



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM BIOLOGIA

LARISSA SANTOS OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* NO BRASIL**

Cruz das Almas

2012

LARISSA SANTOS OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC),
apresentado ao curso de graduação em
Biologia, Universidade Federal do Recôncavo
da Bahia, como requisito para obtenção do
grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha
Moreira

Co-orientador: Dr. Edson Perito Amorim

Cruz das Almas - BA.

Janeiro de 2012

LARISSA SANTOS OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentada como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* NO BRASIL

Banca Examinadora

Ricardo Franco Cunha Moreira– Orientador
Professor Adjunto II do CCAAB

Edna Lobo Machado
Professora Assistente do CCAAB

Edson Perito Amorim
Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura

DEDICO

Aos meus amados pais, Marizete (*in memoriam*) e Francisco Ruy (*in memoriam*) pelo amor ofertado.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência e por ter me dado a capacidade para concretização desta etapa da minha vida;

À minha família, que sempre me deu apoio e força, para o meu crescimento, em especial a minha mãe;

As minhas queridas amigas, Carina, Gabriela, Reizaluamar e Thamyres pelo afeto e ajuda na superação dos desafios;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela minha formação profissional;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica;

Ao Dr. Edson Perito Amorim, pela co-orientação recebida, e ensinamentos transmitidos;

Ao Professor Dr. Ricardo Franco pela orientação no TCC;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão do espaço e recursos financeiros para execução do trabalho;

Aos amigos da Embrapa Mandioca e Fruticultura pela ajuda na execução do trabalho;

Aos amigos do curso pelo carinho e amizade;

À mestrandia Juliana e Shirley pela parceria e pelos ensinamentos no estágio;

Aos mestres pelo conhecimento científico;

À todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* NO BRASIL

RESUMO

O mal-do-Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) é um dos principais problemas fitossanitários da bananicultura. Para esta doença, o controle com fungicidas é inviável, sendo o uso de cultivares resistentes o mais recomendável. Assim este estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por meio de marcadores SSR. Para tanto, foram avaliados 15 isolados coletados em diferentes regiões produtoras de bananeira no Brasil. Os resultados utilizando marcadores moleculares SSR separou os isolados em três grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído de nove indivíduos provenientes dos oito municípios onde as coletas foram realizadas. O segundo grupo, foi composto por cinco isolados . Já o terceiro grupo, formado por um isolado (Foc 2010.05- Corupá- SC). Não houve associação dos agrupamentos SSR com origens geográficas visto que os isolados foram distribuídos indistintamente nos grupos. Com base na análise molecular da variância (AMOVA), observou-se que grande parte da variação observada entre os isolados de *Fusarium* está associada aos locais de coleta.

PALAVRAS CHAVES: mal-do-Panamá. Microssatélites. *Musa* spp.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* in BRAZIL

ABSTRACT

Panama disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) is one of the main problems in banana production. For this disease, the control fungicides is impracticable, being the use of resistant cultivars use has been usually recommended. This study aimed to characterize to isolates of FOC using SSR markers. For this purpose, 15 isolates were collected in the producing regions of Brazil. SSR analysis separated individuals into three distinct groups. The first group consisted of nine individuals from the eight municipalities where the collections were made. The second group composed of five isolates. The third group comprising one isolates (Foc 2010.05 - Corupá- SC). There was no association among groups SSR markers, geographic origins and morphological characteristics of isolates collected from the different municipalities, since they were indistinctly grouped. Through the analysis of molecular variance (AMOVA), we observed that genetic variation among isolates of *Fusarium* is associated with the collection sites.

KEY-WORDS: Panama disease. Microsatellites. *Musa* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Região com sintomas característicos da doença mal-do-Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (A) e crescimento micelial de fungo em meio BDA após oito dias de incubação (B)..... 20
- Figura 2.** Padrão de amplificação do Iniciador MB02. M: Marcador de peso molecular 50 pb (Sigma). Amostras 1 a 16- Isolados de FOC. 22
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade genética dos 15 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* utilizando os cinco iniciadores SSR... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> e local de coleta...	19
Tabela 2. Iniciadores utilizados para estudo SSR seguido da sequência de nucleotídeos e temperatura de anelamento.....	22
Tabela 3. Distribuição da variabilidade genética entre regiões, entre locais de coleta e dentro dos locais de coleta de <i>Fusarium</i> com base na análise molecular da variância (AMOVA).....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 JUSTIFICATIVA	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 A bananicultura e sua importância econômica	13
3.2 O mal-do-Panamá e seus sintomas.....	14
3.3 Variabilidade genética em <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	15
3.4 Melhoramento genético para a resistência ao mal-do-Panamá em bananeira	16
3.5 Variabilidade genética via SSR (<i>Simple sequence repeats</i>).....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Geral:	18
4.2 Específicos:.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Estabelecimento de uma coleção de FOC	19
5.1.1 Isolamento e obtenção de culturas monospóricas.....	20
5.2 Variabilidade genética por marcadores moleculares	21
5.2.1 Crescimento do fungo em meio líquido e extração do DNA.....	21
5.2.2 Amplificação do DNA por SSR.....	21
5.3 Análises estatísticas	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6.1 Análise da variabilidade genética via marcadores SSR.....	23
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO A – Extração de DNA – Método CTAB	31

1 INTRODUÇÃO

A banana é a segunda fruta mais consumida no Brasil, perdendo apenas para a laranja. A cultura é explorada principalmente, por pequenos empresários rurais, permitindo a fixação de mão-de-obra no campo, sendo uma fonte de alimento e renda contínua para estes agricultores, o que evidencia também, a importância da bananicultura no contexto sócio-econômico (RODRIGUES et al., 2001; SILVA et al., 2001). Como ocorre em qualquer espécie cultivada, a bananeira é afetada por diversos problemas relacionados à infestação de patógenos e pragas, sendo os fungos os agentes infecciosos de maior importância para bananicultura mundial. Entre as doenças, destacam-se a Sigatoka-negra, a Sigatoka-amarela e o mal-do-Panamá.

O mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), é uma das doenças mais destrutivas da bananeira, uma vez que infecta diversas variedades de bananeira e causa prejuízos aos bananicultores, principalmente pela dificuldade de aplicação de medidas de controle, sendo considerada uma das doenças economicamente mais importantes dos últimos anos (PLOETZ, 2006).

A doença levou à falência importantes empresas bananeiras na metade do século passado. Por isso, muitos genótipos estão sendo abandonados no Brasil, sendo o principal exemplo, a variedade Maçã, suscetível ao fungo, com áreas de plantio restritas a locais isolados, em solos ainda não cultivados com a bananeira (BORGES, 2007).

Uma ferramenta essencial para os programas de melhoramento é o conhecimento da estrutura de populações de fitopatógenos, essa informação é utilizada pelo melhorista para direcionar o melhoramento genético, cuja etapa final do processo consiste na avaliação dos genótipos em diferentes regiões produtoras.

O programa de melhoramento genético de bananeira, iniciado pela Embrapa em 1983, tem como objetivo desenvolver variedades mais produtivas e resistentes aos principais estresses bióticos e abióticos, como porte e ciclo reduzidos, mantendo ou melhorando a qualidade dos frutos e resistentes a doenças e pragas (SILVA et al., 2001).

Todavia, o melhoramento genético da bananeira é complexo e demorado, e como suporte aos programas de melhoramento várias técnicas têm sido utilizadas com o propósito de acelerar a obtenção de novas variedades resistentes. A biotecnologia tem sido empregada em suas diferentes fases, em especial associadas com estudos da diversidade genética e determinação de marcadores ligados a características agrônômicas desejáveis (JESUS, 2010; SILVA et al., 2010).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por meio de marcadores SSR.

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o quinto produtor mundial de banana, tendo produzido 7,0 milhões de toneladas em 2010, em uma área aproximada de 487 mil hectares (FAO, 2012). No entanto, apenas 13% da produção de bananas e plátanos são transacionadas no mercado internacional, o restante é consumido nos mercados internos dos países produtores (ALMEIDA e CÂMARA, 2010). Entre os principais problemas fitossanitários da bananeira, destaca-se o mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que ocorre, principalmente, nos bananais das cultivares Prata e Maçã e ultimamente em cultivares do subgrupo Cavendish. A doença causa a morte de plantas e dificulta a implantação de novos plantios, pois o fungo pode sobreviver no solo durante muitos anos (CORDEIRO e MATOS, 2005).

O mal-do-Panamá é uma das doenças mais destrutivas da bananeira sendo considerada entre as cinco doenças economicamente mais importantes de todos os tempos (BORGES, 2007). A doença levou à falência poderosas empresas bananeiras na metade do século passado, sendo também responsável pelo quase desaparecimento da banana Maçã do mercado brasileiro. O fato de ser causada por um fungo do solo que, mesmo na ausência da cultura, sobrevive por períodos prolongados, faz com que a medida de controle mais efetiva seja o uso de variedades resistentes.

De acordo com o sistema atual de classificação, a FOC em bananeira ainda é estruturada em raças, sendo que a raça 1 afeta 'Gross Michel' e 'Maçã', raça 2 afeta 'Bluggoe' e outras bananas de cocção 2 e raça 4 afeta as variedades do subgrupo

Cavendish. A raça 4 foi dividida em subtropical e tropical para diferenciar populações que afetam Cavendish em condições subtropicais ou tropicais (PLOETZ, 1990). Assim, identificar e caracterizar estas populações gerará subsídios importantes para o controle da doença e principalmente para programa de melhoramento genético de bananeira do Brasil que é conduzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Este programa tem trabalhado por mais de 29 anos na obtenção de variedades resistentes ao mal-do-Panamá. Algumas variedades foram lançadas, porém um esforço maior ainda é necessário, principalmente relacionado à busca por informações sobre estrutura de populações do patógeno e as bases genéticas e moleculares da resistência a FOC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A bananicultura e sua importância econômica

Segundo a FAO (2012) o Brasil foi em 2010 o quinto produtor de banana do mundo e o maior do hemisfério sul. A produção brasileira em 2010 foi de 7,0 milhões de toneladas em 487 mil hectares. No entanto, a importância do mercado internacional de banana ainda é muito pequena, quando se leva em conta a expressividade no mercado interno nos países produtores, pois em 2008 o Brasil exportou 168 mil toneladas, apenas 2,6% do total de bananas produzidas. Isto caracteriza o agronegócio brasileiro de bananas como predominantemente de mercado interno, embora a exportação para os países do Mercosul tenha uma grande importância para os produtores do estado de Santa Catarina, situação que é favorecida pela maior proximidade geográfica (ALMEIDA e CÂMARA, 2010).

Como toda cultura, a bananeira encontra-se sujeita aos efeitos negativos provocados por agentes causadores de doença, dentre esses o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do mal-do-Panamá. Outras importantes doenças são a Sigatoka-negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, e a Sigatoka-amarela, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach. O desenvolvimento de variedades resistentes é a solução mais recomendada e que tem sido prioridade mundial, na qual o Brasil está inserido com significativa participação (CORDEIRO et al., 2005; PLOETZ, 1994, 2006)

Dentre essas doenças, maior atenção tem sido dada às Sigatokas. O fato de atacar genótipos comercialmente importantes, de não existirem cultivares resistentes que suplantem as comerciais, e a necessidade de se realizar grande número de aplicações de fungicidas (até 60 na América Central), justificam essa atenção. Assim, o mal-do-Panamá, apesar de ser reconhecida como uma das doenças mais destrutivas da bananeira no mundo (MATOS et al., 2001; VILJOEN, 2002; PLOETZ, 2006), tem sido menos atendida. Isto porque a maioria das cultivares exportadas pertence ao subgrupo 'Cavendish' que são resistentes à raça 1 de *Foc*, a qual predomina nas principais regiões exportadoras. Contudo, ao contrário da Sigatoka-negra, o mal-do-Panamá é endêmico em todas as regiões bananicultoras do mundo, e em nível de raças o patógeno é específico a cultivares, sendo que para a cultura da bananeira existem quatro raças predominantes de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* já identificadas, seu controle com fungicidas é inviável e o uso de cultivares resistentes está condicionado à aparição de novas raças do patógeno (GERLACH et al., 2000; GROENEWALD et al., 2006; SMITH et al., 2006).

3.2 O mal-do-Panamá e seus sintomas

O agente etiológico do mal-do-Panamá é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Esta é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras de banana do mundo, sendo citada como uma das cinco mais importantes doenças de plantas cultivadas e responsável por perdas econômicas na ordem de bilhões de dólares (PLOETZ, 2006).

Sua primeira constatação no Brasil foi em 1930, no município de Piracicaba, São Paulo, na cultivar Maçã. Em apenas 3-4 anos foram dizimados cerca de um milhão de plantas de banana naquele município paulista (GOES e MORETO, 2001; CORDEIRO et al., 2005).

Posteriormente, grandes áreas de banana 'Maçã' foram dizimadas em outras regiões desse Estado e também em Minas Gerais, Goiás e Espírito Santo, sendo que, neste último, mais de 20% das plantas pertencentes ao grupo 'Prata' também foram eliminadas (PLOETZ, 1990; MATOS et al. 1998).

A infecção das plantas se inicia através do sistema radicular, principalmente pelas raízes secundárias, alcançando posteriormente o xilema, onde ocorre

abundante esporulação. Plantas infectadas exibem um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo no sentido da nervura principal. Posteriormente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule. Os sintomas exibidos pelas plantas atacadas iniciam-se de 2 a 5 meses após a infecção e podem ser observados interna ou externamente no corte do rizoma e do pseudocaule (CORDEIRO e MATOS, 2003; CORDEIRO et al., 2005). Dependendo do nível de resistência da cultivar, plantas doentes não chegam a produzir cachos, ou aquelas que produzem, têm frutos com valor comercial comprometido. Sendo assim, o único controle efetivo para o mal-do-Panamá é o plantio de clones e cultivares resistentes a essa enfermidade (CORDEIRO e KIMATI, 1997). No entanto há uma constante preocupação com o surgimento de novas raças devido à alta variabilidade do patógeno.

3.3 Variabilidade genética em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, pois gera informação sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de controlar, uma vez que podem adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou por meio da introdução de hospedeiro resistente (CARLIER et al., 2003).

De acordo com o sistema atual de classificação, a estrutura de raças de FOC em bananeira segue os seguintes critérios: raça 1 afeta 'Gross Michel' e 'Maçã', raça 2 afeta 'Bluggoe' e outras bananas de cocção 2, e raça 4 afeta as variedades do subgrupo Cavendish. A raça 4 foi dividida em subtropical (RS4) e tropical (RT4) para diferenciar populações que afetam Cavendish em condições subtropicais ou tropicais. Contudo, o método de diferenciar raças por meio de variedades diferenciadoras não tem sido consistente e tem falhado em agrupar diferentes isolados em raças. A falta de parâmetros baseados na genética da interação hospedeiro-patógeno tem contribuído para isto. Assim, outros critérios baseados na

estrutura dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG – *Vegetative Compatibility Groups*) e diversidade molecular têm sido adotados (BENTLEY et al., 1998). Até o momento pelo menos 21 VCGs e 35 grupos genotípicos têm sido descritos em *Foc*, sendo que pouca ou nenhuma relação destes grupos com a classificação de raças foi encontrada (BENTLEY et al., 1998; GROENEWALD et al., 2006). No Brasil, poucos estudos têm sido realizados visando caracterizar a estrutura das populações de *Foc* em bananeiras, mas segundo Cordeiro et al. (2005) e Goes e Moreto (2001), no Brasil ocorrem raça 1 e 2, com prevalência da raça 1.

3.4 Melhoramento genético para a resistência ao mal-do-Panamá em bananeira

No Brasil o programa de melhoramento genético de bananeira, iniciou-se pela Embrapa Mandioca e Fruticultura em 1982. Os híbridos tetraploides desenvolvidos se concentram em genitores triploides do tipo 'Prata' e cultivares com qualidades similares a 'Maçã', empregando o triploide 'Yangambi'. Cultivares do subgrupo Cavendish e Maçã são, via de regra, estéreis. Mais recentemente a Embrapa Mandioca e Fruticultura também tem direcionado o programa para produção de híbridos triploides secundários. Apesar do número reduzido de sementes que é produzido nos cruzamentos entre diploides e triploides, a Embrapa tem desenvolvido híbridos superiores com maior produtividade e resistente a doenças, tais como os híbridos 'Pacovan Ken', 'Prata Graúda', 'Preciosa', 'Caprichosa' e a 'Tropical'. Mas recentemente foram recomendadas as cultivares 'Vitória', 'Japira' e 'Preciosa' (SILVA et al., 2003).

Este programa tem como objetivo desenvolver variedades mais produtivas e resistentes aos principais estresses bióticos, com porte e ciclo reduzidos, mantendo ou melhorando a qualidade dos frutos (SILVA et al., 2001).

