

IZAEL OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* POR MEIO DE
TÉCNICAS MOLECULARES**



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
MESTRADO EM AGRONOMIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
RIO LARGO, ALAGOAS
MARÇO, 2006**



CECA

IZAEL OLIVEIRA SILVA

**ESTUDA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* POR MEIO DE
TÉCNICAS MOLECULARES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre à Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Produção Vegetal), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Iraldes Pereira Assunção

**RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS
MARÇO DE 2006**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586e Silva, Izael Oliveira.
Estudo da diversidade genética de isolados de *fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por meio de técnicas moleculares / Izael Oliveira Silva. – Rio Largo, 2006. xiii, 53 f. : tabs., grafs.

Orientador: Iraildes Pereira Assunção.
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2006.

Bibliografia: f. [39]-50.
Apêndices: f. 51-53.

1. Fusariose. 2. Mal-do-Panamá. 3. Genética molecular. 4. Variabilidade genética. 5. Biotecnologia. 6. Marcadores moleculares. 7. Banana. I. Título.

CDU: 634.773

***À minha família,
que em todos os momentos de minha vida foram presentes,
tanto na alegria quanto na tristeza sempre foram minha fortaleza.***

OFEREÇO

***A oração me leva a Te , Tua palavra me trás a paz,
o teu a mor me faz vitorioso,
a vós DEUS a minha,***

HOMENAGEM

***Aos meus pais José Raimundo e M^a Juligia Oliveira Silva,
Meus irmãos, Beclaute, Ibéria, Wcleuton e Maricléia
Aos meus sobrinhos Thomas, Adrian Guilherme, Sahvanna e Miguel
A todos os meus familiares,***

DEDICO

***“...A natureza faz poucos homens sábios, mas a dedicação e o
treinamento, fazem milhares...”***

“Livro da arte da Guerra”

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelo dom da vida e por ter me dado o maior presente que tenho até hoje, minha família.

A **Universidade Federal de Alagoas**, e ao Centro de Ciências Agrárias (**CECA**) por me proporcionar a conclusão de mais uma etapa da minha longa jornada em busca dos meus objetivos. A Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas – **FAPEAL**, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Fitopatologia coordenado por Prof^a. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim e Prof^o Ms. Marcelo de Menezes Cruz, pelo espaço cedido a mim para a execução dos meus trabalhos durante o curso.

Aos meus pais **José Raimundo Silva** pelo exemplo de força e segurança e **Maria Julígia Oliveira Silva** a qual “na alegria ou na tristeza sempre foi minha fortaleza” por todo carinho, apoio e alegria transmitidas durante todos estes anos.

Aos Meus irmãos, **Beclaute, Ibéria, Wcleuton, Maricléia**, por sempre me apoiarem e pela presença em todos os momentos sendo os meus exemplos de persistência e conquistas. As minhas cunhadas, Suzana e Gilmar, e cunhado Adriano, por serem grandes e verdadeiros irmãos.

Aos meus sobrinhos amados, **Thomas, Adrian Guilherme, Sahvana e Miguel** pelos abraços sorrisos e amor demonstrado a cada dia. A minha namorada Jaqueline Maria da Silva, pela paciência, amor e dedicação.

A meus avós paternos **Manoel** e **Claudemira** “in memory” a qual foi presente em minha infância como mãe amorosa. A meu avô **José Ferreira** “in memory” pelos momentos de alegria e descontração que tivemos.

A minha guerreira e Amada avó **Cleonice** a qual sem sobra de dúvidas é guerreira, amorosa e vitoriosa, a mulher mais forte que já pode conhecer que sorri mesmo tendo vários motivos para chorar, que num olhar distante, profundo, mas acima de tudo tranqüilo transmite até hoje a paz e o amor que nos faz ter certeza que tudo pode ser mudado quando se crê, a senhora minha avó o meu muito

obrigado por ter me dado o meu maior e mais precioso presente, a minha amada Mãe.

A meus tios e tias maternos pelo afeto que de várias formas e maneiras foi demonstrado. A tia **Ní** pela alegria irradiante, a **Rosa** pela dedicação e cuidado, a **Zeta** pelas saudosas brincadeiras e orações e a **Zeze** pelo carinho que todas às vezes me é dado quando nos vemos. Aos meus tios **Jota, Duda, Ismar e Giselho** (“in memory”) por participarem de todos os momentos de descontração.

A meus tios paternos o meu obrigado, em especial a **Jurimar e M^a das Dores** (“in memory”) **Lourival e José Moreira** os quais sempre foram participativos de forma direta ou indireta em minha vida.

A minha Orientadora Prof^a. Iraildes Pereira Assunção, pelas instruções, dadas, além do aprendizado diário, o qual foi de suma importância para execução deste trabalho, a ela minha Admiração e respeito. Ao Prof^o. Gaus de Andrade Silvestre, pelos momentos de descontração e ensinamento, dos quais sem sombra de dúvidas me fizeram ver que tudo poder ficar melhor quando se busca.

Um agradecimento muito especial à professora Edna Peixoto da Rocha Amorim, que me acolheu no laboratório, à senhora todo meu respeito e admiração. Prof^a Dr^a. Arlida Eloy e o Prof^o Dr. Domingos, pela convivência harmoniosa pelos conselhos e ensinamentos.

Ao amigo Geraldo Lima, sua eficiência é a marca registrada no mestrado, meu muito obrigado. Aos técnicos do Laboratório de Fitopatologia Edvaldo Raimundo da Silva (Pareia) e Sebastião da Silva (Galego), pela amizade sincera.

Aos amigos do mestrado, Juliana P. Carnaúba, por todo apoio, ensinamentos transmitidos e amizade, a Marcio Felix por sua solidariedade e amizade sincera; as minhas companheiras de laboratório Kirley Marques e Sarah Cavalcanti, por todos os momentos de descontração e aprendizado e a todos do Laboratório por todo apoio, ensinamento transmitido, solidariedade e amizade sincera. A André Galvão e Daniella Furtado Galvão pela amizade e pelos ensinamentos, meu muito obrigado.

Aos amigos **IRMÃOS**, Grazziano, Rosevaldo por serem verdadeiros companheiros. E aos Amigos da RUA (Residência Universitária Alagoana),

Aderaldo, Divaci, Adriano, Genival, Ademir, Taciano, Juana, Zé Rocha, Filipe, Sr. Ulisses, Arlene Brandão Cordenadora da Proest e a todos que me ajudaram a obter mais esta vitória, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I – INTRODUÇÃO.....	01
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Importância da bananicultura.....	04
2.2. A fusariose da bananeira ou "Mal-do-Panamá".....	05
2.3. Caracterização e diversidade genética de fungos fitopatogênicos por meio de técnicas moleculares.....	09
III – METODOLOGIA.....	14
3.1. Obtenção dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
3.2. Obtenção de culturas monoconidiais de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense	16
3.3. Extração do DNA genômico dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense.....	16
3.4. Amplificação e análise de rDNA por eletroforese em gel de agarose.....	18
3.5. Análise da diversidade genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense mediante PCR-RFLP das regiões ITS e IGS.....	20
3.6. Análise da diversidade genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense através de RAPD.....	20
3.7. Seqüenciamento das regiões ITS e IGS de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense	22
3.8. Análise filogenética dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense seqüenciados.....	23

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Amplificação de regiões do rDNA de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>.....	24
4.2. Análise de RFLP dos fragmentos amplificados por PCR.....	24
4.3. Análise da diversidade genética entre isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> através de RAPD.....	29
4. 4. Análise filogenética dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>.....	33
V – CONCLUSÃO.....	39
VI – REFERÊNCIAS.....	40
VI - ANEXOS.....	52

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.-** Origem dos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp.*cubense* e cultivares infectadas pelo patógeno utilizados no trabalho..... **16**
- TABELA-2.** Primers utilizados para amplificar regiões do rDNA de 11 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*..... **19**
- TABELA- 3.** Seqüências dos primers decâmeros utilizados para amplificação ao acaso de DNA polimórfico dos isolados de *Fusarium oxysporum*..... **21**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização hipotética dos genes que codificam para o RNA ribossomal nuclear (18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. ITS = “espaços internos transcritos” e IGS = “espaço intergênico IGS”. As setas representam as posições de anelamento dos primers utilizados..... 19
- Figura 2.** Gel de amplificação das regiões genômicas ITS (12 isolados) e IGS (3 isolados) de *Fusarium oxysporum*. F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. X representa o isolado de *Crotalaria* sp. M = marcador (1kb Plus DNA Ladder)..... 25
- Figura 3.** Digestões enzimáticas dos produtos de PCR da região ITS de 12 isolados de *Fusarium oxysporum*. M = marcador (1kb plus DNA Ladder). A, B e C = digestões com *Pst*I, *Hinf*I e *Taq*I, respectivamente. F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. X representa o isolado de *Crotalaria* sp..... 26
- Figura 4:** Fragmentos visualizados após incubação dos produtos de PCR da região IGS de isolados de *Fusarium oxysporum* com as enzimas *Eco*RI e *Pst*I. M = Marcador (1kb Plus DNA Ladder). F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. F12 representa o isolado de *Crotalaria* sp..... 27
- Figura 5.** Padrões típicos de amplificação obtidos com os primers OPAH6; OPAH15 e OPAH16 de 23 isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (linhas 1 a 23) e dois isolados de *F. oxysporum*, de *Crotalaria* sp. (X) e *Heliconia* sp. (Y). M = marcador (1 Kb Plus DNA Ladder)..... 29
- Figura 6.** Árvore filogenética obtida pelo algoritmo UPGMA através do coeficiente de Jaccard, por RAPD dos 23 isolados de FOC e dois isolados de *F. oxysporum*. A, B e C correspondem aos três agrupamentos principais..... 31
- Figura 7.** Seqüências depositadas no Genbank que apresentaram maiores *Score* e menores *e-value* com os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* caracterizados nesse estudo..... 34

Figura 8. Alinhamento das seqüências da região ITS dos isolados 6 (FOC), 9 (FOC2) e 18 (FOC3).....	35
Figura 9. Posições de alterações nas seqüências de nucleotídeos da região ITS dos isolados 6 (FOC1), 9 (FOC2) e 18 (FOC3) de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	36
Figura 10. Árvore filogenética ilustrando a similaridade das seqüências das regiões ITS-5.8S rDNA, Análise baseada no método de “UPGMA”, construído com base em 1000 “bootstrap”.....	37

RESUMO

A banana (*Musa* sp.), é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo plantada predominantemente nos países tropicais. Um dos principais fatores que reduzem a produção da bananeira é a incidência da fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, podendo comprometer até 100% da produção. O principal método de controle da fusariose da bananeira consiste no uso de cultivares resistentes. Contudo, para a adoção dessa estratégia é importante ter um amplo conhecimento sobre a variabilidade do patógeno. O presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de diferentes áreas geográficas, através de marcadores RAPD, RFLP-PCR das regiões ITS e IGS e seqüenciamento da região ITS do rDNA. A utilização de nove primers decâmeros nas reações de RAPD gerou 61 bandas, sendo todas elas polimórficas, o que ressalta a alta variabilidade do patógeno. Não se constatou nenhuma relação entre os agrupamentos baseados em RAPD e a origem geográfica dos isolados. Já a técnica de PCR-RFLP foi menos sensível na constatação da variabilidade genética, principalmente considerando-se a região ITS. Os dados de sequenciamento indicaram fragmentos variando de 517 a 554 nucleotídeos com alta similaridade (96 a 98 %). As seqüências obtidas também mostram elevada similaridade com de seqüências de outros isolados de *Fusarium* spp. depositados no Genbank.

Palavras chaves: Fusariose, mal-do-Panamá, variabilidade genética, marcadores moleculares

ABSTRACT

Bananas (*Musa* sp.) are the most consumed fruit in the world and they are primarily grown in tropical countries. One of the main causes for reduction in banana production is the onset of fusariosis, disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, which can compromise up to 100% of the production. The fusariosis is best controlled through the development of resistant hybrid varieties. However, before such strategy is used it becomes necessary to know a great deal about the variability of the pathogen. The aim of this paper was to study the genetic variability of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* samples from different geographical areas, using RAPD, RFLP-PCR markers from the ITS and IGS regions, including a sequence from the ITS region of the rDNA. The use of nine primers in the RAPD reactions has produced 61 bands, all polymorphic, as an example of the high variability of the pathogen. No relation has been found between the groupings based on the RAPD and the geographical sources of the isolated groupings. On the other hand, the PCR-RFLP technique has proved to be less useful to determine genetic variability, especially in the case of the ITS region. The sequencing data have indicated fragments ranging from 517 to 557 nucleotides with high similarity (96 to 98 %). The sequences obtained also revealed great similarity with sequences from other isolated *Fusarium* spp. stored in the Genbank.

Key words: Fusariosis, mal-do-Panamá, Molecular markers

I – INTRODUÇÃO

A banana possui alto valor nutritivo, sendo consumida na maioria das vezes de forma “in natura”. Por ser de baixo custo é integrante da alimentação de boa parte da população de baixa renda (Cordeiro, 1995, 1997; Alves, 1999). Segundo Gonçalves, *et al.* (2005) a banana é quarto produto vegetal mais consumido no mundo, sendo superada apenas pelo arroz, trigo e milho.

No Brasil, a bananeira (*Musa sp.*) é cultivada em praticamente todos os estados. O país se destaca como o segundo maior com 6,6 milhões de toneladas e com área colhida de 496,6 mil hectares, sendo superado apenas pela Índia (IBGE, 2004; IEA, 2005).

