



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

AValiação de Protocolos de Extração de DNA Total de *Amphobotrys ricini*, AGENTE CAUSAL DO MOFO CINZENTO DA MAMONEIRA

TAVARES, A.C.¹; BEZERRA, C.S.¹ ; MENESES, C.H.S.G.¹; COUTINHO, T.C.²; SILVA, S.C.³; ; COUTINHO, W.M.³; SUASSUNA, N.D.³; VIDAL, M.S.³ 1 - Estagiários da Embrapa Algodão e alunos de Graduação da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB. 2 - Aluna de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN. 3 - Pesquisadores da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande - PB. mvidal@cnpa.embrapa.br

RESUMO

A mamoneira, apesar de ser uma planta rústica, é susceptível a várias doenças, dentre as quais se destaca o mofo cinzento, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*. O mofo cinzento da mamoneira começou a causar sérios prejuízos à medida em que foi se intensificando a exploração desta cultura. A caracterização de fungos por estudos morfológicos é um processo que exige conhecimento, tempo e disponibilidade de material para crescimento das espécies em laboratório. Atualmente, com a utilização de ácidos nucleicos como marcadores moleculares, há um grande potencial para a diferenciação entre espécies e isolados. Este trabalho requer pouco tempo e garante um maior precisão dos dados; entretanto, para a obtenção destas informações são necessárias metodologias específicas. Neste trabalho, objetivou-se a seleção de um método de extração de DNA total de *A. ricini* com o intuito de empregá-lo em programas de genética de populações deste fungo. Para tal, foram testados cinco métodos de extração, obtendo-se resultados positivos com todos os protocolos testados, no entanto, verificou-se que o protocolo de Zollan e Pukkila apresentou melhor concentração de DNA em relação aos outros.

INTRODUÇÃO

A mamoneira, mesmo sendo uma planta rústica, é bastante afetada por vários microrganismos, tais como fungos, bactérias e vírus, que são responsáveis por prejuízos de grande expressão econômica, se as condições climáticas forem favoráveis ao seu desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2001).

Dentre as principais doenças da mamoneira, destaca-se o mofo cinzento, causado por *Amphobotrys ricini*. Esta doença foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1918, e a sua etiologia descrita em detalhes em 1932 (GODFREY, 1923). No Brasil, o mofo-cinzento foi constatado pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1932 (GONÇALVES, 1936). Atualmente, é considerada a principal doença da mamoneira em algumas regiões do país, principalmente naquelas em que o período de frutificação coincide com temperaturas em torno de 25°C e alta umidade relativa. No Nordeste, o mofo-cinzento tem sido constatado na região agreste dos estados da Paraíba e Pernambuco (LIMA e SOARES, 1990).



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

Os sintomas dessa doença caracterizam-se inicialmente pelo aparecimento de pequenas manchas de tonalidade azulada, tanto no caule quanto nas folhas e inflorescências, as quais exsudam gotas de um líquido amarelado; posteriormente, sob condições climáticas favoráveis, hifas do patógeno desenvolvem-se sobre os frutos, lembrando uma teia de aranha, com posterior frutificação do patógeno.; à medida que os cachos são afetados, o micélio desenvolvido sobre os frutos torna-se mais escuro, afetando a qualidade das sementes (BATISTA *et al.*, 1998).

A utilização de cultivares resistentes de mamoneira ao mofo cinzento tem sido preconizado por diversos autores como uma das medidas mais eficientes no manejo dessa doença; no entanto, o melhoramento genético de mamoneira, visando à obtenção de cultivares resistentes ao mofo cinzento, tem sido dificultado principalmente pela falta de informações sobre a reação de cultivares de mamoneira à infecção por *Amphobotrys ricini*, no Brasil.

Diante da importância de se estudar a resistência de cultivares de mamoneira ao mofo-cinzento, causado por *A. ricini*, faz-se necessário estabelecer um protocolo da extração de DNA do referido fungo, visando a uma posterior caracterização molecular deste patógeno.

