



## Validação de marcadores SSR para estudos de diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*

Shirley Nascimento Costa<sup>1</sup>, Larissa Santos Oliveira<sup>1</sup>, Daniela Velame<sup>1</sup>, Saulo Santos de Oliveira<sup>2</sup>, Edson Perito Amorim<sup>2</sup>, Fernando Haddad<sup>2</sup>, Francisco Ferraz Laranjeira<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/EMBRAPA, shirleykosta@bol.com.br, lallahy@hotmail.com, danivelame@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura, saulo@cnpmf.embrapa.br, edson@cnpmf.embrapa.br, fernando@cnpmf.embrapa.br, chico@cnpmf.embrapa.br

**Resumo:** O mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* (FOC), é uma das doenças mais destrutivas da bananeira. A medida de controle mais efetiva é o uso de variedades resistentes. O surgimento de novas raças é preocupação constante e fator desafiador para os programas de melhoramento visando resistência à doença. O objetivo do estudo foi validar primers SSR, para posterior avaliação da estrutura populacional de FOC. Para tanto, nove iniciadores SSR foram utilizados em 15 isolados coletados em diferentes regiões produtoras de banana no Brasil. Dos nove oligonucleotídeos utilizados, quatro não amplificaram nas amostras analisadas. Desta forma, foram utilizados para as análises apenas cinco iniciadores. Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA, com base na distância genética de Nei, tendo sido observada a formação de três grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído nove indivíduos, o segundo composto por cinco isolados e o terceiro grupo com apenas um isolado (FOC 2010.05- Corupá- SC). Constatou-se por meio de variância molecular (AMOVA), que 89,2% da variação genética de FOC está associada a diferenças na frequência dos alelos nos locais de coleta. Os marcadores SSR testados foram eficientes em detectar polimorfismo e separar os isolados em grupos distintos, e serão utilizados para os estudos populacionais de Foc.

Palavras chave: marcadores moleculares, microssatélite, variabilidade genética

### Introdução

A cultura da bananeira está entre as atividades agrícolas de maior expressão econômica e de elevado alcance social no Brasil. A bananicultura é afetada por diversos problemas fitossanitários. O mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*, se destaca por ser endêmico em todas as regiões produtoras de banana, sendo uma doença de difícil controle por diversos fatores como o sobreviver por longos períodos no solo, ausência de controle químico, físico e biológica eficazes e



pela maioria dos cultivares plantados de banana serem suscetíveis a FOC (Ploetz, 2006). Outra questão é surgimento de novas raças do patógeno que suplante a resistência de cultivares inviabilizando o plantio destes em áreas infestadas com estas novas variantes (McDonald, 2002).

Marcadores moleculares são ferramentas versáteis e altamente informativas para estudos genéticos de populações. A escolha de um marcador depende da finalidade da pesquisa, diversidade genética, sistemas de acasalamento, dentre outros atributos do organismo em interesse. Os marcadores moleculares SSR tem sido bastante utilizados, principalmente em função da codominância, polimorfismo e locus específicos (Yang e Zhong, 2008). As sequencias 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.

Não há marcadores moleculares desenvolvidos para FOC, no entanto, Bogale et al. (2005) desenvolveram alguns SSR para *Fusarium oxysporum*, utilizando 21 *formae speciales*. Desta forma, o objetivo do trabalho foi validar os marcadores SSR descritos por Bogale et al. (2005), quanto a capacidade de amplificação e detecção de polimorfismo em populações de FOC, para posteriores estudos de genética de populações deste patógeno.

### **Metodologia**

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura (EMBRAPA). Para obtenção de DNA fúngico, os isolados monospóricos foram transferidos para meio BD (Batata Dextrose) e incubados por sete dias a 25°C sob agitação contínua. A massa micelial de cada isolado foi filtrada e seca por duas horas em câmara de fluxo laminar, em seguida macerada com nitrogênio líquido e transferida para microtubos. O DNA foi extraído conforme metodologia de Doyle e Doyle, (1990) com modificações e quantificado em gel de agarose 1,0%. Posteriormente, o DNA foi diluído para a concentração final de trabalho (10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

As reações de amplificação foram realizadas em duplicata em volume de 25  $\mu\text{L}$  (Bogale et al., 2005). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel 3% de agarose, corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV. Os perfís de bandas gerados pela amplificação foram convertidos em dados binários, atribuindo-se um para presença e zero para ausência de bandas. Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA com base na distância genética Nei, (1978). A variância entre e dentro das regiões de coleta foi obtida por meio da AMOVA (Análise de variância