Por outro lado, o melhoramento genético de bananeira é complexo e demorado. Para isto contribuem fatores inerentes à cultura, como o ciclo longo, níveis de ploidia, frutos sem ou com pouca produção de sementes, entre outros (ORTIZ, 1997; SILVA et al., 1998; OSELEBE et al., 2006). A biotecnologia tem sido empregada como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de cultivares, oferecendo alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e muitas vezes propiciando soluções únicas. Todavia, a falta de conhecimentos sobre os

mecanismos estruturais, genéticos e moleculares envolvidos na resposta de defesa e responsáveis pela resistência é um fator que afeta os programas de melhoramento por métodos biotecnológicos para a resistência ao mal-do-Panamá.

3.5 Variabilidade genética via SSR (*Simple sequence repeats*)

Marcadores genéticos baseados em polimorfismo do DNA têm sido utilizados com sucesso na diferenciação de espécies de vários fitopatógenos e entre as vantagens apresentadas com o uso, destacam-se a rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (FALEIRO et al., 2003). A utilização dos marcadores tem sido cada vez mais expressiva como uma ferramenta fundamental nos estudos de diversidade genética.

SSR's são marcadores amplamente distribuídos no genoma, de expressão co-dominante (permite diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos), multivariável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR's são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação. Devido a sua freqüência e distribuição ao longo de todo o genoma, permitem uma ampla cobertura genética de qualquer organismo eucarioto, sendo indicado para o estudo de diversidade genética, fluxo gênico, mapeamento genético e identificação de parentesco.

De um lado os marcadores microssatélites apresentam um grande número de alelos; de outro, cada reação possibilita acessar somente um loco (baixa capacidade multiplex). Contudo, em geral, apresentam uma alta proporção de locos polimórficos (FERREIRA, 1996).

Os SSR são muito mais freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Estas e outras características fazem com que marcadores baseados em SSR sejam marcadores ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos, e para estudos de genética de populações (FERREIRA e GRATTAPLAGLIA, 1996)

As seqüências das regiões que flanqueiam os SSR's são conservadas em indivíduos da mesma espécie. Dessa maneira, os SSR's são amplamente distribuídos em todo genoma de eucariotos e podem ser amplificados por oligos

específicos sintetizados a partir destas regiões flangeadoras (DUTECH *et al.*, 2007).

É crescente a popularidade de SSR em vista do número de artigos publicados sobre o isolamento de locos microssatélites em vários organismos. Embora eles representem uma poderosa ferramenta em muitos campos da Biologia, microssatélites têm sido isolados em poucas espécies de fungos. Microssatélites em fungos parecem ser mais difíceis de isolar e exibem menor polimorfismo do que em outros organismos (DUTECH *et al.*, 2007)

BOGALE *et al.* (2005) descreveram nove marcadores de SSR desenvolvidos para o estudo de *Fusarium oxysporum*.

O maior problema de *loci* microssatélites é que eles frequentemente necessitam ser isolados de novo em função de cada espécie e isto representa maior custo. A amplificação de *loci* provenientes de outras espécies, das quais eles foram clonados, é geralmente possível somente entre espécies do mesmo gênero e em alguns casos a percentagem de amplificação é baixa, gerando alelos nulos que podem influenciar na análise genética (DUTECH *et al.*, 2007).

4. OBJETIVOS

4.1 Geral:

Caracterizar isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* por meio de marcadores SSR

4.2 Específicos:

- a) Estabelecer uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* provenientes de diferentes regiões produtoras de banana do Brasil;
- b) Caracterizar os isolados de FOC obtidos por meio de marcadores moleculares SSR.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

5.1 Estabelecimento de uma coleção de FOC

Foi estabelecida uma coleção com isolados de FOC de diferentes regiões produtoras de banana do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e local de coleta.

Isolados	Localidade	Hospedeiro
Foc MAR	Cruz das Almas – BA	Marmelo
Foc YG09	Cruz das Almas – BA	*
Foc CNPMF 0801	Cruz das Almas – BA	Maçã
Foc 2011.04	Cruz das Almas – BA	Maçã caule roxo
Foc 2011.05	Cruz das Almas – BA	RM13
Foc 2011.08	Bom Jesus da Lapa – BA	Prata Anã
Foc 2011.14	Palmital – SP	*
Foc MG	Bom Jesus da Lapa – BA	*
Foc 2011.09	Bom Jesus da Lapa – BA	Prata Anã
Foc 2010.10	Torres – RS	FHIA 02
Foc GUA	Guaratuba – PR	Prata Anã
Foc 2010.09	Andirá – PR	PV9401
Foc 2010.08	Andirá – PR	Maçã
Foc 2010.05	Corupá – SC	Maçã
Foc 2010.02	Votuporanga – SP	*

* informações indisponíveis

5.1.1 Isolamento e obtenção de culturas monospóricas

Foram realizados cortes no material, de aproximadamente 0,5 mm², na região do pseudocaule com sintomas característicos da doença (Figura 1A). Posteriormente, os fragmentos retirados da área de transição entre tecido doente e sadio foram desinfestados superficialmente em álcool 70% durante 1 minuto, seguida de desinfestação em hipoclorito de sódio a 0,5% por 30 segundos, após as desinfestações os fragmentos foram lavados 3 X em água destilada esterilizada e plaqueados em meio BDA (Batata, Dextrose e Agar) com o auxílio de uma pinça esterilizada, sendo as placas vedadas com filme plástico.

Após oito dias de incubação em estufa B.O.D a 25 °C ± 1°C , as colônias do patógeno (Figura 1B) foram repicadas e preservadas por meio de dois métodos, de Castellani (1967) e Takatsu (1970), em tubos *ependorf* contendo água destilada estéril, e em tiras de papel. Antes de proceder o armazenamento dos isolados e posteriores estudos, culturas monospóricas foram obtidas.

