

## Comparação entre Protocolos de Extração de DNA para *Amphobotrys ricini*

Marcia Soares Vidal<sup>1</sup>  
Nelson Dias Suassuna<sup>2</sup>  
Cíntia de Sousa Bezerra<sup>3</sup>  
Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses<sup>3</sup>

O cultivo da mamona está em expansão no Brasil, tanto no cerrado, com cultivos mecanizados em grandes áreas, quanto em regiões mais secas, como o Nordeste, com áreas menores e mão-de-obra familiar. O crescente interesse pela ricinocultura se dá pelo fato desta cultura ser geradora de biodiesel, combustível não fóssil e menos poluente; no entanto, existem várias outras aplicações, como produção de plásticos, tintas e lubrificantes. Por outro lado ela assume um papel sócioeconômico importante, em algumas regiões do Brasil (AZEVEDO e LIMA, 2001).

Com o conseqüente adensamento de populações de uma mesma espécie, a expansão agrícola contribui para maior disseminação dos agentes etiológicos de moléstias. Os problemas fitossanitários relacionados à mamoneira são pouco estudados, contrastando com sua importância para o mundo moderno. Apesar de se tratar de uma planta rústica, a mamoneira é susceptível a várias doenças, dentre as quais se destaca o mofo cinzento, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*, cujos sintomas se caracterizam,

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 surgem sobre os frutos, lembrando uma teia de aranha (BATISTA *et al.*, 1998).

O *Amphobotrys ricini* ataca as inflorescências em todas as fases de seu desenvolvimento, deixando-as cobertas por um mofo, a princípio cinzento e, mais tarde, de cor olivácea (GONÇALVES, 1936).

A doença ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de mamona, demandando aplicações de fungicidas para seu controle. Na Paraíba, o mofo cinzento tem sido constatado sobretudo na região Agreste. Para se obter êxito em programas de melhoramento, visando a resistência durável, é necessário o monitoramento sistemático das populações do patógeno, tendo em vista à compreensão da dinâmica de seus aspectos

<sup>1</sup> Bióloga, DSc., Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58.107-720, Campina Grande, PB. E-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. Agr., MSc., Embrapa Algodão. E-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br

<sup>3</sup> Estagiário(a) da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58.109-753, Campina Grande, PB.

genéticos (quantidade e variação espaço-temporal). A caracterização de fungos por estudos morfológicos é um processo que exige conhecimento, tempo e disponibilidade de material, para crescimento das espécies em laboratório.

Uma das formas de se melhorar as características da mamona com o propósito, neste caso, de tolerância ou resistência a doenças, é através do melhoramento genético; portanto, é conveniente conhecer a variabilidade genética existente entre acessos de mamona e do patógeno. Para este tipo de análise se faz necessário extrair DNA em qualidade e quantidade adequadas, de forma rápida e eficiente, além da identificação de marcadores que permitam quantificar a variabilidade genética. Para tal é oportuno estabelecer protocolos de purificação de DNA ideais para cada organismo.

Com o protocolo de extração de DNA para a mamoneira já estabelecido (SILVA *et al.*, 2004), precisava-se estabelecer um protocolo de extração de DNA para o fungo para ser empregado então nos projetos voltados à seleção assistida por marcadores moleculares. Um dos problemas centrais encarado pelos microbiologistas que usam PCR, é determinar o método mais eficiente, rápido e sensível, para isolar pequenas quantidades de DNA a partir de um número limitado de células (GRIFFIN *et al.*, 2002). Vários protocolos têm sido testados para extrair DNA de fungo; entretanto, a maioria consome muito tempo ou requer grande quantidade de tecido. Objetivou-se, através do presente trabalho, estabelecer a metodologia de extração de DNA de *Amphobotrys ricini*.

Para extração de DNA genômico de *A. ricini*, testaram-se cinco protocolos de extração, que diferiram nos tampões de extração empregados (Tabela 1), em algumas etapas, como pode se observar nos seus esquemas dos protocolos de extração. As amostras foram avaliadas quanto à concentração de DNA obtida nos diferentes processos de extração pela leitura em espectrofotômetro. Obteve-se a leitura realizada em gel de agarose a partir da observação de fragmentos pela comparação com marcadores de peso molecular; no entanto, a quantificação realizada

