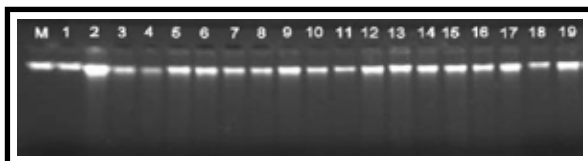
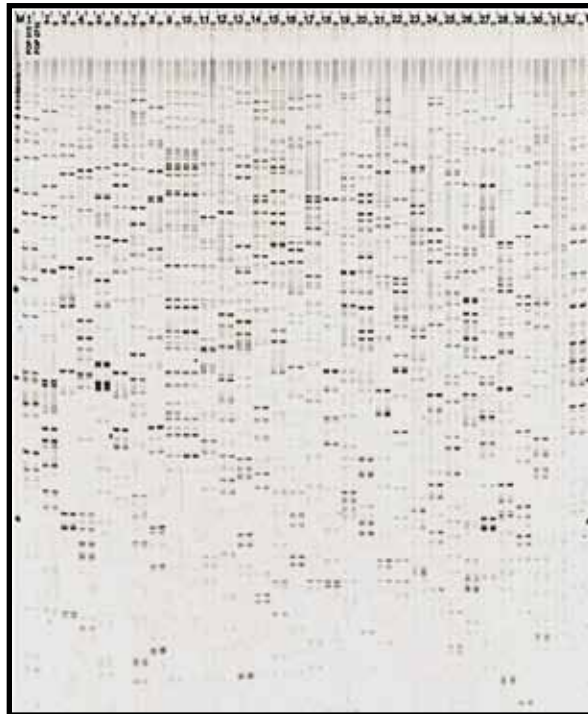


Otimização da análise molecular com marcadores AFLP para estudos de diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*



ISSN 1809-5003

Julho, 2011

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 50**

Otimização da análise molecular com marcadores AFLP para estudos de diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

*Eder Jorge de Oliveira; Aline dos Santos Silva; Ca-
mila Santiago Hohenfeld; Onildo Nunes de Jesus*

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa - s/nº, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.cnpmf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Aldo Vilar Trindade*

Vice-presidente: *Ana Lúcia Borges*

Secretária-executiva: *Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos*

Membro: *Cláudia Fortes Ferreira*

Fernando Haddad

Edson Perito Amorim

Hermínio Souza Rocha

Marcio Eduardo Canto Pereira

Paulo Ernesto Meissner Filho

Supervisão editorial: *Ana Lúcia Borges*

Revisão de texto: *Antônio Alberto Rocha Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Tratamento de ilustrações: *Anapaula Rosário Lopes*

Editoração eletrônica: *Anapaula Rosário Lopes*

Foto(s) da capa: *Eder Jorge de Oliveira*

1ª edição

versão (2011): online

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Mandioca e Fruticultura

Otimização da análise molecular com marcadores AFLP para estudos de diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*[recurso eletrônico]. / Eder Jorge de Oliveira... [et.al.]. - Dados eletrônicos. - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 50/ Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 20 p.).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/>
boletim de pesquisa/documentos

Título da página Web (acesso em 2011)

1. Maracujá. 2. Doença de planta. 3. Marcadores moleculares. I. Oliveira, Eder Jorge. II. Série

CDD 641.344 25 (21.ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	17
Referências	18

Otimização da análise molecular com marcadores AFLP para estudos de diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

*Eder Jorge de Oliveira*¹

*Aline dos Santos Silva*²

*Camila Santiago Hohenfeld*³

*Onildo Nunes de Jesus*¹

Resumo

Apesar do uso generalizado da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) em diversas espécies, os protocolos precisam ser ajustados para cada organismo. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar esta técnica para as análises moleculares do fungo causador da fusariose do maracujazeiro, o *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). Foram avaliados o protocolo de Vos et al. (1995) com modificações (protocolo 1) e um kit comercial (protocolo 2), com diversas combinações de iniciadores. A seleção do melhor protocolo e a combinação de iniciadores foram realizadas, considerando-se o padrão de bandas sem arraste de DNA e com alta resolução das bandas. Das 35 combinações avaliadas no protocolo 1, apenas três combinações foram otimizadas. Por outro lado, o protocolo 2 possibilitou a otimização de 32 das 64 combinações de iniciadores de AFLP. As 35 combinações de AFLP geraram 964 fragmentos, com média de 27,5 e variação de 9 (E + CG/ M + ATC) a 38 (E + CT/ M + AAA) fragmentos, com peso molecular

