

Avaliação de protocolos para a extração de dna e de marcadores moleculares para a identificação de espécies de *Bipolaris*

Primeiro autor: Thays Benites Camargo Pereira
Demais autores: Pereira, T. B. C.^{1}; Fernandes, C. D.²; Chiari, L.²; Verzignassi, J. R.²; Batista, M. V.³*

Resumo

A mancha foliar, causada por *Bipolaris maydis*, é a principal doença de *Panicum maximum*. Este fungo apresenta grande diversidade genética e alta variabilidade morfológica, o que dificulta a sua identificação. Objetivando-se caracterizar molecularmente a diversidade genética de *Bipolaris* spp., oriundos de *P. maximum*, foram testados dois métodos de extração de DNA e quatro marcadores moleculares para diferenciação de espécies do fungo. Para o estudo, selecionaram-se seis isolados dentre os 55 presentes na coleção micológica do laboratório de fitopatologia da Embrapa Gado de Corte. Dois métodos para extração de DNA foram testados: Doyle & Doyle modificado e *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Avaliou-se também o melhor processo para maceração do micélio fúngico, utilizando-se nitrogênio líquido ou areia de aquário autoclavada. Os marcadores moleculares ITS, GPDH, TEF e LSU foram utilizados nos isolados de *Bipolaris* sp., sendo a reação de PCR processada em um volume final de 25 μ L contendo: 50 ng de DNA; 20 pmol. μ L⁻¹ de cada *primer*; 2,5

(1) Pesquisadora DCR/CNPq-FUNDECT, Embrapa Gado de Corte, tbcpereira@usp.br. (2) Pesquisadores da Embrapa Gado de Corte. (3) Técnica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Gado de Corte. * Autor correspondente.

mM de cada dNTPs; 350 nM Tris-HCl, 250 mM KCl, 35 nM MgCl₂ do 10X PCR Buffer; e 1U Uni-Taq DNA Polymerase (5 U.μL⁻¹). As melhores concentrações e purezas do DNA genômico foram obtidas pela utilização do método Doyle & Doyle modificado, após maceração do micélio fúngico em areia de aquário autoclavada. Estas concentrações foram maiores que 100 ng.μL⁻¹ e a razão das absorbâncias 260/280 variando de 1,98 a 2,65. A correta amplificação do fragmento genômico de *Bipolaris* spp. ocorreu somente com a utilização do marcador molecular ITS (≈ 600 pb). Os demais marcadores não apresentaram amplificação de fragmento conforme o esperado, necessitando assim, de uma reavaliação individual das condições de amplificação. Deste modo, estabeleceu-se um protocolo eficiente para extração do DNA de *Bipolaris* sp., bem como das condições ideais para amplificação das regiões ITS do rDNA do patógeno.

Parceria / Apoio financeiro

CNPq, Fundect, Fundapam, Unipasto e Embrapa.