



## Metodologias para Análise de Isoenzimas e Extração de DNA de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Lúcia Vieira Hoffmann<sup>1</sup>

Elizabeth Amélia Alves Duarte<sup>2</sup>

Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega<sup>3</sup>

Walter Fabrício Silva Martins<sup>2</sup>

Taciana de Carvalho Coutinho<sup>2</sup>

O fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans. é um fungo de solo que causa murcha em plantas de algodão. Embora os sintomas tipicamente apareçam por ocasião do florescimento, em condições favoráveis aparecem mais cedo, causando inclusive morte de plântulas. A murcha de *Fusarium* pode ser reconhecida pelo escurecimento dos vasos, observada em corte do caule (WATKINS, 1981). A doença torna-se significativamente mais importante na presença de nematóides do gênero *Meloidogyne*, possivelmente devido à habilidade destes nematóides de formar na planta uma célula nutridora, que produz compostos carbônicos e nitrogenados que servem também para o fungo. A intensidade da doença pode ser mais afetada pelo grau de incidência de nematóides que pela quantidade de inóculo do fungo (HILLOKS, 1992). Assim, a predominância, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, de uma espécie de *Meloidogyne* não patogênica em algodão, *M. javanica*, pode contribuir para que a incidência da doença não seja tão preocupante quanto em São Paulo ou Paraná (PAIVA et al., 2001). O patógeno tem habilidade de multiplicar-se na presença de diversos outros hospedeiros, entre eles soja e plantas daninhas

(HILLOKS, 1992). Embora exista resistência em *Gossypium hirsutum* para a doença, poucas variedades disponíveis para plantio são consideradas resistentes (PAIVA et al., 2001; CIA et al., 2002).

Isoenzimas são diferentes formas de uma enzima que ocorrem em um organismo. Como podem ser separadas através de eletroforese em géis, são amplamente usadas como marcadores bioquímicos em diversos estudos, sendo um de seus principais usos a genética de populações (ALFENAS, 1998). Marcadores moleculares são fragmentos discretos de DNA, também observáveis em gel, que podem ser obtidos por diversas combinações de técnicas, principalmente a PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e as enzimas de restrição (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os procedimentos laboratoriais para obtenção de marcadores bioquímicos ou moleculares podem variar com as características das diferentes espécies. Neste sentido, procurou-se identificar, neste trabalho, algumas enzimas de fácil execução que possam posteriormente ser utilizadas como marcadores, além de identificar um método de extração de DNA que pode ser utilizado para marcadores baseados em DNA.

<sup>1</sup>Eng. Agr. Dr. Pesquisadora Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720 Campina Grande, PB

<sup>2</sup>Biólogos, estagiários da Embrapa Algodão.

<sup>3</sup>Eng. Agr., M. Sc., pesquisadora da Embrapa Algodão.

O fungo foi cultivado em 100mL de meio de Armstrong, contendo: 58,4795mM de sacarose; 1,626mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 21,6216mM de KCl; 10,4761mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 57,8431mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 1,447mg/L de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ; 0,8796mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,406mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , com pequena agitação manual uma vez ao dia, à temperatura ambiente (MENESES e SILVA-HANLIN, 1997). O micélio foi extraído por filtragem através de papel filtro, em funil acoplado a uma bomba de vácuo (Figura 1), seguido de lavagens por TE (Tris 10mM pH 8,0 e ácido etileno diamino tetracético – EDTA -1mM) e congelado a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para extração de enzimas, foram utilizados cerca de 200mg de micélio, macerados em almofariz com o dobro, em volume, de uma das soluções apresentadas na Tabela 1. Foram centrifugadas a 11564g, por 30 minutos, a  $5^\circ\text{C}$ , e coletado o sobrenadante. As amostras foram utilizadas imediatamente. Os extratos protéicos foram aplicados em géis de penetrose 30 ou em géis de acrilamida (ALFENAS, 1998). A coloração dos géis foi feita conforme descrito na Tabela 2.

Para extração de DNA, cerca de 250mg de micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido em almofariz e transferido para tubos de 1,5mL, aos quais foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de um dos seguintes tampões de extração:

- i) dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, Tris-HCl 100mM pH 8,0, NaCl 500mM; EDTA 50mM e -mercaptoetanol 0,6% (SMITH et al., 2001).
- ii) CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 1%; NaCl 0,7M, Tris-HCl 8,0 20mM pH, EDTA 10mM, -mercaptoetanol 1% (ZOLAN e PUKKILA, 1986).

Agitou-se em vórtex por 5s e incubou-se a  $60^\circ\text{C}$  por

30 minutos. Adicionou-se 500mL de CIA (mistura de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, v/v), misturou-se por inversão do tubo, centrifugou-se por 5 minutos, a 8500g, e transferiu-se a fase aquosa para tubo novo. A extração com CIA foi repetida uma segunda vez. Adicionou-se 500ml de isopropanol e centrifugou-se por 5 minutos, a 8.500g. O sobrenadante foi descartado, o tubo lavado com etanol 70%, e o DNA re-suspendido em água milliQ.