Um dos principais fatores que reduzem a produção da banana está relacionado aos aspectos fitossanitários. No Brasil, a fusariose, ou mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, provoca perdas elevadas, podendo atingir até 100% da produção. O problema é ainda mais grave nas cultivares Maçã e Prata, as preferidas do consumidor nacional, mas altamente suscetíveis ao patógeno. O fungo apresenta alta capacidade de sobrevivência no solo, principalmente na forma de clamidósporos (Cordeiro *et al.*, 1993, Cordeiro, 1997).

O Mal-do-Panamá está amplamente distribuído no mundo, infectando grande número de cultivares. No passado, esta doença foi responsável pela substituição da cultivar mais plantada no mundo, a ‘Gros Michel’, e, no Brasil, tem condicionado a redução de áreas plantadas com a cultivar maçã e sua substituição pelas cultivares do subgrupo Cavendish (Matos, *et al.*, 2001).

Métodos baseados na análise de DNA têm sido muito úteis nos estudos de filogenia de *Fusarium* e na diferenciação de espécies, formaes *specialis* e raças de isolados. Dentre os vários métodos existentes, destacam-se a amplificação de fragmentos de DNA polimórficos ao acaso (RAPD), a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e o seqüenciamento do DNA, sendo que as duas últimas têm regiões do DNA ribossômico como principais alvos

(Kistler *et al.*, 1987; Guadet *et al.*, 1989; Peterson, 1991; Lodolo *et al.*, 1993; Kin *et al.*, 1993. 1995, 2001; Oliveira & Costa, 2002).

A região genômica que codifica para o RNA ribossomal nuclear (rDNA) é constituída de seqüências codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes velocidades. Esta região apresenta várias cópias do rDNA e tem sido amplamente utilizada para estimar a variabilidade genética tanto de fungos quanto de outros organismos (Leal-Bertioli, 1998; Lorieco *et al.*, 1995; Peterson, 1991).

O principal método de controle da fusariose da bananeira consiste no uso de cultivares resistentes, embora a ocorrência de distintas raças do patógeno dificulte sua adoção em muitas áreas produtoras (Alves, 1999; Cordeiro; 1995, 1999; Borges & Sousa, 2004). Para a utilização de cultivares resistentes é importante a determinação precisa da(s) raça(s) de ocorrência numa determinada área, assim como é importante o conhecimento da variabilidade genética do patógeno (Borges & Sousa, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* de diferentes áreas geográficas, através de marcadores RAPD, RFLP-PCR das regiões ITS e IGS e seqüenciamento da região ITS do DNA ribossomal.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da bananicultura

A banana (*Musa sp.*) é uma fruta de grande importância econômica e social em todo o mundo, sendo cultivada em mais de 100 países, com área colhida de quatro milhões de hectares e produção superior a 66,5 milhões de toneladas, oriundas, principalmente, de pequenas propriedades (IBGE, 2005).

No Brasil é cultivada em praticamente quase todos os estados, destacando-se como principais produtores: São Paulo, Bahia, Santa Catarina, Pará e Ceará. Estima-se que o volume total da produção esteja em torno de 6,6 milhões ton/ano e área colhida de 496 mil hectares, sendo superado apenas pela Índia, colocando o país como o segundo maior produtor. O nordeste brasileiro é responsável por 35,77% da produção nacional, com 2.534.759t, seguido pelas regiões Sudeste, com 1.953,66t (29,67%) e norte, com 16,53%. O estado de Alagoas contribui aproximadamente 51,8 mil toneladas (IBGE, 2004). O Brasil é o maior consumidor per capita com 29kg/hab/ano (IBGE, 2004; IEA, 2005).

Embora a bananeira seja uma planta tipicamente tropical e não ocorram restrições com relação à temperatura, pluviosidade, luminosidade, altitude e umidade relativa à produtividade alcançada em alguns bananais é muito baixa, o que limita a competitividade econômica com outros centros produtores de banana (Silva, 2003; Borges & Sousa, 2004; Salomão *et al.*, 2005).

2.2. A fusariose da bananeira ou "Mal-do-Panamá"

A fusariose da bananeira, também conhecida como mal-do-Panamá ou murcha-de-fusário da bananeira é uma importante doença causada pelo fungo *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. A doença foi descrita pela primeira vez por Higgins, em 1904 no Havaí (EUA). Por volta de 1912, a fusariose da bananeira já se apresentava na Jamaica como o mal que iria destruir as plantações constituídas

pela cultivar 'Gros Michel' da América Central. No Brasil, a fusariose da bananeira foi relatada pela primeira vez em 1930, no Município de Piracicaba - São Paulo, na cultivar Maçã, na qual causou severas perdas, tornando-se fator limitante para o seu cultivo. Por ser de fácil disseminação, e pela alta capacidade de sobrevivência do fungo na ausência do hospedeiro, atualmente a doença está presente em todos os estados brasileiros (Cordeiro & Kimati, 1997; Alves, 1999; Pereira *et al.*, 2005).

No campo, a infecção inicial das plantas de bananeira pode ocorrer através de ferimentos nas raízes, nematóides contaminados, por insetos que tenham tido contato com plantas infectadas, pelas águas das chuvas ou de irrigação, entre outras (Borges, & Sousa, 2004; Salomão *et al.*, 2005).

Na bananeira, o patógeno invade o sistema radicular, se disseminam no cilindro central do rizoma e daí segue para as bainhas das folhas. Em seguida as folhas apresentam uma clorose, semelhante a um sintoma de deficiência de potássio. As folhas podem também se apresentar com várias faixas amarelas, com largura de 2 a 4 cm, ligando a nervura principal com a do bordo. Quando isto ocorre, geralmente aparece um fendilhamento vertical no pseudocaule, com profundidade de 2, 3 ou 4 bainhas. Esse fendilhamento inicial é pequeno, mas logo se alonga por algumas dezenas de centímetros de comprimento com vários de largura; ele aparece sempre a partir de 10 a 20 cm acima do colo do rizoma. Isto ocorre porque as bainhas externas param de crescer, enquanto que as bainhas internas continuam o seu crescimento normal. Nessa ocasião, fazendo-se um corte transversal no pseudocaule, próximo à sua base, é possível observar a existência de manchas isoladas escuras e irregulares nos tecidos das bainhas, sintoma característico da doença (Cordeiro, 1997; Cordeiro & Kimati, 1997; Alves, 1999)

Decorridas algumas semanas, estas manchas avançam irregularmente pelo pseudocaule, até atingirem a roseta foliar. Em estágio mais avançado da infecção, as manchas formadas nos tecidos semi-desidratados também se colonizam lateralmente e formam um anel escuro, um pouco distante da bainha da folha mais nova. Essa região fica escurecida e seca (Moreira, 1999). Na ausência do hospedeiro, o patógeno sobrevive principalmente no solo, na forma de estruturas

de resistência denominadas clamidósporos (Cordeiro & Kimati, 1997; Cordeiro *et al.*, 2005). Esses mesmos autores citam a importância de estirpes não virulentas de *F. oxysporum* na manutenção de estirpes virulentas. De acordo com essa linha de raciocínio as linhagens não-virulentas podem formar heterocários com linhagens virulentas, assim os núcleos da forma virulenta persistem no micélio de crescimento saprofítico, voltando a atuar quando em presença da planta hospedeira (Borges & Sousa, 2004).

As principais formas de disseminação de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* constituem no contato do sistema radicular de plantas saudáveis com esporos liberados por plantas doentes e, em muitas áreas, no uso de mudas contaminadas. O fungo também é disseminado por água de irrigação, drenagem e inundação, assim como pelo homem, por animais e equipamentos agrícolas (Cordeiro & Kimati, 1997; Cordeiro, 1997; Batista-Filho 2002; Borges & Sousa, 2004; Salomão *et al.*, 2005).

Os propágulos entram em contato com a superfície do hospedeiro suscetível e iniciam a etapa de infecção. A germinação das estruturas reprodutivas exige condições de alta umidade. Os conídios germinam formando um promicélio ou tubo germinativo que se fixa na superfície vegetal através de um apressório. A hifa originária do apressório penetra de forma direta sobre a superfície intacta do tecido vegetal através da pressão mecânica e produção de enzimas e toxinas. A penetração pode ser também através de aberturas naturais (Batista-Filho, 2002).

A alta umidade relativa e temperatura das regiões tropicais favorecem a ocorrência da doença, assim como solos arenosos e mal drenados, problemas nutricionais principalmente aqueles relacionados aos elementos P, Ca, Mg e Zn, solos ácidos e carência de matéria orgânica, ferimentos nas raízes, incidência de nematóides (*Radopholus similis* e *Meloidogyne* sp.) e de pragas como o moleque da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) (Cordeiro, 1999; Alves, 1999; Borges & Sousa, 2004).

A capacidade de sobreviver no solo através de clamidósporos, mesmo na ausência da hospedeira, por um período de até 50 anos, torna este fitopatógeno um dos mais sérios problemas para a bananicultura no Brasil e no mundo

induzindo a morte prematura de plantas adultas, principalmente na ocasião do florescimento (Pereira & Gasparotto, 2003; Borges & Sousa, 2004; Pereira *et al.*, 2005). Borges & Sousa (2004), relatam que o patógeno tem sido detectado associado com plantas invasoras, dentre elas *Paspalum fasciculatum*, *Panicum purpurascens*, *Ixophorus unisetus*, *Commelina diffusa* e *Amaranthus* sp., todas de ocorrência comum em bananais.

A obtenção de cultivares resistentes é hoje uma das principais linhas de ação visando o controle da doença (Borges & Sousa, 2004; Pereira *et al.*, 2005).

As cultivares de interesse comercial apresentam graus variáveis de resistência à doença. Destacam-se, nesse sentido, as cultivares: 'Ouro', 'Nanicas', 'Nanicão', seguidas de 'Terra' e 'Prata'. Por outro lado a cultivar 'Maça' comporta-se como altamente suscetível à doença (Borges & Sousa, 2004). Apesar da resistência de algumas cultivares, fatores, como desequilíbrios nutricionais, parasitismo de nematóides, ou períodos elevados de estiagem, podem tornar-las predispostas ao ataque do patógeno. (Alves, 1999, Borges & Sousa, 2004).

São conhecidas quatro raças de *F. oxysporum* f. sp. *cabense* (Ploetz, 1993; Robinson, 1996), sendo para a banana as raças 1, 2 e 4 as mais importantes. As raças 1 e 2 estão distribuídas no mundo todo (Nozaki, 2003; Pereira & Gasparotto, 2003) e é virulenta para a maioria das cultivares. A raça 2, infecta bananeiras do subgrupo Bluggoe (ABB), como as cultivares Figo cinza, Figo Vermelho ou Marmelo, Pelipita entre outras, enquanto a raça 3 só foi encontrada em espécies selvagens e em plantas ornamentais (*Heliconia* sp.) (Batista-Filho, 2002).

O aparecimento da raça 4 deu novo destaque aos problemas fitosanitários, enfatizando a necessidade de pesquisas na busca de novas alternativas genéticas ou culturais para o controle da doença (Sun *et al.*, 1978¹, *apud* Nozaki, 2003). Essa raça é virulenta a algumas cultivares do subgrupo Cavendish que se comportam como resistentes à raça 1 (Nozaki, 2003). A raça 4 é a mais agressiva e apresenta ampla gama de hospedeiros (Hwang, 1993;). No Brasil, a raça 1 tem sido relatada com maior frequência (Cordeiro, 1997; Nozaki, 2003). Messiaen & Cassini, 1968² *apud* Menezes & Oliveira, (1993), relatam à existência de mais de

60 *formae specialis* dentro desta espécie. A fase sexual ou teliomórfica desse patógeno ainda é desconhecida (Menezes & Oliveira, 1993)

¹SUN, E.J.; SU, H.J.; KO, W.H. **Identification of *Fusarium oxysporum f. sp. Cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters.** Phytopathology, Sain Paul, v. 8, p. 1672-1673, 1978.

²MESSIAEM, C.M. ET & CASSINI, R., RECHERCHES SUR LES *Fusarium*, **La systématique dès *Fusarium***, tome 19, p. 396-454. 1968.

2.3. Caracterização e diversidade genética de fungos fitopatogênicos por meio de técnicas moleculares

Uma das regiões genômicas que vêm sendo mais utilizadas para estudos de diversidade genética de fungos fitopatogênicos é aquela que codifica para os genes do RNA ribossômico (rDNA). A função básica dos ribossomos é a de traduzir o mRNA em peptídeos. Dessa forma, esses genes estão presentes universalmente em sistemas vivos, em um alto número de cópias no genoma (White *et al.*, 1990)

O DNA que codifica o RNA ribossômico (rDNA) em organismos eucarióticos apresenta-se como um agregado gênico composto pelas subunidades 18S, 5,8S e 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas “internal transcribed spacer” (ITS1 e ITS2) que são transcritas e processadas para dar origem aos RNA's ribossômicos (Brasileiro 2003; Nozaki, 2003). Por ser constituído por regiões que evoluem em diferentes velocidades, o rDNA é considerado como um “conjunto de cronômetros”, cada um oferecendo diferentes perspectivas da história da evolução dos fungos. Este atributo torna o rDNA muito útil para determinar relações filogenéticas entre os grupos de fungos de taxa distantes, assim como entre isolados da mesma espécie (White *et al.*, 1990)

A presença de seqüências conservadas do rDNA (18S, 5,6S e 28S) permitiu o desenvolvimento de “primers” universais, isto é que podem ser utilizados em uma ampla gama de espécies de fungos. Estes primers universais, flanqueiam as regiões ITS e IGS do rDNA (White *et al.*, 1990; Silva-Hanlin *et al.*, 1997; Kuramae & Sousa, 2002).

