

## VIABILIDADE DA EXTRAÇÃO DE DNA DE FUNGOS EM MEIO SÓLIDO

*Almiro Neves dos Santos Júnior<sup>1,2</sup>, João Pedro Alves de Almeida Takahashi<sup>2</sup>,  
Emili Rane de Jesus Nascimento<sup>2</sup>, Franco Jesus de Andrade<sup>1</sup>, Guilherme Silva Nascimento<sup>2</sup>,  
Noemí Rocha dos Santos Silva<sup>2</sup>, Karina Peres Gramacho<sup>1,2\*</sup>*

<sup>1</sup>FITOMOL/CEPEC/CEPLAC, km 22, Rod. Ilhéus/Itabuna. 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil; almiro39@live.com.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Ilhéus/ Itabuna, km16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

\*Autor por correspondência: gramachokp@hotmail.com

O sucesso da aplicação de técnicas de biologia molecular se deve principalmente ao uso de DNA genômico de alta qualidade, integridade e ausência de impurezas. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade da extração de material genômico de fungos cultivados em meio sólido utilizando o Kit Wizard (Promega). Os isolados examinados incluíram *Ceratocystis cacaofunesta*, *Fusarium* spp., *Moniliophthora perniciosa* e *Trichoderma* spp. A concentração e a pureza do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria. Os resultados demonstraram que tanto o cultivo fúngico em meio sólido, quanto o protocolo de extração adotado, foram eficientes para a extração de concentrações substanciais de DNA de todos os isolados, mantendo sua qualidade e integridade.

**Palavras-chave:** Biologia molecular, Kit Wizard (Promega), micélio fúngico, protocolo de extração.

**Viability of fungal DNA extraction from solid medium.** The successful application of molecular biology techniques is mainly due to the use of high-quality, intact, and impurity-free genomic DNA. This study aimed to validate a genomic DNA extraction protocol from fungi grown on solid media using a DNA extraction protocol from a commercial kit designed for plant material. The isolates examined included pairs of *Ceratocystis cacaofunesta*, *Fusarium* spp., *Moniliophthora perniciosa*, and *Trichoderma* spp. The concentration and purity of the extracted DNA were evaluated by spectrophotometry. The results revealed DNA high-yield, was obtained from fungal cultivation on solid media as well as from comercial Kits.

**Key words:** Extraction protocol, fungal mycelium, molecular biology, Wizard kit (Promega).

As técnicas de biologia molecular permitem acessar e avaliar o genótipo e a variabilidade do DNA. Obter este material genético com alta qualidade a partir de tecido fúngico é um processo demorado e trabalhoso, frequentemente representando um gargalo em experimentos que requerem alto rendimento.

A extração de DNA fúngico é um processo frequentemente demorado, por incluir múltiplas etapas, incluindo crescimento do fungo em meio líquido ou sólido, rompimento da parede celular, remoção de proteínas e precipitação do material genético. As paredes fúngicas são ricas em quitinas; logo a eficácia da extração do ácido desoxirribonucleico depende de um processo de lise celular eficiente que recupere o DNA de maneira adequada para subsequente amplificação (Abdel-Latif; Osman, 2017).

Diversos métodos de extração de DNA fúngico têm sido desenvolvidos por vários pesquisadores (Trypathy et al., 2017), no entanto, os métodos tradicionais são demorados e requerem produtos químicos citotóxicos. Sendo assim, o uso de kits de extração eficazes e padronizados é cada vez mais importante para a obtenção de DNA de alta qualidade.

A extração de DNA a partir de micélio obtido diretamente do meio sólido oferece a vantagem de simplificar o processo, eliminando etapas adicionais de transferência e manipulação. Isso reduz o risco de contaminação e preserva a integridade do material genético, garantindo uma amostra de DNA de maior qualidade para as análises subsequentes.

O objetivo deste trabalho foi investigar a eficácia de um protocolo de extração de DNA genômico em diferentes espécies de fungos cultivados em meio sólido, empregando o Wizard® HMW Genomic DNA Purification Kit. O estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular CEPEC/CEPLAC, sendo utilizadas diferentes espécies fúngicas: *Ceratocystis cacaofunesta*, *Fusarium* spp., *Moniliophthora perniciosa* e *Trichoderma* spp.