Objetivou-se neste trabalho, testar cinco protocolos de extração de DNA (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998; SMITH *et al.*, 2001; WEISING, 1995 - com e sem etapa opcional; ZOLLAN e PUKKILA, 1986) visando ao estabelecimento de um protocolo de extração de DNA mais adequado a *A. ricini*.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas puras de *Amphobotrys ricini* foram obtidas pelo isolamento desse fungo de frutos de mamoneira com sintomas típicos de mofo cinzento no campo experimental da Embrapa Algodão, município de Campina Grande – PB. O fungo cresceu em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), durante 12 dias. Para extração do DNA, utilizou-se o micélio aéreo do fungo. O micélio aéreo foi raspado da placa com o auxílio de uma alça de platina e, em seguida, congelado e macerado na presença de nitrogênio líquido. Foram testados os seguintes protocolos para extração de DNA:

1- Smith: O micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido em tubos de microcentrifuga 1,5 mL, ao qual foi adicionado 500µL de tampão contendo: SDS 2%; Tris-HCl 100mM pH 8,0; NaCl 500mM; EDTA 50mM e β-mercaptoetanol 0,6%. Agitou-se em vórtex por 5 segundos e incubou-se a 60°C por 30 minutos. Adicionou-se 500µL de CIA (mistura de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, v/v), misturou-se por inversão do tubo, centrifugou-se por 5 minutos a 8.500 g e transferiu-se a fase aquosa



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

para um novo tubo. A extração com CIA foi realizada duas vezes. Adicionou-se 500µL de isopropanol e centrifugou-se por 5 minutos a 8.500 g. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado com etanol 70%, e ressuspendido em água MilliQ™.

2- Weinsing OPC: O micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido em tubos de microcentrifuga 1,5 mL, ao qual foi adicionado 600µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM, pH 8,0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 0,5%) e agitou-se em vórtex por 30 segundos. Os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido e em seguida incubados a 100° C por 10 minutos, este procedimento foi realizado 5 vezes (etapa opcional). Adicionou-se 300 µL de NaOAc 3 M, misturou-se por inversão do tubo e incubou-se por 20 minutos a -20°C. O material foi centrifugado a 8.500 g em 18° C por 15 minutos, em seguida, o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e incubou-se o material por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 8.500 g por 15 minutos a 18°C e em seguida lavado com etanol 70%. O material foi seco e ressuspendido com 100µL água MilliQ™.

3- Weinsing: O micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido em tubos de microcentrifuga 1,5 mL, ao qual foi adicionado 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8,0; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 0,5%) e agitou-se em vórtex por 30 segundos. Adicionou-se 300µL de NaOAc 3M, misturou-se por inversão do tubo e incubou-se por 20 minutos a -20° C. O material foi centrifugado a 8.500 g em 18°C por 15 minutos, em seguida, o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e incubou-se o material por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 8.500 g por 15 minutos a 18°C e, em seguida, lavado com etanol 70%. O material foi seco e ressuspendido com 100µL água MilliQ™.

4- Ferreira e Grattapaglia: Foi adicionado 600 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; EDTA 20mM; Tris-HCl 100mM, pH 8,0; PVP-40 1%; β-mercaptoetanol 0,2%) previamente aquecido. Com o auxílio de um agitador, homogeneizou-se o conteúdo por um período de 30 segundos. Em seguida, incubaram-se os tubos em banho-maria a 65°C por 30 minutos, agitando-os a cada 5 minutos. Adicionaram-se 600µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturou-se lentamente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 7.000 g, a 4°C, por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo. Adicionaram-se 600µL de isopropanol gelado misturando-o lentamente por inversão. Centrifugou-se a amostra a 7.000 g, 4°C por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 300µL de etanol 70%. Centrifugou-se a amostra a 7.000 g, 4°C por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 300 µL de etanol 95% gelado. Centrifugou-se a amostra a 7.000 g, 4°C por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Secou-se o precipitado a temperatura ambiente e



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

ressuspendeu-se em 100µL de água MilliQ™.

5- Zollan e Pukkila: Foi adicionado 500µL de tampão de extração (CTAB 1%; NaCl 700mM; Tris -HCL 20mM pH 8,0; EDTA 10mM; β-mercaptoetanol 1%) , agitou-se em vórtex por 5 segundos e, em seguida, incubou-se os tubos a temperatura ambiente por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, adicionou-se 500 µL de CIA, misturou-se por inversão dos tubos e o material foi centrifugado a 7.000 g a 15°C por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo. Adicionaram-se 500µL de isopropanol gelado misturando-o lentamente por inversão. Centrifugou-se a amostra a 7.000 g, 15°C por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 500µL de etanol 70%. Centrifugou-se a amostra a 7.000 g, 4°C por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Secou-se o precipitado a temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 100µL de água MilliQ™.

Após as extrações as amostras de DNA foram tratadas com RNase A e, então visualizadas em gel de agarose [agarose 0,8%, TBE 1X (Tris-borato 0,09 mM, EDTA 0,002M, pH 8,0) e quantificadas em espectrofotômetro A concentração das amostras de DNA foi realizada por espectrofotometria, onde:

[DNA] = D.O.₂₆₀ X 50ng/µL X FD, sendo FD igual a fator de diluição. Para cada amostra foram utilizados 2 µL de DNA total, ajustando-se o volume para 500 µL com água MilliQ™, obtendo-se então um fator de diluição de 250.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para extração de DNA genômico de *A. ricini*, foram testados cinco protocolos diferentes de extração avaliando-se a concentração de DNA em espectrofotômetro. A leitura realizada em gel de agarose foi obtida a partir da observação de fragmentos pela comparação com marcadores de peso molecular, no entanto, a quantificação realizada diferiu consideravelmente da obtida pela leitura em espectrofotômetro. Para os protocolos testados verificou-se que Zollan e Pukkila apresentou maior concentração de DNA (1075ng/µL) em relação aos outros protocolos como pode ser observado com os dados obtidos por espectrofotometria (Tabela 1). Para análise realizada em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda (232, 260 e 280 nm), verificou-se que o protocolo de Weinzing apresentou melhor padrão de pureza obtido entre a razão (260 e 280nm), indicando maior grau satisfatório de pureza em relação aos outros protocolos testados, no entanto, não apresentou o mesmo rendimento pelas amostras extraídas pelo método descrito por Zollan e Pukkila.

Tabela 1. Quantificação das amostras em espectrofotômetro.



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

Protocolos	D. O.			[DNA]
	260 nm	280 nm	320 nm	
Weinzing	0,047	0,027	0,008	587,5 ng/ μ L
Weinzing OPC	0,012	0,008	0,004	150 ng/ μ L
Smith	0,078	0,046	0,011	975 ng/ μ L
Zollan e Pukkila	0,086	0,054	0,019	1075 ng/ μ L
Ferreira e Grattapaglia	0,065	0,042	0,018	812,5 ng/ μ L



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos verificou-se que o protocolo de Zollan e Pukkila apresentou melhor concentração de DNA em relação aos outros protocolos testados.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998. 220p.
- GODFREY, G. H. Gray mold of castor bean. **Journal of Agriculture Research**, v. 13, p. 679-715, 1923.
- GONÇALVES, R. D. O Mofo cinzento da mamoneira. **O Biólogo**, v. 11, p. 232-235, 1936.
- LIMA E. F.; SOARES J. J. Resistência de cultivares de mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 96-97, 1990.
- SANTOS, R. F.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Análise econômica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.17-35
- SMITH, S. N.; DEVAY, J. E.; HSIEH, W. H.; LEE, H. J. **Soil-borne populations of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, a cotton wilt fungus in California fields**. [s.n.t.]
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton, CRC Press, 1995.
- ZOLAN, M.E., PUKKILA, P.J. Inheritance of methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular Cell Biology** v. 6, p.195-200, 1986.