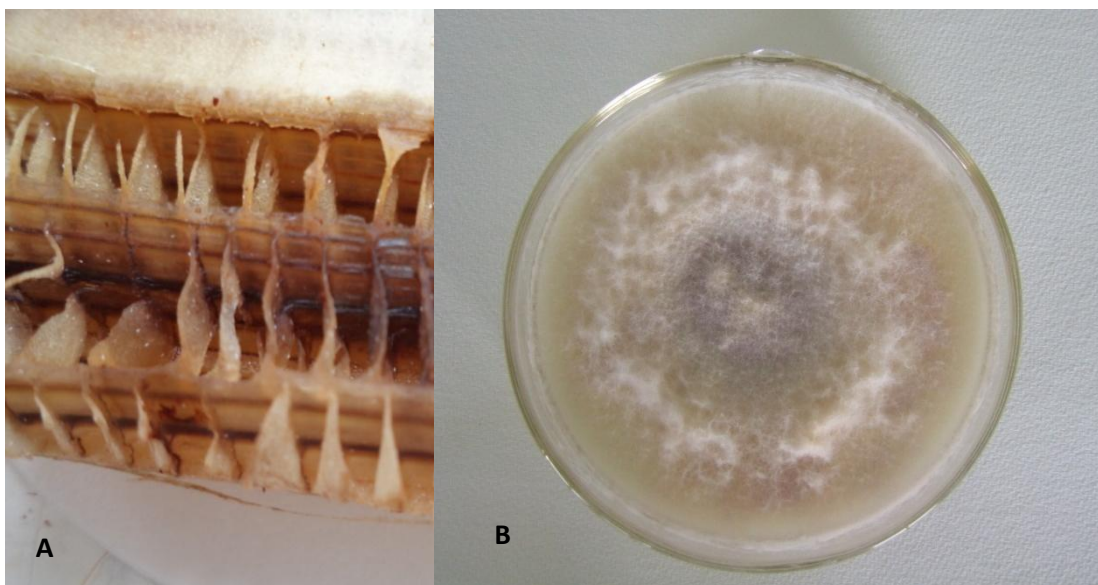


Figura 1. Região com sintomas característicos da doença mal-do-Panamá causado *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (A) e crescimento micelial de fungo em meio BDA , após oito dias de incubação (B).

5.2 Variabilidade genética por marcadores moleculares

5.2.1 Crescimento do fungo em meio líquido e extração do DNA

Para obtenção de massa micelial e subsequente DNA fúngico, transferiu-se para meio BDE (batata + dextrose), os 15 isolados de FOC. Todos os isolados foram repicados em duplicata e incubados por sete dias a 25°C, sob agitação contínua (SM Edmund Buhler). Após este período, a massa micelial de cada isolado foi filtrada e seca por 2 horas em câmara de fluxo laminar para a extração do DNA.

Um grama da massa micelial foi macerada com nitrogênio líquido e transferida para cápsulas de plástico do tipo Eppendorf (XML) onde se procedeu à extração de DNA baseada no método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com modificações (Anexo 1).

A quantificação foi feita em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo (1,0 mg/mL) utilizando como padrão uma série de concentrações do fago Lambda (Invitrogen). A estimativa da concentração de DNA nas amostras foi feita visualmente com base na intensidade das bandas. Posteriormente, o DNA foi diluído para a concentração final de trabalho (10 ng μL^{-1}).

5.2.2 Amplificação do DNA por SSR

As reações de amplificação pela técnica SSR (*simple sequence repeats*) foram realizadas em duplicata em volume de 25 μL , seguindo a metodologia citada por Bogale et al. (2005) com adição de 2,5 M de cada dNTP. Os ciclos de PCR foram realizados em termociclador *Applied Biosystems*, programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 72°C, cada ciclo de 30 segundos, e por fim uma extensão final de 10 minutos. As temperaturas de anelamento foram específicas para cada iniciador (Tabela 2).

Os produtos resultantes da amplificação foram separados por eletroforese 3% e coloração com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV (Figura 2).

Tabela 2 - Iniciadores SSR (*simple sequence repeats*) utilizados na análise de variabilidade dos isolados de FOC

Iniciadores	Sequência dos nucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)
MB2	F: TGCTGTGTATGGATGGATGG R:CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG	57
MB5	F:ACTTGGAGGAAATGGGCTTC R:GGATGGCGTTTAATAAATCTGG	54
MB9	F:TGGCTGGGATACTGTGTAATTG R:TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG	51
MB10	F: TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC R: TTGCAATTACCTCCGATACCAC	48
MB11	F:GTGGACGAACACCTGCATC 68 R: AGATCCTCCACCTCCACCTC	68
MB 13	F:GGAGGATGAGCTCGATGAAG R:CTAAGCCTGCTACACCCTCG	68
MB14	F: CGTCTCTGAACCACCTTCATC R: TTCCTCCGTCCATCCTGAC	57
MB17	F:ACTGATTCACCGATCCTTGG R:GCTGGCCTGACTTGTTATCG	57
MB18	F: GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC R: TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC	57

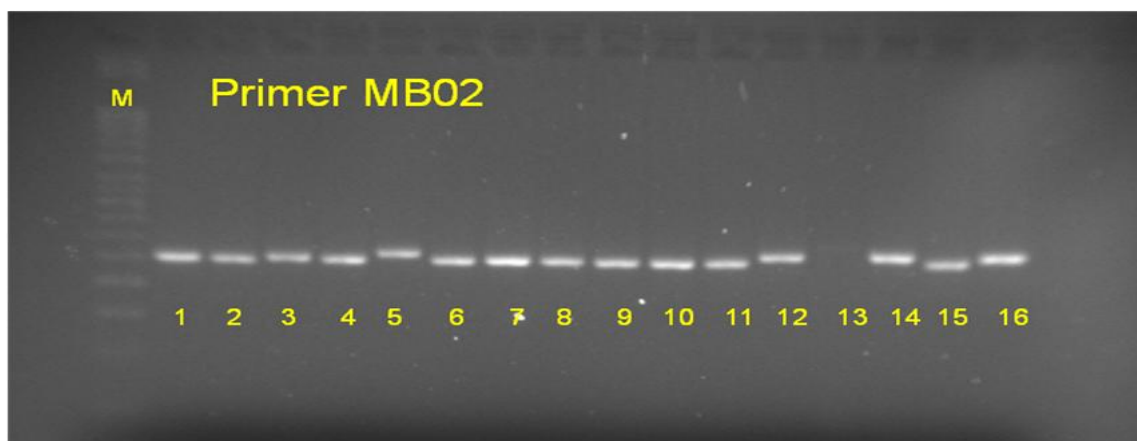


Figura 2. Padrão de amplificação do Iniciador MB02. M: Marcador de peso molecular 50 pb (Sigma). Amostras 1 a 16- Isolados de FOC.

5.3 Análises estatísticas

Os dados de SSR foram submetidos à análise de similaridade e agrupamento utilizando programa NTSYS (ROLHF, 2000). Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas presentes nos isolados. As estimativas de similaridade genética foram efetuadas pelo coeficiente Nei e Li. O dendrograma foi obtido por meio de análise de agrupamento de similaridades, utilizando-se o método da média das similaridades (UPGMA).

A variância entre e dentro das regiões de coleta foi obtida por meio da Amova (Análise molecular de variância) proposta por Excoffier et al., 1992.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise da variabilidade genética via marcadores SSR

Dos nove iniciadores utilizados para as análises dos 15 isolados, quatro não amplificaram nas amostras estudadas necessitando de ajustes. Além disso, os iniciadores MB11 e MB14 apresentaram comportamento monomórfico para os isolados analisados. Desta forma, foram utilizados para as análises apenas cinco iniciadores. O número de alelos obtidos foi de 11, com média de 2,2 alelos por primer. O maior número de alelos foi identificado nos primers MB02, MB17 e MB18 (3 alelos) e o menor número nos primers MB11 e MB14 (1 alelo).

A análise realizada com os 15 isolados de FOC e os cinco iniciadores, considerando-se os alelos amplificados, separou os isolados em três grupos distintos conforme é apresentado no dendrograma (Figura 3).

O primeiro grupo englobou nove indivíduos provenientes dos oito municípios onde as coletas foram realizadas, sendo que sete foram coletados no Estado da Bahia. O segundo grupo, composto por cinco isolados, dois coletados no município de Cruz das Almas, Bahia (Foc YG09 e Foc 2011.04). O último grupo foi formado por apenas um isolado, proveniente do município de Corupá (SC).

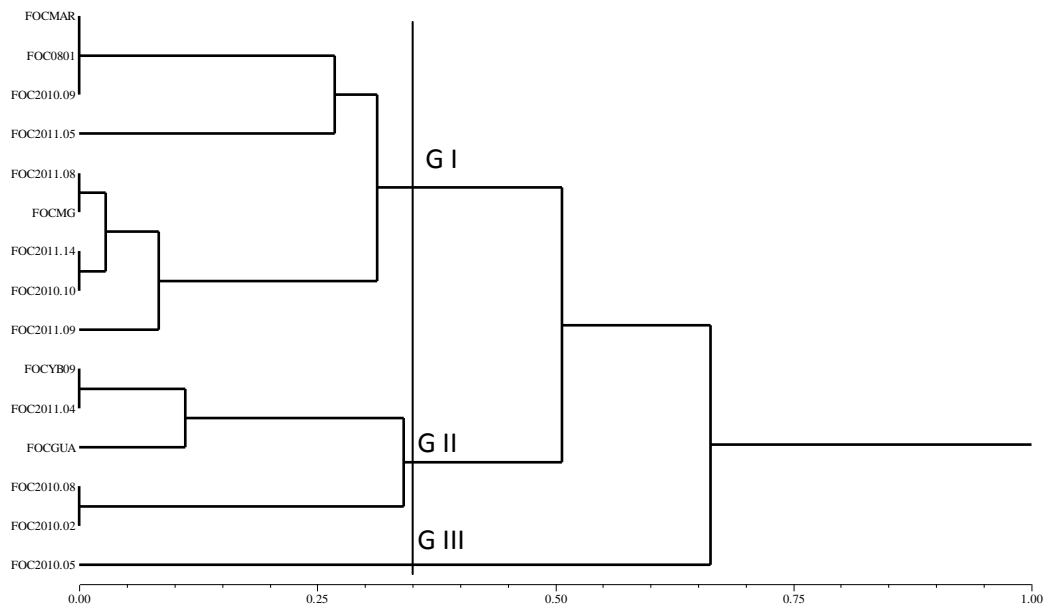


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética dos 15 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizando os cinco iniciadores SSR.

A análise com os marcadores SSR separou os isolados em três grupos distintos (Figura 3). A formação dos grupos pode estar relacionada ao número de iniciadores utilizados, o que detectou um baixo polimorfismo nos isolados amostrados ou mesmo relacionado com o número de amostras obtidas associadas com os locais de coleta. Cabe destacar que mesmo com um número baixo de alelos, é possível inferir-se sobre a presença de variabilidade genética entre os isolados.

Os marcadores moleculares SSR tem sido bastante utilizados em pesquisas, principalmente em função de seu alto nível de codominância, polimorfismo e lócus específicos (YANG e ZHONG, 2008), porém os mesmos têm sido pouco utilizados para espécies de fungo, uma vez que a obtenção desses marcadores com nível aceitável de polimorfismo é geralmente mais difícil em fungos do que em outros organismos (DUTECH et al., 2007). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies geneticamente relacionadas, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. A grande limitação dos SSR é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie. A amplificação de locus provenientes de outras espécies, das quais eles foram

clonados, é geralmente possível somente entre espécies do mesmo gênero e em alguns casos, a percentagem de amplificação é baixa, gerando alelos nulos, que podem influenciar na análise genética (DUTECH et al., 2007).