Em espécies de *Fusarium*, assim como em outros fungos, a variação no rDNA tem sido estimada pela análise do polimorfismo no comprimento de restrição (RFLP) de fragmentos amplificados por PCR (Nicholson *et al.*, 2003) ou por comparação de seqüências de nucleotídeos determinadas mediante seqüenciamento de regiões do rDNA (Logrieco *et al.*, 1991). Kuramae & Sousa (2002) detectaram variabilidade genética entre “formae speciales” de *F. oxysporum* através de digestão de produtos de PCR correspondente à região ITS.

Utilizando a mesma técnica, Brasileiro (2003) encontrou variabilidade entre isolados de *F. solani*, e Galvão (2005) detectou a polimorfismo em isolados de *F. guttiforme*, agente da fusariose do abacaxi.

Muitas análises vêm sendo realizadas com uma outra porção do rDNA que é a região espaçadora ou intergênica (IGS). Esta região é mais conservada do que a ITS e ela está localizada entre os genes 18S e 28S. Kin *et al.* (2001) encontraram variações dentro da região espaçadora intergênica (IGS) para *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* através da digestão com enzimas de restrição (*Bgl*II, *Eco*RI, *Hin*clI, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Nru*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xho*I, e) demonstrando assim que técnica pode ser útil na distinção de *formae specialis*.

Alves-Santos *et al.* (1999), também utilizaram a região IGS para avaliar a variabilidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Foi feita a relação entre compatibilidade vegetativa de isolados não patogênicos e patogênicos e também a digestão com endonucleases da região IGS e os resultados obtidos demonstraram que não havia nenhuma correlação entre o polimorfismo do comprimento do fragmento com virulência.

Llorens *et al.* (2005), caracterizou através do polimorfismo de comprimento por PCR-RFLP, da região IGS, 44 isolados de *Fusarium* spp., sendo cinco *F. culmorum*, sete *F. graminearum*, um *F. cerealis*, um *F. poae*, 26 *F. oxysporum*, e um complexo de quatro espécies de *Gibberella fujikuro*, oriundas de diferentes hospedeiros e provenientes da Espanha e da Holanda. Os padrões da digestão do produto de PCR correspondente à região IGS não mostraram nenhuma relação com hospedeiro, à origem geográfica ou com a capacidade de produção de micotoxinas dos isolados. Entretanto, os haplótipos obtidos com as seis enzimas de restrição (*Alu*I, *Eco*RI, *Cfo*I, *Hap*II, *Pst*I e *Xho*I) permitiram separar as seis espécies de *Fusarium* e verificar a relação genética entre os grupos. Portanto, a região IGS também parece ser bastante confiável para esse tipo de análise.

Edel *et al.* (2001) estudaram a diversidade genética de 350 isolados de *F. oxysporum* de seis solos franceses. Todos os isolados foram caracterizados pela análise de digestão do fragmento IGS, com diferentes enzimas de restrição. Estas

análises revelaram que a estrutura genética das populações variaram extensamente, e que esta variação estava relacionada com o tipo de solo em que o fungo foi isolado.

Yli-Mattila *et al.* (2004), utilizaram sondas para região do rDNA para separar *F. langsethiae* de *F. poae*, os quais foram descritos recentemente e incluídos em um mesmo grupo por apresentarem semelhanças morfológicas. Os autores ressaltam que sem os resultados obtidos com as ferramentas moleculares não seria possível descrever *F. langsethiae* como uma espécie nova.

Um grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR (reação em cadeia de polimerase) ocorreu com a idéia de se usar primers mais curtos e de seqüências arbitrárias para dirigir a amplificação de regiões aleatórias do genoma. Essa técnica é conhecida como amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA) e foi desenvolvida no início da década de 1990 por dois grupos independentes, (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). Esta variação foi desenhada para contornar o problema do conhecimento prévio da seqüência de DNA que se deseja amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos onde nenhum conhecimento de seqüência de DNA exista. Tal método permite de maneira mais rápida, identificar o grau de similaridade entre genótipos a níveis inter e intraespecífico (Brasileiro, 2003).

Desde então, a técnica de RAPD vem sendo aperfeiçoada e amplamente utilizada com as mais diversas aplicações na análise genética de procariotos e eucariotos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Além do fato de não ser necessário conhecer seqüências do genoma, a técnica de RAPD apresenta outros aspectos positivos como o fato de cobrir todo o genoma, inclusive regiões não codificantes, as quais não sofrem pressão de seleção. Adicionalmente, os marcadores RAPD são apontados como os mais simples de serem gerados e os de custo mais baixo. Em virtude desses aspectos positivos a técnica de RAPD se tornou o procedimento mais empregado em análises de diversidade (Williams *et al.*, 1990). Contudo, alguns cuidados devem ser observados com sua utilização. Por exemplo, a técnica deve ser utilizada, preferencialmente, para comparar indivíduos

da mesma espécie, ou no máximo do mesmo gênero. Outro aspecto a ser considerado é que muitas bandas de RAPD são de difícil reprodutibilidade, assim apenas as bandas mais consistentes devem ser consideradas (Ferreira & Grattapaglia, 1996)

O polimorfismo detectado em um loco RAPD pode ser conseqüências de mutações que ocorrem em uma ou em ambas as fitas de DNA. Essas mutações por sua vez podem ser devidas a substituições de nucleotídeos ou a deleções ocorridas nas regiões de anelamento dos primers. Outra possibilidade é a ocorrência de inserções de fragmentos de DNA entre as regiões de anelamento dos primers, tornando a região a ser amplificada mais extensa, além da possibilidade de amplificação por parte da DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Cruz & Milach, 1998).

Outra desvantagem dos marcadores RAPD é o fato de serem tipicamente dominantes, isto é, o fenótipo eletroforético de um indivíduo heterozigoto para um determinado loco não é geralmente distinguido de um indivíduo homozigoto para o mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A capacidade multiplex da RAPD, ou seja a capacidade de identificação de mais de um loco polimórfico na mesma reação permite comparar as diferentes técnicas moleculares em relação à sua eficiência para análise de variabilidade genética. Marcadores RAPD em geral apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, possuem uma boa capacidade multiplex, identificando um alto número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco. O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o seguimento amplificado está presente ou ausente (Brasileiro, 2003).

Através da análise de RAPD vários pesquisadores têm conseguido detectar variabilidade genética entre isolados de *Fusarium* spp. Por exemplo, Jesus *et al.* (1995) detectou alta variabilidade entre isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Kelly *et al.* (1994) conseguiram distinguir *F. oxysporum ciceris*, agente causal de fusariose em grão de bico (*Cicer arietinum* L), de outras *formae specialis* e de

outras espécies de *Fusarium* que ocorrem na cultura. Com a mesma análise separaram os isolados que causam amarelecimento, seca e os não virulentos.

O seqüenciamento de DNA, procedimento que determina a ordem com que os nucleotídeos ocorrem num genoma ou numa seqüência de DNA, constitui na técnica mais eficiente na determinação de variabilidade genética. Existem vários métodos disponíveis, e cada um apresenta vantagens e desvantagens. Um dos mais utilizados é o chamado “método didesoxi” conhecido também como de “terminadores de cadeia” ou de “Sanger”; ele constitui a base da metodologia empregada no seqüenciamento da maioria dos genomas. Esse método utiliza análogos de nucleotídeos conhecidos como didesoxiribonucleotídeos. Esses compostos podem ser incorporados a uma seqüência em extensão, mas não permitem que a extensão da cadeia continue. Cada didesoxiribonucleotídeo é marcado com uma fluorescência distinta, possibilitando identificar o nucleotídeo incorporado na extremidade (Figueiredo, *et al.*, 2003).

As seqüências de nucleotídeos de vários organismos são depositadas em bancos de dados virtuais, sendo o Genbank o mais conhecido. Dessa forma, tais dados podem ser utilizados para analisar a filogenia de vários organismos, comparando-se a seqüência obtida com outras seqüências armazenadas em bancos de dados.

III – METODOLOGIA

3.1. Local de execução.

Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de Biologia Molecular do departamento de Fitotecnia e Fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)- Campus Delza Gitaí, em Rio Largo Estado de Alagoas de janeiro de 2005 a fevereiro de 2006.

3.2. Obtenção dos isolados de *Fusarium oxysporum*

Os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* foram coletados em diferentes regiões produtoras dos Estados de Alagoas, Pernambuco, Bahia e Tocantins e Honduras (Tabela 1). As plantas de bananeira apresentando sintomas típicos da doença foram coletadas e levadas ao Laboratório de Fitopatologia para isolamento do patógeno. A identificação dos isolados foi feita com base nas características morfométricas de acordo com Booth (1977) e na sintomatologia, mediante teste de patogenicidade realizados em cultivares de bananeiras suscetíveis ao patógeno.

Adicionalmente foram empregados, em algumas etapas desse estudo, dois isolados de *F. oxysporum*, cuja *formae speciales* não foi determinada, um desses isolados foi obtido de *Crotalaria* sp. e o outro de *Heliconia* sp., ambos procedentes do município de Rio Largo-AL.

Tabela1. Origem dos isolados de *Fusarium oxysporum* e cultivares infectadas pelo patógeno utilizados no trabalho.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	CULTIVARES	ORIGEM GEOGRÁFICA
01	FOC AL 1	Prata	Feliz Deserto/AL
02	FOC AL 2	Prata	Penedo/AL
03	FOC AL 5	Maçã	Maceió/AL
04	FOC AL 10	Pacovan	Palmeira dos índios/AL
05	FOC AL 17	Maçã	Jacuipe/AL

06*	FOC AL 18	Maçã	Jacuípe/AL
07	FOC AL 19	Maçã	Jundiá/AL
08	FOC AL 20	Maçã	Jundiá/AL
09*	FOC AL	Maçã	Rio Largo/AL
10	FOC BA 1	Maçã	Cruz das Almas/BA
11	FOC 6M	Maçã	Pernambuco
12	FOC8M	Maçã	Pernambuco
13	FOC 11M	Pacovan	Pernambuco
14	FOC 12M	Maçã	Pernambuco
15	FOC 5	Prata	Pernambuco
16	FOC 6	Maçã	Jacuípe/AL
17	FOC 12	Maçã	Escada/PE
18*	FOC B	Maçã	Bahia
19	FOC	Pacovan	São Vicente Ferrer/PE
20	FOC W	Maçã	Pernambuco
21	FOC 1	Pacovan	Palmas/TO
22	FOC R1	-	Honduras
23	FOC CPMI	Maçã	Cruz das Almas/BA
24	FO-X	Crotalaria	Rio Largo/AL
25	FOY	Heliconia	Maceió/AL

* Isolados utilizados para seqüenciamento das regiões do rDNA.

3.3. Obtenção de culturas monoconidiais de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense

A partir de culturas fúngicas cultivadas em meio DBA (batata-dextrose-ágar), fez-se uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada. A suspensão foi filtrada em uma camada de gaze dupla esterilizada. Desta suspensão inicial fez-se uma diluição em série, a partir da qual alíquotas de 1 mL foram retiradas e transferidas, para tubos de ensaio com 9 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se as concentrações 10^1 , 10^2 , 10^3 . Posteriormente, fez-se a transferência de 0,1mL da suspensão de conídios na concentração de 10^3

conídios/mL de cada isolado para placas de Petri contendo meio BDA com adição de oxitetraciclina (950 µg/ml).

As culturas fúngicas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 26°C sob alternância luminosa e diariamente foram observadas em microscópio ótico. Os conídios germinados foram individualmente transferidos para placas de Petri contendo DBA com auxílio de uma alça de platina previamente flambada. As placas de Petri contendo as culturas fúngicas foram mantidas em condições de ambiente e após sete dias, discos de BDA (3 mm) contendo micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4ml de meio BDA e armazenados a 4°C.

3.4. Extração do DNA genômico dos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense

O DNA genômico total dos isolados foi extraído a partir de culturas monoconidiais crescidas em 5 mL de meio BD (batata-dextrose). As culturas foram incubadas à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12h sob agitação constante por 72h. Após esse período, o micélio foi lavado em água destilada esterilizada e utilizado para a extração do DNA total, segundo o protocolo de extração CTAB 10% descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), com modificações.

Cerca de 50mg do micélio de cada isolado foi macerado em tubos de microcentrífuga de 1500 µL, com auxílio de pistilo, na presença de 700µL de tampão de extração CTAB 10% (NaCl 700 mM, Tris-HCl 50mM, pH 8,0, EDTA 10mM) pré aquecido e 2% de β-mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi agitado em vortex por 1 min e mantido em banho-maria (65°C) por 30 minutos, invertendo-se suavemente os tubos a cada 10 min para homogeneizar a suspensão. Após o resfriamento da suspensão fez-se a extração com solvente orgânico adicionando-se 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool:isoamílico 24:1(v/v)). Os tubos foram agitados durante cinco minutos, invertendo-os para homogeneizar a

solução e posteriormente, centrifugados a 9000 rpm por 10 min a uma temperatura de 10°C. Cuidadosamente os tubos foram retirados da centrífuga e em seguida, transferiu-se 500 µl da fase aquosa para um outro tubo de microcentrífuga, ao qual foram adicionados 600 µl de isopropanol frio (-20 °C) e 10% de acetato de potássio a 5 M, misturando-se cuidadosamente para precipitação dos ácidos nucléicos. Estes tubos foram incubados por uma hora à -20 °C. Logo após, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm à temperatura de 4 °C.

Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com 0,5 mL de Etanol 70% e secados à temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido em 60 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1mM), contendo 10µg/µL de RNase e incubados à 37 °C por 30 minutos para a digestão do RNA. As amostras de DNA foram armazenados à uma temperatura -20°C até sua utilização.

Para determinar a concentração do DNA extraído, alíquotas de 3µL das soluções foram misturadas a 1 µL do azul de bromofenol (0,25%) e aplicada em gel de agarose (1%), submerso em tampão TAE 1X (tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Aplicaram-se também soluções de DNA do fago lâmbda de concentrações conhecidas (25; 50; 100 e 200ng/µL de DNA), para estimativa das concentrações do DNA extraído. Em seguida, o gel foi corado numa solução de brometo de etídio (EtBr) na concentração de 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultra-violeta.

3.5. Amplificação e análise de rDNA por eletroforese em gel de agarose

Todas as reações de amplificações foram realizadas utilizando termociclador modelo Eppendorf Mastercycler personal. Cerca de 30 ng do DNA extraído foram utilizados como molde em PCR's contendo os oligonucleotídeos universais que anelam em regiões específicas do rDNA de fungos. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados encontram-se na Tabela 2.

Foram utilizados os oligonucleotídeos CNS1 e CNL12 que direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 2200 pb, incluindo as

extremidades dos genes que codificam para as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal e a região compreendida entre esses genes – intergenic sequence (IGS) (Figura 1) (Appel & Gordon, 1996).

Também foram empregados nas ampliações os oligonucleotídeos ITS4 e ITS5 que direcionam a amplificação de um fragmento de 650 pb, compreendendo a região espaçadora ITS1 e ITS2, bem como o gene que codifica para a subunidade 5.8S do RNA ribossomal (Figura 1) (White *et al.*, 1990).

A Figura 2 esquematiza as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho no rDNA de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.

Tabela 2. Seqüência dos primers utilizados para amplificar regiões do rDNA dos isolados de *Fusarium oxysporum*

PRIMERS	SEQÜÊNCIA (5'→3')
IGS (CNS1)	GAG ACA AGC ATA TGA CTA CTG
IGS (CNL12)	CTG AAC GCC TCT TAA GTC AG
ITS-4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS-5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AA



Figura 1. Localização hipotética dos genes que codificam para o RNA ribossomal (18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. ITS = “espaços internos transcritos” e IGS = “espaço intergênico IGS”. As setas representam as posições de anelamento dos primers utilizados.

As reações de amplificações das regiões ITS e IGS do rDNA, foram realizadas num volume total de 30 µL, contendo 30 ng do DNA molde, 3 µL do tampão 10X (tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 0,4 µM de cada oligonucleotídeo.

A amplificação da região ITS foi efetuada usando o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 2 min a 95° C, seguida de 38 ciclos a 95° C por 30s, 55° C por 30s, 72° C por 45s. Após os 38 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final a 72° C por 10 min. Nas reações de amplificações da região IGS, fez-se uma desnaturação inicial do DNA genômico a 94° C por 85s, seguida por 35 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação. A temperatura e o tempo dos 13 primeiros ciclos foram de 95° C por 35s, 58° C por 55s, 72° C por 45s. Para os ciclos seguintes (de 14 a 26 e de 27 a 35) foram utilizados os mesmos parâmetros, exceto na etapa de extensão pela Taq polimerase, que foram de 2 e 3 min, respectivamente (Appel & Gordon, 1995).

Após as amplificações, alíquotas de 3 µL das reações foram acrescidas de 1 µL de azul de bromofenol (0,25%) e aplicadas em gel de agarose (1,5%). As amostras foram então submetidas à eletroforese por aproximadamente 2 horas a 3V/cm do gel. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta. Ao lado das amostras, aplicou-se uma alíquota do 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

3.6. Análise da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* mediante PCR-RFLP das regiões ITS e IGS.

Os produtos de PCR obtidos a partir dos diferentes isolados de *F. oxysporum* f.sp.*cubense* foram clivados com algumas enzimas de restrição, a fim de detectar variabilidade genética. A análise foi realizada utilizando-se as enzimas *EcoRI*, *HinfI*, *PstI*, *SmaI*, *TaqI*, *XhoI*. Para confirmar a presença e ausência dos

sítios de reconhecimento das enzimas citadas anteriormente, foram construídos os mapas físicos a partir dos isolados seqüenciados, com auxílio do programa *pDRAW32* descrito por Olesen, (1999). As reações de clivagem consistiram de: 20 unidades da enzima, 2,0 µL do respectivo tampão 10X e 10µl do produto de PCR (aproximadamente 300ng de DNA), completando-se o volume para 20 µL com água destilada estéril. As reações foram incubadas a 37° C durante um período de aproximadamente 12 h.

Os produtos das clivagens foram analisados por meio de eletroforese em géis de agarose (2,3 %). As condições de eletroforese foram às mesmas descritas no item 3.4

3.7. Análise da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* através de RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 15 µl, contendo 15 ng do DNA molde, 1,5 µL do tampão 10X (tris-HCl 10mM, pH 8,3; KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 0,4 µM do oligonucleotídeo.

As condições de amplificação foram baseadas em Texeira *et al.* (2004) com a seguinte programação: 3 min a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação das fitas de DNA), 1 min a 36 °C (anelamento dos primers), 2 min a 72 °C (alongamento das novas fitas de DNA) e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Foram testados nove primers decâmeros de seqüência arbitrária (operon technologies inc, Alameda, CA, USA) (Tabela 3).

A amplificação foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A separação eletroforética foi de aproximadamente 3 horas a 3V/cm do gel. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografado

sob luz ultravioleta. Também foi aplicada no gel uma alíquota do 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

Tabela 3. Seqüências dos primers decâmeros utilizados para amplificação ao acaso de DNA polimórfico dos isolados de *Fusarium oxysporum*.

PRIMERS	SEQÜÊNCIA (5" → 3")
OPAH5	GGC TTT AGC C
OPAA6	GTG GGT GCC A
OPAH6	GTA AGC CCC T
OPAH9	AGA ACC GAG G
OPAH13	TGA GTC CGC A
OPAH15	CTA CAG CGA A
OPAH16	CAA GGT GGG T
OPAH17	CAG TGG GGA G
OPAH18	GGG CTA GTC A

Os dados de RAPD foram analisados considerando a presença e ausência de bandas no gel e foram codificados de forma binária (1 para presença e 0 para ausência). A análise dos dados obtidos foi efetuada no programa computacional *Freetree* elaborado por Pavlicek *et al.* (1999), que gerou uma matrix de similaridade. Esses dados também foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética com o auxílio do programa *Treeview X* (Roderic, 2000).

O agrupamento e a distância genética entre os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* foi feito através de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging). A matriz de distância foi transformada em dendrograma pelo método SAHN Clustering (Sequential Agglomerative, Hierarchical and Nested) Nozaki, (2003)

3.8 Seqüenciamento das regiões ITS e IGS de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Os produtos de PCR das regiões IGS e ITS dos isolados 6, 9 e 18 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foram submetidos a seqüenciamento automático de DNA. Para realização do sequenciamento foi necessário purificar os produtos da PCR. A purificação foi realizada com os kits GFX PCR DNA Gel Band Purification. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder da Invitrogen.

Para o seqüenciamento das amostras de ITS que possuem 550pb utilizou-se aproximadamente 50ng do produto de PCR, já para IGS que possui cerca de 2200pb foi utilizado 110ng. O Mix da reação foi composto de: premix de seqüenciamento 4 μ L, primer 5 μ M 0,6 μ L, PCR purificada 2 μ L (ITS) e 5,4 μ L. (IGS) e água ultrapura 3,4 μ L para um volume final de 10 μ L. Para o seqüenciamento foi necessário colocar 110ng da PCR purificada. Os demais componentes foram os mesmos descritos para o seqüenciamento de ITS. As reações de seqüenciamento foram realizadas no MegaBace 1000 (GE Healthcare).

3.8. Análise filogenética dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* seqüenciados

As seqüências correspondentes à região ITS dos três isolados estudados foram comparadas com outras seqüências depositadas no Genbank, utilizando-se o programa Blast. Nas seqüências de maiores identidades foram salvas e utilizadas num alinhamento usando o software *DNAman6* (Farias, 2005). Esse mesmo software foi usado para gerar uma árvore filogenética entre os isolados seqüenciados e os isolados de maiores identidades, através do método “UPGMA” com valores de 1000 “bootstrap”. Utilizou-se uma seqüência de *F. oxysporum* como “Outgroup” para as análises das relações filogenéticas. Para detecção de polimorfismos nas seqüências de *F. oxysporum* f.sp. *cupense*, utilizou-se a terceira versão do programa computacional *DnaSP* (DNA Sequence Polymorphism) elaborado por Rozas & Rozas, (1999), empregando-se o método de DNA polimorfismo.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação de regiões do rDNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

O método CTAB, descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), mostrou-se eficiente na extração do DNA total das amostras dos isolados de *F. oxysporum*, utilizados neste estudo. A quantidade de DNA total extraído Variou de 2,5 a 5 ng/uL. Este método vem sendo utilizado para isolamento de DNA de alto peso molecular de vários microrganismos, entre eles, fungos (Ferreira & Grattapaglia 1996; Assunção *et al.*, 1997; Silva-Hanlin *et al.*, 1999).

Em todas as amostras de DNA utilizadas nas PCR's foram observados produtos de ampliações de aproximadamente 550 pb para ITS e 2200 pb para IGS, quando os oligonucleotídeos ITS4, ITS5 e CNS1, CNL12 foram utilizados nas reações, respectivamente (Figura 2). Analisando-se os produtos de PCR não foi possível observar polimorfismo entre os isolados, demonstrando a necessidade de se utilizar outros métodos como RFLP e seqüenciamento dos produtos de amplificação, para uma análise mais detalhada da região do rDNA avaliada. Vários trabalhos têm sido realizados utilizando-se essas metodologias para estudo de variabilidade de isolados de *Fusarium* spp. (O'Donnell, 1992; Edel *et al.*, 1995; Silva-Hanlin *et al.*, 1999; Edel *et al.*, 2001), e outros fungos fitopatogênicos, tais como *Verticillium dahliae* (Otero *et al.*, 2004) e *Dicyma pulvinata* (Texeira *et al.*, 2004).

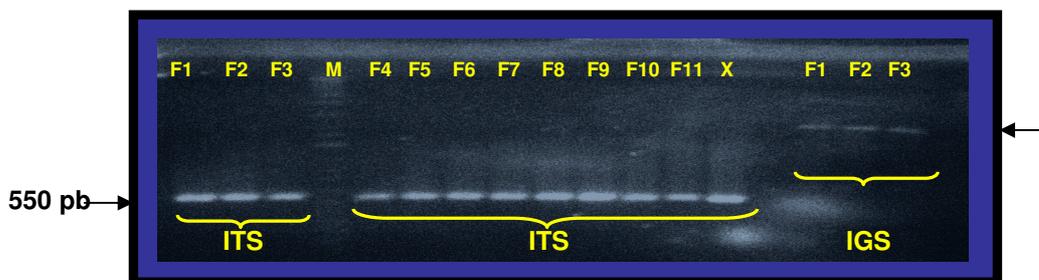


Figura 2. Gel de amplificação das regiões genômicas ITS (12 isolados) e IGS (3 isolados) de *Fusarium oxysporum*. F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. X representa o isolado de *Crotalaria* sp. M = marcador (1kb Plus DNA Ladder).

4.2. Análise de RFLP dos fragmentos amplificados por PCR

Aparentemente o fragmento de aproximadamente 0,55 kb, compreendendo a região ITS de todos os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, não apresenta nenhum sítio reconhecido pelas enzimas *Sma*I, *Xho*I (dados não mostrados) e *Pst*I, (Figura 3A) pois seu tamanho não foi alterado após a incubação com estas enzimas. Contudo, esses fragmentos apresentaram pelo menos um sítio de reconhecimento para *Hin*I (Figura 3B) e dois para *Taq*I (Figura 3C). Todavia os padrões de restrição obtidos para ambas as enzimas foram monomórficos, demonstrando o alto nível de conservação dessa região, conforme observado por O'donnell, (1992); Edel *et al.*, (1995); Edel *et al.* (2001); Brasileiro (2003); Nozaki, (2003); Galvão, (2005).

Para confirmar a ausência e presença de sítios de restrição nesta região genômica foram feitas digestões eletrônicas a partir das amostras seqüenciadas (isolados 6, 9 e 18). Os resultados obtidos corroboram com os dados gerados com as digestões em laboratório (Figura 3).

Galvão, (2005) sugere uma pré-seleção de enzimas de restrição através de ferramentas de bioinformática. Pois a partir do mapa físico gerado é possível verificar e/ou selecionar as enzimas que apresentam os melhores resultados para estudo em laboratório (Apêndice 1).

