

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Botrytis cinerea* UTILIZANDO BROMETO DE CETILTRIMETILAMÔNIO

JUSSUANE PORTELLA DA SILVA¹; SELENE HENSE LILGE²; PEDRO LOPES REISSER³; GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO⁴; VANESSA GALLI⁵; CESAR VALMOR ROMBALDI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – jussuane.biotec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – selenelilge04@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - vane.galli@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria X ananassa*) é um pseudofruto de clima temperado, que tem efeitos positivos à saúde (GIAMPIERI et al., 2015) devido aos seus compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, entre outros. Além das características sensoriais, o morango é de relevante valor econômico e, por isso, os estresses bióticos e abióticos que atingem o morangueiro são amplamente estudados.

O *Botrytis cinerea* é um fungo filamentosos fitopatogênico do gênero Botryotinia (GARFINKEL, 2021), sendo um dos estresses bióticos que atingem o morangueiro. As infecções causadas pelo fungo podem causar perdas pré e pós-colheita, e devido a isso, são desenvolvidos métodos de controle como agentes biológicos e fungicidas, para os quais o fungo já apresenta formas de resistência (LEROUX et al., 2002).

Considerado o segundo fungo patogênico de plantas de maior importância científica e econômica (DEAN et al., 2012), o *Botrytis* apresenta algumas formas de infecção como a excreção de proteínas que degradam a parede celular e pequenas moléculas de RNA, as quais atuam como efetores de supressão do sistema imune do hospedeiro (WEIBERG et al., 2013). Esses RNAs são chamados RNAs de interferência, e se apresentam tanto no modo de infecção do fungo, quanto na resposta de defesa da planta (WANG et al., 2016).

Para que sejam desenvolvidas técnicas de controle biológico do *Botrytis*, como aquelas baseadas em RNAi, é necessário primeiramente a obtenção de DNA de qualidade, para posteriormente amplificar regiões de interesse através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para tais fins, o presente trabalho baseou-se no protocolo de extração de DNA à base de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Doyle e Doyle (1990) para o isolamento de DNA de plantas.

Sabendo da necessidade de otimização das extrações de DNA (SCHENK et al., 2023), pretende-se padronizar o protocolo de isolamento de DNA de *Botrytis*, visando a minimização de degradação e perda do material genético, bem como um material de alta qualidade e concentração. Assim, o método CTAB modificado para RNA (MESSIAS et al., 2014) foi utilizado como referência devido à sua utilização na rotina do laboratório.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras e propagação de *Botrytis* em placas

As amostras de *Botrytis cinerea* foram isoladas a partir de morangos infectados, coletados diretamente do produtor. A inoculação do fungo foi feita

através de propagação em placas contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar), cultivados por 14 dias. Foram feitas 24 placas, divididas em 4 grupos com 3 repetições.

2.2 Extração de DNA CTAB

Foram utilizados 200 mg de tecido fúngico macerados com nitrogênio líquido e então divididos em dois tubos de 2 mL. Em seguida, adicionamos 1 mL de um tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 2% CTAB, 2 M de NaCl, 25 mM de EDTA) homogeneizando a amostra. Foram adicionados 3% (v/v) de β -mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 65 °C por 30 minutos, agitando-os a cada 15 minutos. Após, foram adicionados 500 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), e então agitados por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 16.500 x g por 10 minutos, e após o sobrenadante foi colocado em um novo tubo. Adicionou-se novamente clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), repetindo a centrifugação.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionando 1x o volume de isopropanol gelado, e então os tubos foram incubados a -60 °C por 10 minutos. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados, e descartado o sobrenadante. O DNA foi lavado com etanol 80% e centrifugado duas vezes a 16.500 x g por 2 minutos. Por fim, o DNA foi ressuscitado em 100 μ L de água Milli-Q estéril e os tubos foram armazenados a -20 °C.

2.3 Quantificação de DNA

Para averiguar a qualidade do DNA extraído, foram feitas as análises de quantificação em espectrofotômetro NanoVue™ Plus, e a integridade em eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o marcador de peso molecular 1Kb Kasvi e corado com brometo de etídio.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método CTAB é largamente utilizado tanto no isolamento de DNA (SILVA, 2010) como de RNA (MESSIAS et al., 2014) em amostras vegetais, além de ser utilizado para isolamento de DNA de amostras fúngicas (WATANABE et al., 2010), e por isso foi avaliada sua eficácia no presente estudo.

Para tanto, inicialmente foram obtidas as amostras de *Botrytis cinerea*. Como observado na figura 1, apenas duas das 24 placas mostraram padrão de crescimento e cor da colônia característicos, que coincidem com os trabalhos de *Botrytis* presentes na literatura (KUMARI et al., 2014; WANG et al., 2022), e por



isso foram selecionadas para o isolamento de DNA.

Figura 1. Crescimento micelial característico de *Botrytis cinerea*, placa A (esquerda) e placa B (direita).

A tabela 1 expõe os resultados obtidos a partir da análise quantitativa com espectrofotometria, onde as amostras, em geral, têm concentrações de DNA adequadas, porém a qualidade das amostras tem uma variação significativa.

Ao analisarmos as amostras individualmente, podemos ver que a amostra A1 obteve concentração inferior às demais amostras. Já ao analisar a razão A_{260}/A_{280} , usada para avaliar a pureza dos ácidos nucleicos em relação a contaminação por proteínas, esta amostra obteve o valor de 2,13, sugerindo um DNA relativamente puro. Enquanto isso, a razão A_{260}/A_{230} , que é uma medida secundária para a pureza de ácidos nucleicos, foi de 2,39, sugerindo então que a amostra não tem contaminação significativa de outros compostos.

É possível observar o mesmo padrão ao analisarmos as razões das amostras A2 e B1, sendo que estas apresentaram valores maiores de concentração. Dentre todas as amostras, a amostra B2 obteve a maior concentração, entretanto, apresentou a menor razão A_{260}/A_{230} , indicando ainda uma qualidade adequada, porém inferior às demais amostras.

Tabela 1 – Concentração de DNA e pureza das amostras (razão A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) obtidas a partir da extração de DNA CTAB.

| Amostra | Concentração de DNA (ng/μL) | Razão (A_{260}/A_{280}) | Razão (A_{260}/A_{230}) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A1 | 115,0 | 2,13 | 2,39 |
| A2 | 280,0 | 2,08 | 2,34 |
| B1 | 211,0 | 2,12 | 2,36 |
| B2 | 323,5 | 2,06 | 1,80 |

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Ao analisar a integridade do DNA extraído, na figura 2 podemos visualizar bandas visivelmente grandes, padrão esperado para DNA genômico. No entanto, há um arraste significativo que indica degradação do material genômico, além da presença de RNA, indicado na figura 2.

Sendo assim, apesar da obtenção de boas concentrações e baixo nível de contaminação indicados pela quantificação em espectrofotometria, o método não garantiu a total integridade do DNA, e devido à presença de RNA, as amostras poderão ser submetidas a tratamento com RNase para verificar de fato a qualidade das amostras.

Embora o método de extração de DNA utilizado neste trabalho seja eficiente nas rotinas de laboratório para tecidos de plantas, para que apresente melhores resultados na extração de DNA de *Botrytis* é possível otimizar alguns passos, como por exemplo, o uso de SDS (dodecilbenzeno sulfonato de sódio) na lise celular ou a precipitação com isopropanol e etanol (WATANABE et al., 2010).

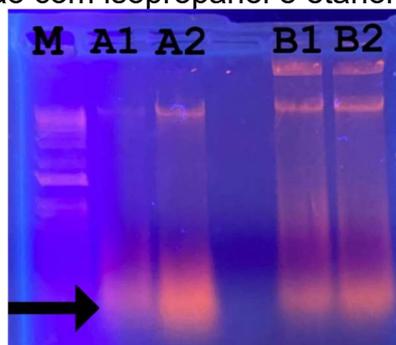


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras obtidas a partir da extração de DNA utilizando o método CTAB, indicando a presença de RNA. M- Marcador de peso molecular, A1, A2, B1 e B2.

4. CONCLUSÕES

O método foi eficiente na extração do DNA do fungo *Botrytis cinerea*, porém para que se estabeleça como padrão, o protocolo deve sofrer pequenas alterações que garantam maior integridade ao produto da extração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, maio 2012.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FILLINGER, S.; ELAD, Y. (EDS.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- GARFINKEL, A. R. The History of *Botrytis* Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. **Phytopathology**®, v. 111, n. 3, p. 437–454, mar. 2021.
- GIAMPIERI, F. et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. **Food & Function**, v. 6, n. 5, p. 1386–1398, 2015.
- KUMARI, S. et al. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. **Microbiological Research**, v. 169, n. 11, p. 862–872, nov. 2014.
- LEROUX, P. et al. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 876–888, set. 2002.
- MESSIAS, R. D. S. et al. ISOLATION OF HIGH-QUALITY RNA FROM GRAINS OF DIFFERENT MAIZE VARIETIES. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697–707, 3 out. 2014.
- WANG, M. et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, v. 2, n. 10, p. 16151, 19 set. 2016.
- WANG, L. et al. Isolation and control of *Botrytis cinerea* in postharvest green pepper fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 302, p. 111159, ago. 2022.
- WATANABE, M. et al. Rapid and Effective DNA Extraction Method with Bead Grinding for a Large Amount of Fungal DNA. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1077–1084, jun. 2010.
- WEIBERG, A. et al. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 4 out. 2013.
- SCHENK, J. J. et al. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. **Applications in Plant Sciences**, v. 11, n. 3, p. e11517, maio 2023.
- SILVA, M. N. D. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973–978, dez. 2010.