Tabela 1. Concentração dos reagentes usados nos tampões de extração

Protocolo	Detergente (%)	Tris-HCl (mM)	NaCl (mM)	EDTA (mM)	βmercaptoetanol (%)	PVP (%)
Smith et al	SDS 2	100	500	500	0,6	-
Weising et al	SDS 0,5	200	250	25	-	-
Weising OPC	SDS 0,5	200	250	25	-	-
Ferreira e Grattapaglia	CTAB 2	100	1400	20	0,2	1
Zollan e Pukkila	CTAB 1	20	700	10	1	-

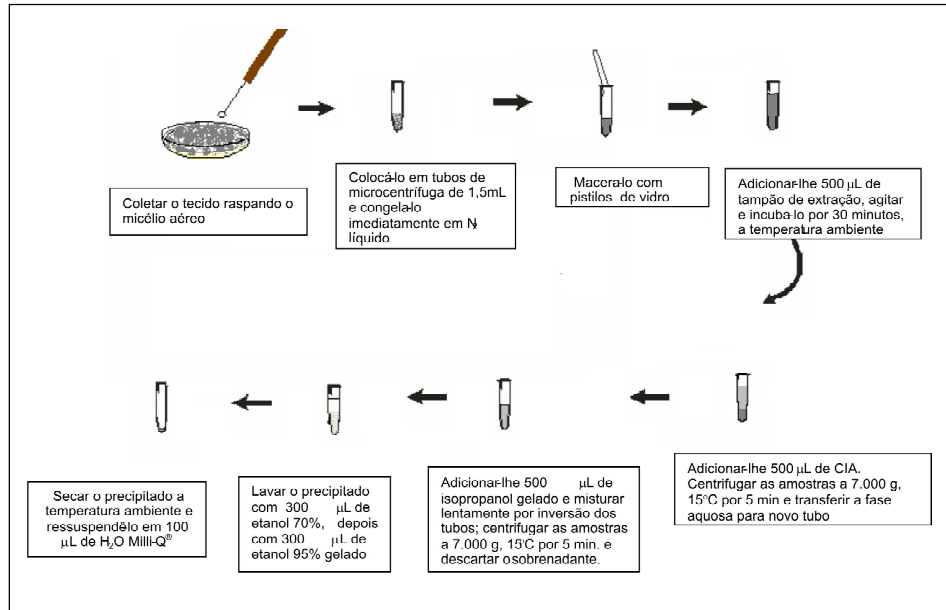
diferiu consideravelmente da obtida pela leitura em espectrofotômetro.

Entre os protocolos testados, o sugerido por Zollan e Pukkila apresentou maior concentração de DNA (1.075 ng/mL) em relação aos outros protocolos, segundo os dados obtidos por espectrofotometria (Tabela 2). Para análise realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda (260, 280 e 320 nm), verificou-se que o protocolo de Weinsing apresentou melhor padrão de pureza obtido entre a razão (260 e 280 nm), indicando maior grau satisfatório de pureza em relação aos outros protocolos testados, porém, não apresentou o mesmo rendimento pelas amostras extraídas com o método descrito por Zollan e Pukkila.

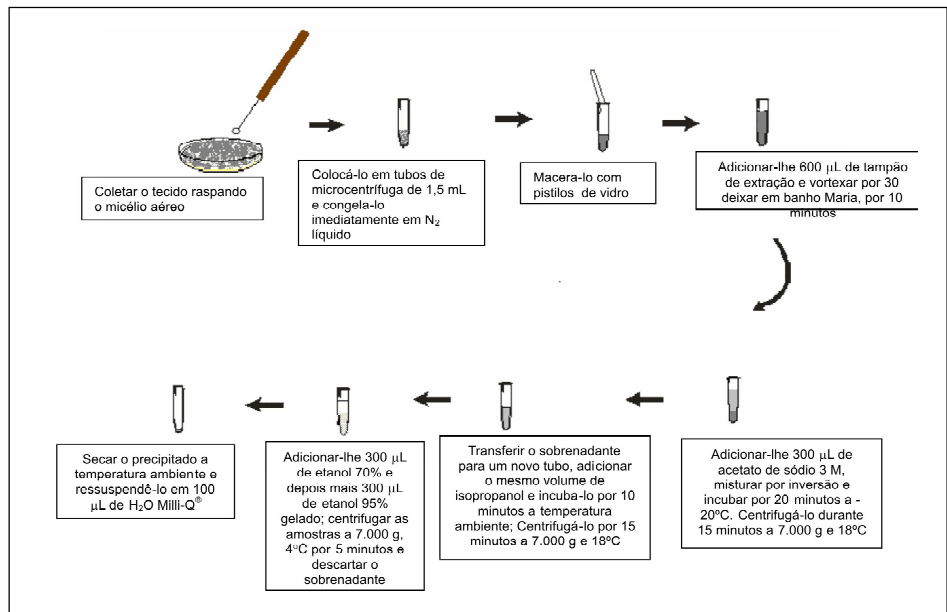
Tabela 2. Quantificação das amostras em espectrofotômetro.

