

ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REP-PCR APLICADA AO ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Pyricularia grisea*

Maycon Eduardo Nicoletti⁽¹⁾, Gustavo Emygdio Halfen⁽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 – Estação Experimental de Itajaí.

O fungo *Pyricularia grisea* é o agente etiológico da brusone, principal doença da cultura do arroz. Esse fungo possui alta variabilidade genética, resultando em mais de 256 raças diferentes. As causas dessa diversidade, conforme Kistler & Miao (1992), estão associadas a mutações, deleções, trocas genéticas entre cepas, e inserção de elementos transponíveis, estes responsáveis por rearranjos no material genético do fungo. Por essa razão, é imprescindível o estudo da variabilidade do fungo, de sua base genética, assim como da interação com seu hospedeiro. Kachroo *et al.* (1994), estudando a genética de *P. grisea*, identificou seqüências nucleotídicas repetidas ao longo de seu genoma (Pot-2) que, por estarem presentes em torno de 100 cópias por genoma, tornam-se um promissor marcador molecular no estudo de diversidade genética de *P. grisea*. A partir desse conhecimento, George *et al.* (1998) desenvolveram a técnica Rep-PCR, baseada na amplificação das regiões entre os elementos repetitivos Pot-2, gerando fragmentos de tamanhos variados, e desde então esta técnica vem sendo amplamente utilizada. Para que sejam mantidas a especificidade e a confiabilidade da técnica, são requeridas concentrações adequadas de reagentes, além da adição de componentes que melhorem as condições para a reação enzimática. Conforme Frackman *et al.* (1998), o uso de aditivos nas reações de PCR pode aumentar a eficiência, a especificidade e a consistência dos resultados. Por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido freqüentemente usado em otimizações de PCR, e a amplificação de seqüências-alvo muitas vezes só é conseguida com a adição deste (Frackman, *et al.*, 1998). Por isso, testes com aditivos ou otimizadores são de grande valia em estudos genéticos baseados nessa técnica. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a concentração ideal de DNA genômico, assim como avaliar o efeito da adição de DMSO nas reações de Rep-PCR para o estudo de diversidade genética de *P. grisea*.

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 N líquido, e a extração do material genético foi baseada no protocolo descrito por Scott *et al.* (1993). A quantificação e a qualificação do DNA foi feita através de fluorômetro (Bio-Rad VersaFluorTM) com o corante Hoechst 33258, e de corrida eletroforética por 90 min em géis de agarose 0,8% corados com SYBR[®] Safe (Invitrogen). Foram conduzidos dois experimentos: **(i) teste de quantidade de DNA genômico** - o DNA genômico de três isolados de *P. grisea* foi submetido à técnica de Rep-PCR nas quantidades de 25 ng, 50 ng, 75 ng e 100 ng por reação; e **(ii) teste de concentração do aditivo DMSO** - reações de rep-PCR foram realizadas com 75 ng de DNA genômico e diferentes concentrações do aditivo DMSO (0%, 2,5%; 5%; 7,5% e 10%); ambos foram conduzidos com três repetições. As amplificações enzimáticas para as regiões espaçadoras dos elementos Pot-2 foram realizadas nas condições descritas por George *et al.* (1998), em reações de 25 µL com 3 mM de MgCl₂, 600 µM de dNTPs, 2 U de *Taq* DNA polimerase Platinum, 0,5 µM de cada iniciador, tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, e 50 mM KCl) com concentrações variadas de DNA genômico e DMSO, conforme descrito acima, de acordo com a metodologia de cada experimento. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética

em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Invitrogen®).

No experimento (i), onde foram testadas diferentes quantidades de DNA genômico de *P. grisea*, foram amplificados fragmentos em três dos quatro tratamentos (Figura 1). Os tratamentos extremos (25 ng e 100 ng) não apresentaram resultados positivos, quando comparados com as concentrações intermediárias (50 ng e 75 ng). O tratamento de menor concentração não resultou em amplificações visíveis em gel de agarose, e o de maior concentração apresentou somente amplificação pouco visível dos fragmentos de menor peso molecular, e em apenas dois dos isolados testados. Analisando os produtos de amplificação do tratamento com concentração de 50 ng por reação, pode-se observar a baixa intensidade das bandas de maior peso molecular. Isso ocorre devido à quantidade insuficiente de DNA na reação, o que pode comprometer a análise, trazendo dificuldades na interpretação dos resultados. O melhor tratamento, portanto, foi o de 75 ng de DNA por reação, que proporcionou visualização clara dos fragmentos gerados, independente do peso molecular destes, o que torna esta concentração recomendada para análises de diversidade genéticas de *P. grisea* baseadas em Rep-PCR.

