento da integridade das amostras de DNA, certamente por melhorar a eficiência do processo de desproteínização. Este aumento da integridade conferida pela utilização de fenol também foi verificado no trabalho de Faleiro *et al.* (1996).

Pela análise dos resultados (Figura 2), verifica-se que as amostras de DNA extraídas a partir de massa micelial produzida nos meios 1 e 4 apresentaram sérios problemas de integridade, fazendo com que as amostras não fossem visualizadas (Figura 2B). Essa baixa integridade do DNA possivelmente deveu-se a um processo degradativo da massa micelial e, conseqüentemente do próprio DNA, o que pode ter iniciado assim que o crescimento micelial atingiu as bordas da placa de Petri (aproximadamente sete dias após a inoculação). A confirmação dessa hipótese foi feita ao se extrair DNA de boa integridade e qualidade a partir de micélio produzido nos meios 1 e 4 durante cinco dias de crescimento (dados não apresentados). Portanto, a extração de DNA de qualidade a partir de massa micelial de *C. pernicioso* deve ser feita a partir de micélio novo.

Amostras de DNA mais íntegros possibilitaram a

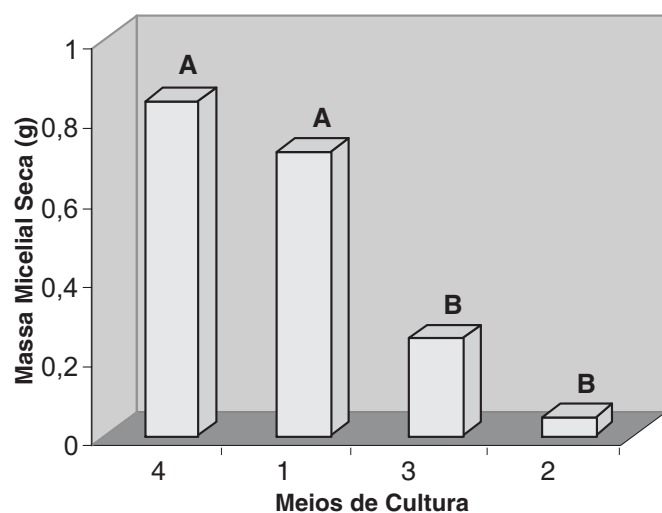


FIG. 1 - Produção de massa micelial seca (g) de *Crinipellis pernicioso* por placa de Petri após dez dias de crescimento em quatro meios de cultura: 1. extrato de levedura; 2. extrato de malte; 3. BD e 4. extrato de malte + BD. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

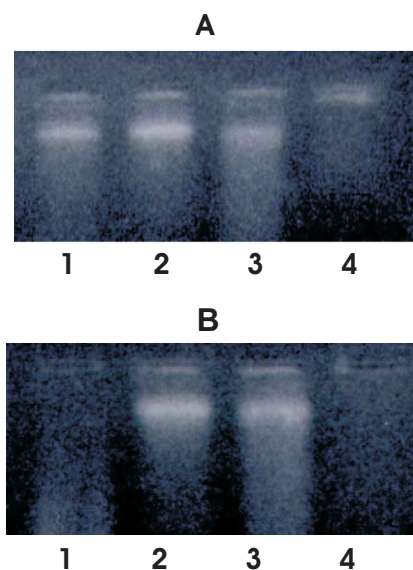


FIG. 2 - Amostras de DNA extraído a partir de micélio de *Crinipellis pernicioso* produzido nos meios de cultura: 1. extrato de levedura; 2. extrato de malte; 3. BD e 4. Extrato de malte + BD. As amostras de DNA foram extraídas utilizando-se (A) e não se utilizando fenol (B) durante a desproteínização. Foram aplicados, aproximadamente, 2,5 μ g de DNA por amostra.

obtenção de marcadores RAPD mais nítidos e reprodutíveis (dados não apresentados), confirmando a importância da qualidade do DNA extraído para a amplificação via reação em cadeia da polimerase (Williams *et al.*, 1990).

Pode-se concluir que é possível a extração de DNA de *C. pernicioso*, a partir de massa micelial produzida em meio de cultura barato como o BD, sem a necessidade de desproteínização com fenol (produto altamente tóxico), embora tal reagente melhore a pureza e a integridade do DNA. A utilização de micélio novo de *C. pernicioso* é fundamental para obtenção de amostras de DNA íntegras. O crescimento de massa micelial nos meios 1 e 4 visando extração de DNA deve ser feito por, no máximo, sete dias. Tais procedimentos, provavelmente, podem ser utilizados, com sucesso, na extração de DNA a partir da massa micelial de outros fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERBRHAN, T. & FURTEK, D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer isolates from different hosts. *Plant Pathology* 43:1020-1027. 1994.
- ANDERBRHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M.M., CASCARDO, J.C.M. & FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 105:167-175. 1999.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. *Basic Plant Pathology Methods*. Florida. CRC Press. 1995.
- FALEIRO, F.G., BARROS, E.G., VILARINHOS, A.D., CORRÊA, R.X., PAULA JÚNIOR, T.J. & MOREIRA, M.A. Otimização da

- extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. Fitopatologia Brasileira 21:304- 307. 1996.
- GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P., FALEIRO, F.G., SILVA, S.D.M., ARAÚJO, I.S., BAHIA, R.C., VALLE, R.R., MORAES, M.G. & AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Proceedings, vol.1, 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 2000a. pp.605-612.
- GOMES, L.M.C., MELO, G.R.P., FALEIRO, F.G., PIROVANI, C.P., SILVA, S.D.M., AHNERT, D. & MORAES, M.G. Similaridade genética de isolados de *Crinipellis pernicioso* coletados na região cacaueteira do sul da Bahia, baseada no seqüenciamento da região ITS. Genetics and Molecular Biology 23:197. 2000b. (Resumo).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.3. 1989.
- THOROLD, C.A. Diseases of Cocoa. Oxford, U. K., Clarendon Press. 1975.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218. 1990.