



## **BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLLETOTRICHUM SPP.**

**Protocolo das aulas práticas**

**Ano letivo 2024/25**

**Patrick Materatski**

**Carla Varanda**

**TÍTULO:**

BIOTECNOLOGIA VEGETAL: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLLETOTRICHUM SPP.,  
Protocolo das aulas Práticas, Ano letivo 2024/25

**AUTORES:**

Patrick Materatski

Carla Varanda

**ENDEREÇO:**

Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém – ESAS  
Quinta do Galinheiro – S.Pedro, 2001-904 Santarém,

**EDITOR:** INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

COPYRIGHT © 2025

**ISBN:**

**Ano Letivo 2024/25**

## **Unidade Curricular de Biotecnologia Vegetal**

### **Autores:**

#### **Carla Varanda**

Professora Adjunta

Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Santarém

CERNAS—Research Centre for Natural Resources, Environment and Society

E-mail: [carla.varanda@esa.ipsantarem.pt](mailto:carla.varanda@esa.ipsantarem.pt)

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/061E-C9D5-C76E>

Orcid ID: <http://orcid.org/0000-0002-6915-1793>

#### **Patrick Materatski**

Investigador Auxiliar

MED—Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, IIFA—Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora,

E-mail: [pmateratski@uevora.pt](mailto:pmateratski@uevora.pt)

Website institucional: <https://www.uevora.pt/pessoas?id=37663>

Ciência Vitae: <https://www.cienciavitae.pt/portal/9010-F718-9E95>

Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-5769-1963>

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	5
<b>LISTA DE ACRÓNIMOS</b> .....	6
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>ETAPA 1 – ISOLAMENTO DE FUNGOS DO GÉNERO COLLETOTRICHUM</b> .....	8
<b>ETAPA 2 – EXTRAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM</b> .....	13
<b>ETAPA 3 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE</b> .....	17
<b>ETAPA 4 – IDENTIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DOS ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM</b> .....	19

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Oliveira com azeitonas apresentando sintomas de antracnose causada pelo fungo <i>Colleterotrichum</i> spp.	9
<b>Figura 2.</b> Exemplos de três espécies do fungo causador da antracnose em oliveira isolados em meio PDA: 1. <i>C. acutatum</i> , 2. <i>C. nymphaeae</i> , 3. <i>C. godetiae</i> e 4. <i>C. fioriniae</i> . <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR (Materatski & Sousa, 2024). <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Figura 4.</b> Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	17
<b>Figura 5.</b> Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).	22
<b>Figura 6.</b> Exemplificação da qualidade de um cromatograma aberto pela ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA.	23
<b>Figura 7.</b> Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do início (região 3') dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.	24
<b>Figura 8.</b> Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação do fim (região 5') dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.	25
<b>Figura 9.</b> Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA após a seleção da região de melhor qualidade a ser exportada para o 'Explorador de alinhamentos' em formato ficheiro FASTA.	25
<b>Figura 10.</b> Sequência exportada do cromatograma para a interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA em formato ficheiro FASTA após a seleção da região de melhor qualidade.	26
<b>Figura 11.</b> Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a procura de sequências homólogas na base de dados GenBank através da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)'. <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Figura 12.</b> Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com a indicação dos parâmetros para a procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'. <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Figura 13.</b> Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com os resultados obtidos após procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'. <b>Erro! Marcador não definido.</b>	

## **LISTA DE ACRÓNIMOS**

PDA	<i>Agar Dextrose de Batata</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)</i>
CTAB	<i>Brometo de Amónio Cetiltrimetilamónio</i>
EDTA	<i>ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
HCl	<i>Ácido clorídrico</i>
NaCl	<i>Cloreto de sódio</i>
PVP	<i>Polivinilpirrolidona</i>
MgCl <sub>2</sub>	<i>Cloreto de magnésio</i>
TBE	<i>Tris/Borato/EDTA</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados</i>

## INTRODUÇÃO

A Unidade Curricular (UC) de Biotecnologia Vegetal (LBBA1250), é uma UC obrigatória do 2º ano da Licenciatura em Biologia e Biotecnologia Alimentar. Esta UC compreende, para além das aulas teóricas, uma componente teórico-prática e uma componente de prática laboratorial, nas quais se pretende que os estudantes aprofundem conhecimentos e obtenham competências no isolamento e cultura de organismos como bactérias e fungos de plantas de interesse para a região e o país. Pretende-se ainda que os alunos dominem técnicas de extração e identificação molecular que sustentam os vários domínios de aplicação tecnológica das plantas e dos seus sistemas e processos. Assim, os protocolos aqui descritos, incluem várias etapas realizadas num laboratório de biotecnologia vegetal, desde o isolamento de fungos de plantas, à extração e amplificação do DNA e identificação do organismos isolados. Uma vez que os protocolos usados em fungos de plantas são transversais em biotecnologia, os estudantes apreendem de forma simples, as várias das metodologias usadas rotineiramente num laboratório de biotecnologia vegetal.

Este manual descreve os protocolos a realizar nas aulas práticas no ano letivo de 2024/25.

### BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**Código:** LBBA1250

5 ECTS

**Área de Ensino:** Ciências biológicas

**Área Científica:** Biologia e Bioquímica

#### Objetivos de Desenvolvimento Sustentável



## ETAPA 1 – ISOLAMENTO DE FUNGOS DO GÉNERO COLLETOTRICHUM

### INTRODUÇÃO

Oliveiras (*Olea europaea* L.) em geral e a cultivar ‘Galega vulgar’ em particular são afetadas por diversas doenças. Entre elas, a antracnose continua a ser a mais devastadora, capaz de destruir produções inteiras (Talhinhas et al., 2005). Um grande número de espécies pertencentes ao género *Colletotrichum* estão associados à antracnose na oliveira, embora dentro do género, os agentes causadores da doença estejam divididos em dois complexos; *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Talhinhas et al., 2015). O Alentejo e Ribatejo são provavelmente as regiões mais importantes para a produção de azeitonas e também para a diversidade das espécies de fungos causadores de antracnose na oliveira. Nestas regiões a doença ocorre de forma epidémica embora tenham sido identificadas apenas três espécies dentro do complexo *C. acutatum*, como, *C. nymphaeae*, *C. acutatum* e *C. godetiae*, nas quais, a espécie *C. nymphaeae* prevalece (>95%) (Materatski, et al., 2019). O método de isolamento de fungos patogénicos de oliveira, neste caso espécies do género *Colletotrichum* é geralmente usado para: i) identificar um isolado de fundo associados aos sintomas causados numa árvore de oliveira, incluindo frutos, ramos e folhas de diferentes cultivares; ii) testar a infecciosidade dos isolados de fungos; e iii) propagar os isolados de interesse (Materatski, 2019).