Para a extração de DNA, o micélio fúngico foi retirado do meio de cultura com auxílio de um bisturi estéril, através da raspagem das colônias formadas em placa de Petri contendo Batata Dextrose Agar (Himedia®). A massa micelial obtida foi macerada em almofariz de porcelana, em contato com nitrogênio

líquido (N<sub>2</sub>). Parte do macerado foi colocado em um microtubo de 2,0 mL, ocupando 1/5 de seu volume, e as amostras foram submetidas ao Protocolo 3.C – para obtenção de DNA de tecido vegetal da Wizard® HMW Genomic DNA Purification Kit.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260nm (Sambrook et al., 1989) e a relação  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada para avaliar a pureza do material. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 1%, foram usadas como indicadores da integridade da amostra.

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise quantitativa por espectrofotometria, indicando que, de maneira geral, as amostras possuem concentrações adequadas de DNA, principalmente para *Ceratocystis cacaofunesta* e *Trichoderma* spp. A razão  $A_{260}/A_{230}$ , que serve como uma medida secundária de pureza dos ácidos nucleicos, situou-se entre 1,4 e 1,5, sugerindo a ocorrência de contaminantes, tais como proteínas ou carboidratos. Para aprimorar a qualidade das amostras, é recomendada uma etapa adicional de purificação do DNA. A integridade das amostras de DNA (Figura 1) foi confirmada por eletroforese em

Tabela 1. Quantificação e análise de pureza de amostras de DNA, extraídas de micélio fúngico utilizando-se leituras de absorvância de 260/280nm. A) *Ceratocystis cacaofunesta*; B) *Fusarium* sp.; C) *Moniliophthora perniciosa*; D) *Trichoderma* spp.

	A		B		C		D	
Concentrações (ng/μL)	451,1	467,1	185,1	185,3	110,8	104,2	386,4	227,7
A <sub>260</sub> /280	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,4

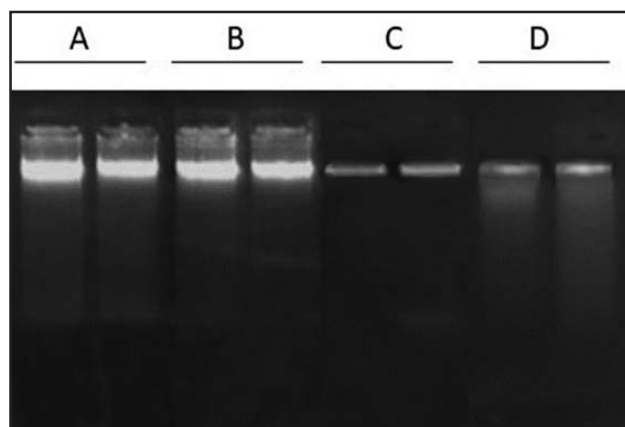


Figura 1. DNA genômico de fungos, extraído de micélio em meio sólido. A) *Ceratocystis cacaofunesta*; B) *Fusarium* sp.; C) *Moniliophthora perniciosa*; D) *Trichoderma* spp.

gel de agarose a 1% , onde foi possível observar DNA íntegro em todos os isolados fúngicos analisados.

A obtenção de DNA genômico de micélio coletado diretamente do meio sólido de diversos isolados fúngicos de diferentes espécies fúngicas: *Fusarium* spp., *C. cacaofunesta*, *M. pernicioso* e *Trichoderma* spp., utilizando o protocolo para tecido vegetal do kit Wizard® HMW Genomic DNA Purification. Essa abordagem gerou material genético de boa qualidade e alta concentração de DNA em  $\mu\text{l}$ . Além disso, embora necessite serem aprimorados, os resultados confirmam a adequação do uso do kit de extração de material vegetal Wizard® (Promega) para amostras fúngicas.

## Literatura Citada

- ABDEL-LATIF, A.; OSMAN, G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13 (1): 1 - 9.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory. 653p.
- TRIPATHY, S. K. et al. 2017. Exploring rapid and efficient protocol for isolation of fungal DNA. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6 (3): 951 - 960. ●