Analisando-se os resultados, observa-se que não houve associação dos agrupamentos SSR com origens geográficas, pois isolados coletados nas mesmas regiões brasileiras para este estudo, ficaram distribuídas em grupos distintos. Bentley et al. (1995), concluíram que os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* são geralmente VCG específico e sem nenhuma correlação entre a localização e a cultivar de bananeira. Sugeriram que a variação genética detectada poderia ser devido à adaptação e co-evolução do fungo com o hospedeiro e com os fatores ambientais do local. Leong et al. (2009), caracterizando isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* coletados em diferentes cultivares de bananeira da Malásia e Indonésia, utilizando PCR-RFLP de regiões de IST+5.8S e ERIC-PCR, obtiveram similaridade variando de 42,9 a 100%. Os isolados foram intimamente relacionados independentemente da cultivar de bananeira e localização. Resultados semelhantes sobre a falta de correlação com a origem geográfica foram obtidos por Santos et al. (2008) e Silva et al. (2010), estudando a variabilidade genética de FOC nos bananais do norte de Minas Gerais e por Gherbawy (1999), onde utilizou marcadores RAPD para analisar a diversidade genética de 20 isolados de 14 *formae specialis* de *F. oxysporum* e também não encontrou correlação com origem geográfica.

Na Tabela 3 está apresentado o resultado da Amova realizada considerando a estrutura hierárquica ‘Entre regiões de coleta’; “Entre locais de coleta dentro de regiões” e “Dentro das regiões”. Percebe-se que grande parte da variação observada está associada aos locais de coleta (89,22%), permitindo inferir-se que há variação entre os isolados de *Fusarium* identificada por meio dos marcadores SSR.

Nesse sentido, estudos de diversidade genética são essenciais nos programas de melhoramento genético a fim de conhecer a estrutura das populações destes patógenos e, assim direcionar os estudos de resistência ao mal-do-Panamá.

Tabela 3. Distribuição da variabilidade genética entre regiões, entre locais de coleta e dentro dos locais de coleta de *Fusarium* com base na análise molecular da variância (AMOVA).

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Porcentagem da variação total	p-valor
Entre regiões	2	1,99	-0,93	-56,79	≤ 0,001
Entre locais de coleta dentro de regiões	2	5,80	2,90	89,22	≤ 0,001
Dentro das regiões	10	11,06	1,10	67,57	≤ 0,001
TOTAL	14	18,86	1,34		

7 CONCLUSÃO

Não há associação dos agrupamentos dos genótipos com relação à origem geográfica dos isolados avaliados. As técnicas moleculares SSR aplicadas são eficientes em separar os isolados em grupos distintos.

Grande parte da variação observada entre os isolados de *Fusarium* está associada aos locais de coleta.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. V. B; CÂMARA, F. M. Mercado nacional de banana. **Anais do I Simpósio sobre a cultura da bananeira nos subtrópicos do Cone Sul**, J.F.N p.192-203. 2010.
- BENTLEY, S.; PEGG, K.G.; DALE, J. L. Genetic variation among World-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, p. 1378-1384, 1995.
- BENTLEY, S., PEGG, K.G., MOORE, N.Y., DAVIS, D.R. AND BUDDENHAGEN, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analyzed by DNA fingerprinting. **Phytopathology**, v.88, p. 1283 – 1293. 1998.
- BOGALE, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENKAMP, E.T. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. **Molecular Ecology**, v5, p. 622-624, 2005.
- BORGES, A. J. S; TRINDADE, A. V; MATOS, A. P. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p. 35-41, 2007.
- CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M.-F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mucosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, p.123-129, 2003.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181-184, 1967.
- CORDEIRO, Z.J.M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp). 45 In: KIMATI, H. *et al.* Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo. **Agronômica Ceres**, v. 2, p.112 -153, 1997.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. MAL-DO-PANAMÁ: FIM DO BANANAL?. Cultivar HF (Pelotas), PELOTAS, v. 3, p. 27-29, 2003.
- CORDEIRO, Z. J. M., A. P. MATOS e H. KIMATI Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: H. Kimati , L. Amorin, *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 99-117, 2005.
- DOYLE JJ, DOYLE JL, Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.
- DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; FRANÇOIS, D.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. Science Direct. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 933-949, 2007.

EXCOFFIER L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variante inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, Tex., US, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E. D. M.N.; CERQUEIRA, A. O.; C. ROCHA, S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 312-315, 2003.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 06 de fev. de 2012.

FERREIRA, M. E. Caracterização da Biodiversidade e Oportunidades tecnológicas. In: **Workshop Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas, I**, Campinas, SP, Anais..., Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 12 p., 1996.

FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores na análise genética. Brasília: Embrapa, Cenargen, p. 220, 1996.

GERLACH, K. S., S. BENTLEY, N. Y. MOORE, K. G. PEGG e E. A. B. AITKEN. Characterisation of Australian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* by DNA fingerprinting analysis. **Australian Journal Of Agricultural Research**, v.51, p. 945-953. 2000.

GOES, A; MORETO, K.C.K. Mal-do-Panamá. In **Banicultura**, Ed RUGGIEIRO, C. p 419 - 435. FUNEP, Jaboticabal. 2001.

GROENEWALD, S., N. VAN DEN BERG, W. F. O. MARASAS e A. VILJOEN. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. **Mycological Research**, v.110, p. 297-305, 2006.

JESUS, O. N. **Caracterização molecular de acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa**. 2010. 137p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ/USP), Piracicaba.

LEONG, S.K.; BAHARUDDIN, S.; LATIFFAH, Z. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* of banana. **American Journal of Applied Sciences**, New York, v. 6, n.7, p. 1301-1307, 2009.

MATOS, A. P.; BORGES, M. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. M.; ANDRADE, S. M. reaction of banana genotypes to fusarium wilt (*fusarium oxysporum* f.sp. *cupense*) under field conditions in Brazil. **Reunion Acorbat**, p. 311-319, 1998.

MATOS, A.P., CORDEIRO, Z.J.M., SILVEIRA, J.S. e FERREIRA, D.M.V.. O Mal-do-Panamá ou murcha de fusarium da bananeira. In 1 Simpósio norte mineiro sobre a cultura da banana, Nova Porteirinha, Minas Gerais, 2001. p. 38-50. 2001.

ORTIZ, R; CROUCH J. H.. The efficiency of natural and artificial pollinators in plantain (*Musa* spp. AAB group) hybridization and seed production. **Annals Of Botany**, v. 80, p. 693-695, 1997.

OSELEBE, H. O; TENKOUANO, A; PILLAY, M; OBI, I. U; UGURU, M. I. Ploidy and genome segregation in *Musa* breeding populations assessed by flow cytometry and randomly amplified polymorphic DNA markers. **Journal Of The American Society For Horticultural Science**, v.131, p. 780-786, 2006.

PLOETZ RC. Panama-disease - Return of the first banana menace. **International Journal of Pest Management**, v. 40, p.326-336, 1994.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R.C. Variability In *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1357-1363, 1990.

RODRIGUES, M. G. V.; SOUTO, R. F. MENEGUCCI, JOÃO. L. P. Influência do ensacamento do cacho na produção de frutos da bananeira 'prata-anã' irrigada, na região norte de minas gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.23, n. 3. P. 559-562, 2001.

ROHLF, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **New York: Exeter Software**, 38, 2000.

SANTOS, T.M.; NIETSCH, S.; COSTA, M.R.; XAVIER, A.A.; PEREIRA, G.V.; FERNANDES, T.P. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em bananais do Norte de Minas Gerais. 2008. **XX Congresso brasileiro de Fruticultura**. Vitória Espírito Santo, p. 98-99, 2008.

SILVA, C. M.; HINZ, R. H.; STADNIK, M. J.; TCACENCO, A. P. F. A. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v.40, n.12, p. 2480-2485, 2010.

SILVA, S. D. E., MATOS, A. P. de; ALVES, E. J.. Genetic improvement of banana tree. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.33, p. 693-703, 1998.

SILVA, S.O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A.P.; CORDEIRO, Z.J.M.; FERREIRA, C.F.; RAMOS, M.M.; JESUS, O.N. **Banana breeding program in Brazil** - Recent results. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca Fruticultura, 39p, 2003.

SILVA, S.O.; JUNIOR, M. T. S.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1. p. 399-436, 2001.

SMITH, M. K., HAMILL, S. D., LANGDON, P. W., GILES, J. E, DOOGAN, PEGG, V. J. Towards the development of a Cavendish banana resistant to race 4 of Fusarium wilt: gamma irradiation of micropropagated Dwarf Parfitt (*Musa* spp., AAA group, Cavendish subgroup). **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, v.46, n.1, p.107-113. 2006.

TAKATSU, A. Preservação de bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 461-462. 1970.

VILJOEN, A. The status of *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana in South Africa. **South African Journal of Science**, v.98, n.7-8, Jul-Aug, p.341-344. 2002.

YANG, B.J.; ZHONG, S.B. Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.910-912, 2008.

ANEXO A – Extração de DNA – Método CTAB
(Doyle e Doyle, 1990, com modificações)

SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

SOLUÇÕES/REAGENTES/CONC. FINAL		V. FINAL 10 mL
CTAB a 10%	2,0 %	2,0 mL
NaCl a 5 M	1,4 M	2,8 mL
Tris HCl a 1M pH 8,0	0,1 M	1,0 mL
EDTA a 0,5 M	20 mM	400 µL
2-mercaptoetanol	0,4 %	40 µL
PVP (Polivinilpirrolidona)	1,0 %	0,1 g
H ₂ O de milli-Q		3,76 mL

1. Deixar pré-aquecendo o tampão CTAB a 65°C
2. Macerar o micélio em nitrogênio líquido, e passar para tubo *ependorf* de 1,5 mL (abaixo da marca de 500 µL)
3. Adicionar (1 mL de CTAB 2%+15 µL de 2-β-mercaptoetanol)
4. Incubar a 65°C por 30 min (agitar a cada 10 min)
5. Centrifugar por 5 min a 13000 g e posteriormente depositar 500 µL da fase sobrenadante em dois tubos novos
6. Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico [(50 % de **Fenol** + 50 % **Clorofórmio-álcool isoamílico** (24:1)], (25:24:1)
7. Vortexar por 15 seg. Ou manter sob agitação por 3 minutos
8. Centrifugar a 13000g por 5 minutos
9. Depositar 400 µL do sobrenadante de cada tubo para **um** novo tubo
10. Adicionar 600 µL de **clorofórmio;álcool isoamílico**, 24:1;
11. Vortexar
12. Centrifugar a 13000g por 5 minutos;
13. Pipetar a fase superior (aprox. 700 µL do sobrenadante)
14. Adicionar 700 µL de **isopropanol frio** + 1/10 (70 µL) de acetato de sódio 3 M e pH = 5,2
15. Inverter suavemente
16. Incubar a -20 °C por 10 minutos (essa fase pode ser paralisada...)
17. Centrifugar a 13000 g por 7 minutos
18. Descartar o **isopropanol**; Lavar o pelet com 500 µL de etanol 70 % gelado, por duas vezes. Em cada lavagem os tubos serão centrifugados a 13000g por 3 min;
19. Secar na bancada de um dia para o outro;
20. Diluir em 50 µL de **tampão TE** + 2 µL de **Rnase** [1 mg mL⁻¹], e incubar a 37 °C por duas hora, para a ação da enzima.
21. Estocar no freezer.