Protocolos	D. O.			[DNA]
	260 nm	280 nm	320 nm	
Weinsing	0,047	0,027	0,008	587,5 ng/μL
Weinsing OPC	0,012	0,008	0,004	150,0 ng/μL
Smith	0,078	0,046	0,011	975,0 ng/μL
Zollan e Pukkila	0,086	0,054	0,019	1.075,0 ng/μL
Ferreira e Grattapaglia	0,065	0,042	0,018	812,5 ng/μL

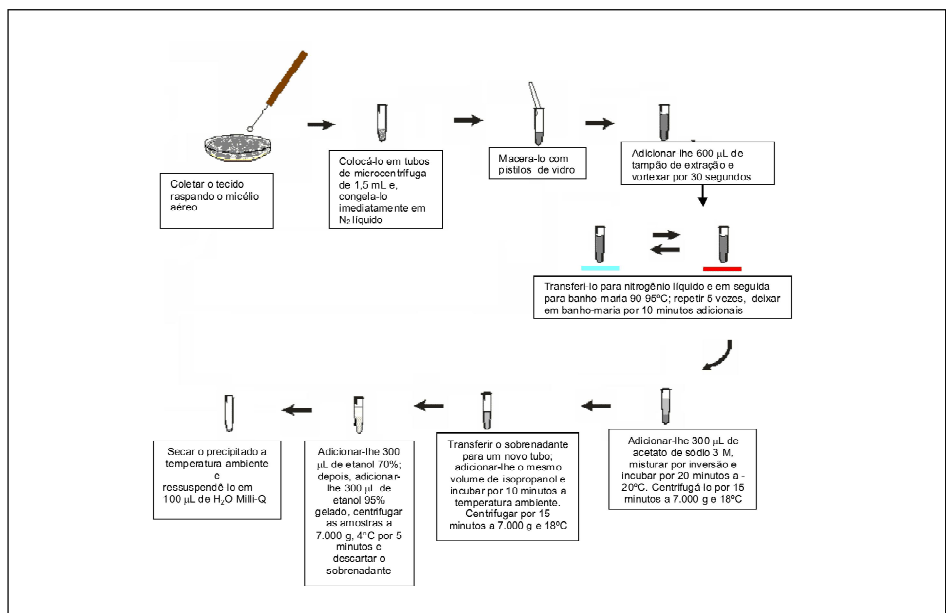
Esquema do protocolo 1 (Zolan e Pukilla, 1986)



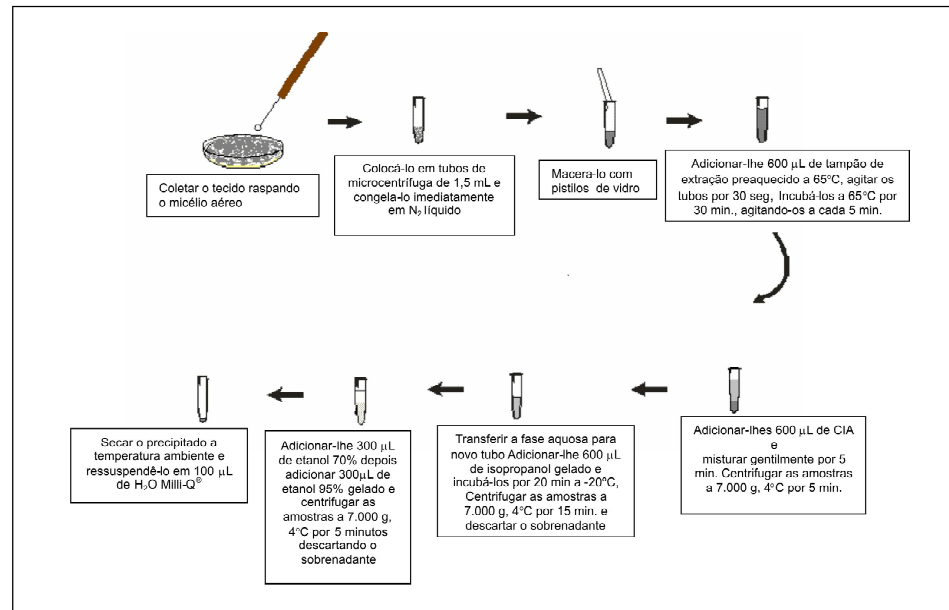
Esquema do protocolo 2 (Weinsing et al., 1995)