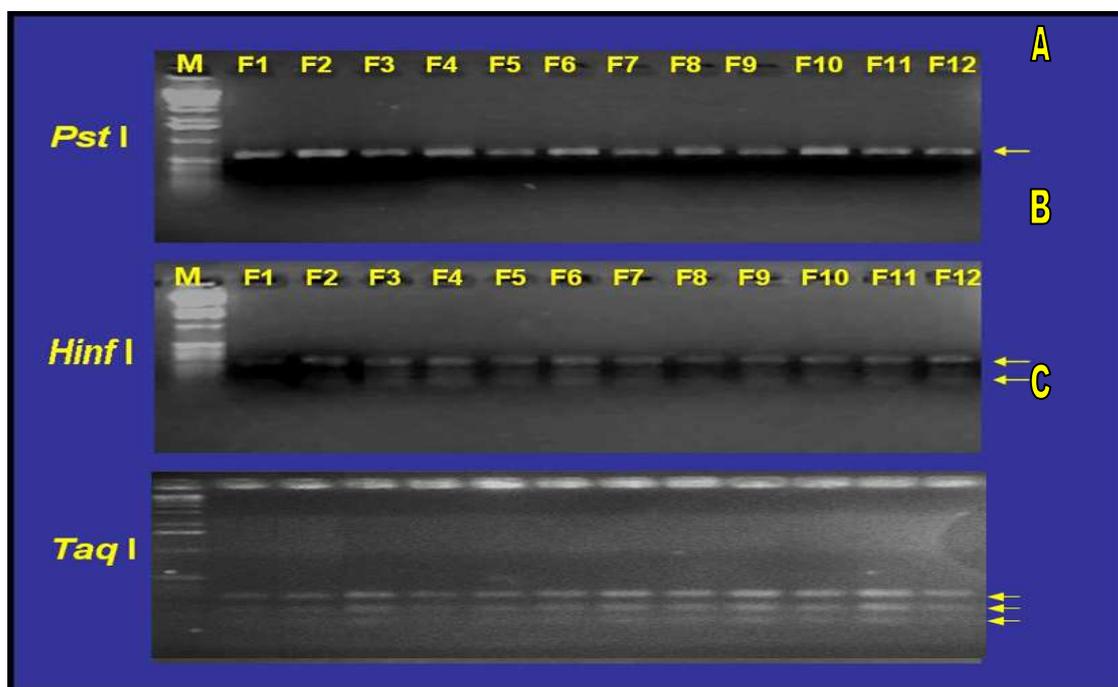


Figura 3. Digestões enzimáticas dos produtos de PCR da região ITS de 12 isolados de *Fusarium oxysporum*. M = marcador (1kb plus DNA Ladder). A, B e C = digestões com *Pst*I, *Hinf*I e *Taq*I, respectivamente. F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. X representa o isolado de *Crotalaria* sp.

A clivagem dos produtos de PCR dos diversos isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cupense*, com a enzima *Hinf*I gerou quatro perfis de bandas (dados não mostrados), todos os isolados apresentaram três sítios de clivagem, revelando um único haplotipo entre os isolados analisados. Resultados semelhantes foram observados por Otero *et al.*, 2004, em estudos da variabilidade de isolados de *V. dahliae* comparando sítios de restrição usando a mesma endonuclease, revelando padrões de RFLP idênticos para a enzima analisada.

A clivagem dos fragmentos de PCR amplificados a partir da região IGS dos genes 28S e 18S do rDNA, com a enzima *Eco*RI revelou diferentes perfis de bandas, indicando divergência na seqüência dessa região entre os isolados estudados corroborando com os resultados de KIN *et al.* (2001) e Llorens *et al.*

(2005). Conforme observado na Figura 4, a maioria dos isolados apresentou um único sítio de clivagem, o que resultou na visualização de duas bandas, contudo a localização desse sítio variou conforme o isolado considerado.

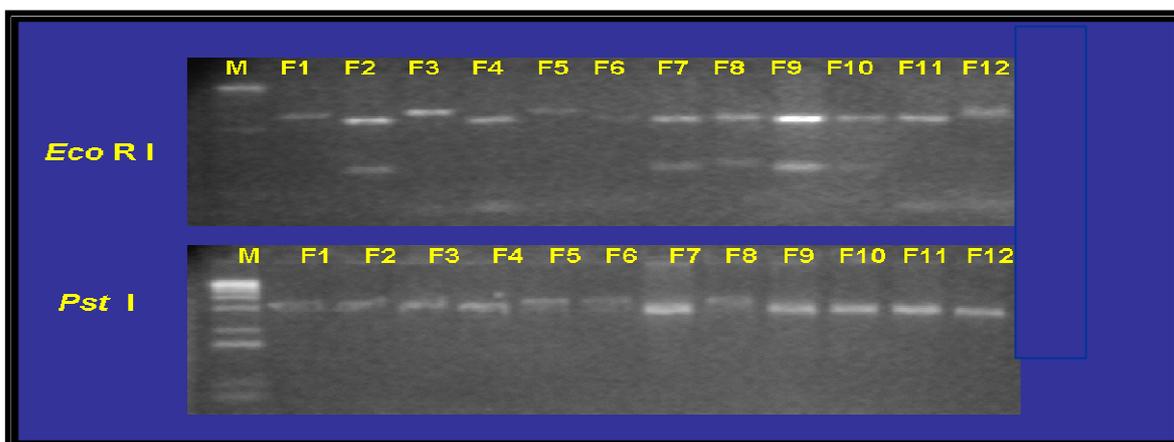


Figura 4: Fragmentos visualizados após incubação dos produtos de PCR da região IGS de isolados de *Fusarium oxysporum* com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. M = Marcador (1kb Plus DNA Ladder). F1 a F11 correspondem aos isolados 6, 9, 18, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 23, respectivamente. F12 representa o isolado de *Crotalaria sp.*

Padrões de RFLP do produto de PCR da região IGS, foram analisados por outros autores utilizando a enzima *EcoRI*, para caracterização de isolados de *F. oxysporum* e *V. dahliae*. Em alguns desses estudos, observaram-se diferentes haplotipos desses fungos fitopatogênicos (Otero *et al.*, 2004).

A digestão dos fragmentos de PCR da região IGS com a endonuclease *PstI* resultou em padrões de bandas ligeiramente diferentes, demonstrando que seis dos doze isolados não apresentavam sítios de restrição para esta enzima, enquanto que os outros seis apresentaram apenas um sítio de clivagem. (Figura 4). A hipótese de que esse sítio está localizado na extremidade do fragmento é suportada pelo fato de que apenas fragmento foi observado, indicando que o outro

fragmento deve ser de tamanho muito reduzido, o que impede sua visualização no gel.

Quando não se dispõem de seqüências do genoma, a clivagem de produtos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) tem sido muito utilizada para estimar a diversidade genética de vários fitopatógenos (Otero *et al.*, 2004). No entanto, essa técnica permite que apenas o sítio de reconhecimento da enzima (uma seqüência de 4 a 6 bases, dependendo da enzima) seja analisado. Dessa forma qualquer alteração fora dessa região permanece indetectada.

Em decorrência de sua fácil aplicação e de seu custo relativamente baixo, a técnica de PCR-RFLP, tem sido muito utilizada no estudo de variabilidade genética de fungos do gênero *Fusarium*. Por exemplo, Alves-Santos *et al.* (1999), também realizaram a clivagem das regiões IGS para demonstrar a existência de variabilidade entre isolados de *F. oxysporum* f. sp *phaseoli* do feijoeiro, enquanto Llorens *et al.* (2005), caracterizaram molecularmente, através de PCR-RFLP da região IGS, 44 isolados de *Fusarium* spp. Kin *et al.* (2001) encontraram variações dentro da região ITS e IGS de *formae speciales* de *F. oxysporum* através da digestão com enzimas de restrição.

De um modo geral a região IGS tem sido mais utilizada para esse tipo de estudo, pois se apresenta mais divergente que a região ITS. Além disso, a clivagem da região ITS normalmente resulta em fragmentos de tamanhos muito reduzidos e, conseqüentemente de difícil visualização nos géis.

As demais enzimas avaliadas (*Xho*I, *Mst*I, *Hin*FI) geraram padrões monoméricos e/ou duvidosos, por isso, seus resultados não foram apresentados.

4.3. Análise da diversidade genética entre isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* através de RAPD

Dentre os nove primers testados apenas dois não geraram padrões de amplificação. A utilização dos outros sete primers resultou num total de 61 bandas, todas polimórficas, ilustrando a alta variabilidade genética dos isolados estudados. Isso corresponde a aproximadamente 8,7 bandas por primers, valor considerado elevado para primers decâmeros (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Alguns padrões de amplificação são apresentados na Figura 5.

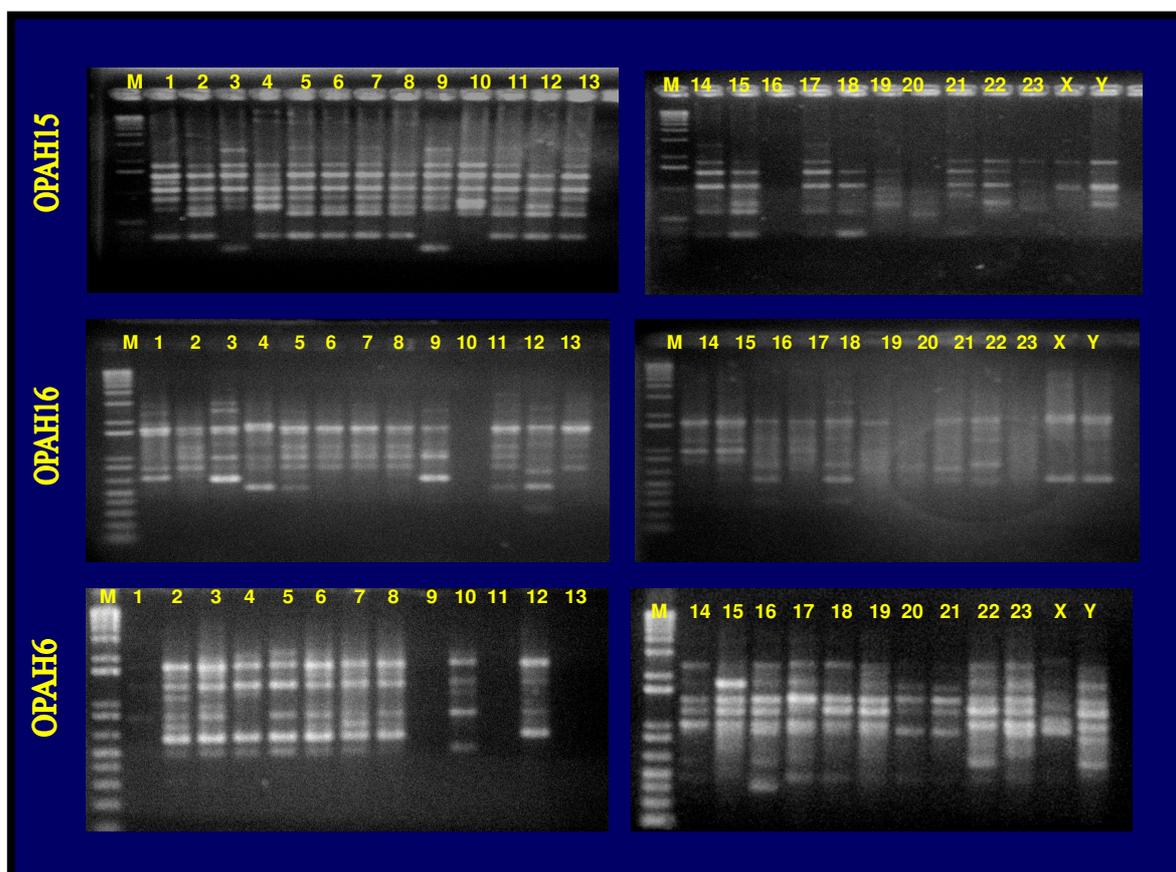


Figura 5. Padrões típicos de amplificação obtidos com os primers OPAH6; OPAH15 e OPAH16 de 23 isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (linhas 1 a 23) e 2 isolados de *F. oxysporum*, de *Crotalaria* sp. (X) e *Heliconia* sp. (Y). M = marcador (1 Kb Plus DNA Ladder).

A partir do perfil eletroforético, foi construída uma matriz de similaridade genética segundo o coeficiente de Jacard. Os dados obtidos revelaram similaridade de 9,7 a 85,1% (Apêndice 2). Os baixos valores de similaridade observados para algumas comparações, uma vez mais, ressaltam a diversidade genética de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. A alta variabilidade constatada é de certa forma surpreendente, principalmente se for considerado que esse fungo se reproduz predominantemente de maneira assexuada (Nozaki, 2003).

A árvore filogenética, construída através do programa *Treeview X* (método UPGMA), teve 100% de suporte estatístico, sugerindo a presença de três grupos genéticos distintos A; B e C (Figura 6). O grupo "A" foi o que deteve o maior número de representantes, os quais foram divididos em cinco "Operational Taxonomic Units" (OTU's) designados como *a1*, *a2*, *a3*, *a4*, *a5*, representado por isolados oriundos de Alagoas, Pernambuco, Bahia, Tocantins e Honduras (Figura 6).

O OTU "*a1*," representado pelos isolados 2; 6, 7; 8; 10, oriundos de Alagoas e, Bahia, apresentaram graus de similaridade variados, dos quais os isolados 6 e 8 tiveram suporte estatístico de 52% e similaridade genética de 85,18%. A similaridade existente entre os isolados 6 e 8 em relação ao isolado 2 foi de 73,33 e 77,78% com suporte estatístico de 58%, já para o isolado 7 foi 85,18 e 79,31% apresentando um suporte estatístico de 50%. A similaridade existente entre o isolado 10 com os isolados 2; 6; 7; 8 e 12 variou de 46,87 a 66,67%. A baixa similaridade do isolado 12 em relação aos demais do subgrupo "*a1*" demonstra o alto grau de variabilidade genética existente dentro deste subgrupo. Baseado nisso pode ser sugerido que o isolado o 12 surgiu de um ancestral comum mais distante que os demais.

O OTU "*a2*", formado pelos isolados 4 e 5, ambos procedentes de Alagoas, apresentou similaridade de 68%.

O OTU "*a3*", representado pelos isolados 14, 15, 21 e 22; apresentou suporte estatístico que variou de 13 a 36%. Os isolados 14 de Pernambuco e 22 de Honduras agruparam-se com 68,6% de similaridade e 36% de suporte

estatístico. A similaridade entre os isolados 15 e 21, foi de 54,5%, já a relação de similaridade entre os isolados 15 e 21 com isolado 14 e 22 variou de 54 a 64 %.

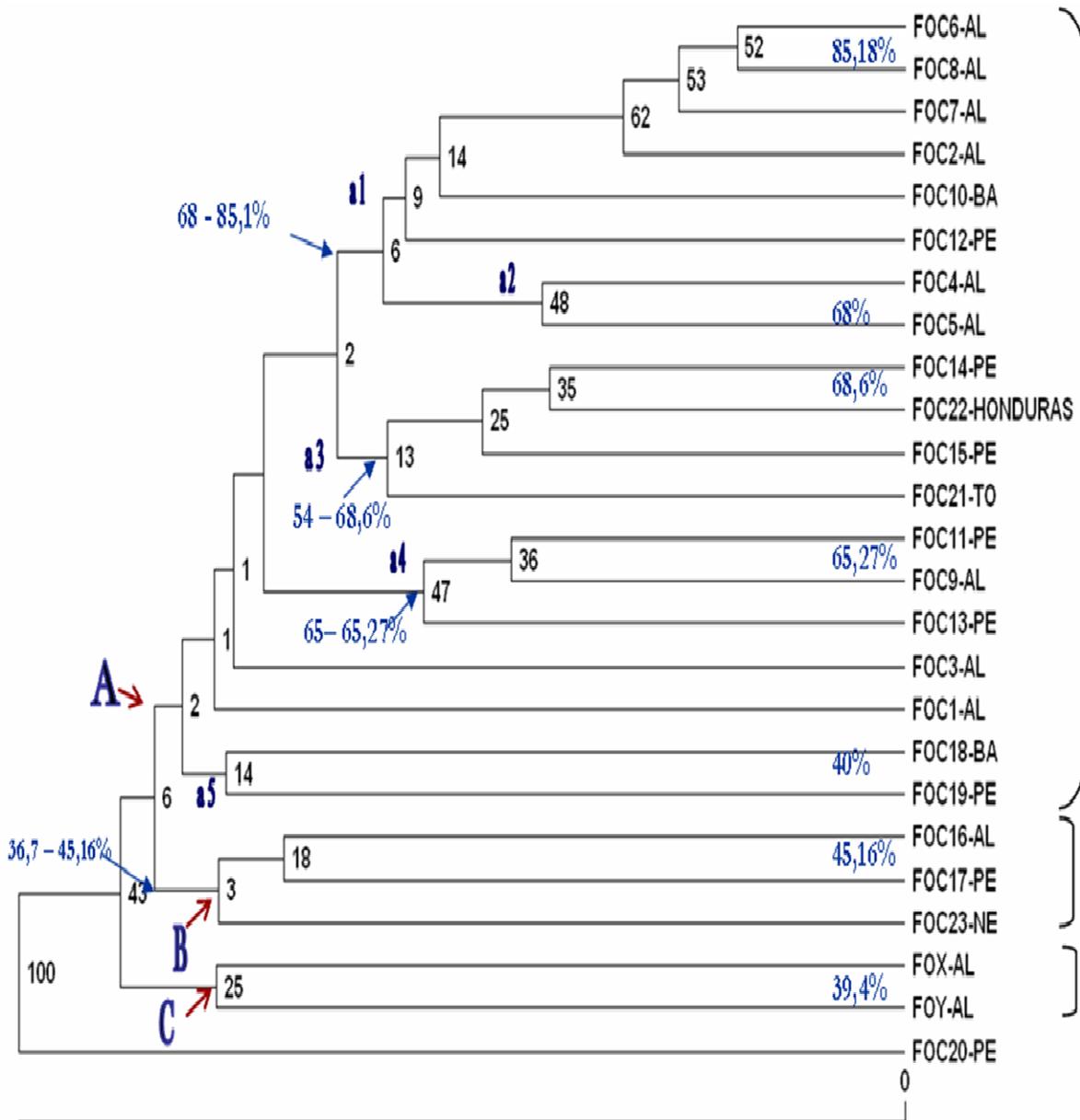


Figura 6. Árvore filogenética obtida pelo algoritmo UPGMA através do coeficiente de Jaccard, por RAPD dos 23 isolados de FOC e dois isolados de *F. oxysporum*. A, B e C correspondem aos três agrupamentos principais.

O OTU "a4", formado pelos isolados 9, 11 e 13, oriundos de Alagoas e Pernambuco, apresentou suporte estatístico que variou 38 a 47%. O OTU formado pelos isolados 9 e 11 apresentaram similaridade de 65,27 %. A relação entre o isolado 13 com os demais isolados deste subgrupo foi de 65 %. Os isolados 1 e 3 foram os que apresentaram menor similaridade genética entre os representantes do subgrupo A, por isso eles devem ter surgido de uma ancestral mais distante. A similaridade entre o isolado 1 e todos os isolados do subgrupo "A" variou de 28 a 46% e do isolado 3 de 25 a 55%, enquanto o OTU "a5", constituído pelos isolados 18 e 19, apresentou baixo suporte estatístico (14%) e similaridade de 40%.

O OTU "B", representados pelos isolados 16 e 17 e 23, teve suporte estatístico que variou de 3 a 20 %. O agrupamento formado pelos isolados 16 e 17 tiveram similaridade de 45,16 %, mas a similaridade entre 16-17 em relação ao 23 foi de 36,7 e 41,9 % respectivamente.

O OTU "C", formado pelos isolado de *F. oxysporum* de crotalária e hellicônia, ambos de Alagoas, apresentou suporte estatístico de 25 % e similaridade de 39,13 %. Sendo este o OTU que apresentou menor relação com os demais isolados, isso já era esperado, visto que os isolados representados eles não serem da *formae specialis cubense*. Isso demonstra a eficiência dos marcadores RAPD na distinção de táxons infraespecíficos.

O OTU formado por Foc20 de Pernambuco foi o mais basal de todos, sendo o que apresentou menor similaridade genética com os demais isolados, comportando-se como "grupos externo" Possivelmente a amostra pode ter sido contaminada ou mal caracterizada. Segundo Futuyma (1992) e Suzuki *et al.* (1998) organismos proximamente relacionados são descendentes de um ancestral mais recente, enquanto os organismos mais distantemente relacionados possuem ancestrais comuns mais distantes.

A variabilidade genética existente entre os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, não mostrou relação com a origem geográfica, visto que isolados de Alagoas, Pernambuco, Tocantins, Bahia e Honduras se agruparam no grande grupo "A". Esses dados se contrapõem a Galvão (2005), que testou a variabilidade

genética de isolados de *F. guttiforme*, agente da fusariose do abacaxi e de Martins (2005) que trabalhou com *Fusarium* spp., patogênicos ao tomateiro e à soja.

Apesar das limitações, a técnica de RAPD tem sido muito utilizada na detecção de variação intra e inter-específica em fungos fitopatogênicos (Assunção *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 2004a, Mehta *et al.*, 2004b). As maiores vantagens da técnica são a simplicidade de execução, o baixo custo e o fato de analisar o genoma por completo, inclusive regiões não codificantes, sem a necessidade prévia do conhecimento de seqüências do genoma Ferreira & Grattapaglia (1996). Outros métodos como PCR-RFLP e “southern blot” geralmente consideram uma ou poucas regiões específicas do genoma ou são operacionalmente mais complexos e de custo mais elevado.

4. 4. Análise filogenética dos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

O produto da reação de PCR da região espaçadora (IGS) apresentou cerca de 15ng/uL, concentração considerada insuficiente para reação de seqüenciamento que necessita de uma alíquota mínima de 20,4ng/uL. O eletroferograma gerado a partir deste seqüenciamento não eram confiáveis, por este motivo os resultados não foram mostrados neste trabalho.

No entanto, as amostras correspondentes à região ITS dos isolados 6, 9 e 18 foram determinadas e comparadas com outras seqüências depositadas no Genbank. Foram obtidas aproximadamente 70 seqüências com alto *score* e baixo *e-value* (Figura 7) Todas essas seqüências foram provenientes de *Fusarium* spp., sendo a maioria de *F. oxysporum*.

As seqüências da região ITS dos três isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* caracterizados nesse estudo apresentaram de 517 a 557 nucleotídeos.. Essas seqüências foram inicialmente alinhadas entre si, revelando similaridades entre 96 a 98 % (Apêndice 3). Os elevados valores de similaridade confirmam o alto grau de conservação dessa região genômica, conforme relatado por alguns autores (O'donnell, 1992; Edel *et al.*, 1995; Silva-Hanlin *et al.*, 1999).

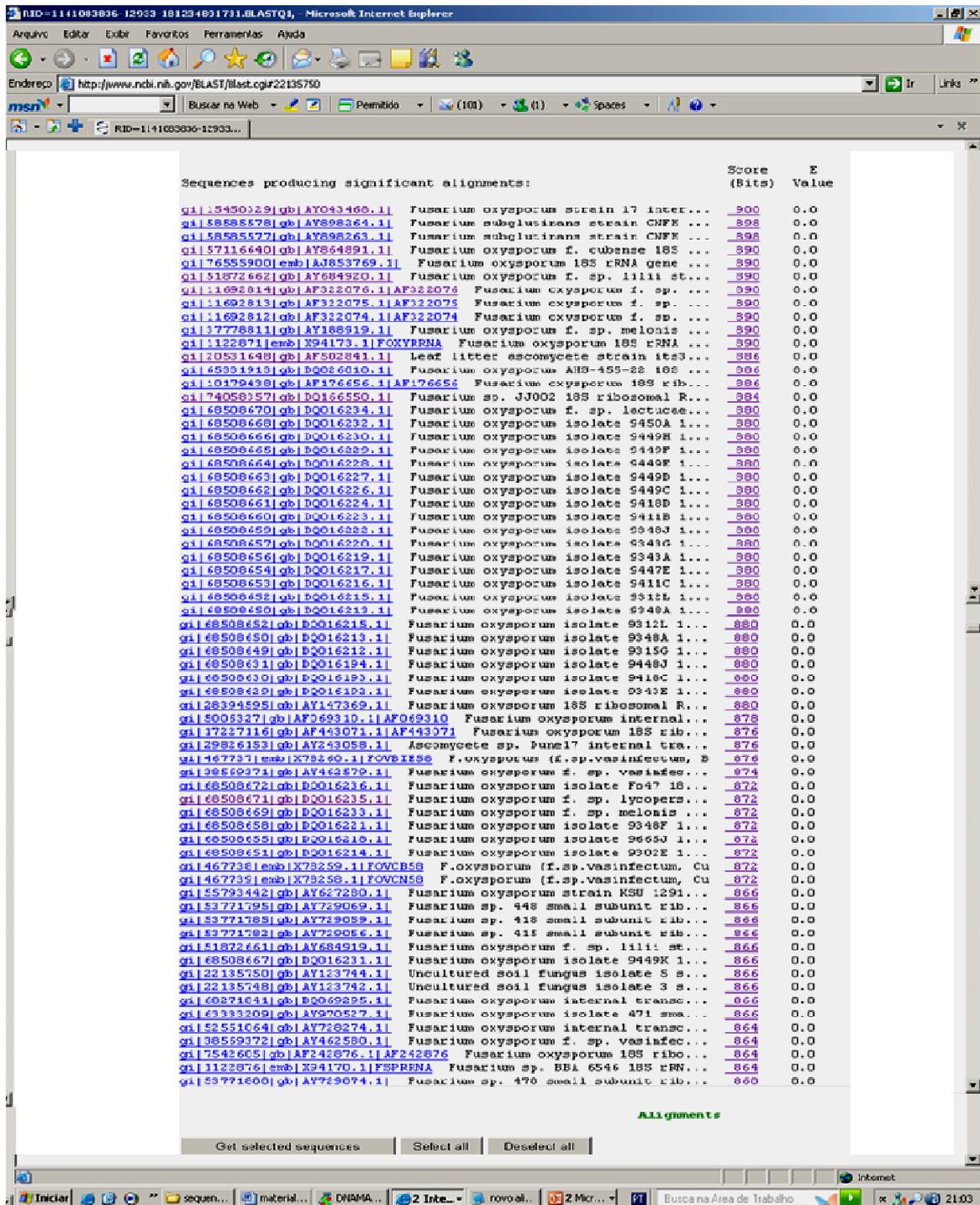


Figura 7. Seqüências depositadas no Genbank que apresentaram maiores Score e menores e-value com os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* caracterizados nesse estudo.