Este método consiste na amostragem de folhas, ramos e frutos com sintomas de antracnose, em cultivares de oliveira. A amostragem de tecidos sintomáticos é essencial uma vez que podem existir oliveiras sem a presença dos fungos. No entanto, em caso de oliveiras assintomáticas para a antracnose, estas podem conter a presença de isolados de *Colletotrichum* spp., embora este processo de isolamento possa ser mais difícil. Após a amostragem, os tecidos sintomáticos são colocados para crescimento em placas de Petri com meio PDA (Agar Dextrose de Batata) para crescimento dos fungos presentes nos tecidos.

Nesta protocolo prático, pretende-se amostrar e isolar fungos do género *Colletotrichum* em tecidos de árvores de oliveira a partir de tecidos sintomáticos. A **figura 1** mostra tecidos de arvores de oliveira com sintomas de antracnose.



**Figura 1.** Oliveira com azeitonas apresentando sintomas de antracnose causada pelo fungo *Colleterotrichum* spp.

### **MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:**

- Árvores de oliveira sintomáticas para a antracnose
- Diferentes tecidos de plantas sintomáticos (frutos, ramos, e folhas)
  
- Tesoura de poda
- Sacos plásticos 1 litro
- Esguicho com etanol 70%
- Rótulos e lápis
- Etanol a 96%,
- Hipoclorito de sódio a 3%,
- Etanol a 70%
- Água ultrapura
- Papel filtro (Whatman) estéril.
- Placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio PDA (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Placas de Petri de 3 cm de diâmetro contendo meio PDA (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Caixa de esferovite
- Gelo
  
- Frigorífico para armazenar amostras
- Estufas

- Câmara de fluxo vertical

#### \*Preparação do Hipoclorito de Sódio a 3%

##### **Hipoclorito de Sódio a 3%:**

A partir do hipoclorito de sódio 100% fazer uma diluição para 3% utilizando água destilada, para uma solução final de 100 mL a 3%, junta-se 97 mL de água destilada e 3 mL de hipoclorito de sódio a 100%.

##### **Etanol 70% e 96%:**

A partir do Etanol 100% fazer uma diluição para 70% utilizando água destilada. Para uma solução final de 100 mL etanol a 70%, junta-se 70 mL de etanol 100% e 30 mL de água destilada.

A partir do Etanol 100% fazer uma diluição para 96% utilizando água destilada. Para uma solução final de 100 mL etanol a 96%, junta-se 96 mL de etanol 100% e 4 mL de água destilada.

#### **PROCOLO EXPERIMENTAL:**

As oliveiras amostradas podem pertencer a qualquer cultivar de oliveira com sintomas visíveis de antracnose. A amostragem deve-se realizar em diferentes tecidos da planta (frutos, ramos e folhas) e também incluir réplicas dos tecidos sintomáticos. As réplicas devem ser, técnicas (dentro da mesma árvore) ou biológicas (em diferentes árvores). A amostragem deve ser feita antes das aplicações dos produtos químicos e as amostras devem ser recolhidas ao redor de toda a árvore a 1,5 m acima do chão.

1. Amostrar os frutos, ramos e folhas sintomáticas, estes devem ser destacados dos ramos e colocados em sacos plásticos diferentes, e no caso do ramos estes devem ser destacados das arvores, com tamanho de  $\pm 30$  cm, com recurso a tesoura de poda. Todos os tecidos devem ser colocados em sacos plásticos diferentes (por tecido) e em cada saco deve ser introduzida a informação de amostragem (data, local, cultivar e tipo de tecido). As amostras devem ser transportadas para o laboratório numa caixa de esferovite refrigerada, armazenadas a 4 °C num frigorífico e processadas nas 48 h seguintes.
2. No laboratório, e para suprimir os microrganismos epífitos nas amostras recolhidas no campo (frutos, ramos e folhas), estas amostras devem ser desinfetadas superficialmente. A desinfecção envolve uma sequência de 3 minutos de imersões em etanol a 96%, 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 3%, 3 minutos em etanol a 70% e 3 vezes (3 minutos cada) em solução de água ultrapura, respetivamente, e de seguida, as amostras serão secas em papel Whatman estéril. Os ramos desinfetados devem ser cortados em secções de 0,5 cm<sup>2</sup>; os frutos devem ser cortados longitudinalmente e as folhas transversalmente e colocados (6 peças por

placa) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio PDA. Todo o procedimento deve ser realizado dentro de uma câmara de fluxo de ar laminar para garantir ambiente estéril. As placas devem então ser incubadas no escuro a 23–25 °C durante 4 dias.

3. Devido ao crescimento de diversos fungos os isolados de *Colletotrichum* spp. devem ser selecionados de acordo com as suas características morfológicas, como cor do micélio (cor laranja), a taxa de crescimento, textura, natureza da margem de crescimento e cor do verso. A forma dos conídios deve ser observada num microscópio composto (ampliação de 1000×). Após a distinção do isolado de *Colletotrichum* spp. este deve ser isolado, transferindo uma colónia para uma nova placa de PDA de 3 cm para crescimento de forma a garantir somente um isolado por placa.

### **Observação dos resultados:**

Os sintomas devem ser registados por cada grupo no **caderno de laboratório** e os registos devem, sempre que possível, ser acompanhados de fotografias.

1. Registrar o crescimento dos fungos a cada dia de crescimento (horário a combinar com o docente).
2. Registrar o crescimento dos fungos com crescimento bastante acelerado como *Rhizopus* sp. que podem indicar uma contaminação e poderá dificultar o isolamento do *Colletotrichum* spp.

### **Resultados esperados:**

4 dias após a introdução das amostras dos tecidos vegetais nas placas de Petri de 9 cm deve ser possível começar a diferenciá-los pelas características morfológicas. Aqueles com características de fungos do género *Colletotrichum* devem então ser isolados, com transferência do micélio, para crescimento em placas de 3 cm.