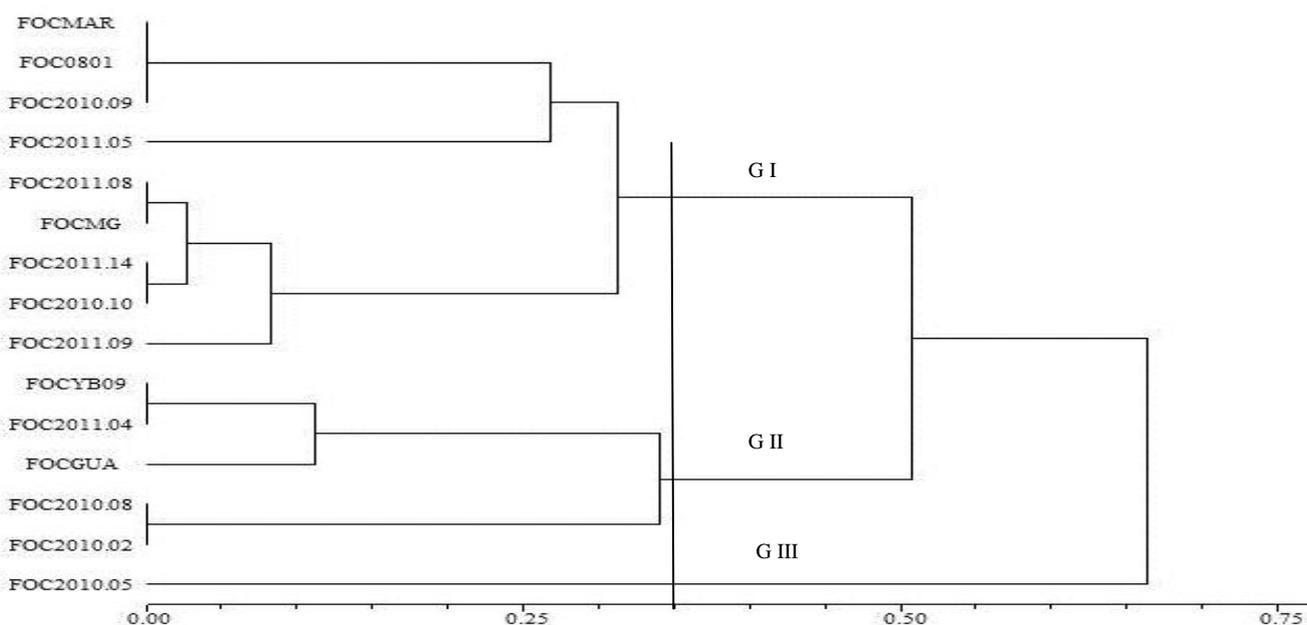
molecular).

### Resultados e discussão

Para quatro dos nove iniciadores não houve amplificação dos produtos de PCR, provavelmente pela ausência de complementariedade no DNA genômico dos isolados avaliados. Deve-se notar que os primers utilizados, não foram desenvolvidos exclusivamente para *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. Dessa forma, foram utilizados para as análises cinco iniciadores. Os primers MB11 e MB14 foram monomórficos para os isolados analisados. Entretanto, isto pode ser um efeito de amostragem e tamanho da população analisada, visto que foram usados apenas 15 isolados.

O maior número de alelos foram identificados nos primers MB02, MB17 e MB18 (3 alelos) e o menor número nos primers MB11 e MB14 (1 alelo). A análise separou os isolados em três grupos distintos conforme o dendrograma (Figura 1).

Figura 1. Dendrograma de similaridade genética dos 15 isolados de *F. oxysporum f. sp. cubense* utilizando cinco iniciadores SSR pelo método UPGMA.



O primeiro grupo é composto por nove indivíduos, sendo sete indivíduos coletados na Bahia, enquanto Foc 2011.14 e Foc 2010.10 foram coletados no Estado de São Paulo e Rio Grande do Sul, respectivamente. O segundo grupo, composto por cinco isolados, dois deles coletados na Bahia (Foc YB09 e Foc 2011.04), dois no Paraná (Foc GUA e Foc 2010.08), e um no Estado de São Paulo (Foc 2010.02). O último grupo tem apenas um isolado, oriundo de Corupá (SC).

Com base na AMOVA (Tabela 1), pode-se inferir que a maior parte da variação se deve às



diferenças genéticas entre indivíduos da menor unidade hierárquica (município) (89,22%). Os marcadores SSR testados foram eficientes em separar os isolados em grupos distintos, e serão utilizados para os estudos populacionais de Foc.

Tabela 1- Distribuição da variabilidade genética entre regiões, entre locais de coleta e dentro dos locais de coleta de Foc com base na análise de variância molecular (AMOVA).

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	Porcentagem de variação total	p-valor
Entre regiões	2	1.99	-0.93	-56,79	≤ 0.001
Dentro de 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		

### Considerações finais

Os marcadores aqui testados serão utilizados para estudos populacionais de Foc, utilizando uma amostragem representativa de isolados, em conjunto com estudos fenotípicos e moleculares, tais como: i) Grupos de compatibilidade vegetativa; ii) virulência e agressividade em cultivares diferenciadoras; e iii) variabilidade genética com base em análises das sequências do gene nuclear fator de alongação 1 alfa (tef- 1 alfa) e da região IGS (InterGenic Spacer).

### Referências Bibliográficas

- BOGALE, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENKAMP, E.T. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. **Molecular Ecology**, v.5, p.622-624, 2005.
- DOYLE JJ, DOYLE JL, Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- MCDONALD, B. A., and LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.40: p.349-379, 2002.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: p.583. 1978.
- 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.
- 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.