Com o alinhamento das seqüências correspondentes a região ITS verificou-se 51 sítios polimórficos (Figura 8). Dentre as alterações, constaram-se mudanças de nucleotídeos, inserções e deleções entre as posições 1 a 524 conforme a figura 9

DNAMAN File: Multiple Alignment			
FOC1	G G C G G G G A T C A . . . T T A C G A G T T . . . T A A A T C C C A A A C C C	34	
FOC2	C G G A G G G A T C A C . . . T T A C G A G T T A . . . C A A C T C C C A A A C C C	36	
FOC3	C G G A G G G A T C A C T A T T A C G A G T T T A C A A A C T C C C A A A A C C C	40	
Consensus	c g g a g g g a t c a c . . . t t a c g a g t t . . . t a a a t c c c a a a a c c c		
FOC1	T . . G T G A A C A T A A . . C A C T T T G . . T T G . C T C G G C G G A . . T C A	66	
FOC2	T . . G T G A A C A T A . . C A C T T T G . . T T G G C T C G G C G G A . . T C A	68	
FOC3	C T G C T G A A C A T T A C C A C T T T T G T T T T G G C T C G G C G A G A T C C A	80	
Consensus	t . . g t g a a c a t a a . . c a c t t t g . . t t g g c t c g g c g g a . . t c a		
FOC1	G C C C G C T C C C G G T A A A A C G G G A C G G G C C G C C A G A G G A C C	105	
FOC2	G C C G C T C C T C G G T A A A A C G G G A C G G G C C G N C A G A G G A C C	107	
FOC3	G G C C G C T C C C G G T A A A A C G G G A C G G G C C G C A G G A G G A A C C	120	
Consensus	g c c c g c t c c c g g t a a a a c g g g a c g g g c c g c c a g a g g a c c		
FOC1	C T A A A C T C . . . T G T T T C T A T A T G T A A C T T C T . . G A G T A A A A C	142	
FOC2	C T A A A C T C . . . T G T T T C T A T A T G T A A C T T C T . . G A G T A A A A C	144	
FOC3	C T A A A C T C C T T T G T T T C T A T A T G T A A C T T C T T . . G A G T A A A A C	160	
Consensus	c t a a a c t c . . . t g t t t c t a t a t g t a a c t t c t . . g a g t a a a a c		
FOC1	C A T A A . . A T A A A T C A A . . A A C T T T C A A . . C A A C G G A T C T C T T	178	
FOC2	C A T A A . . A T A A A T C A A . . A A C T T T C A A . . C A A C G G A T C T C T T	180	
FOC3	C A T A A C . . A T A A A T C A A C . . A A C T T T C A A C . . C A A C G G A T C T C T T	200	
Consensus	c a t a a . . a t a a a t c a a . . a a c t t t c a a . . c a a c g g a t c t c t t		
FOC1	G G T T C T G G C . . A T C G A T G A A G A A C G C A G C A A A A . . T G C G A T	215	
FOC2	G G T T C T G G C . . A T C G A T G A A G A A C G C A G C A A A A . . T G C G A T	217	
FOC3	G G T T C T G G C C A T C G A T G A A G A A C G C A G C C A A A C A T G C G A T	240	
Consensus	g g t t c t g g c . . a t c g a t g a a g a a c g c a g c a a a a . . t g c g a t		
FOC1	A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A . . T T C A G T G A A T C A T C G A A . . T	253	
FOC2	A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A . . T T C A G T G A A T C A T C G A A . . T	255	
FOC3	A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A A T T C A G T G A A T C A T C G A A C T	280	
Consensus	a a g t a a t g t g a a t t g c a g a a . . t t c a g t g a a t c a t c g a a . . t		
FOC1	C T T T G A A C G C A C A T T G C . . G C C C G C C A G T A T T C T G G C G G G C	292	
FOC2	C T T T G A A C G C A C A T T G C . . G C C C G C C A G T A T T C T G G C G G G C	294	
FOC3	C T T T G A A C G C A C A T T G C C . . G C C C G C C A G T A T T C T G G C G G G C	320	
Consensus	c t t t g a a c g c a c a t t g c . . g c c c g c c a g t a t t c t g g c g g g c		
FOC1	A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T T C A A C C C T C A A G C A C A . . G C T	331	
FOC2	A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T T C A A C C C T C A A G C A C A . . G C T	333	
FOC3	A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T T C A A C C C T C A A G C A C A C G C T	360	
Consensus	a t g c c t g t t c g a g c g t c a t t t c a a c c c t c a a g c a c a . . g c t		
FOC1	T G G T G T T G G G . . A C T C G C G T T A A A T T C G C G T T C C C A A A A T T G	370	
FOC2	T G G T G T T G G G . . A C T C G C G T T A A A T T C G C G T T C C T C A A A A T T G	372	
FOC3	T G G T G T T G G G A C T C G C G T N A A A T T C G C G T T C C T C A A A A T T G	400	
Consensus	t g g t g t t g g g . . a c t c g c g t t a a a t t c g c g t t c c c a a a a t t g		
FOC1	A T T G G C G G T C A C G T C G A G C T T C C A T A G C G T A . . G T A G T A A A	409	
FOC2	A T T G G C G G T C A C G T C G A G C T T C C A T A G C G T A . . G T A G T A A A	411	
FOC3	A T T G G C G G T C A C G T C G A G C T T C C A T A G C G T A A G T A G T A A A	440	
Consensus	a t t g g c g g t c a c g t c g a g c t t c c a t a g c g t a . . g t a g t a a a		
FOC1	A C C C T C G T T A C T G G T A A T C G T C G C G G C A C G C C G T T A A A . . C	448	
FOC2	A C C C T C G T T A C T G G T A A T C G T C G C G G C A C G C C G T T A A A . . C	450	
FOC3	A C C C T C G T T A C T G G T A A T C G T C G C G G C A C G C C G T T A A A A C	480	
Consensus	a c c c t c g t t a c t g g t a a t c g t c g c g g c a c g c c g t t a a a . . c		
FOC1	C C C A A C T T C T G A A T . . G T T G A C C T C G G A T C A G . . G T A G G A A T	486	
FOC2	C C C A A C T T C T G A A T . . G T T G A C C T C G G A T C A G . . G T A G G A A T	488	
FOC3	C C C A A C T T C T G A A T T G T T G A C C T C G G A T C A G C . . G T A G G A A T	520	
Consensus	c c c a a c t t c t g a a t . . g t t g a c c t c g g a t c a g . . g t a g g a a t		
FOC1	A C C C G G T G A A C T T A A G	502	
FOC2	A C C C G . . T G A A C T T A A G	503	
FOC3	A C C C G . . T G A A C T T A A G	535	
Consensus	a c c c g t g a a c t t a a g		

Figura 8. Alinhamento das seqüências da região ITS dos isolados 6 (FOC), 9 (FOC2) e 18 (FOC3)

POSIÇÕES	1	4	12	13	14	16	17	24	25	26	27	30	38	41	42	43	52	53	54	60	61	62	66	74	75	-
FOC1	G	G				T	A				T	A	C	T			A	A	G					G	A	
FOC2	G	G	C			T	A	A			C	C	C	T			A		G				G	G	A	
FOC3	C	A	C	T	A	A	C	T	A	C	A	C	A	C	T	G	T	A	C	T	G	T	G	A	G	

POSIÇÕES	76	77	78	129	130	151	166	176	186	187	210	224	233	234	261	279	298	357	371	380	393	432	479	494	510	525
FOC1			T									A								T	C					G
FOC2			T									A								T	C					
FOC3	A	T	G	C	T	T	C	C	A	C	C	C	C	A	A	C	C	C	C	C	N	T	A	A	T	C

Figura 9. Posições de alterações nas seqüências de nucleotídeos da região ITS dos isolados 6 (FOC1), 9 (FOC2) e 18 (FOC3) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Um alinhamento das seqüências dos três isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* juntamente com outras sete seqüências depositadas no Genbank também foi efetuado (Figura 9). Os dados desse alinhamento foram utilizados para gerar uma matriz que revelou graus de similaridade variando de 43 a 99,8 % (Figura 10).

Nessa análise, o isolado depositado no Genbank como *Fusarium oxysporum*, na verdade se tratava de *Fusarium solani*, proveniente do Brasil e depositado pelos pesquisadores Miller & Lopes em 2001, por este motivo este isolado apresentou similaridades baixas (cerca de 43 %) em relação a todos os outros isolados utilizados na comparação. A identificação equivocada desse isolado se fez importante neste trabalho, pois ilustra a importância da utilização de dados moleculares, juntamente com morfológicos e fisiológicos na identificação de fungos fitopatogênicos.

Os dados do alinhamento também foram empregados na construção de uma árvore filogenética, a qual se encontra representada na Figura 10. Percebe-se a formação de dois grupos ou que um deles (grupo "B") apresentou apenas o isolado de *F. oxysporum* (gi|15450329) do Brasil.

O grupo “A” foi constituído por nove isolados e apresentou alta similaridade (96,5 a 99,8 %). Verifica-se também, no apêndice 3, que os isolados 1 e 2 (FOC1 e FOC2) agruparam mais proximamente que o isolado 3 (FOC3). Esse resultado pode ser consequência do fato que os isolados FOC1 e FOC2 foram coletados de áreas mais próximas (Feliz Deserto-AL e Penedo-AL) que o isolado FOC3 (Cruz das Almas-BA). Ainda com relação ao grupo “A”, o isolado de *F. oxysporum* f.sp. *ubense* (gi|57116640) apresentou similaridade de 98,9% com FOC1, 98,0% com FOC2 e 97,2% com FOC3. Os isolados *F. oxysporum* f.sp. *ubense* (gi|57116640); *F. oxysporum* (gi|15450329); *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (gi|11692814); *F. oxysporum* f. sp. *luffae* (gi|34559404); *Fusarium* sp (gi|74058357); *F. subglutinans* (gi| 58585570); *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (gi|34559395) e *Fusarium subglutinans* (gi|58585570) apresentaram altas similaridades (98 a de 99,8 %) (Figura 10).

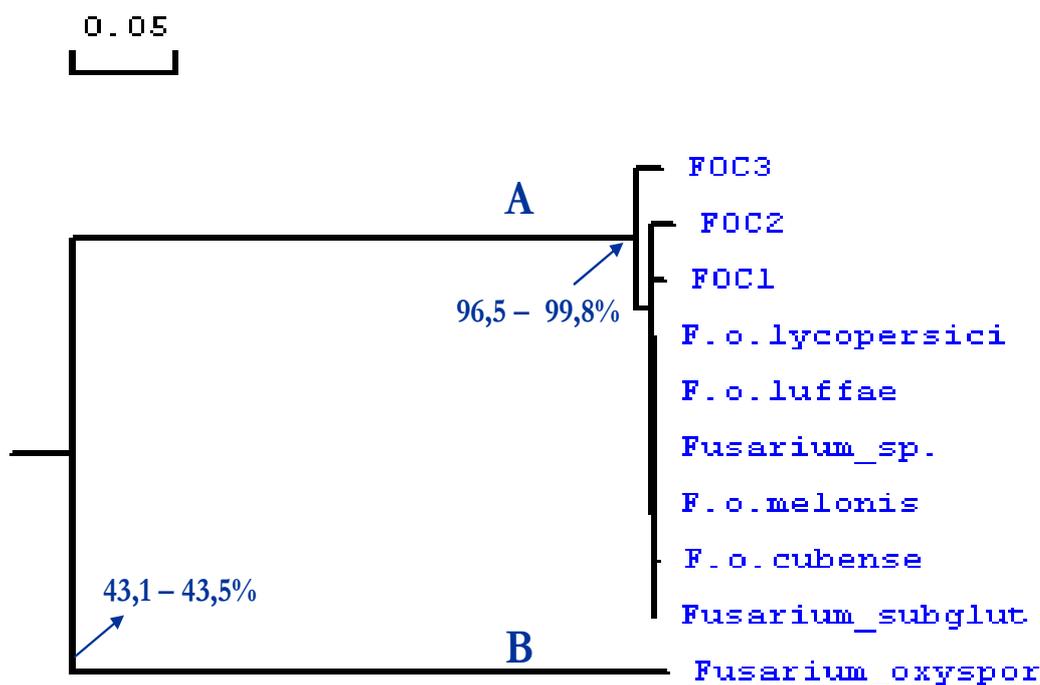


Figura 10. Árvore filogenética ilustrando a similaridade das seqüências das regiões ITS-5.8S rDNA, Análise baseada no método de “UPGMA”, construído com base em 1000 “bootstrap”.

No presente trabalho diferentes técnicas que se baseiam no DNA foram empregadas para demonstrar a alta variabilidade genética de isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, agente da fusariose da bananeira. Esse fato é preocupante, pois sugere uma maior dificuldade na adoção de medidas de controle como a utilização de cultivares resistentes e a aplicação de fungicidas.

V - CONCLUSÃO

A técnica de PCR-RFLP, com as enzimas testadas, foi pouco eficiente na demonstração da variabilidade entre os isolados.

A região IGS apresenta-se muito mais variável que a região ITS e, portanto, deve ser preferencialmente escolhida no estudo da variabilidade genética.

Utilizando-se a técnica de RAPD foi constatada uma alta variabilidade genética entre os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* estudados.

O agrupamento dos isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, com base nos dados de RAPD, não se relacionou com suas respectivas origens geográficas.

Apesar da região ITS ser considerada uma região com alto grau de conservação, foi possível detectar através do seqüenciamento várias posições que sofreram mutações.

As alterações ocorridas nas seqüências dos nucleotídeos podem alterar o sitio de reconhecimento das enzimas e assim gerar através de RFLP-PCR, polimorfismo, e conseqüentemente variabilidade genética.

V - REFERÊNCIAS

ALVES, E.J. **A Cultura da Banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais.** 2ª ed., ver.-Brasília: Agroindustriais: Embrapa-SPI/ Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF. 585p. 1999.

ALVES-SANTOS, F. M., BENITO, E. P., ESLAVA, A. P., & MÍNGUEZ J. M. D. **Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Strains from Common Bean Fields in Spain.** AEM (Applied and Environmental Microbiology). Vol. 65, No. 8.p. 3335-3340. August Salamanca, Spain,1999.

