



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

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

SELEÇÃO DE MARCADORES DO TIPO RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Amphobotrys ricini*

BEZERRA, C.S.¹; MENESES, C.H.S.G.¹; TAVARES, A.C.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

Com a intensificação da exploração da mamoneira, o mofo cinzento, doença causada pelo fungo *Amphobotrys ricini*, vem causando sérios prejuízos à cultura. A doença ocorre em praticamente em todas as regiões produtoras de mamona, demandando aplicações de fungicidas para seu controle. Na Paraíba, o mofo cinzento tem sido constatado, principalmente, na região Agreste. Para que haja êxito em programas de melhoramento, visando a resistência durável, é necessário o monitoramento sistemático das populações do patógeno visando a compreensão da dinâmica de seus aspectos genéticos (quantidade e variação espaço-temporal). Para tal, são necessários marcadores que permitam quantificar a variabilidade genética. Este estudo teve como objetivo identificar marcadores do tipo RAPD para serem empregados na análise da variabilidade genética de isolados de *A. ricini* do estado da Paraíba. Amostras do fungo foram coletadas em diferentes regiões do estado da Paraíba, isolados e cultivados em meio BDA. DNA total dos isolados de *A. ricini* foi extraído segundo descrito por Zollan e Pukilla e, então, submetidos a reações de PCR utilizando 93 oligonucleotídeos da série OPERON. Quarenta e um oligonucleotídeos foram capazes de gerar polimorfismo, sendo possível a identificação de pelo menos 191 loci.

INTRODUÇÃO

A mamoneira é uma planta rústica com grande capacidade de adaptação a todas as áreas do Brasil, mas é também bastante afetada por diversos microorganismos que causam prejuízos de grande expressão econômica, se as condições climáticas forem favoráveis ao seu desenvolvimento (AZEVEDO e LIMA, 2001).

A principal doença da mamoneira é o mofo cinzento, relatada pela primeira vez nos Estados Unidos da América em 1918. Essa doença tem como agente etiológico o fungo *Amphobotrys ricini*. No Brasil, a primeira constatação desta doença foi em 1932 no estado de São Paulo (GONÇALVES, 1936).

Os sintomas 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



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

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

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). *Amphobotrys ricini* ataca as inflorescências em todas as fases de seu desenvolvimento (GONÇALVES, 1936)

A partir do desenvolvimento dos programas de melhoramento genético com base na análise do genoma de organismos, surgiu a possibilidade de analisar o genoma do patógeno *A. ricini* e da mamona com o objetivo de identificar cultivares tolerantes ou resistentes à doença. Pois cada variedade apresenta diferentes níveis de resistência ao patógeno.

Para que haja êxito em programas de melhoramento, visando à resistência durável, é necessário o monitoramento sistemático das populações do patógeno, com o objetivo de compreender a dinâmica de seus aspectos genéticos (quantidade e variação espaço-temporal). Para tal, são necessários marcadores que permitam quantificar a variabilidade genética.

MATERIAL DE ESTUDO

O patógeno estudado (*A. ricini*) foi coletado em diferentes municípios do estado da Paraíba, de acordo com a tabela 1. O fungo foi isolado e cultivado em meio BDA (batata-dextrose-Agar) por aproximadamente 10 dias, ao fim dos quais foi realizada a extração de DNA a partir do micélio aéreo.

Tabela 1: Locais de coleta de isolados de *A. ricini* e respectivos locais de coleta.

Município	Código
Lagoa seca	1
Esperança	3
Remígio	4
Itabaiana	5
São Sebastião da Lagoa de Roça	7
Campina Grande	8

Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido utilizando-se o protocolo descrito por Zollan e Pukilla (1981). 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, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, adicionou-se 500 µL de CIA; misturou-se por inversão dos tubos, centrifugando o material 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%. A amostra foi centrifugada a 7.000



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

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

g, 4°C, por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante. Secou-se o precipitado a temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 100µL de água MilliQ™.

Reações RAPD

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 2,5 ng/µL com água MilliQ, e foram armazenadas a -20°C. As reações de amplificação foram realizadas em solução total de 25 µL contendo: 0,2 mM de dNTP; tampão da *Taq* DNA polimerase “AmershamBiosciences”; 0,3 mM de oligonucleotídeos; 5ng de DNA total de *A..ricini*; 2,5 mM de MgCl₂; 1µL de *Taq* polimerase. Cada um dos isolados foi amplificado com oligonucleotídeos com 10 pares de bases, pertencentes aos Kits de oligonucleotídeos A, C, E, P e M (OPERON Technologies, Inc. Alameda, CA).