¹ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa, s/n – CP.007, 44380-000, Cruz das Almas - BA, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; onildo@cnpmf.embrapa.br;

² Mestranda do curso de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: lineagro@yahoo.com.br;

³ Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Universitário, 44380-000 Cruz das Almas - BA. E-mail: chohenfeld@gmail.com

variando de 35 a 916 pb. Foram identificadas 16 combinações de iniciadores de AFLP capazes de gerar mais de 30 fragmentos por gel, com alta capacidade informativa. Estas informações permitem o direcionamento das análises moleculares com o FOP de modo a compreender a variabilidade do fungo e sua futura associação com variabilidade patogênica.

Palavras-chaves: maracujazeiro, fusariose, marcadores moleculares, variabilidade genética

Optimization of AFLP markers for the analysis of genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

Abstract

Despite the widespread use of the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) in several species, protocols need to be adjusted for each organism. The objective of this work was to optimize this technique aiming the molecular analysis of the fungus that causes fusarium wilt of passion fruit, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). It were evaluated the with modifications (protocol 1) and a commercial kit (protocol 2) with various primer combinations. The selection of the best protocol and primer combination was performed, considering the pattern of DNA bands with no smear and high resolution of bands. Regarding the 35 combinations evaluated in protocol 1, only three combinations were optimized. Furthermore, protocol 2 allowed the optimization of 32 from the 64 AFLP primer combinations. The 35 AFLP combinations generated 964 fragments, with 27.5 in average, and range of 9 (E + CG / M + ATC) to 38 (E + TC / M + AAA) fragments with molecular weights ranging from 35 to 916 pb. Sixteen AFLP primer combinations were identified which were able to produce more than 30 fragments per gel, being highly informative. This information allows the improvement of molecular analysis with FOP in order to understand the variability of this fungus and its future association with pathogenic variability.

Key-words: passion fruit, fusarium wilt, molecular markers, genetic variability

Introdução

A espécie *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Emend. Snyder & Hans.) compreende fungos de solo com ampla distribuição geográfica e alta diversidade genética. A maioria dos isolados desta espécie são saprófitas. Algumas estirpes não patogênicas têm sido utilizadas como agentes de controle biológico (Postma; Rattink, 1992), enquanto outros possuem importância veterinária ou médica (PEREIRO et al., 2001).

Apesar da existência de muitos isolados não patogênicos de *F. oxysporum* com significativa variação genética (Bao et al., 2002), a maioria dos estudos tem dado ênfase aos trabalhos com as formas patogênicas de *F. oxysporum*, que são reconhecidamente fitopatógenos que causam a murcha vascular e a podridão da raiz de diversas culturas de importância econômica.

A especialização desse fungo a um hospedeiro permite sua classificação em *forma specialis* (f.sp.). Existem mais de 150 *formae speciales* específicas de determinado hospedeiro, descritas no complexo *F. oxysporum*, cada um deles composto de um ou mais grupos de compatibilidade vegetativa e, muitas vezes, distintas raças patogênicas (Baayen et al., 2000). Em alguns casos, além de atacar grupos específicos de plantas, estes fungos são divididos em raças, de acordo com a habilidade de infectar cultivares específicas, indicando a elevada plasticidade genética deste patógeno. Entretanto, a base genética da especificidade do hospedeiro (*forma specialis*) e da cultivar (raça) em *F. oxysporum* não é muito bem esclarecida.