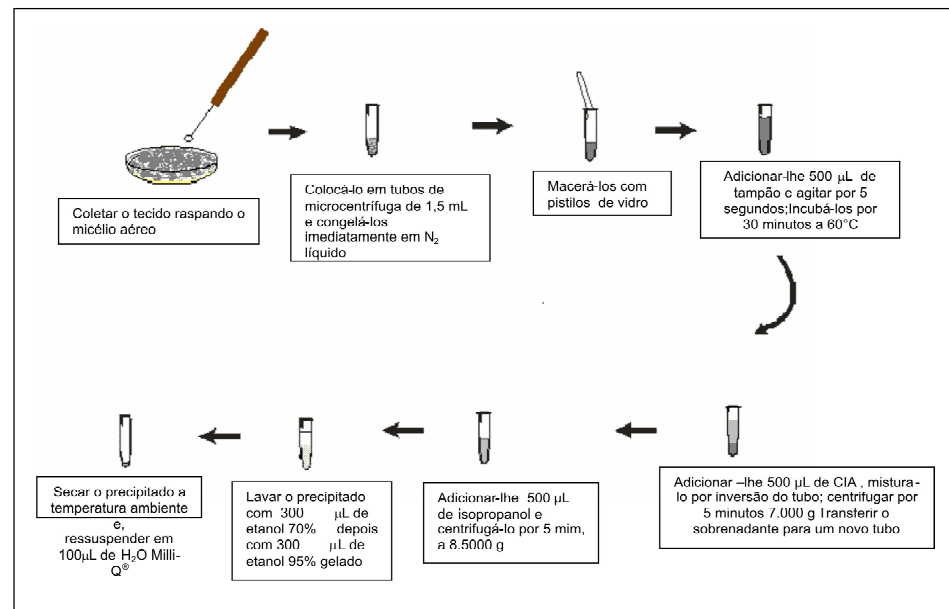
Esquema do protocolo 3 (Weinsing et al., 1995 e etapa sugerida por Griffin et al., )



Esquema do protocolo 4 (Ferreira e Grattapaglia, 1995 modificado)



Esquema do protocolo 5 (Smith et al., 2001)



## Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Eds.) O agronegócio da mamona no Brasil., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p 63-76
- BATISTA, F.A.S.; LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N., AZEVEDO, D.M.P.de; PIRES, V.A.; VIEIRA, R.M.; SANTOS, J.W.dos Avaliação da resistência de genótipos de mamoneira *Ricinus communis* L. ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini* Godfrey. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1998. 5p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 73)
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p
- GONÇALVES, R.D. O Mofo cinzento da mamoneira. O Biólogo, v. 11, p. 232-235, 1936.
- GRIFFIN, D.W.; KELLOGG, C.A.; PEAK, K.K. & SHINN, E. A. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. Letters in Applied Microbiology, v 34. 210-214, 2002.
- LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; VIEIRA, R.M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle in BELTRÃO, N.E. de M. O agronegócio do algodão no Brasil v2 Embrapa, Brasília, 1999

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.  
*Mycologia*, v. 93, p. 737-743, 2001.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W.

DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton:  
CRC Press, 1995. 322p

ZOLAN, M.E.; PUKKILA, P.J. Inheritance of  
methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular Cell  
Biology* v. 6, p.195-200, 1986.

Comunicado  
Técnico, 239

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Algodão  
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174  
58107-720 Campina Grande, PB  
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367  
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br  
1ª Edição  
Tiragem: 500



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Comitê de  
Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho  
Secretária Executiva: Nivia M. S. Gomes  
Membros: Cristina Schetino Bastos  
Fábio Akiyoshi Suinaga  
Francisco das Chagas Vidal Neto  
Gilvan Barbosa Ferreira  
José Américo Bordini do Amaral  
José Wellington dos Santos  
Nair Helena Arriel de Castro  
Nelson Dias Suassuna

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M. S. Gomes

Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão  
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho  
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho