



Comparação entre Protocolos de Extração de DNA para *Ramularia areola*

Márcia Soares Vidal¹
Cíntia de Sousa Bezerra²
Nelson Dias Suassuna³
Lúcia Vieira Hoffman⁴

A expansão agrícola, com o conseqüente adensamento de populações de uma mesma espécie vegetal contribui para maior disseminação dos agentes etiológicos de moléstias. Assim como as demais culturas, o algodoeiro está sujeito ao ataque de microorganismos diversos, como bactérias, vírus e fungos, alguns dos quais lhe causam doenças de grande expressão econômica. (LIMA *et al*, 1999).

Nos últimos anos tem se verificado, principalmente no Cerrado brasileiro, o aumento da severidade de algumas doenças que antes eram consideradas secundárias, notadamente a mancha da ramulária ou ramulariose a qual se tornou, em um curto espaço de tempo, a principal doença do algodoeiro nessa região. Essa doença pode causar perdas consideráveis à população, caso as medidas de controle necessárias não sejam tomadas em tempo hábil.

A ramulariose, também conhecida como mancha da ramulária, míldio areolar ou míldio cinza tem como agente etiológico o fungo *Ramularia areola*. O patógeno causa manchas de aparência irregular e angular, com 3-4mm de largura limitadas pelas

nervuras. As manchas variam de verde claro a amarelo esverdeado na superfície superior da folha, na superfície inferior, variam de branco gelo ao cinza, a folha torna-se clorótica e as lesões marrom avermelhadas, ocorrendo então a desfoliação (WATKINS, 1981). Na região do Cerrado ela ocorre precocemente podendo causar a desfolha no "baixeiro" das plantas e danos econômicos significativos aos produtores. A intensidade do prejuízo varia conforme a época de incidência da doença e a variedade utilizada (SIQUERI, 2001).

As variedades de algodoeiro reagem diferentemente à *Ramularia areola*, sendo provável a presença de genes de resistência a mancha da ramularia em algumas cultivares de *G. hirsutum* e *G. barbadense* (RATHAIAH, 1976).

A partir do desenvolvimento dos programas de melhoramento genético com base na análise do genoma de organismos, dentre os quais destaca-se a utilização de marcadores moleculares, que detectam polimorfismo ao nível de DNA, surgiu a possibilidade de analisar o genoma de *R. areola* e do algodoeiro com o objetivo de identificar cultivares tolerantes ou

¹ Bióloga, DSc., Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

² Estagiária da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753, Campina Grande, PB.

³ Eng. Agr., MSc., Embrapa Algodão. E-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br

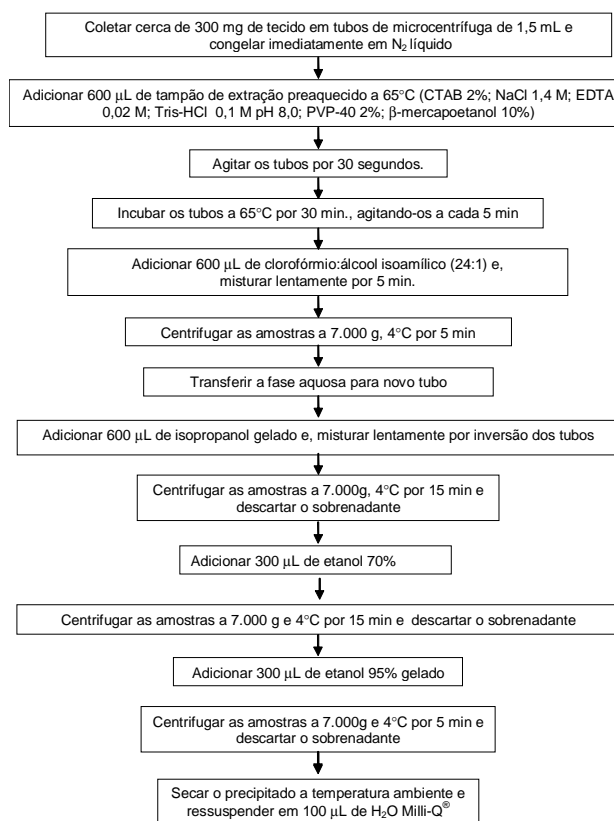
⁴ Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão. E-mail: hoff@cnpa.embrapa.br

resistentes à doença, sendo necessário estabelecer protocolos de purificação de DNA ideais para cada organismo.