Dentre as diversas *formae speciales* encontra-se o *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (McKnight, 1951) (FOP), agente etiológico da fusariose ou murcha do maracujazeiro. Esta doença tem causado sérios problemas ao sistema de produção da cultura do maracujazeiro, reduzindo a produtividade, desestimulando a produção e aumentando o caráter itinerante da cultura e o desemprego nas principais regiões produtoras. Além disso, tem-se como agravante o fato de haver alta variabilidade fenotípica do patógeno, de acordo com observações dos isolamentos

do fungo, oriundos de áreas infectadas. O mecanismo desta variabilidade é pouco conhecido, porém sabe-se que mecanismos que promovam altas taxas de mutação estão relacionados (LANGIN et al., 1995).

Técnicas baseadas em polimorfismo diretamente em nível de DNA têm sido cada vez mais as ferramentas de escolha para o entendimento da diversidade genética e filogenia de espécies de *Fusarium* (O'Donnell, 2000; O'Donnell et al., 2000). Mais recentemente, marcadores moleculares do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) têm sido utilizados para *fingerprinting* de DNA de microrganismos.

A análise de AFLP é baseada na amplificação seletiva de fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição (VOS et al., 1995). Tecnicamente é semelhante ao RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), exceto pelo fato que apenas um subconjunto dos fragmentos é representado por meio da redução do número de fragmentos gerados por amplificações seletivas. Existem inúmeras vantagens no uso da técnica de AFLP, como alto número de bandas analisadas em um único gel, pela restrição e amplificação de fragmentos espalhados por todo o genoma, além da considerável reprodutibilidade e, principalmente, por não necessitar de dados de sequenciamento prévio da espécie em estudo (Spooner et al., 2005; Vuylsteke et al., 2007). A alta repetibilidade e a eficiência da técnica AFLP têm permitido sua utilização na distinção de espécies e grupos filogenéticos de *Fusarium* (Zeller et al, 2003; Leslie et al, 2004), incluindo *F. oxysporum* (BAAYEN et al, 2000; BELABID et al., 2004).

Por outro lado, a principal desvantagem dos marcadores AFLP é que os alelos não são facilmente reconhecidos em algumas situações (MAJER et al., 1998). Assim, a técnica necessita de otimização prévia para se obter resolução máxima no padrão de bandas, além do direcionamento das principais combinações de iniciadores que permitam obter o máximo de polimorfismo.

Estudos sobre a variação genética do FOP poderiam gerar maior conhecimento sobre o fungo, bem como contribuir para o desenvolvimento

de variedades com resistência mais duradoura ao patógeno; porém pouco se sabe sobre a variabilidade genética do FOP. Como os marcadores AFLP associam alto polimorfismo e cobertura genômica sem a necessidade de dados de sequenciamento prévio do FOP, esta técnica torna-se ideal para a caracterização deste fungo. Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar a técnica AFLP para estudos de divergência genética em isolados de FOP.

Materiais e Métodos

Foram utilizados dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, FOP013 e FOP071, obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O DNA dos isolados foi extraído pelo método CTAB, descrito por Zolan e Pukilla (1986). A qualidade e a concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Foram testados dois protocolos de amplificação, o primeiro empregando-se a metodologia descrita por Vos et al. (1995) com modificações e o segundo utilizando o *AFLP® Core Reagent Kit* (Invitrogen) para as etapas de digestão e ligação dos adaptadores, com as posteriores etapas seguindo o protocolo anterior.

Protocolo descrito por Vos et al (1995) com modificações

Para a digestão, 300 ng de DNA genômico foram digeridos com uso de 8U de cada enzima de restrição, *EcoRI* e *MseI*; 1X de tampão de PCR; 0,6 µg de BSA. O volume foi completado para 60 µL com água Milli-Q esterilizada. O material foi incubado por três horas a 37°C, sendo cuidadosamente agitado a intervalos de uma hora. Após a digestão, a reação foi submetida a um tratamento térmico por 20 minutos a 65°C, para inativar as endonucleases.