## Resultados e Discussão

A enzima esterase apresentou padrões definidos em géis de penetrose quando utilizado ácido cítrico 0,04M pH 7,1 como tampão tanto no gel como do eletrodo.

Dois sistemas descontínuos foram satisfatórios para revelação malato desidrogenase em géis de penetrose e estão apresentados na Tabela 3.

Os sistemas satisfatórios para esterase não foram satisfatórios para malato desidrogenase ou vice-versa. Quatro outros sistemas (1, 9, 13 e 19, segundo metodologia proposta por Alfenas, 1998) não foram satisfatórios para nenhuma das duas enzimas.

Os tampões I, II e III utilizados para extração de esterase e MDH (Tabela 1) foram igualmente satisfatórios para ambas as enzimas.

Em géis descontínuos de acrilamida obtiveram-se bons padrões de resolução para esterase (três bandas), superóxido dismutase (duas bandas), álcool desidrogenase (1 banda), manitol desidrogenase (uma banda) e enzima málica (3 bandas). Nestes géis foram testados os tampões de extração I e IV, apresentados na Tabela 2, que foram igualmente eficientes, exceto no caso de álcool desidrogenase, para a qual só foram visualizadas bandas quando as

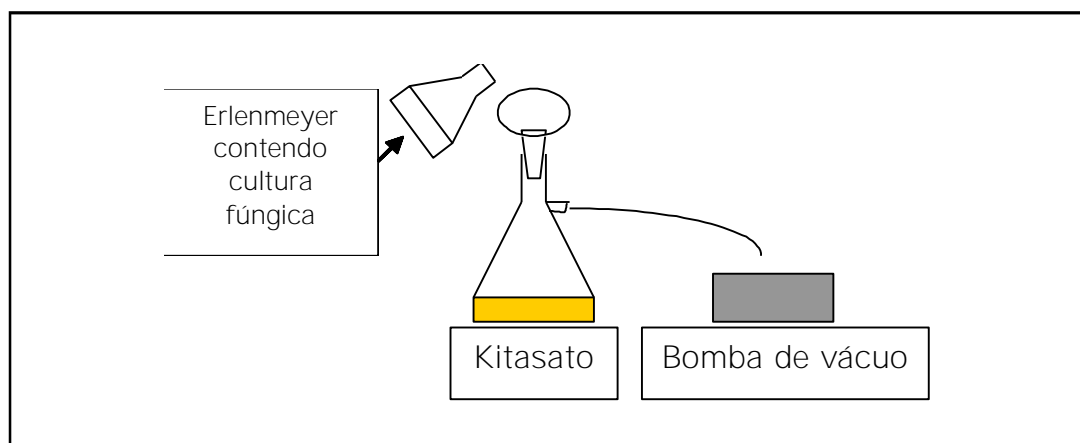


Fig. 1. Filtragem de micélio para posterior extração de enzimas ou DNA.

Tabela 1. Composição de tampões de extração satisfatórios para extração de enzimas de *F. o. vasinfectum* e sua composição.

Tampão	Composição
I	fosfato de sódio bibásico 34,0mM; sacarose 0,2M; Polivinil-pirolidona (PVP-40) 2,56%; ditiotreitól 3mM; ácido ascórbico 5,7mM; dietilditiocarbamato de sódio 5,8mM; bissulfito de sódio 2,6mM; borato de sódio 2,5mM; polietilenoglicol-6000 1%; $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%; 0,12g de PVPP (Alfenas 1998). *
II	fosfato de sódio monobásico 0,04M; sacarose 0,2M; EDTA 2M; ditiotreitól 3mM; ácido ascórbico 5mM; bissulfito de sódio 2,5mM; dietilditiocarbamato de sódio 6mM; polivinil-pirolidona (PVP-360) 0,05%; albumina bovina cristalizada 0,1%; $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%. Ajustado pH para 7,3. (Alfenas 1998).
III	$\beta$ -mercaptoetanol a 0,2%; 0,16g de PVP-40
IV	Tris HCl 0,6173M, pH 6,8

\* Nota: -mercaptoetanol e PVPP foram adicionados imediatamente antes da trituração do micélio.

Tabela 2. Soluções para revelação de enzimas.

Enzima	Solução e condições de revelação
Esterase	$\alpha$ -naftil-acetato 0,03%; fast blue RR salt 0,1% em tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0. Revelação no escuro a 37°C.
Malato desidrogenase	ácido málico 0,02M, 0,020% de NAD <sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo); 0,02% de MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-Difeniltetrazólio brometo); PMS (Fenazina Metosulfato) 0,002% em Tris-HCl 0,1M pH 8,5. Incubação no escuro a 37°C.
Superóxido dismutase*	Riboflavina 0,04%, Na <sub>2</sub> EDTA 0,3% e MTT 0,02% em Tris-HCl 0,05M pH 8,5). Incubação na presença de luz, à temperatura ambiente.
Álcool desidrogenase	Etanol 20%, NADP <sup>+</sup> 0,02%; MTT 0,02%; PMS 0,002%, e Tris-HCl 0,2M pH 8,0. Incubação no escuro a 37°C.
Manitol desidrogenase	Manitol 0,1%, NADP <sup>+</sup> 0,02%; MTT 0,02%; PMS 0,002% e Tris-HCl 0,1M pH 8,5. Incubação no escuro a 37°C..
Enzima málica	Ácido málico 0,2M, NADP <sup>+</sup> 0,02%, MTT 0,02%; PMS 0,002% e MgCl <sub>2</sub> 0,02% em Tris-HCl 0,1M pH 8,5. Incubação no escuro a 37°C.

Fonte: Alfenas (1998). \*Modificado pelo autor.

Tabela 3. Combinações de tampões do gel e de eletrodo satisfatórias para revelação de MDH em géis de penetrose.

Tampão do gel	Tampão do eletrodo
Tris 0,1M pH 8,8	hidróxido de sódio 0,05M ácido bórico 0,3M pH 8,0
Histidina-HCl 0,005M pH 7,0	Tris 0,135M Ácido cítrico 0,44M pH 7,0

amostras foram extraídas com o tampão I.

Os tampões de extração I e II foram desenvolvidos para extração de proteínas de plantas (ALFENAS, 1998) e contêm uma série de substâncias que visam inibir a atividade de fenóis ou quinonas, formadas a partir de fenóis por polifenoloxidades e peroxidases da planta. Tanto fenóis como quinonas podem inibir a atividade das enzimas, impedindo sua revelação, ou

alterar sua mobilidade. Entretanto, para extração de enzimas do micélio de *F. o. vasinfectum*, exceto no caso de álcool desidrogenase, tais inibidores não foram necessários, e os tampões mais simples, a exemplo do IV, podem ser utilizados.

As extrações de DNA quando utilizando o tampão de extração com SDS forneceram DNA de integridade e em quantidades adequadas (média de 3mg),

conforme verificado em géis 0,8% de agarose. Este tampão de extração já havia sido testado para *F. o. vasinfectum* por Smith et al. (2001), embora os passos seguidos por estes autores fossem diferentes dos expostos neste trabalho. O tampão de extração contendo CTAB também permitiu a extração, porém com baixa eficiência (em apenas quatro de doze amostras testadas).

Assigbetse et al. (1994) utilizaram marcadores RAPD para construção de um dendrograma com isolados de *F. o. vasinfectum* de diferentes locais do mundo (Américas, África e Ásia) e mostraram que os agrupamentos formados foram correspondentes às raças fisiológicas. Sugerem, então, que o marcador molecular possa tornar-se um método alternativo, mais prático, de diferenciar raças do patógeno. A diferenciação de raças fisiológicas é de grande importância, pois a resistência de cultivares ou linhagens em programas de melhoramento depende das raças fisiológicas com as quais são confrontadas. Marcadores isoenzimáticos podem também ser futuramente desenvolvidos com esta finalidade.

## Conclusões

As enzimas malato desidrogenase, esterase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase, manitol desidrogenase e enzima málica podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos em estudos sobre o fungo *F. o. vasinfectum*. A metodologia de extração de DNA, quando utilizado tampão de extração contendo SDS, é adequada, podendo ser usada para futuros estudos envolvendo marcadores moleculares para o patógeno.

## Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C. (ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*, v. 84, p. 622-625, 1994.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; PIZZINATTO, M. A.; BORTOLETTO, N. Uma escala para classificação da resistência de cultivares a doenças do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 28, p. 28-32, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa 1998. 220p.

HILLOCS, R. J. *Fusarium Wilt*. In: Hillocks, R. J., ed. *Cotton diseases*. Melksham: CAB International, 1992. Cap. 4, p. 127-160.

MENESES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco/Imprensa Universitária, 1997. 106p.

PAIVA, F. A.; ASMUS, G. L.; ARAÚJO, A. E. Doenças. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE (Dourados, MS). *Algodão: tecnologia de produção*. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, Embrapa Algodão, 2001. Cap. 13, p. 245-267.

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.

WATKINS, G. M. (Ed.) *Compendium of cotton diseases*. Aquila: The American Phytopathological Society, 1981. 87p.

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

### Comunicado Técnico, 175

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Algodão  
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174  
58107-720 Campina Grande, PB  
Fone: (83) 315 4300 Fax (83) 315 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: Demóstenes M.P. de Azevedo  
José Wellington dos Santos  
Lúcia Helena A. Araujo  
Márcia Barreto de Medeiros  
Mária Auxiliadora Lemos Barros  
Mária José da Silva e Luz  
Napoleão Esberard de M. Beltrão  
Rosa Maria Mendes Freire

### 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