#### **Dicas**

- ✓ Para otimizar o isolamento devemos, logo que possível (2-3 dias após início do crescimento), fazer o isolamento daqueles isolados com características de *Colletotrichum* spp. para as placas de PDA de 3 cm.
- ✓ No mesmo tecido podem estar isolados diferentes da mesma espécie ou diferentes espécies do fungo do género *Colletotrichum*, para não perdermos esta variabilidade de isolados ou espécies devemos sempre observar as

características morfológicas, para em caso de diferenças ser possível obter estes isolados diferentes .

## REFERÊNCIAS:

Talhinhas, P.; Sreenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J.; Oliveira, H. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 2987–2998.

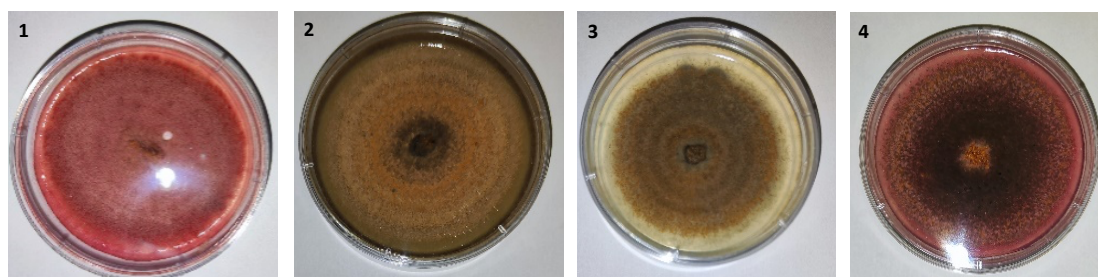
Talhinhas, P.; Gonçalves, E.; Sreenivasaprasad, S.; Oliveira, H. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *Eur. J. Plant Pathol.* 2015, 142, 73–83.

Materatski, P.; Varanda, C.; Carvalho, T.; Dias, A.B.; Campos, M.D.; Gomes, L.; Nobre, T.; Rei, F.; Félix, M.R. (2019). Effect of Long-Term Fungicide Applications on Virulence and Diversity of *Colletotrichum* spp. Associated to Olive Anthracnose. *Plants*, 8(9), 311.

## ETAPA 2 – EXTRAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM

### INTRODUÇÃO

O genoma dos fungos é constituído por DNA, e o primeiro passo do para a identificação molecular dos isolados de fungos é a extração do ácido nucleico. A extração do ácido nucleico permite a sua identificação, caracterização molecular e desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis, para isso o genoma pode ser clonado, sequenciado e expresso em vetores de expressão. Este protocolo permite a extração do DNA dos isolados de *Colletotrichum* obtidos na etapa anterior (Figura 2), para a identificação molecular e futura análise da diversidade destes isolados. Após a identificação molecular e diferenciação destes isolados, em caso de existir diversidade, pode-se então associá-los intensidade da doença, as cultivares amostradas e regiões. É possível também procurar regiões do genoma com mutações associadas a resistência aos fungicidas. O protocolo de extração do DNA total dos fungos segue o método brometo de amónio cetiltrimetilamónio (CTAB) (Doyle, J. e Doyle, 1987) adaptado no nosso laboratório por Varanda et al. (2016). Este é um método com baixo custo financeiro por amostra comparado com outros métodos baseados em kits com colunas (por exemplo os Kits da Quiagen, NZyTech e outros).



**Figura 2.** Exemplos de quatro espécies do fungo causador da antracnose em oliveira isolados em meio PDA: 1. *C. acutatum*, 2. *C. nymphaeae*, 3. *C. godetiae* e 4. *C. fioriniae*.

### MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:

- Isolados de fungos
- Almofariz esterilizado
- Pilão de Almofariz
- Tubos eppendorfs de 1,5 e 2 mL
- Micropipetas de 10, 100 e 1000 µL
- Pontas micropipetas de 10, 100 e 1000 µL
- Tubo falcon de 15 mL
  
- Azoto líquido

- EDTA 0,5 M (pH 8,0)
  - Tris HCL 1 M (pH 8,0)
  - HCl pH 8,0,
  - NaCl, 1,4 M
  - CTAB 10%
  - PVP
  - $\beta$ -mercapetanol
  - Proteinase K
  - Clorofórmio ISO 1000
  - Etanol absoluto
- 
- Ultracentrifuga para tubos eppendorfs
  - Agitador orbital com aquecimento
  - Câmara de fluxo vertical
  - Micro-espectrofotômetro
  - Ultra-congeladora -80°C
  - Centrífuga speed vácuo com aquecimento.

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL:**

### **Maceração dos isolados de Colletotrichum**

1. Micélio de cada isolado de Colletotrichum deverá ser macerado em almofariz com o uso de pilão e com recurso a azoto líquido, e armazenado em microtubos de 2 mL a -80°C para posterior utilização na extração de DNA.

### **Preparação do tampão CTAB**

O tampão de extração CTAB deverá ser preparado para um número exato de amostras. Em cada amostra de fungo macerado previamente e armazenado num microtubo de 2 mL deverá ser adicionado 600  $\mu$ L de tampão de extração CTAB. Se forem por exemplo 24 amostras, deverá ser preparado 14,4 mL de tampão de extração CTAB, no entanto, é recomendado adicionar mais para contemplar os pequenos desperdícios, ou seja, deverá ser preparado 15 mL de Tampão de extração CTAB.

1. Num tubo falcon de 15 mL deve-se adicionar 1,4 M NaCl (4,2 mL para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).
2. Em seguida, adiciona-se 20 mM EDTA (0,6 mL para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).
3. Em seguida, adiciona-se 0,1 M Tris pH 8.0 (o acerto do pH é realizado com HCl) (1,5 mL para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).

4. Em seguida, adiciona-se 4% de PVP (0,6 g para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).
5. Em seguida, adiciona-se 2 % de CTAB a 10% (4,5 mL para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).
6. 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercapetanol para cada 1 mL de tampão de extração CTAB (15  $\mu$ L para o caso da solução final de tampão CTAB de 15 mL).
7. O volume final tampão de extração CTAB deve ser acertado para 15 mL, ou seja, água ultrapura deverá ser adicionada até o volume alcançar os 15mL.
8. Esta solução deverá ser colocada no agitador orbital a 150 rpm com temperatura de 55°C por 10 minutos, ou até a homogeneização completa do tampão de extração CTAB.

### **Extração de DNA dos isolados de Colletotrichum**

Em cada tubo eppendorf de 2 mL (previamente com os isolados de Colletotrichum macerados) deve-se adicionar 600  $\mu$ L de tampão de extração CTAB.

1. Logo após a introdução dos 600  $\mu$ L de tampão de extração CTAB em cada eppendorf de 2 mL com cada isolado de Colletotrichum macerado, deve-se adicionar 10  $\mu$ L Proteinase K.
2. Em seguida, os eppendorfs deverão ser colocados no agitador orbital a 150 rpm com temperatura de 55°C por 90 minutos. Deve-se a cada 15 minutos, agitar os eppendorfs manualmente por inversão durante 5 minutos.
3. Após os 90 minutos, em cada tubo deve-se adicionar 600  $\mu$ L de clorofórmio ISO 1000, agitar manualmente por inversão durante 10 minutos e em seguida centrifugar por 10 minutos a 5000g na ultracentrifuga.
4. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo deverá ser transferido para um novo tubo, em cada tubo também deverá ser adicionado 800  $\mu$ L de etanol absoluto que foi previamente colocado no congelador (24 horas antes). Deve-se gentilmente agitar o tubo por inversão e em seguida centrifugar por 20 minutos a 10000g na ultracentrifuga.
5. Após a centrifugação deve-se descartar o sobrenadante gentilmente, deixando somente o pellet no fundo do eppendorf. Em seguida, adiciona-se 500  $\mu$ L de etanol 70% que foi previamente colocado no congelador (24 horas antes). Em seguida deve-se centrifugar por 15 minutos a 10000g na ultracentrifuga.
6. Após a centrifugação, descarta-se gentilmente o sobrenadante deixando somente o pellet (com o DNA extraído) no fundo do eppendorf. Coloca-se os tubos eppendorfs com a tampa aberta a girar na centrífuga speed vácuo a 55°C, até que os restos de etanol 70% tenham evaporado por completo.
7. Em seguida, deve pousar os tubos eppendorf com a tampa aberta a temperatura ambiente (em cima da bancada) por 10 minutos.

8. Por fim, adiciona-se em cada tubo 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, agita-se gentilmente os tubos eppendorf, e armazena-se os tubos com o DNA extraído em ultragongeladora  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior identificação molecular.

#### **Resultados esperados:**

Espera-se observar uma grande concentração do DNA extraído, visto que se parte de colônias purificadas de fungos com grande quantidade de material biológico.



#### **Dicas**

- ✓ **Nas centrifugações deve-se sempre colocar tubos com os mesmos pesos para manter o equilíbrio no rotor. Quando os tubos são em número ímpar, deve-se colocar outro a equilibrar com o mesmo peso em água.**
- ✓ **Adicionar o fungo macerado em azoto líquido nos tubos eppendorf até ao máximo da marcação de 200  $\mu\text{L}$  nos tubos graduados.**

#### **REFERÊNCIAS:**

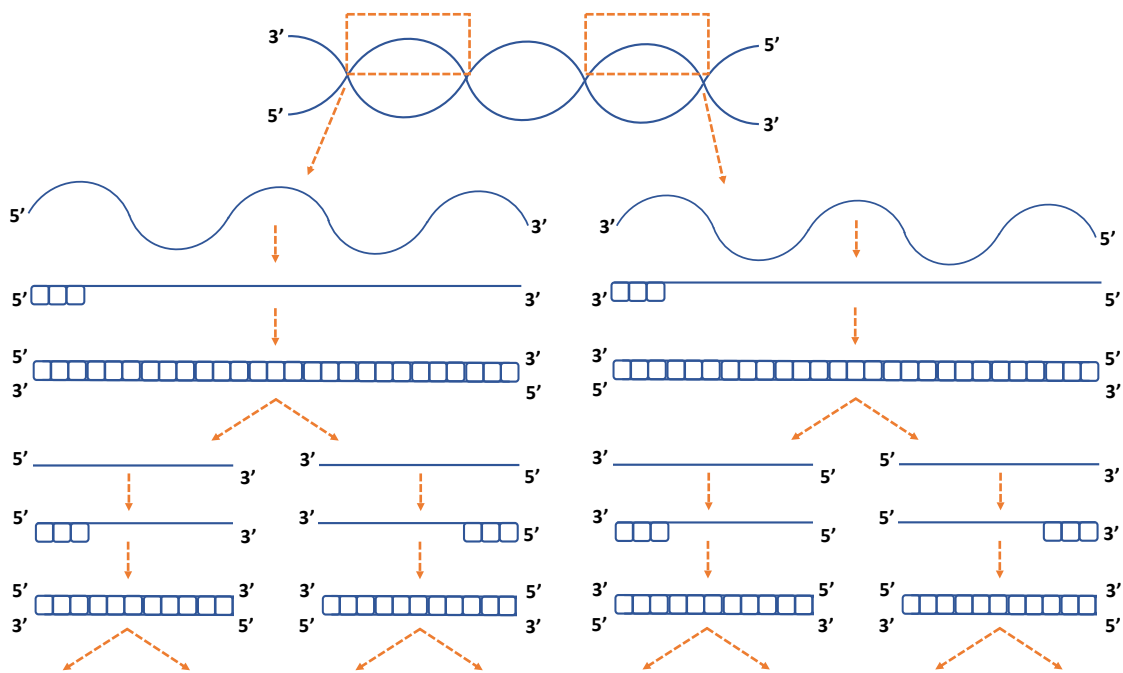
Doyle J, Doyle J, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Varanda, C.M.R.; Oliveira, M.; Materatski, P.; Landum, M.; Clara, M.I.; Félix, M.R. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 120(12): 1525-1536.

## ETAPA 3 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

### INTRODUÇÃO

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é a técnica mais usada na identificação precisa de fungos. Permite amplificar um segmento de DNA que esteja entre duas sequências conhecidas, podendo fazer milhões de cópias de uma sequência em poucas horas. Uma reação de PCR apresenta três etapas caracterizadas por diferentes temperaturas: (1) desnaturação (90–95 °C), que separa as duas cadeias de DNA, (2) hibridação de primers específicos (45–60 °C), que permite o emparelhamento dos primers às suas bases complementares do novo DNA de cadeia simples e (3) extensão do primer usando uma polimerase de DNA que vai fazer uma cópia do DNA alvo a 72 °C (Figura 3). A concentração de DNA extraído de cada isolado de *Colletotrichum* será determinada utilizando um microespectrofotômetro Quawell Q9000 (Quawell Tecnologia, Pequim, China). Os isolados de *Colletotrichum* devem ser identificados por amplificação por PCR da região ITS (espaçador transcrito interno) e parte do gene da  $\beta$ -tubulina 2 (*tub2*) utilizando os primers ITS1 e ITS4 (fragmento 600pb) (White, et al., 1990), T1 e T22 (fragmento 1200pb) (Guerber, et al., 2003), respectivamente. As reações de PCR foram realizadas num total volume de 50  $\mu$ L, contendo 30–80 ng de DNA genômico. Por fim, o produto do resultado do PCR será revelado em eletroforese em gel de agarose a 1%.



**Figura 3.** Representação esquemática do processo de amplificação de DNA por PCR (Materatski & Sousa, 2024).

## **MATERIAL, REAGENTES E EQUIPAMENTO:**

- Ultra-centrífuga de bancada
- Espectrofotômetro
- Gelo
- Micropipetas
- Termociclador
- Equipamento de eletroforese
  
- Água ultrapura
- dNTPs
- DNA total extraído na etapa anterior
- Enzima DNA polimerase (DreamTaq)
- MgCl<sub>2</sub>
- Primers (Forward and Reverse)
- Tampão '10X DreamTaq Green Buffer' 'Greensafe' (NZYTech)
- 'Greensafe' (NZYTech)
- Agarose
- Tampão TBE 0,5X

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL:**

### **PCR com primers ITS e tub 2**

#### 1. Adicionar:

35 µL água ultrapura

5 µL tampão dream taq 10X

2,5 µL MgCl<sub>2</sub>

2,0 µL dNTPs

2,0 µL Primer 5' (ITS1 ou T1)

2,0 µL Primer 3' (ITS4 ou T22)

1 µL do DNA extraído

0,5 µL *DreamTaq*

#### 1. Programa de amplificação

Programação da reação no termociclador primers ITS (otimizada para os fungos *Colletotrichum*).

- 1X: Desnaturação inicial: 95°C, 2 min

- 39X: Desnaturação: 95°C, 1 min; Hibridação: 55 °C, 1 min; Extensão: 72 °C, 2 min
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

Programação da reação no termociclador primers tub 2 (otimizada para os fungos *Colletotrichum*).

- 1X: Desnaturação inicial: 95°C, 2 min
  - 39X: Desnaturação: 95°C, 1 min; Hibridação: 58 °C, 1 min; Extensão: 72 °C, 2 min
- 1X: Extensão final: 72 °C, 10 min

## 2. Visualização dos produtos amplificados

Colocar 10 µl da amostra em gel de agarose 1% em TBE 0,5X preparado com *greensafe*, 1 hora a 80V.

Observar o gel sob luz UV para visualização dos fragmentos de PCR.

### Resultados esperados:

No gel de agarose realizado, espera-se a observação de uma banda única no caso dos primers ITS de 600 pb e no caso do primers tub 2 de 1200 pb correspondente à região do genoma delimitada pelos pares de *primers* específicos usados nas reações.



#### Dicas

- ✓ **As enzimas são fornecidas em tampões com base em glicerol. Para uma correta pipetagem da enzima deve-se, no momento da pipetagem, mergulhar a ponta no mínimo volume possível, para evitar a aderência de enzimas na parte exterior da ponta, evitando o desperdício.**
- ✓ **O tampão 10X dream taq deve sempre ser cuidadosamente agitado sempre antes da pipetagem**

### REFERÊNCIAS:

White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In *Pcr Protocols: A Guide to Methods and*

Applications; Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1990; pp. 315–322.

Guerber, J.; Liu, B.; Correll, J.; Johnston, P. Characterization of diversity in *colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtdna and intron rflps, and mating compatibility. *Mycologia* 2003, 95, 872–895.

Materatski, P.; Sousa, A.C.A. (2024). VIROLOGIA: Protocolos das Aulas Práticas, Ano letivo 2023/24. Universidade de Évora. 1: 1-41. ISBN: 978-972-778-376-2.

## **ETAPA 4 – IDENTIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DOS ISOLADOS DE COLLETOTRICHUM**

### **INTRODUÇÃO**

Os produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificados utilizando primers ITS e tub 2, previamente visualizados em gel de agarose, foram posteriormente purificados utilizando o kit de purificação Nzytech (Nzytech, Lisboa, Portugal), conforme as diretrizes do fabricante. Em seguida, os produtos purificados foram enviados para sequenciação Sanger na empresa Macrogen (Madrid, Espanha). Após a conclusão da sequenciação, a Macrogen disponibiliza os resultados eletronicamente, os quais são fornecidos em arquivos com a extensão .AB1, que geram os cromatogramas resultantes da sequenciação. Para a análise subsequente das sequências de nucleótidos será empregue o software MEGA, versão 10.1.8 (Kumar et al., 2018), utilizando o algoritmo CLUSTAL W. Neste protocolo, o software MEGA é utilizado como ferramenta integrativa para a leitura de cromatogramas (ficheiros . AB1) e para o alinhamento de sequências de nucleótidos, podendo ser realizado de forma automática ou manual. As sequências alinhadas através do software MEGA serão empregues na identificação de sequências homólogas na base de dados GenBank (versão 242.0) (Benson et al., 2013). A procura de sequências homólogas será realizada com recurso à ferramenta de pesquisa de alinhamento local BLAST, disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). No caso específico das sequências amplificadas com os primers ITS estas somente permitiram a identificação dos isolados de coletotrichum ao nível do género, somente os primers desenhados no gene da  $\beta$ -tubulina é que permitem a identificação ao nível das espécies. Neste protocolo, procederemos à análise dos cromatogramas resultantes da sequenciação dos produtos de PCR amplificados durante a etapa anterior. Para tal, será realizada a conversão dos cromatogramas (arquivos .AB1) em sequências de nucleotídeos (arquivos .FASTA). Em seguida, será realizada a busca por homologias de sequências em bases de dados internacionais, culminando na identificação ao nível da espécie dos fungos isolados de árvores de oliveira.

### **MATERIAL e EQUIPAMENTO:**

- Computador
- Software MEGA versão 10.1.8
- Ficheiros (.AB1) com sequências 'forward' e 'reverse'.

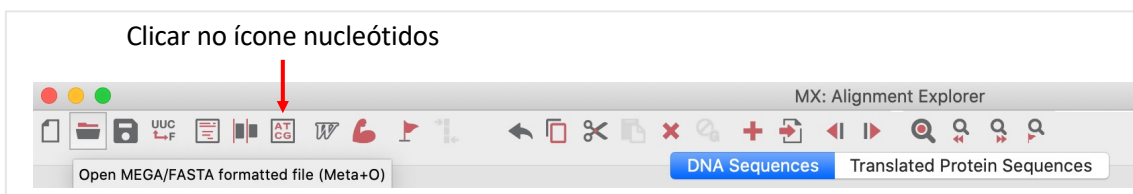
### **PROTOCOLO EXPERIMENTAL:**

## I – Abertura de componentes no software MEGA

1. Abrir o software MEGA e selecionar a opção ALINHAMENTO.
2. Selecionar a opção EDITAR/CRIAR NOVO ALINHAMENTO.
3. Selecionar a opção CRIAR NOVO ALINHAMENTO.
4. Após esta última seleção, o software apresentará a pergunta: ‘Are you building a DNA or a protein sequence alignment?’. Deve ser selecionada a opção de DNA. Nesta fase o software MEGA abre a ferramenta ‘Explorador de Alinhamentos’.

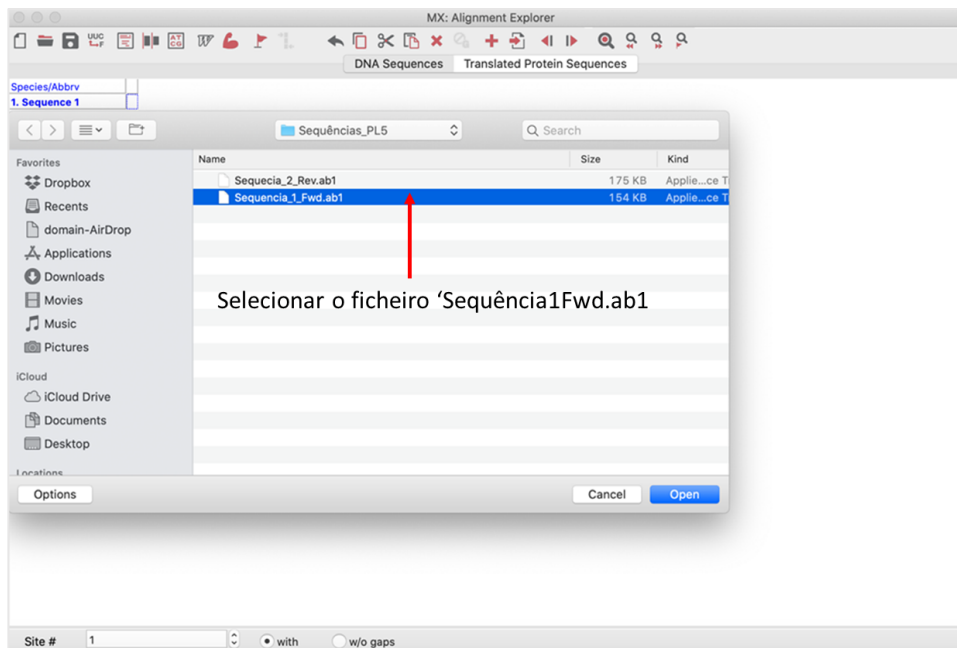
## II – Abertura dos Cromatogramas

1. No ‘Explorador de Alinhamentos’, selecionar a opção nucleótidos na parte superior esquerda da tela (Figura 4).



**Figura 4.** Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

2. Abrir o ficheiro . AB1. Procurar no computador a pasta onde estão os ficheiros .AB1, selecionar o ficheiro ‘Sequencia1FWD.ab1’ e abrir o ficheiro (Figura 5). Nesta fase o software MEGA abre o cromatograma. Este processo deve ser repetido para as sequências forward e reverse amplificadas da região ITS e do gene da  $\beta$ -tubulina. As figuras abaixo exemplificam a análise de uma sequência forward.

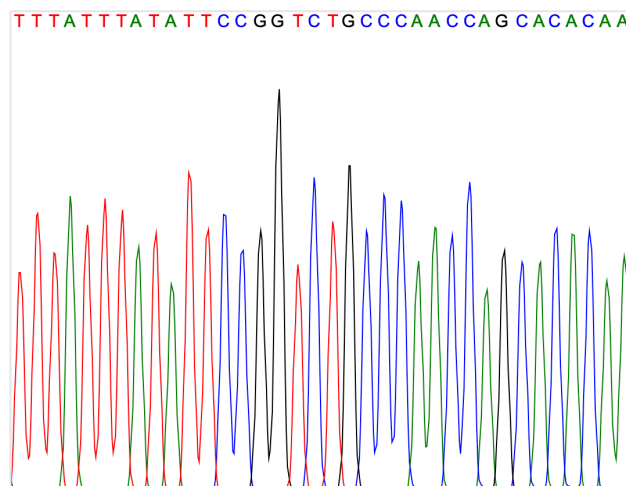


**Figura 5.** Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do ícone de abertura dos ficheiros do cromatogramas (.AB1).

## II – Seleção da sequência ‘forward’

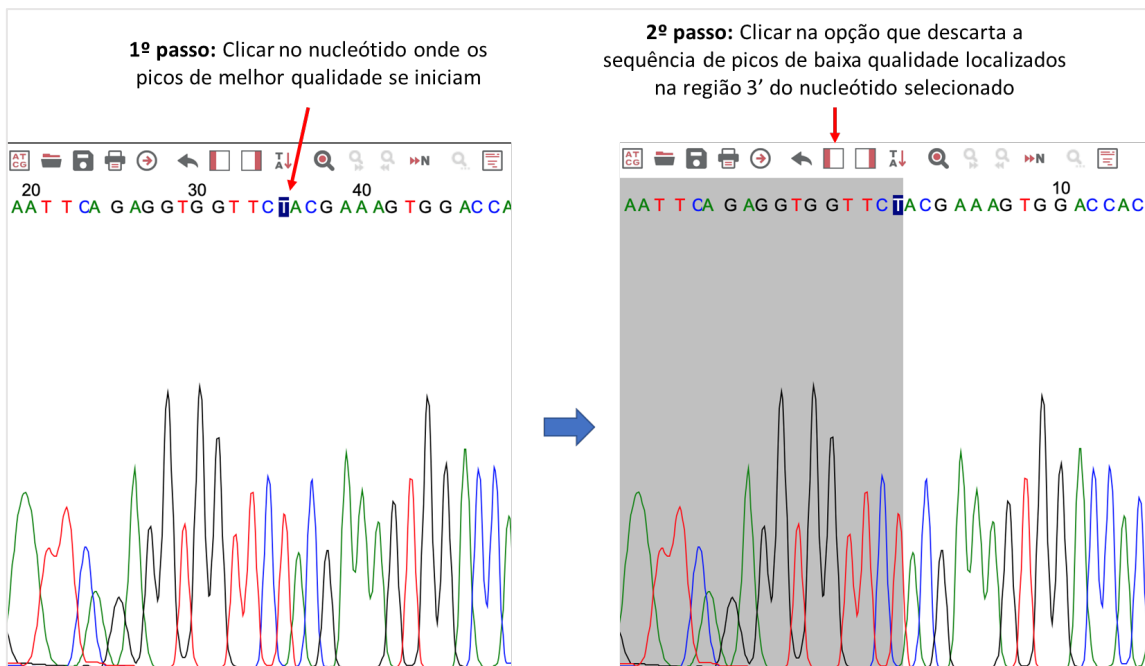
1. Após a abertura do cromatograma, devemos avaliar a sua qualidade para futura utilização. Partindo do pressuposto de que nas aulas anteriores os resultados foram os esperados, a sequenciação SANGER apresentará bons resultados até aproximadamente 600 nucleótidos, podendo estes resultados variar para mais ou para menos.

No cromatograma, cada nucleótido está representado por um pico de cor diferente, permitindo assim a diferenciação de cada nucleótido (A, T, C, G) da nossa sequência. Bons resultados são verificados com picos únicos (sem mistura de cor) e longos (indicam um sinal forte) tal como ilustrado na Figura 6.



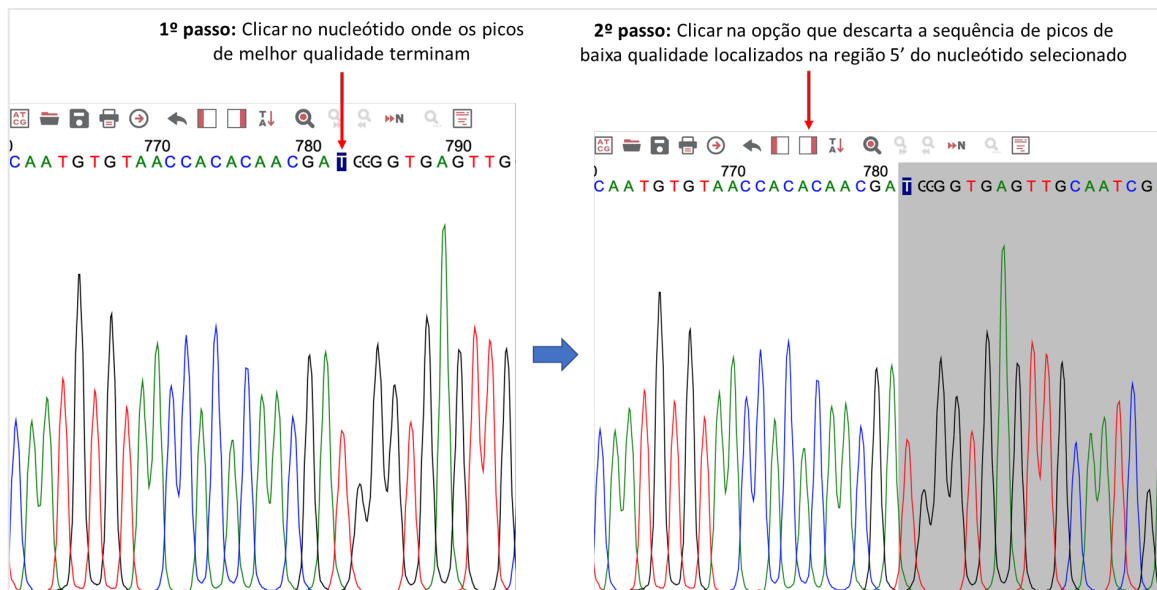
**Figura 6.** Exemplificação da qualidade de um cromatograma aberto pela ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA.

2. Para **selecionar a melhor sequência para a futura identificação do vírus** deve-se começar pela região 5’, verificando onde começam os picos únicos, sem a interferência de outros picos. Por vezes, na região terminal 5’ os picos ainda são pouco intensos (curtos), indicado um sinal ainda fraco, uma vez que se trata do início da sequenciação. Nestes casos, deve-se utilizar este início, mesmo com picos pouco intensos, desde que sejam únicos e sem interferência de outros picos. Logo que seja encontrado este início de qualidade dos picos deve-se marcar no cromatograma o início, clicando na letra do nucleótido referente ao pico, ficando este nucleótido sombreado. Seguidamente, deve-se selecionar a opção específica que **descarta os picos de baixa qualidade, localizados na região 5’** (região sombreada) do nucleótido selecionado (Figura 7).



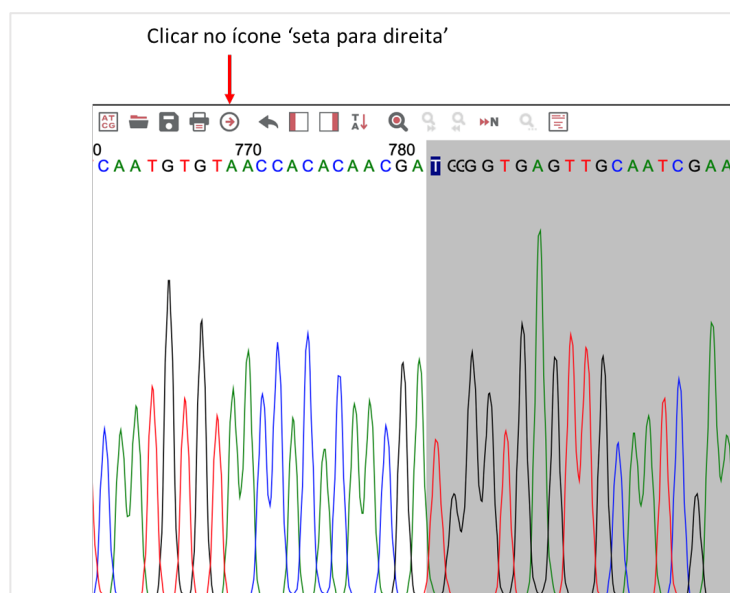
**Figura 7.** Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do início (região 3’) dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.

3. À semelhança ao passo anterior, deve-se verificar a **qualidade dos picos em direção a região 3’ do cromatograma** e logo que seja encontrado o fim da qualidade dos picos deve-se marcar no cromatograma o fim, clicando na letra do nucleótido referente ao pico, ficando este nucleótido sombreado. Seguidamente seleciona-se a opção específica **que descarta os picos de baixa qualidade, localizados na região 3’** (região sombreada) do nucleótido selecionado (Figura 8).



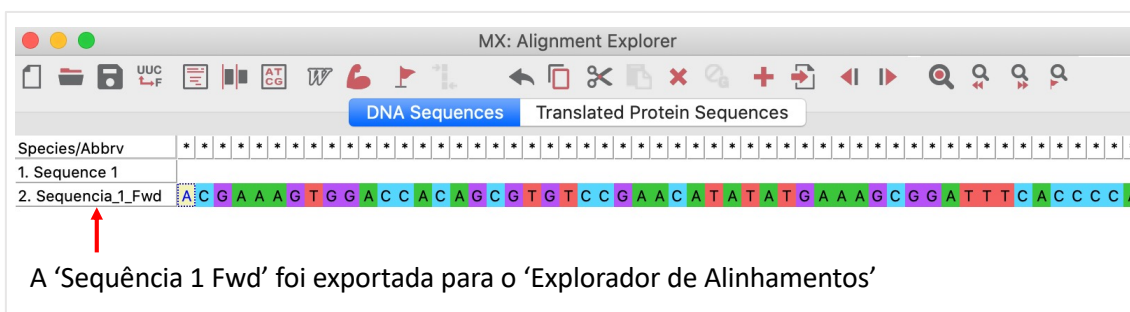
**Figura 8.** Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA com a indicação do fim (região 5’) dos picos dos nucleótidos de melhor qualidade.

4. Para finalizar a seleção da sequência ‘forward’ deve-se selecionar a opção do ícone ‘seta para direita’ que enviará, para o ‘Explorador de Alinhamentos’, toda a sequência de nucleótidos que se considerou ter melhor qualidade com base na qualidade dos picos do cromatograma (Figura 9).



**Figura9.** Cromatograma (ficheiro .AB1) da sequência forward aberto pela Interface da ferramenta ‘Explorador de alinhamentos’ do software MEGA após a seleção da região de melhor qualidade a ser exportada para o ‘Explorador de alinhamentos’ em formato ficheiro FASTA.

5. Nesta fase, a sequência ‘forward’ é enviada para o ‘Explorador de Sequências’ (Figura 10).



**Figura 10.** Sequência exportada do cromatograma para a interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA em formato ficheiro FASTA após a seleção da região de melhor qualidade.

**NOTA IMPORTANTE:** Após este passo já é possível fazer a identificação inicial dos isolados de *Colletotrichum* ao nível da espécie, no caso das análises das sequências forward do gene da  $\beta$ -tubulina, embora seja importante também fazer a análise das sequências 'reverse' para uma identificação precisa e cientificamente robusta. O exemplo abaixo é de uma análise de uma sequência 'contig' que é a junção das sequencias 'forward' e 'reverse' do mesmo gene amplificados do mesmo isolado de fungo.

#### V – Procura de alinhamento na base de dados 'GenBank'

1. Com a sequência 'forward', seleccionar e copiar a sequência para o site BLAST da NCBI e clicar em 'Nucleotide BLAST' (Figura 11).

**1º passo:** Selecionar e copiar a sequência 'contig'

**2º passo:** No browser abrir o site BLAST da NCBI

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**3º passo:** Clicar em 'Nucleotide BLAST'

**Figura 11.** Interface da ferramenta 'Explorador de alinhamentos' do software MEGA com a indicação para a procura de sequências homólogas na base de dados GenBank através da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)'.

2. A sequência ‘forward’, que foi copiada no passo anterior, deve ser copiada para o campo específico.

- Apagar toda a informação que não são nucleótidos,
- Manter todos os parâmetros pré-selecionados,
- Clicar em BLAST.

Neste momento o software irá procurar por sequência homólogas ao contig na base de dados ‘GenBank’ (Figura 12).

**1º passo:** Colar a sequência ‘contig’ no campo específico

**2º passo:** Seleccionar e apagar a informação indicada, mantendo somente os nucleótidos

**3º passo:** Manter os parâmetros pré-selecionados e clicar em BLAST

**Figura 12.** Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com a indicação dos parâmetros para a procura de sequências homólogas na base de dados ‘GenBank’.

3. O resultado será apresentado com as espécies com maiores homologias com o isolado de fungo Colletotrichum, seguido de toda a informação necessária, incluindo o nome científico e o número de acesso (Figura 13).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
<p>select all 32 sequences selected</p> <p>O resultado da procura vai listar em ‘Description’ as maiores homologias encontradas na base de dados</p>		<p>O resultado da procura vai listar o Nome científico dos “organismos” com maior homologia</p>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
		1485	1485	98%	0.0	99.63%	813	
		1483	1483	100%	0.0	98.80%	3702	
		1480	1480	98%	0.0	99.38%	813	
		1480	1480	98%	0.0	99.51%	813	
		1480	1480	98%	0.0	99.51%	813	
		1469	1469	98%	0.0	99.26%	813	
		1463	1463	98%	0.0	99.14%	813	
		1461	1461	98%	0.0	98.89%	813	

**Figura 13.** Interface da ferramenta básica de alinhamento local, BLAST, do 'National Center for Biotechnology Information (NCBI)' com os resultados obtidos após procura de sequências homólogas na base de dados 'GenBank'.



#### Dicas

- ✓ **Quando abrimos o 'Explorador de Sequências', este cria automaticamente uma sequência em branco (sem nucleótidos), neste caso podemos apagar esta sequência (Sequence 1 na figura anterior). Para isso, clicar na 'Sequence 1' e em seguida na opção X, e a sequência será apagada.**

#### REFERÊNCIAS:

Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35, 1547–1549.

Benson, D.A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Sayers, E.W. GenBank, *Nucleic Acids Research*. 2013, 41, (D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>