O preparo dos adaptadores específicos aos terminais clivados para cada enzima foi realizado do seguinte modo:

Adaptador *EcoRI*: foi preparada uma solução contendo 5 μM de adaptador *EcoRI forward*; 5 μM de adaptador *EcoRI reverse*; 0,5X de tampão *One Phor All 10X*; e água Mili-Q esterilizada para o volume final de 100 μL .

Adaptador *MseI*: foi preparada uma solução contendo 50 μM de adaptador *MseI forward*; 50 μM de adaptador *MseI reverse*; 0,5X de tampão *One Phor All 10X*; e água Mili-Q esterilizada para o volume final de 100 μL .

Após a homogeneização dos componentes, a solução foi mantida a 95°C durante dois minutos; em seguida 95°C, decrescendo 1°C por minuto até 25°C. Após o término da reação as amostras foram mantidas a - 20°C.

Para esta etapa, foram acrescentados aos fragmentos de DNA digeridos (39,5 μL) 5X do tampão da enzima *T4 DNA ligase*; 0,1 μM de cada adaptador da enzima *EcoRI* e *MseI*; 1U de *T4 DNA ligase* (1 U μL^{-1}); 5,0 μL de água Mili-Q esterilizada, completando a reação para 50 μL . As reações de ligação foram realizadas a 20°C durante três horas, sendo levemente agitadas a intervalos de uma hora e as amostras armazenadas a - 20°C. A mistura foi diluída na proporção 1:5 em uma solução 1:10 (TE + água Mili-Q).

Na reação de pré-amplificação, foram utilizados iniciadores de *EcoRI* e *MseI* com extensão de um nucleotídeo seletivo na extremidade 3', a fim de selecionar parte dos fragmentos. Utilizaram-se para teste os pares de iniciadores E + C / M + A e E + A / M + C, onde E = adaptador *EcoRI*; M = adaptador *MseI*; C = citosina; A = adenina.

As reações foram realizadas em um volume final de 20 μL , compostas por 3,0 μL da solução com o DNA digerido e ligado ao adaptador; 0,5 μM do iniciador da enzima de corte raro (E + C); 0,5 μM do iniciador da enzima de corte frequente (M + A); 0,15 mM de dNTP; 1X de tampão sem MgCl₂; 1,5 mM de MgCl₂; 1U de Taq DNA polimerase e água Mili-Q esterilizada.

A condição da pré-amplificação foi de 95°C por dois minutos; seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C por um minuto e 72°C por dois minutos. O ciclo final foi de cinco minutos a 72°C. O material pré-amplificado foi diluído na proporção 1:25 com uso de uma solução 1:10 (TE + água Mili-Q).

Na etapa seletiva utilizaram-se combinações de iniciadores, com extensão de duas e três bases para *EcoRI* e *MseI*, respectivamente, adicionados ao adaptador na extremidade 3'. Nessas reações foram utilizados 2,5 µL dos produtos pré-amplificados; 0,5 µM do iniciador da enzima de corte raro (E + CN e E + AN), onde N pode ser qualquer nucleotídeo; 0,5 µM do iniciador da enzima de corte frequente (M + ANN e M + CNN); 0,15 µM de dNTP; 1X de tampão de PCR; 2 mM de MgCl₂; 8 µg/mL de BSA; 1,5U de Taq DNA polimerase; água Mili-Q esterilizada para completar o volume final de 20µL.

O programa de amplificação foi realizado de acordo com o protocolo: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos; seguida de 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos com redução de 0,7°C por ciclo, 72°C por dois minutos; seguidos por 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos; encerrando os ciclos com 72°C por dois minutos.

Análise com kit comercial

Utilizou-se o kit comercial *AFLP[®] Core Reagent Kit* (Invitrogen) para as etapas de digestão e ligação dos adaptadores, com as posteriores etapas seguindo o protocolo anterior, com pequenas modificações. Para a reação de digestão, 250ng de DNA genômico foram digeridos utilizando a combinação *EcoRI/MseI*, por duas horas a 37°C e, posteriormente, a 70°C por 15 minutos, para inativar as enzimas.

