

VARIAÇÃO GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* COM MARCADORES AFLP

Aline dos Santos Silva¹; Eder Jorge de Oliveira²; Camila Santiago Hohenfeld³; Onildo Nunes de Jesus⁴

⁽¹⁾Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: lineagro@yahoo.com.br;

⁽²⁾Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br;

⁽³⁾Estudante de Licenciatura em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: chohenfeld@gmail.com;

⁽⁴⁾Bolsista PNP/DCAR/PROF - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, e-mail: onildo@cnpmf.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* é constituído por espécies que formam um complexo de fungos de solo, conhecido por ser filogeneticamente diverso. Esses fungos são agentes etiológicos de muitas doenças de importância econômica em plantas cultivadas, destacando-se a murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum*. Esta espécie é composta por patótipos classificados em várias *formae speciales*, com base em critério patogênico. Dentre essas, está o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* que causa a murcha do maracujazeiro ou fusariose, uma das doenças mais prejudiciais da cultura. Variações dentro das f. sp., identificadas como raças, sugerem diferenças na severidade da doença e dificultam a indicação de fontes de resistência estáveis.

Para a cultura do maracujazeiro poucos estudos sobre a variabilidade genética do agente patogênico da fusariose foram realizados. A caracterização com uso de marcadores moleculares como o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Vos et al., 1995), que gera grande quantidade de bandas polimórficas com uma simples combinação de primers, é uma alternativa viável para melhor compreensão da diversidade do fungo.

Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar e determinar a variabilidade genética de diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, mediante marcadores AFLP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 14 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) de diferentes regiões, e cinco de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), utilizados como *outgroup*, obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Tabela 1). O DNA dos isolados foi extraído pelo método CTAB (brometo de centiltrimetilâmonio).

As análises com AFLP foram realizadas de acordo com o protocolo de Vos et al. (1995) com algumas modificações, onde a digestão e ligação dos adaptadores foi realizada com o AFLP® Core Reagent Kit (Invitrogen). Para a reação de digestão, 250ng de DNA genômico foram digeridos utilizando a combinação *EcoRI/MseI*, por 2 horas a 37°C e posteriormente, a 70°C por 15 minutos. Os fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores e diluídos na proporção 1:10 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na reação de pré-amplificação foram utilizados iniciadores *EcoRI* e *MseI*, com extensão de 1 nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (*Eco* + A / *Mse* + C; *Eco* + C / *Mse* + A), e o produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Para a amplificação, os iniciadores *EcoRI* e *MseI* possuíram 2 e 3 pares de bases adicionados na extremidade 3', respectivamente. Foram utilizadas 25 combinações de primers para o estudo. Os produtos foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com prata (Creste et al., 2001). A matriz de distância genética foi obtida no programa Genes-UFV, utilizando o coeficiente de dissimilaridade "Simple Matching". O agrupamento foi realizado usando o método UPGMA.

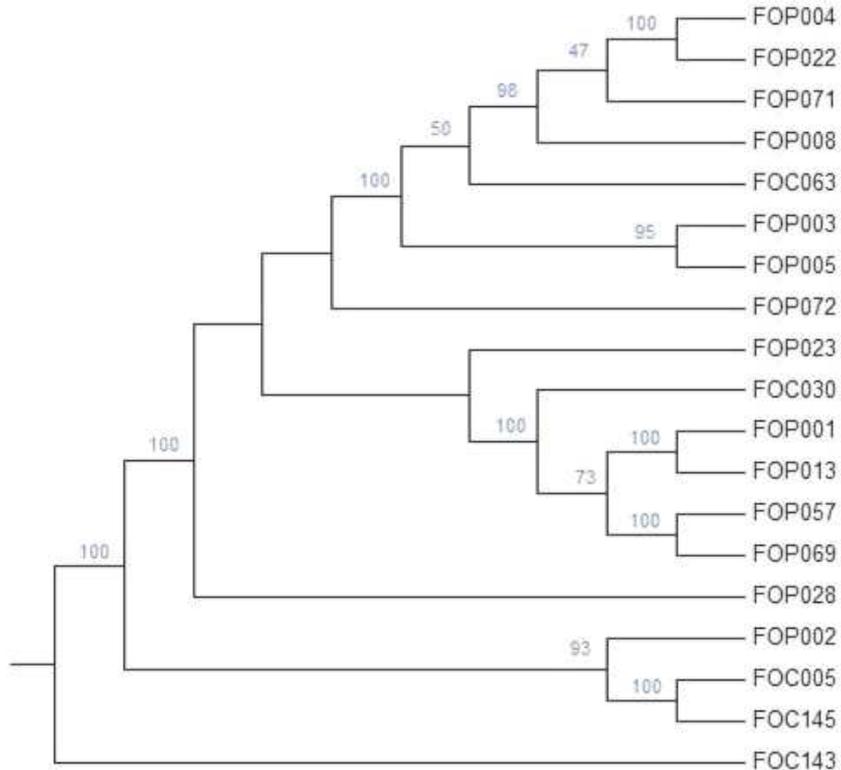
Tabela 1. Relação de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* utilizados na análise molecular com marcadores do tipo AFLP.