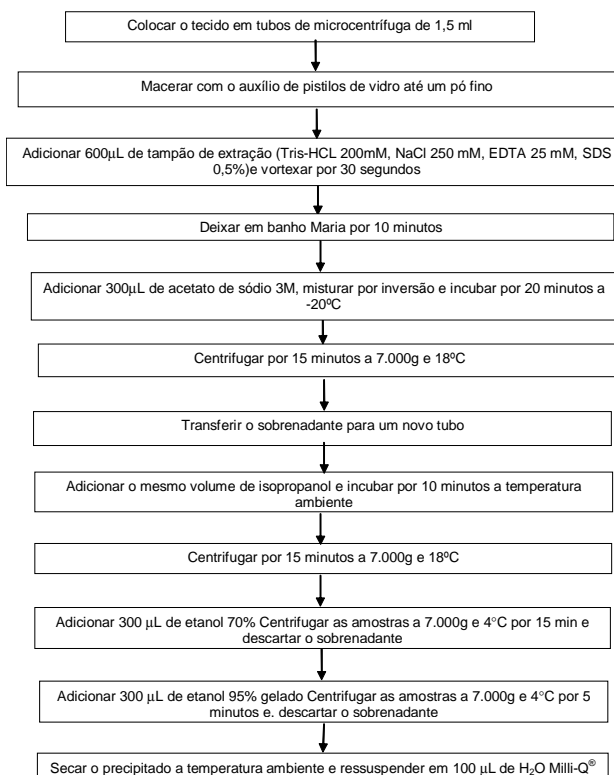
Um dos problemas centrais encarado pelos microbiologistas que usam PCR é determinar o método mais eficiente – rápido e sensível – para isolar pequenas quantidades de DNA a partir de um número limitado de células (GRIFFIN *et al.*, 2002). Vários protocolos tem sido testados para extrair DNA de fungo; entretanto, a maioria consome muito tempo ou requer grande quantidade de tecido. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a metodologia de extração de DNA de *Ramularia areola*. Os isolados foram obtidos a partir de folhas com sintomas da doença coletadas em diferentes municípios do estado de Goiás. O fungo foi cultivado em placas de Petri, contendo meio V8, até atingirem o tamanho ideal para fazer uma extração de DNA. Para extração de DNA genômico foram testados os protocolos sugeridos por Ferreira e Grattapaglia (1995), Goodwin *et al* (1992) e Weising *et al.* (1995), sendo este último com três modificações.

Os protocolos de Weising *et al.* (1995); Ferreira e Grattapaglia (1995) e Goodwin *et al* (1992) foram eficazes. Em todos constatou-se a presença de DNA suficiente para realizar as reações de PCR. Como se procurava um protocolo rápido e barato, o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995) não foi o ideal quando comparado ao de Weising *et al.* (1995), uma vez que se mostrou mais oneroso e consumindo mais tempo, o que dificulta a análise de grande número de indivíduos.