A ligação dos adaptadores foi realizada utilizando-se 9 µL dos adaptadores do kit comercial. Foram misturados com 1 µL da *T4* DNA ligase e ligados nos fragmentos digeridos, nas mesmas condições descritas no

protocolo anterior. O material digerido e ligado foi diluído na proporção 1:10 numa solução 1:10 (TE:água Mili-Q esterilizada).

As reações de pré-amplificação foram realizadas com os mesmos iniciadores, nucleotídeos seletivos, e condições de reação do protocolo de Vos et al. (1995). O produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água Mili-Q esterilizada).

Para a amplificação seletiva, também foram utilizados os mesmos iniciadores e bases adicionadas na extremidade 3', do protocolo anterior. A programação de amplificação também foi idêntica.

Separação dos fragmentos

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante 6% poli(acrilamida) (6% acrilamida/bis-acrilamida (19:1) e 7,5 M de uréia). O produto da amplificação foi misturado com 3 μ L de tampão de carregamento (formamida 98%, EDTA 0,5M pH 8,0; azul de bromofenol 0,002% p/v e xileno cianol 0,002% p/v). Após a desnaturação a 95°C por cinco minutos, um volume de 3 μ L de cada amostra foi carregado no gel pré-aquecido durante uma hora a 70 W. A eletroforese foi realizada a 70 W por três horas. O produto da amplificação foi visualizado por coloração com prata de acordo com Creste et al. (2001).

O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 50 pb.

Resultados e Discussão

Para uso eficiente dos marcadores AFLP, é necessário que o DNA apresente ótima qualidade, a fim de que as etapas de digestão enzimática e amplificação não sejam afetadas. O protocolo de extração de DNA genômico utilizando método de CTAB, desenvolvido por Zolan e Pukilla (1986), permitiu a obtenção de DNA de qualidade para amplificação com marcadores AFLP (Figura 1).

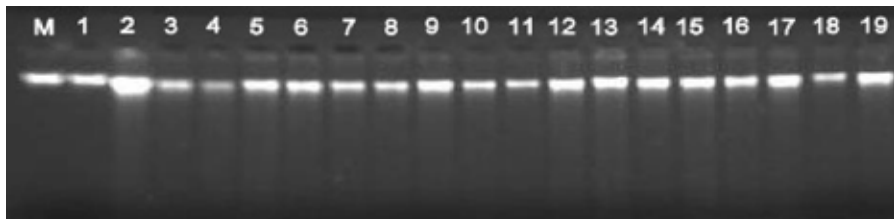


Figura 1. Perfil eletroforético de DNA total extraído de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* com o uso do protocolo de Zolan e Pukilla (1986). M = marcador λ de 50 ng; 1 a 19 = isolados de FOP.

Combinações de iniciadores de AFLP foram avaliadas em dois isolados de FOP (FOP013 e FOP071). Os fragmentos obtidos foram analisados, sobretudo para identificação daqueles com melhor padrão de bandas, sem arraste de DNA e baixa resolução das bandas.

Na otimização do protocolo de AFLP com o uso do protocolo desenvolvido por Vos et al. (1995) com modificações, avaliaram-se na pré-amplificação as combinações E + C / M + A e E + A / M + C. Na etapa posterior (amplificação) foram testadas 35 combinações, sendo 32 derivadas de E + C / M + A e três derivadas de E + A / M + C. Destas, apenas as três oriundas de E + A / M + C, quais sejam: E + AA / M + CTG; E + AT / M + CTG e E + AG / M + CTG, apresentaram bom padrão de amplificação e por isso foram utilizadas nas análises posteriores.

Por outro lado, o uso do kit comercial (*AFLP[®] Core Reagent Kit*) nas etapas de digestão e ligação dos adaptadores permitiu a amplificação de um grande número de combinações. Com o uso desse kit foram avaliadas 64 combinações (32 E + C / M + C e 32 E + A / M + C). Ao contrário do que foi observado sem o uso do kit, houve 100% de amplificação nas combinações derivadas de E + C / M + A e nenhuma com o uso das combinações de E + A / M + C. Na Figura 2 é apresentado o perfil molecular de 32 iniciadores testados.