A ciclagem foi obtida em termocicladores (Eppendorf-Mastercycler Gradient), com 45 ciclos de amplificação; cada ciclo foi constituído por uma desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, um anelamento de oligonucleotídeos a 35°C por 1 minuto e uma amplificação do DNA a 72°C, por 2 minutos e, ao final dos 45 ciclos, uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C.

Às reações foram acrescentados 4µL de tampão de amostra (sacarose 4 g, azul de bromofenol 0,025 g) e então os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose (agarose 1%, tampão TBE 1X e brometo de etídio) visualizados em transiluminador e fotografados em equipamento de foto documentação. Aplicou-se como marcador de peso molecular o DNA do bacteriófago lambda digerido com *Pst*I no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 93 oligonucleotídeos testados com os kits OPA, OPC, OPE, OPM, OPP e OPZ, 41 produziram um total de 191 bandas polimórficas, como pode ser observado na tabela 1. Quinze dos oligonucleotídeos testados não amplificaram nenhuma das amostras empregadas nas reações de RAPD, enquanto oito oligonucleotídeos geraram dados não conclusivos, sendo eliminadas as análises. As reações com estes oligonucleotídeos devem ser refeitas, de modo a gerarem dados mais consistentes, que possam ser então empregados na seleção de novos marcadores do tipo RAPD.



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

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

Tabela 1. Número de marcadores do tipo RAPD amplificados por oligonucleotídeo, número de bandas analisadas e número de bandas polimórficas.

Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas	Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas	Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas
OP-E01	12	1	OP-P16	8	1	OP-A16	10	0
OP-E02	9	4	OP-P19	10	0	OP-C03	1	0
OP-E03	12	2	OP-M02	11	1	OP-C05	10	3
OP-E04	11	0	OP-M03	11	0	OP-C06	6	1
OP-E06	16	9	OP-M04	10	0	OP-C07	5	0
OP-E07	11	0	OP-M05	5	0	OP-C08	5	1
OP-E09	13	13	OP-M06	7	2	OP-C11	7	1
OP-E11	12	8	OP-M07	6	0	OP-C13	8	3
OP-E12	16	8	OP-M08	4	1	OP-C14	5	0
OP-E14	12	9	OP-M09	5	1	OP-C15	9	1
OP-E15	11	6	OP-M10	8	6	OP-C16	4	0
OP-E19	4	3	OP-M11	10	10	OP-C17	1	0
OP-E20	20	14	OP-M15	9	9	OP-C20	8	0
OP-P01	8	1	OP-M16	8	8	OP-Z01	5	1
OP-P02	11	3	OP-M17	9	8	OP-Z03	5	1
OP-P03	15	10	OP-M18	6	3	OP-Z04	4	0
OP-P06	7	4	OP-M20	3	0	OP-Z05	4	0
OP-P08	12	0	OP-A01	10	2	OP-Z07	3	0
OP-P09	16	0	OP-A02	13	0	OP-Z08	5	0
OP-P11	19	12	OP-A05	13	0	OP-Z09	10	0
OP-P12	15	8	OP-A12	9	0	OP-Z10	6	0
OP-P13	14	10	OP-A13	6	0	OP-Z11	6	0
OP-P14	7	7	OP-A14	10	0			
OP-P15	10	10	OP-A15	6	1			

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível selecionar 41 oligonucleotídeos da linha OPERON capazes de gerar bandas com padrão polimórfico.

REFERÊNCIAS

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.

ZOLAN, M.E., PUKKILA, P.J. Inheritance of methylation in *Coprinus cinereus*. **Mol. Cel. Biol.**, v. 6, n.1, p. 195-200, 1986

BATISTA, F.A.S., LIMA, E.F., MOREIRA, J. A. N., AZEVEDO, D. M. P., PIRES, V.A., VIEIRA, R. M., SANTOS, J.W. **Avaliação da resistência de genótipos de mamoneira *Ricinus comunis* L. ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini* Godfrey.** CT nº 73, CNPA fev./98, p 1-5