

Uso de marcadores AFLP para *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*

Camila Hohenfeld¹; Eder Jorge de Oliveira²; Aline dos Santos Silva³,
Onildo Nunes de Jesus⁴

¹Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;
²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³Mestranda do curso de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ⁴Bolsista PNPd da Capes/Embrapa Mandioca e Fruticultura

INTRODUÇÃO

Dos principais problemas fitossanitários que contribuem para a baixa produtividade do maracujazeiro destaca-se a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). Além da especificidade a grupos de plantas (f.sp), raças deste fungo podem atacar cultivares específicas indicando a elevada plasticidade genética deste patógeno. O mecanismo desta variabilidade é pouco conhecido, sabe-se que fator que promova alta taxa de mutação possa estar relacionado. Para a cultura do maracujá pouco se sabe a respeito da variabilidade genética deste fungo, sendo este estudo não apenas importante para conhecimento do fungo, mas também para ações de melhoramento, visando identificar fontes de resistência a este fitopatógeno. Os marcadores AFLP por combinar o polimorfismo de restrição com a capacidade de detecção do PCR, alto polimorfismo e maior cobertura do genoma torna-se um marcador ideal para a caracterização deste fungo. Assim, este trabalho teve como objetivo validar a técnica AFLP para estudos de divergência genética em isolados de FOP.

METODOLOGIA

Foram utilizados os isolados FOP013 e FOP071 para extração do DNA pelo método CTAB. Nas etapas de digestão e ligação dos adaptadores testou-se as metodologias de Vos et al., 1995 e o Core Reagent Kit (Invitrogen). Para a etapa de reação de digestão, 250ng de DNA genômico foram digeridos utilizando a combinação *EcoRI* /*MseI*, por 2 horas a 37 °C e 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 um

nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (*EcoRI* + A e *Mse* + C); O produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na etapa de amplificação os iniciadores *EcoRI* e *MseI* possuíram 2 e 3 pares de bases adicionados na extremidade 3', respectivamente. Os produtos foram separados em gel desnaturante de 6 % poliacrilamida e corado com prata. Usou o marcador de 50 pb.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA genômico utilizando método de CTAB permitiu a obtenção de DNA de qualidade para amplificação com marcadores AFLP. Na etapa de amplificação utilizando apenas o protocolo desenvolvido por Vos et al. (1995) os resultados obtidos não foram satisfatórios. Entretanto, o uso do kit comercial (AFLP[®] Core Reagent Kit) apresentou os melhores resultados. A amplificação utilizando as 32 combinações de AFLP mostrou-se altamente polimórfica. Estas combinações permitiram a obtenção de 913 bandas com média de 28,5 fragmentos por *primers*, com peso molecular variando de 35 a 916pb. A combinação mais polimórfica foi a *EcoRI* + CT / *MseI* + AAA com 38 bandas. A combinação *EcoRI* + A / *MseI* + C não produziu fragmentos nítidos. As 32 combinações avaliadas apresentaram alta capacidade informativa, possibilitando seu uso em pesquisas futuras com maior número de isolados, visando compreender a variabilidade do *FOP*, bem como definir subpopulações dentro das *formas specialis* permitindo sua identificação ou de novas raças. Aliado a compreensão genética do organismo este conhecimento é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle desta doença e para ações de melhoramento visando obtenção de cultivares resistentes ou tolerantes.

CONCLUSÃO

Os iniciadores testados permitiram detectar alto polimorfismo nos isolados avaliados. Esses iniciadores permitirão dar os primeiros passos para a compreensão da variabilidade dessa espécie e assim desenvolver estratégias de controle desta doença.

Palavras-chave: fusariose, iniciadores, DNA genômico.