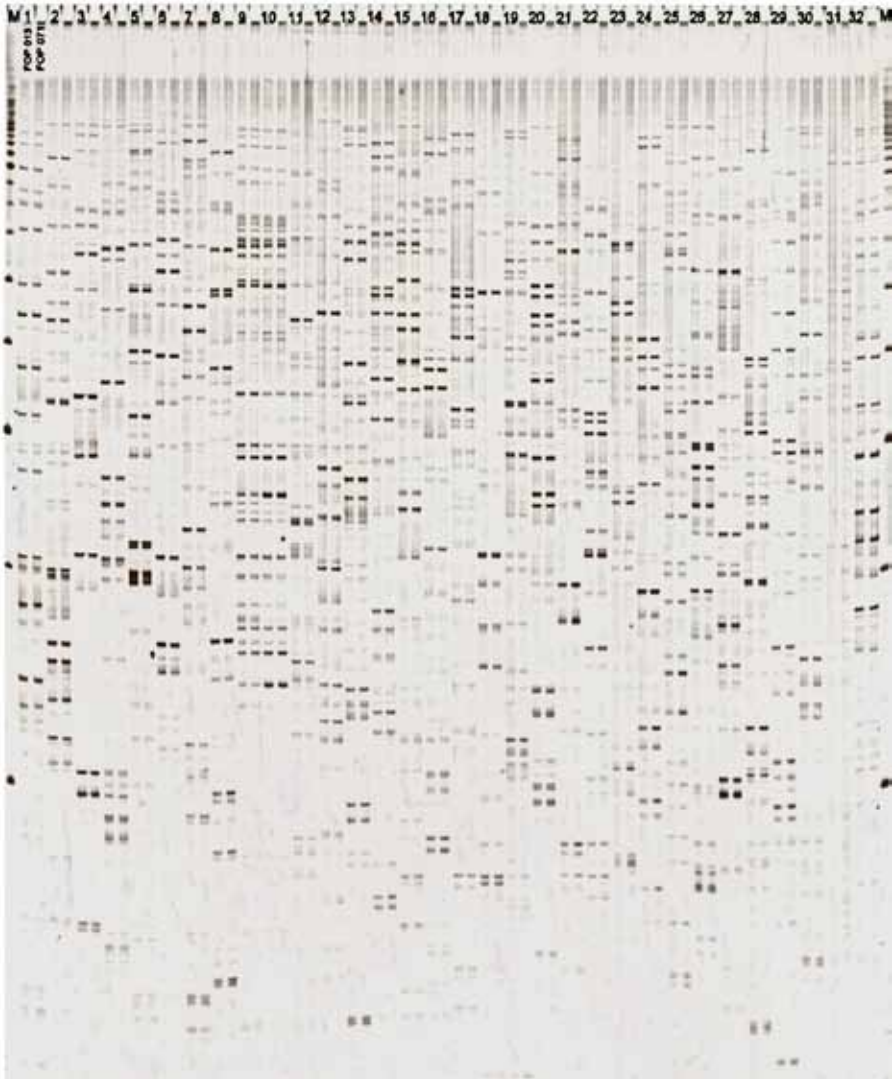


Figura 2. Produtos da amplificação utilizando 32 combinações de marcadores AFLP. A primeira e segunda amostras são os isolados FOP 013 e FOP071, respectivamente. M: marcador de peso molecular 50 pb.