Isolado	Origem geográfica	Isolado	Origem geográfica
FOP001	Cruz das Almas (BA)	FOP057	Ubaíra (BA)
FOP002	Cruz das Almas (BA)	FOP069	Linhares (ES)
FOP003	Cruz das Almas (BA)	FOP071	Porto Seguro (BA)
FOP004	Cruz das Almas (BA)	FOP072	Livramento de Nossa Senhora (BA)
FOP005	Cruz das Almas (BA)	FOC005	Botucatu (SP)
FOP008	Ubaíra (BA)	FOC030	Cruz das Almas (BA)
FOP013	Ubaíra (BA)	FOC063	Cruz das Almas (BA)
FOP022	Ubaíra (BA)	FOC143	Janaúba (MG)
FOP023	Ubaíra (BA)	FOC145	Cruz das Almas (BA)
FOP028	Ubaíra (BA)		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 25 combinações de primers geraram 1075 fragmentos diferentes, com tamanho variando de 916 a 30pb. Apenas 10 bandas monomórficas foram observadas. A combinação Eco + CT / Mse + AAA apresentou o maior número de marcas polimórficas com 59 fragmentos, enquanto o menor polimorfismo foi observado para os iniciadores Eco + CC / Mse + ATC.

O dendrograma dos haplótipos de AFLP de cada isolado está representado na Figura 1. A correlação cofenética foi de 0,975 indicando que houve pouco desvio entre os dados da matriz de dissimilaridade e de construção do dendrograma.



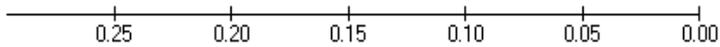


Figura 1. Dendrograma das relações genéticas entre 19 isolados por meio de marcadores AFLP, obtido da matriz de dissimilaridade do coeficiente *Simple Matching* e método agrupamento UPGMA. Valores de bootstrap são mostrados. Linha tracejada indica o valor médio da dissimilaridade.

A dissimilaridade, obtida pelo *simple matching*, variou de 4 a 48% com média de 31%, indicando diversidade genética nos isolados avaliados. Utilizado a distância média de 31% como ponto de corte, foi possível identificar cinco grupos. A confiabilidade destes grupos pode ser confirmada pelos altos valores observados do *bootstrap* (Figura 1). O isolado FOC143 de f. sp. *cubense* mostrou-se o mais divergente dos isolados, enquanto as cepas mais próximas foram FOP001 e FOP013 com 4% de dissimilaridade. O FOP028 e o FOP72 não se agruparam com outros indivíduos evidenciando diferenças genéticas destes em relação aos demais isolados. Apesar de pertencer a diferentes f. sp., não houve separação evidente entre as formas especializadas avaliadas, resultado também observado em outros estudos, indicando que a origem das linhagens avaliadas é polifilética (Arroyo et al., 2003). Assim, os isolados de FOC63 e FOC30 agruparam-se com isolados FOP e o FOP002 agrupou-se com as cepas FOC.

A variabilidade nos coeficientes de dissimilaridade indica as divergências genéticas existentes entre os isolados de FOP, porém observou-se ausência de correlação entre a diversidade genética e origens geográficas, onde os isolados de cada região foram distribuídos em diferentes grupos demonstrando a alta variabilidade existente (Tabela 1 e Figura 1). Não se sabe ao certo como ocorre esta diversidade, mas para o *F. oxysporum* isto pode ser explicado por mecanismos de recombinação genética, onde a troca de material genético se dá através de mecanismos parassexuais (Oliveira & Costa, 2003). A variação genética dentro de *forma specialis* pode ocorrer ainda pela co-evolução do fitopatógeno com o hospedeiro e os fatores ambientais da região geográfica de localização do fungo.

CONCLUSÕES

O uso do marcador molecular AFLP permitiu identificar variabilidade genéticas entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, possibilitando futuras classificações

em raças deste patógeno e auxiliando na indicação de fontes de resistência à murcha do maracujazeiro.

AGRADECIMENTOS

À Fapesb e ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROYO-GARCÍA, R.; CENIS, J. L.; TELLO, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.; CIFUENTES, D. Genetic relationships among seven specialized forms of *Fusarium oxysporum* determined by DNA sequencing of the ITS regions and AFLPs. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.5, p. 55-63, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A; A. FIGUEIRA. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p.229-306, 2001.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 089-092. 2003.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.