No experimento (ii), onde foram testadas diferentes concentrações do aditivo DMSO, observaram-se diferenças dos tratamentos quando comparados com a testemunha, o que demonstra a efetividade do produto na técnica utilizada (Figura 2). Segundo Kovárová e Dráber (2000), o DMSO, assim como outros aditivos, é conhecido por incrementar, sob determinadas condições, a especificidade e eficiência da PCR. Esse incremento pode ser proporcionado pelo auxílio na desnaturação de seqüências ricas em GC (Frackman *et al.*, 1998), já que o DMSO é um co-solvente que pode aumentar a estringência da reação. Foram obtidas diferenças entre as concentrações testadas, sendo que o tratamento com DMSO a 2,5% pode ter sido insuficiente para que houvesse eficácia quando comparado à testemunha. Já o tratamento com DMSO a 7,5% apresentou queda na eficiência de amplificação, e não se obteve amplificação no tratamento com a concentração mais alta (10%). É sabido que a concentração de 10% de DMSO pode reduzir pela metade a atividade da enzima Taq DNA polimerase (Innis & Gelfand, 1990; Gelfand & White, 1990), o que justifica a inexistência de fragmentos amplificados quando esta concentração foi utilizada neste experimento. Assim sendo, a concentração intermediária (5%) foi a que proporcionou melhores resultados na amplificação, e consequentemente na visualização dos fragmentos de maior peso molecular.

Com base nesses resultados, pode-se concluir que: (i) a concentração de DNA genômico é fator determinante na obtenção de produtos de amplificação por rep-PCR, sendo que a concentração de 75 ng por reação apresenta os melhores resultados; (ii) a concentração do aditivo DMSO também influencia nos resultados de rep-PCR, sendo que a adição de 5% de DMSO por reação otimiza a obtenção e visualização de fragmentos específicos em Rep-PCR para estudos de diversidade genética de *P. grisea*.

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.
- FRACKMAN, S.; KOBS, G.; SIMPSON, D.; STORTS, D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. **Promega notes**, v.65, p.27-30, 1998.
- GELFAND, D.H.; WHITE, T.J. Thermostable DNA polymerases. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, CA: Academic Press, p.129-141. 1990.
- 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.

- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, CA: Academic Press, p.3-12, 1990.
- 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.
- KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.131-152, 1992.
- KOVÁROVÁ, M.; DRÁBER, P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.13, e70, 2000. Online ISSN: 1362-4962.
- 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.sbpcnet.org.br/livro/58ra>. Acesso em: 27/03/07.

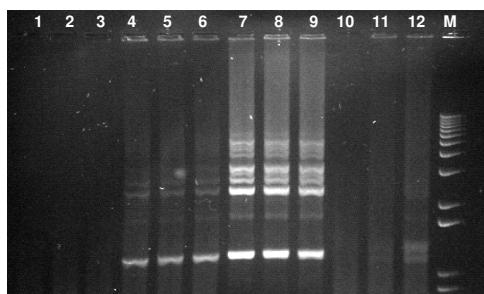


Figura 1. Produtos de Rep-PCR obtidos em reações com diferentes quantidades de DNA genômico de *Pyricularia grisea* por reação. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). Linhas 1 a 3 = 25 ng; 4 a 6 = 50 ng; 7 a 9 = 75 ng; 10 a 12 = 100 ng; M = marcador de peso molecular de 1 Kb Plus Invitrogen.

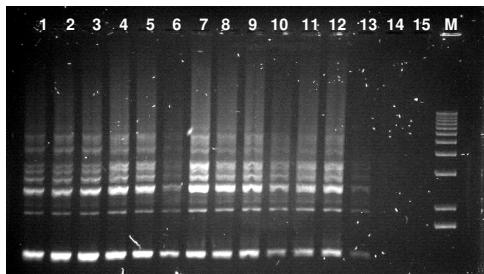


Figura 2. Produtos de Rep-PCR obtidos em reações com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) e 75 ng de DNA genômico de *Pyricularia grisea* por reação. Os fragmentos foram submetidos a corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR® Safe (Invitrogen). Linhas 1 a 3 = testemunha sem DMSO; 4 a 6 = DMSO 2,5%; 7 a 9 = DMSO 5%; 10 a 12 = DMSO 7,5%; 13 a 15 = 10% DMSO; M = marcador de peso molecular de 1 Kb Plus Invitrogen.

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