A amplificação utilizando as 35 combinações de AFLP mostraram um alto número de fragmentos. Essas combinações permitiram a obtenção de 964 fragmentos com média de 27,5 fragmentos por combinação, com peso molecular variando de 35 a 916 pb (Tabela 1). A combinação mais polimórfica foi a E+CT / M+AAA com 38 bandas. Entretanto, as combinações E+CA/ M+AAA, E+CT/ M+AAC, E+CC/ M+AAC, E+CG/ M+ATG, E+CA/ M+AAT, E+CT/ M+ATA, E+CG/ M+AAC, E+CT/ M+ATT, E+CT/ M+ATC, E+CG/ M+ATT, E+CC/ M+ATA, E+CG/ M+AAT, E+CT/ M+AAT, E+CG/ M+AAG e E+CG/ M+AAA também apresentaram alto número de fragmentos por combinação, acima de 30 (Tabela 1).

Com o uso de quatro combinações de iniciadores de AFLP com duas bases seletivas para a enzima *EcoRI* e *MseI*, Abdel-Satar et al. (2003) obtiveram em média 44 fragmentos por combinação na análise do polimorfismo de 46 isolados de *Fusarium* spp. Esse maior número de bandas está associado à menor seletividade de fragmentos nas amplificações, o que muitas vezes pode comprometer a qualidade do gel e, com isso, dificultar a sua leitura. Por outro lado, a análise de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com 32 combinações de iniciadores AFLP, indicaram apenas oito como adequadas, com base no número de fragmentos gerados e na resolução dos géis (Abd-Elsalam et al., 2004). Destas, duas combinações com uma base seletiva para a enzima *EcoRI* e duas para *MseI* possibilitaram a identificação de 34 e 37 fragmentos de DNA por isolado, com padrões de baixa complexidade.

Na análise do polimorfismo de FOP, o uso de duas bases seletivas para o corte gerado pela enzima *EcoRI* e três para *MseI* possibilitou a visualização de um grande número de bandas por gel, com alta resolução e sem ambiguidade, o que demonstra o potencial do uso deste tipo de marcador na análise genética dessa espécie de *Fusarium*.

Tabela 1. Iniciadores e número de bandas geradas por combinação de iniciadores de AFLP, avaliados no estudo do polimorfismo em isolados de FOP.

<i>Isolados de FOP</i>	<i>Combinação EcoRI/MseI</i>	<i>Número de bandas</i>	<i>Isolados de FOP</i>	<i>Combinação EcoRI/MseI</i>	<i>Número de bandas</i>
1	E+CA/ M+AAA	30	19	E+CC/ M+AAC	30
2	E+CA/ M+AAT	31	20	E+CC/ M+AAG	28
3	E+CA/ M+AAC	18	21	E+CC/ M+ATA	34
4	E+CA/ M+AAG	19	22	E+CC/ M+ATT	29
5	E+CA/ M+ATA	25	23	E+CC/ M+ATC	27
6	E+CA/ M+ATT	22	24	E+CC/ M+ATG	20
7	E+CA/ M+ATC	29	25	E+CG/ M+AAA	37
8	E+CA/ M+ATG	24	26	E+CG/ M+AAT	34
9	E+CT/ M+AAA	38	27	E+CG/ M+AAC	31
10	E+CT/ M+AAT	35	28	E+CG/ M+AAG	36
11	E+CT/ M+AAC	30	29	E+CG/ M+ATA	26
12	E+CT/ M+AAG	29	30	E+CG/ M+ATT	33
13	E+CT/ M+ATA	31	31	E+CG/ M+ATC	9
14	E+CT/ M+ATT	33	32	E+CG/ M+ATG	30
15	E+CT/ M+ATC	33	33	E+AT/ M+CTG	23
16	E+CT/ M+ATG	26	34	E+AC/ M+CTG	27
17	E+CC/ M+AAA	26	35	E+AA/ M+CTG	12
18	E+CC/ M+AAT	19	-	-	-
Total					964
Média					27,5

O tipo de marcador molecular mais apropriado para determinados estudos depende de uma série de fatores como: grau de polimorfismo

pressuposto, disponibilidade de reagentes e equipamentos para uso, pessoal qualificado e limitações de recursos financeiros e de tempo para execução (SPOONER et al., 2005). Os resultados do presente trabalho indicam que, havendo disponibilidade de equipamentos para eletroforese vertical, os marcadores do tipo AFLP podem ser práticos e rápidos na detecção de variações moleculares em FOP.

