

AMPLIFICAÇÃO DE DNA RIBOSSOMAL DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE NESTED PCR

Aline de Liz Ronsani; Carla Cândida Cleto; Sonia Purin.

Estudante do curso de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Catarina; Rodovia Ulisses Gaboardi km 3 – Fazenda Pessegueirinho; Curitibanos, SC; alinelizronsani@gmail.com; Rodovia Ulisses Gaboardi km 3 – Fazenda Pessegueirinho, Curitibanos, SC.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) aumentam a absorção de água e nutrientes nas plantas, principalmente o fósforo. Há grandes dificuldades em fazer a identificação destes fungos através de características morfológicas, para isto, tem-se usado métodos moleculares, baseados na amplificação de DNA via PCR. Esse trabalho teve como objetivo amplificar o DNA ribossomal de FMAs através da técnica de nested PCR, testando diferentes temperaturas de anelamento. Foram usadas as espécies *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Claroideoglossum etunicatus* fornecidos pela CICG (Coleção Internacional de Cultura de Gloromycota). O DNA foi extraído de esporos desinfetados superficialmente através de seu rompimento dentro de 5µL de solução tampão. Para a extração usou-se uma agulha estéril 25G. A região genômica amplificada foi D1-25S-D2, através de duas reações. Para primeira reação de PCR foram usados os primers ITS1 e LSU0599. O volume total da reação foi de 50µL, sendo 3,0µL de cada primer (0,2mM), 1,0 µL de dNTP's (10mM cada), 5µL de solução tampão (1X) contendo DNA extraído, 0,5µL de Pfu polimerase (2,5U) e 37,5 µL de água. A amplificação foi conduzida de acordo com o protocolo recomendado para a enzima e as temperaturas de anelamento usadas foram 53, 55 e 57°C. Para a segunda reação os primers usados foram FLR2 e LSU0061. O DNA molde foi o produto da primeira PCR (1µL) e as temperaturas de anelamento usadas foram 52, 54 e 56°C. Os produtos da segunda reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% com tampão de carregamento e GelRed. O DNA da espécie *Rhizophagus clarus* foi amplificado em 50% das amostras na temperatura de 54°C, enquanto as temperaturas de 52 e 56° C promoveu amplificação em 100% das amostras. Na espécie *Gigaspora albida*, a temperatura de 52° C promoveu amplificação em 50% das amostras, enquanto nas temperaturas de 54° e 56°C, 50% e 100% das amostras tiveram DNA amplificado, respectivamente. A amplificação de DNA da espécie *Claroideoglossum etunicatus* foi realizada na maioria das amostras, porém o produto não foi detectado em quantidades suficientes para que a quantificação fosse realizada. Conclui-se que a técnica de Nested PCR e as temperaturas de anelamento aqui testadas foram eficientes para amplificação da região genômica de interesse.

Palavras-chave: *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida*, *Claroideoglossum etunicatus*.

Apoio financeiro: CNPQ