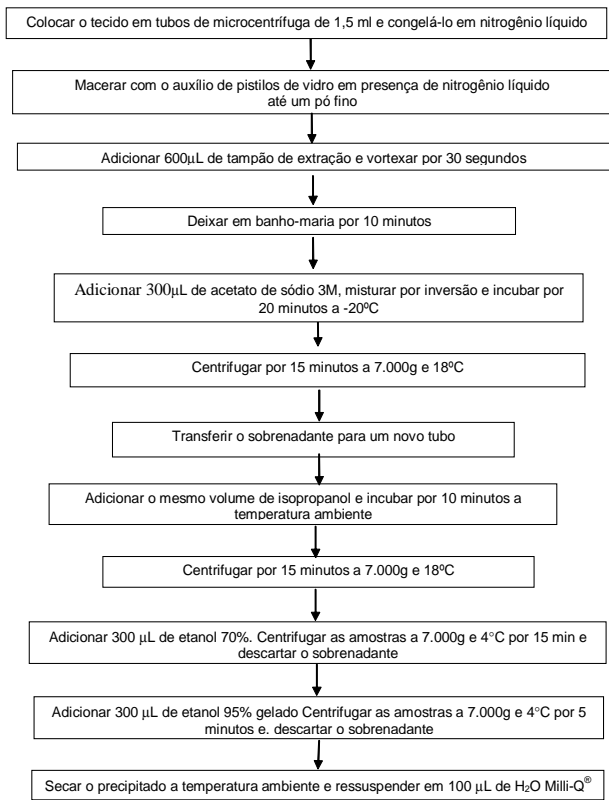
Entre as modificações testadas do protocolo de Weising *et al.* (1995), o mais adequado foi o número 1, no qual a amostra foi macerada diretamente no tampão de extração e a extração foi prosseguida sem realizar a etapa de gelo e degelo. O fato de congelar a amostra dificulta a maceração, e a etapa de gelo e degelo demanda mais tempo, como todos os tratamentos foram eficientes na extração sugere-se o emprego deste por ser mais rápido e simples que os demais.



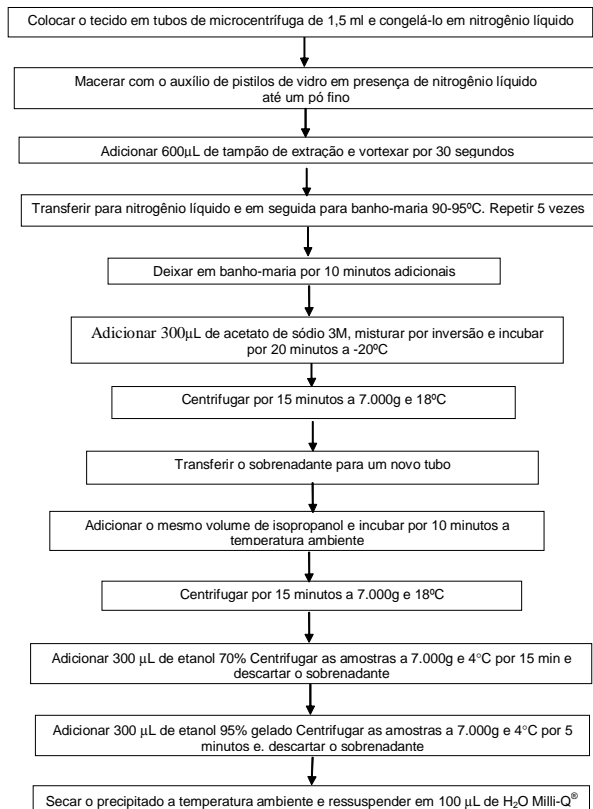
Esquema do protocolo 1 (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995 modificado)



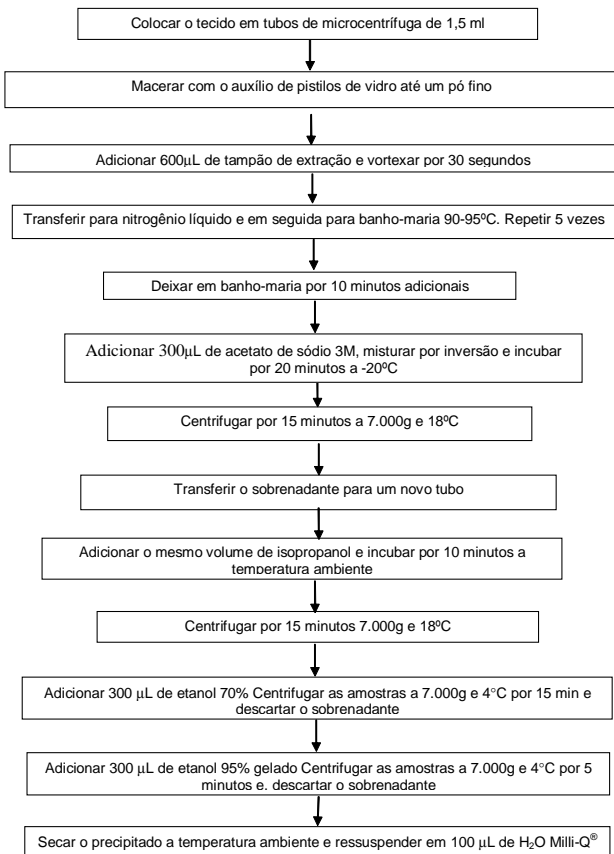
Esquema do protocolo 2 (Weising et al., 1995)



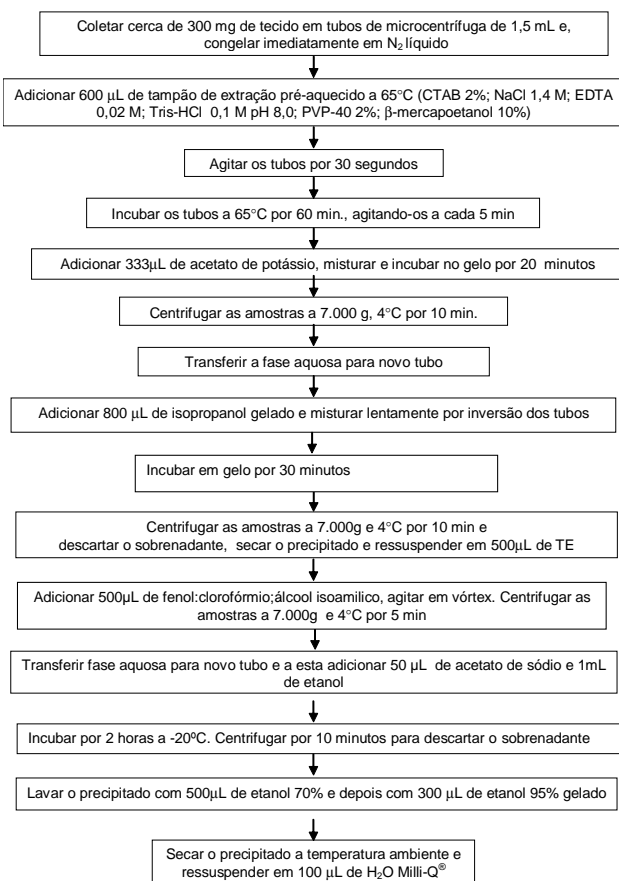
Esquema do protocolo 2, modificação 1 (Weinsing et al., 1995)



Esquema do protocolo 2, modificação 3 (Weinsing et al., 1995)



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



Esquema do protocolo 3 (Goodwin et al., 1992)

Referências Bibliográficas

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

GOODWIN, S.B.; DRENTH, A.; FRY, W.E. Cloning and genetic analyses of two highly poly morfic, moderately repetitive nuclear DNA,s from *Phytophthora infestnas*. **Current Genetics**, v. 22, p. 107-105, 1992.

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**, v34. P. 210-214, 2002

LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; VIEIRA, R.M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle in BELTRÃO, N. E. M. (org); **O agronegócio do algodão no Brasil** Brasília: Embrapa Comunicação para

Transferência de Tecnologia, 1999, v 2, p

RATHAIAH, Y. Reaction of cotton species and cultivars to four isolates of *Ramularia areola*. **Phytopatology** v 66 1976. p 1007-1009

SIQUERI, F. V.; ARAUJO, A. E. Controle químico de ramularia (*Ramularia areola*) no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In:CONGRESSO Brasileiro de Algodão, 2001, Campo Grande. **Anais...** Dourados: Embrapa Algodão/Embrapa CPAO/UFMS, 2001. p.546-548.

WATKINS, G. M. (ED) **Compedium of cotton diseases**. Aquila. The American Phytopathological Society, 1981 p.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton, CRC Press, 1995 322p

Comunicado Técnico, 240

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