De maneira geral, as combinações dos marcadores AFLP apresentaram alta capacidade informativa, o que possibilita seu uso em pesquisas futuras com maior número de isolados, visando compreender a variabilidade do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* bem como definir subpopulações dentro das *forma specialis*. Aliado à compreensão genética do organismo, esse 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.

Embora alguns estudos indiquem inexistência de associação entre *formae speciales* e variação genética detectada por marcadores moleculares, sugerindo que grupos filogenéticos têm pouca ligação com grupos de virulência em uma grande variedade de espécies (Baayen et al., 2000; Bao et al., 2002), o uso de marcadores AFLP pode contribuir futuramente para a detecção e separação de isolados de FOP em diferentes raças patogênicas, sobretudo pelo alto número de fragmentos gerados por gel, o que maximiza os estudos de polimorfismo em diferentes amostras.

Conclusões

A técnica AFLP pode ser utilizada para a detecção de polimorfismos em isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* com o uso de duas bases seletivas para o corte gerado pela enzima *EcoRI* e três bases para a de corte frequente *MseI*. Além disso, existem 16 combinações de iniciadores com capacidade de gerar mais de 30 fragmentos por gel. Esses resultados agregarão valor às futuras pesquisas de resistência à fusariose, permitindo a identificação de variantes do patógeno.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pelo auxílio financeiro e pela concessão de bolsas.

Referências

- ABD-ELSALAM, K. A.; OMAR, M. R.; MIGHELI, Q.; NIRENBERG, H.I. Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.111, p.534–544, 2004.
- ABDEL-SATAR, M. A.; KHALIL, M. S.; MOHAMMED, I.N.; ABD-ELSALAM, K. A.; VERREET, J. A. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.51-55, 2003.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot diseases. **Phytopathology**, v.90, p.891-900, 2000.
- BAO, J.R.; FRAVEL, D. R.; O'NEILL, N. R.; LAZAROVITS, G.; VAN BERKUM, P. Genetic analysis of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plants. **Canadian Journal of Botany**, v.80, p.271-279, 2002.
- BELABID, L.; BAUM, M.; FORTS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analyses. **African Journal of Biotechnology**, v.3, p.25-31, 2004.

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

LANGIN, T.; CAPY, C.; DABOUSSI, M.J. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. **Molecular and General Genetics**, v.246, p.19-28, 1995.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LOGRIECO, A.; MULE, G.; MORETTI, A.; RITIENI, A. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2254-2262, 2004.

MAJER, D.; LEWIS, B. G.; MITHEN, R. Genetic variation among field isolates of *Pyrenopeziza brassicae*. **Plant Pathology**, v.47, p.22-28, 1998.

McKNIGHT, T. A wilt disease of the passion vines (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. **The Queensland Journal of Agricultural Science**, v.8, p.1-4, 1951.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v.92, p.919-938, 2000.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; TACKE, B. K.; CASPER, H. H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.97, p.7905-7910, 2000.

PEREIRO, M.J.; ABALDE, M.T.; ZULAICA, A.; CAEIRO, J.L.; FLÓREZ, A.; PETEIRO, C.; TORIBIO, J. Chronic infection due to *Fusarium oxysporum* mimicking *Lupus vulgaris*: Case report and review of cutaneous involvement in Fusariosis. **Acta Dermatology and Venereology**, v.81, p.51-53, 2001.

POSTMA, J.; RATTINK, H. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.1199-1205, 1992.

SPOONER, D.; van TREUREN, R.; VICENTE de, M. C. **Molecular markers for genebank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126 p. (IPGRI Technical Bulletin, 10).

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.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; EIJK, M. JT. V. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, v.2, p.1387-1398, 2007.

ZELLER, K.A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.95, p.943-954, 2003.

ZOLAN, M. E.; PUKILLA. P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cellular Biology**, v.6, p.195-200, 1986.

Embrapa

Mandioca e Fruticultura

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA