



Ubiraci G. P Lana¹, Newton P. Carneiro¹, Ana L. M. Castanheira², Isabel R. P. Souza¹,
Elizabeth de Oliveira¹, Charles M. Oliveira³ e Edilson Paiva¹.

¹Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, 35701-970, Sete Lagoas/MG; ²Doutoranda em
Genética e Melhoramento de Plantas-UFLA; ³Embrapa Cerrados CP. 08223, 73301-970,
Planaltina, DF. E-mail: newtonc@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: Spiroplasma, Mollicutes, *Zea mays* L., DNA genômico.

INTRODUÇÃO

Espiroplasmas são microrganismos procarióticos pertencentes ao Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Mollicutes, Ordem Spiroplasmatales, Família Spiroplasmataceae e Gênero *Spiroplasma* (Gasparich, 2002). São conhecidas hoje diversas espécies de espiroplasma, mas apenas três são fitopatogênicas: *S. citri*, *S. kunkelii* e *S. phoenicium*. Esses microrganismos são transmitidos por insetos vetores sugadores de seiva, e infectam o floema da planta hospedeira. O *S. kunkelii* é patogênico ao milho, sendo transmitido pela cigarrinha *Dalbulus maidis* e causando a doença conhecida como Enfezamento Pálido (*Corn stunt spiroplasma*). Os principais sintomas da doença são estrias cloróticas que se alongam da base ao ápice da folha, encurtamento dos internódios e proliferação de espigas com poucos ou nenhum grão, causando perdas expressivas na produção de grãos (Masola Júnior, 1999). Para análises do genoma desse patógeno tem sido utilizado um kit comercial para extração do DNA (Bai e Hogenhout 2002) de alto custo. O desenvolvimento de métodos alternativos e de menor custo para extração de DNA de espiroplasma pode contribuir para facilitar a realização de análises moleculares diversas, visando a geração de conhecimento aplicável ao controle do Enfezamento Pálido. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo prático de extração de DNA de espiroplasma, com qualidade e quantidade adequadas para uso em análises da variabilidade desse patógeno através das técnicas de PCR e restrição utilizando reagentes de custo relativamente baixo.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e multiplicação do espiroplasma

Os isolados de espiroplasma foram obtidos de diferentes regiões produtoras de milho, Dourados-MS (D), Itumbiara-GO (I), Sete Lagoas-MG (S) e Uberlândia-MG (U). O espiroplasma foi isolado de plantas de milho apresentando sintomas típicos de enfezamento e multiplicado em meio de cultura líquido LD8A3, pelo período de um mês (Lee & Davis, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi desenvolvido por pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo um protocolo para extração de DNA de espiroplasma cultivado *in vitro*, o qual está descrito a seguir. Um volume de 40 mL do meio de cultura de espiroplasma, em tubo Nalgene de capacidade de 50 mL, foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, 39 mL do sobrenadante foram descartados, cuidadosamente e com o auxílio de micropipeta, para não haver perda do *pellet*. O volume restante de 1 mL contendo o *pellet* foi agitado em vortex e transferido para um tubo de eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µl do tampão de lise composto de 300 mM de Tris-HCl pH 8,0, 30 mM EDTA pH 8,0, 3% SDS e 1,5 M NaCl. O volume final de 1,5 mL foi transferido para dois microtubos, colocando-se 750 µL em cada um. A cada tubo foram adicionados 500 µl de fenol (equilibrado pH 8.0) mais 300 µl de clorofórmio, sendo agitados em vortex por 1 minuto e centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação e separação das fases, foi coletada a fase superior contendo o DNA e transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 500 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos, centrifugados a 16.000 x g por 5 minutos e novamente coletada a fase superior contendo o DNA. Após repetição da extração com clorofórmio foi adicionado um volume de isopropanol 99% v/v (-20°C) e mantidos a -20°C por uma hora para precipitação do DNA. A solução foi centrifugada a 16.000 x g por 10 minutos, o precipitado lavado com etanol 70% v/v (-20°C) e seco a vácuo. Após secagem, o DNA foi ressuscitado em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

Para comparar a efetividade do protocolo desenvolvido, três procedimentos foram utilizados para a extração do DNA dos isolados de espiroplasma em meio de cultura sendo: kits comerciais da Promega (A e B), respectivamente, Wizard[®] Genomic DNA Purification (cat.no. A1120) e Wizard[®] SV Genomic DNA Purification (cat.no. A2365) e o protocolo desenvolvido na Embrapa Milho e Sorgo (C). Para confirmar que o DNA extraído era dos diferentes isolados de espiroplasma, realizou-se uma reação de PCR empregando-se um par de *primers* específicos para a detecção do gene da espiralina CSSF2 e CSSR6 (Barros et al., 2001), sendo os fragmentos de PCR resolvidos em gel de agarose 0,8%. A quantificação do DNA extraído pelos três diferentes procedimentos, encontra-se na **Figura 1**. A qualidade do DNA extraído pelos três procedimentos é semelhante, entretanto, devido aos DNAs terem sido ressuscitados nos mesmos volumes (40 µl) e o volume aplicado ter sido o mesmo, observa-se que maior quantidade de DNA foi obtida com o procedimento C. Apenas a amostra de Sete Lagoas teve DNA detectável no gel pelos três métodos. Na **Figura 2** são apresentados os resultados da reação de PCR, específico para detecção de espiroplasma, empregando-se o DNA extraído pelos três diferentes procedimentos. Com este teste verificou-se que mesmo nas amostras que não apresentavam quantidades de DNA detectáveis em gel de agarose (Dourados-MS (D), Itumbiara – GO (I) e Uberlândia-MG (U)), foram obtidos produtos de PCR indicando a presença de DNA dos espiroplasmas. A análise semi-quantitativa pelo PCR confirmou novamente a maior quantidade de DNA de espiroplasma na amostra de Sete Lagoas (S). Na **Tabela 1** verifica-se a concentração de DNA extraído de alguns isolados de espiroplasma e estimados utilizando-se o padrão Lambda DNA. O protocolo desenvolvido para a extração de DNA de isolados de espiroplasma do milho, multiplicados em meio de cultura, apresentou resultados satisfatórios em termos de qualidade e principalmente de quantidade obtida em relação aos kits comerciais. Além

disto, mostrou ser um procedimento rápido, versátil e de baixo custo. A versatilidade está no fato de poder ser utilizado em escalas reduzidas, como por exemplo, com um volume inicial de 1 mL de meio de cultivo, desde que haja quantidade suficiente de células do espiroplasma. A maior ou menor concentração de células de espiroplasma depende do período de tempo de cultivo. Desta forma, cultivos recentes, com pelo menos um mês, dependem de quantidades iniciais maiores de espiroplasma para a extração de DNA. Cultivos com idade variando de 3 a 5 meses apresentam quantidades maiores de células, podendo ser utilizados volumes de meio de cultura menores (de até 1 mL) para a extração do DNA. Contudo, culturas com crescimento excessivo desse microrganismo podem não ser adequadas para a extração do DNA, pois a presença de células mortas poderia resultar na presença do DNA degradado. A quantificação de células no meio de cultivo é feita por meio de microscópio óptico de contraste de fase ou de campo escuro. Para o procedimento em pequena escala, levando-se em consideração a idade do cultivo e quantidade de células, a única modificação no protocolo é que pode-se utilizar diretamente 1 mL do meio de cultivo sem necessidade da primeira centrifugação, já iniciando-se na etapa de adição de 500 µL do tampão de lise, seguindo-se o restante do protocolo. Devido ao volume inicial do meio de cultivo ser menor, recomenda-se que o DNA seja ressuspense em um menor volume de TE. A função do tampão de lise, além de destruir as membranas plasmáticas é manter o pH e quelar metais que porventura possam ativar endonucleases. O fenol e o clorofórmio, imediatamente após o rompimento da membrana do espiroplasma, auxilia na desnaturação das proteínas e as centrifugações subsequentes têm o objetivo de remover proteínas desnaturadas, carboidratos e os minerais (Sambrook et al., 1989). Cálculo da concentração de DNA, abaixo de 250 ng/ul tornam-se imprecisas em espectrofotômetro. Em função disto, as concentrações do DNA dos espiroplasmas foram estimadas em gel de agarose empregando-se DNA padrão. O gel de agarose 0,8% também foi usado para verificar se o DNA genômico estava fragmentado, o que não ocorreu. Quando ocorre fragmentação ou degradação excessiva do DNA é possível ver um rastro ao longo de toda a canaleta. Quanto maior e mais intenso é o rastro, maior é o nível de degradação do DNA. Dentre os fatores de degradação ou fragmentação do DNA inclui-se a química por endonucleases e a física por manipulação excessiva. Nesse protocolo não foi utilizada RNase, sendo então provável que o RNA do espiroplasma esteja intacto na amostra, em pequenas quantidades. O DNA extraído com o referido protocolo foi utilizado na técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), confirmando que a qualidade e a quantidade do DNA obtido foram suficientes para as etapas de restrição e amplificação via PCR (Dados não mostrados).

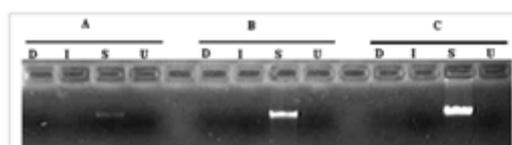


FIGURA 1. Quantificação do DNA extraído de isolados de espiroplasma (D, S, I, U) empregando-se os kits comerciais da Promega, A e B e o protocolo desenvolvido C. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado em UV.

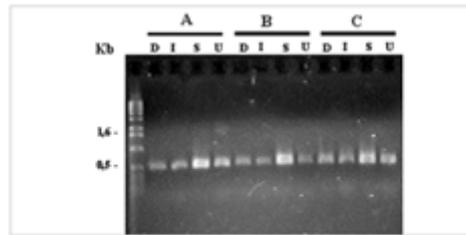


FIGURA 2. Resultado das reações de PCR com um par de primers específicos para detecção do gene da espirulina em amostras de DNA extraídas dos meios de cultura dos diferentes isolados (D, I, S, U) de espiroplasma. A, B e C, procedimentos para extração de DNA, M = marcador de peso molecular, tamanho dos fragmentos em Kb.

TABELA 1. Concentração aproximada do DNA dos isolados de espiroplasma estimada por comparação com DNA de fago lambda como padrão em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

Identificação dos isolados	Concentração do DNA (ng/µl)
D1	100
D2	100
D3	50
I1	200
I2	50
I3	100
S1	100
S2	50
S3	100
U1	200
U2	50
U3	50