APPEL DJ, GORDON TR. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer (IGS) region of the ribosomalDNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:125–38. 1996

APPEL, DJ, GORDON TR.. **Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer (IGS) region of the rDNA.** *Exp. Mycol.* 19:120–28. 1995

ASSUNÇÃO, I.P.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; LIMA, G.S.A.; COELHO, R.S.B. **Análise de isoenzimas e RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.** XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. *Fitopatologia Brasileira*, v.22 p.245, 1997

BATISTA-FILHO, A. B. VI **Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Banana.** Instituto Biológico. 54p. São Bento do Sapucaí, 2002. . Anais

BORGES, A. L. (Org.); SOUZA, L.S. (Org.). **O cultivo da bananeira. 1. ed. Cruz das Almas**: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical,. v. 1. 279 p. 2004

BOOTH, C. *Fusarium*. **Laboratory guide to the identification of the major species**. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute. 1977.

BRASILEIRO, T. R. V., Variabilidade Genética em isolados de *Fusarium solane* detectada com a utilização de marcadores moleculares. 2003. 91p. Tese (Doutorado e genética) Universidade Federal de Pernambuco.

CARVALHO, G. A., SEDIYAMA, T, MARIN, A. L. A *et al.*, **Identification of RAPD markers linked to a soybean stem canker resistance gene**. *Fitopatol. bras.*, Sept./Oct. vol.27, no.5, p.474-478. ISSN 0100-4158. 2002

CASELA, C. R.. **Caracterização Molecular de microorganismo do ecossistema agrícola do cerrado**. II - *Colletotrichum graminicola*. Embrapa.-Milho e Sorgo. Comunicado técnico nº 68 Sete Lagoas/ MG.. ISSN-0168. 2003

CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de produção de banana para o Estado do Pará** Embrapa Mandioca e Fruticultura **Sistema de Produção**, 9ISSN 1678-8796 Versão eletrônica jan/2003. Http: //sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ Banana/BananaPara/mercado.htm . Visitado em Novembro de 2005

CORDEIRO, Z.J.M. **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. Ed.1, Brasília, DF: EMBRAPA: SPI. 106p. (publicações técnicas FrupeX).1995.

CORDEIRO, Z.J.M. **Doenças da bananeira**. In: . ALVES, E.J. (Org.)A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa-SPI;Cruz das Almas:Embrapa-CNPMPF, Cap. 13, p.353-408. 1997

CORDEIRO, Z.J.M.; KIMATI, H. **Doenças da bananeira**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.1, p.112-136, 1997

CORDEIRO, Z.J.M., SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; DANTAS, J.L.L. **Avaliação de resistência ao Mal-do Panamá em híbridos tetraplóides de bananeira**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 18, n.4.p. 478-483, 1993.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. **Análise de RAPD**. In: MILACH, S.C.K. (Ed.), **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p.107-116.

EDEL, V. STEINBERG, C., GAUTHERON, N., RECORBET, G. ALABOUVETTE, C. **Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France**. *FEMS-Microbiology Ecology*. n. 36 pág.61-71. France, 2001.

Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G., and Alabouvette, C. **Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains**. *Phytopathology* 85:579-585. 1995.

FAO **FAOSTAT-Agricultural statistics database**. Rome: World agricultural Information Centre, 2003 Dispo MEDINA, J.C. et al., *Banana: cultura, material-prima, processamento e aspectos econômicos*. 2. Ed. Campinas: ITAL, 1995. 301p. Disponível em: <http://www.fao.org/waicent/agricultult.htm>

FARIA, J.C. **DNAMAN.6**. Lynnon biosolt copyright Embrapa-CNPAP. DEMO. Brasil. 2005. Site: <http://www.lynnon.com/pc/framepc.html>. Vistado em 10 de janeiro de 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília. EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1996.

FIGUEIREDO, J. E. F.; PAOLI, H. C., QUINTÃO, P. L. COELHO, V. T. S., PINTO, N. F. J. *et al.*, **Caracterização Molecuçar de miroorganismo do ecossistema agricula do cerrado**. III – *Acremonium strictum*. Embrapa.-Milho e Sorgo. Comunicado bº 69. Sete Lagoas/ MG. 2003b. ISS1679-0162. Acesso em 02 de dezembro de 2005

FUTUYMA, D.J., *Biologia evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto, 646p. 1992.

GALVÃO, A. L. B. **Caracterização morfocultural e diversidade genética de *Fusarium guttiforme***. 2005. 128f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e proteção de Plantas) Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas-UFAL.. Rio Largo/AL..

GONÇALVES, J. S.; PEREZ, L. H. & SOUZA, S.A. M.: **Perspectiva econômica da banana não é negra e futuro indica: siga a modernidade e toca inovação**. *Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico Trabalho apresentado na XIII REFIB. 2005*

GORDON, T. R. & MARTYN, R. D. **The evolutionary biology of fusarium oxysporum**. *Annual Review of Phytopathology*, September 1 Vol. 35, Pages 111-128 (doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.111) 1997

GRAHAM, G.C. MEYERS, P.; HENRY, R.J. **A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis**. *BioTechniques*, 16:48-50. 1994

GUADET, J., JULIEN, J., LAFAY, J. F., & BRYGOO, Y. **Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison.** Mol. Biol. Evol. 6:227-242. 1989.

HWANG, SHING-CHUAN. **Somaclonal resistance in Cavendish banana to *Fusarium* wilt.** In: PLOETZ, R.C. *Fusarium wilt* of banana. 2ed. St. Paul, APS PRESS,. P.121-125. 1993

ITAL (Campinas, SP).1990., **Banana: Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** 3ª.ed. Campinas: ITAL, 302p. (ITAL. Frutas Tropicais, 3).1990.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** 2005. Site www.ibge.gov.br. Vistado em 10 de fevereiro de 2006.

IEA. **Instituto de Economia Agrícola.** Produção mundial de banana. Site <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4094>.

YLI-MATTILA. T., MACH, R.L., ALEKHINA, I.A., BULAT, S.A., KOSKINEN, S. KULLNIG-GRADINGER, C.M., KUBICEK C. P. & KLEMSDAL, S.S. **Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, h-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis.** International Journal of Food Microbiology n.95 pág. 267–285 Turku, Finland. 2004.

JESUS, J., CASCARDO, J. C. M., FIGUEIRA, A., SOUZA JÚNIOR, M.T., CORDEIRO, Z.J.M. **Uso de Marcadores RAPD no estudo de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Magistra.** Cruz das Almas-Ba, v. 7, maio/ago., 1995.

KELLY, A., ALCALÁ-JIMÉNEZ, A. R., BAINBRIDGE, B. W., HEALE, J. B., PÉREZ-ARTÉS, E., & JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.. **Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea.** *Phytopathology* 84:1293-1298. 1994

KIN, Hyun-Jung, CHOI ,YONG-Keel & MIN, Byung-Re. **Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales.** *The Journal of Microbiology*, Vol. 39, No. 4, p.265-272. Korea, december 2001.

KIN, D.H., MARTYN, R.D. & MAGILL, C.W. **Mitochondrial DNA (mtDNA) - Relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae.** *Phytopathology* 83:91-97. 1993.

KIN, D.H., MARTYN, R.D. & MAGILL, C.W. **Mitochondrial DNA (mtDNA) - Relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae.** *Phytopathology* 83:91-97. 1995

KISTLER, H. C.,& BENNY, U.. **The mitochondrial genome of *Fusarium oxysporum*.** *Plasmid* 22:86-89. 1989.

KURAMAE, E. E & SOUSA, N.L. **Variabilidade genética entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum lycopersici* através de RAPD e seqüências de regiões ITS do rDNA.** *Acta Scientiarum Maringá*, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002

KURAMAE-IZIOKA, E. E. **A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium Oxysporum* for RAPD.** *Revista Unimar*, Maringá, v.19, n.3, p.683-689, 1997.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.. **O impacto da biologia molecular na taxonomia de fungos.** In: Wilmar Cório da Luz. (Org.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. , 1998, v. 6, p. 197-

LLORENS, A.; HINOJO M.J.; MATEO, R.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T & VALLE-ALGARRA, F.M.; LOGRIECO, A. & JIMÉNEZ, M. **Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA).** *International Journal of Food Microbiology*. Applied and Environmental Microbiology. Article in press 10p Madrid, Madrid, Spain, 2005.

LODOLO, E.J., VANZYL, W.H., & RABIE, C.JA. **Rapid Molecular Technique to Distinguish *Fusarium* Species.** *Mycological Research* 97, 345-346. (1993).

MANICOM, B. Q., M. BAR-JOSEPH, A. ROSNER, H. VIGODSKY-HORS, and J. M. KOTZE. **Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*.** *Phytopathology* 77:669-672. 1987.

MANICOM, B.Q., BAR-JOSEPH, M., KOTZE, J.M. & BECKER, M.M. **A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.** *Phytopathology* 80:336-339. 1990.

MARTINS, M.K., **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp., e estudo da interação com plantas hospedeira.** *Escolola superior de agricultura*. Piracicaba/SP.. Tese de doutorado. 124p. Fevereiro de 2005

MATOS, A. P; CORDEIRO, Z. J. M, SILVEIRA; J. S; FERREIRA, D. M. V. **O Mal-do-Panamá ou Murcha de *Fusarium* da Bananeira.** In: Simpósio Norte Mineiro sobre a cultura da banana,1. 2001, Nova Porteirinha, MG. *Anais...* Nova Porteirinha: EPAMIG, 2001 p. 38-51.

MEHTA, Y.R., CASSETAR, I., NETO, D., PIZZINATO, M.A., TEIXEIRA, E.A., CUNHA, H.C. **Variabilidade genética entre os isolados de *Alternaria macrospora* do algodoeiro.** Summa Phytopathologica, 30, p.481-487, 2004a.

MEHTA, Y.R., MEHTA, A., RIEDE, C.R. **Variabilidade molecular e patológica entre os isolados de *Pyronophora citri-repentis* causando mancha amarela de trigo no estado do Paraná.** Summa Phytopathologica, 30, 436-444, 2004b.

MENEZES, M. & OLIVEIRA, S.M.A. **Fungos Fitopatogênicos.** Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 1993

MOREIRA, R. S. Banana In: **Enciclopédia Agrícola Brasileira/ESALQ.** São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, p.335-354, v.1.499p. 1995

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo.** 2. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. 1CDROM.

NELSON. A. J.; ELIAS, K.S.; ARÉVALO .E. G., DARLINGTON, L. C., and BAILEY B. A. **Genetic Characterization by RAPD Analysis of Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Erythroxyli* Associated with an Emerging Epidemic in Peru.** IN: Ecology and Population Biology. PHYTOPATHOLOGY Vol. 87, No. 12, 1997 p 120-126. Peru. 1997.

Nicholson, P.; Jenkinson, P.; Rezanoor, H.N., Parry, D.W. **Restriction fragment length polymorphism analysis of variation in *Fusarium* species causing ear blight of cereals.** Plant Pathology 42, 905– 914. 1993.

NOZAKI, D. N., Variabilidade Genética De *Fusarium Spp.* Isolado de solos e de bananeiras com sintomas do mal do Panamá. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Botucatu/Sp. 53f. Jan. 2003.

O'DONNELL, K; GRAY, L.E. **Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen fusarium solani f.sp. phaseoli inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification.** Mol. Plant-Microbe interact, St. Paul, v.8, p. 709-716, 1995

OLIVEIRA, V. C. & COSTA, J. S., **Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *f. solani* f. sp. *glycines*.** Fitopatol. bras. vol.27 no.6 Brasília Nov./Dec. 2002

OLESEN, K. **pDRAW32 DNA analysis software.** Acaclone softwore Rev. 1.1.88. 1999. Site :<http://www.bio.net/bionet/mm/bio-soft/1999-May/020732.html> visitado em 12 de janeiro de 2006.

OTERO L., DUCASSE, D.; MILLER R.N.; **Variability in ribossomal DNA genic spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts.** **Fitopatologia Brasileira**, 29, p.441-446, 2004

PAVLICEK, A, HRDA, S. & FLEGR, J. **FreeTree..** Program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap}jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Prague)* 45, 1999.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas.** Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003 (Circular técnica).

PEREIRA, J. C. R. ; PEREIRA, J. R. ; CASTRO, M. E.A ; GASPAROTTO, L. . **Ocorrência do mal-do-panamá em bananeiras do subgrupo Figo, em Piau, Minas Gerais.** **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza - CE, v. 30, n. 5, p. 554-554. ISSN 0100-4158. 2005

PETERSON, S.W. **Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequences comparisons.** *Phytopathology*, St. Paul, v.81, n.9, p.1051-1054, 1991.

PLOETZ, R.C. **Origins and relatedness of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum f. sp. Cubense*.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. V.18, Suplemento. P.254-255. 1993.

ROBINSON, J.C. **Bananas and Plantains. UK.** CAB International, 1996.

RODERIC, D. M. **TreeviewX** - Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology Institute of Biomedical and Life Sciences University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, UK. 2000. Site <http://darwin.zoology.gla.ac.uk/%7Erpage/treeviewx/> Visitado em 10 de janeiro de 2006

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003). **DnaSP**, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

SALOMÃO, L. C. C., SIQUEIRA, D. L., MOTOIKE, S. Y. **Cultura da Bananeira ed. 2. ed. Viçosa:** UFV-Minas Gerais. 38p. 2005.

SILVA, S. O; MATOS, A.P.; CORDEIRO, Z. J. M; LIMA, M. B. **Nova cultura de banana tolerante ao mal do Panamá.** Circular técnico n.68. Cruz das Almas/BA Dezembro de 2003.

SILVA-HANLIN ; W, D. M. ; MENEZES, M. ; HANLIN, R. T. ; RAMALHO-NETO ; E, C. **Ribosomal DNA sequencing data reveals low genetic variability AMONG *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* ISOLATES.** *FITOPATOLOGIA BRASILEIRA*, v. 24, n. 04, p. 534-539, 1999.

SOUZA, L. S. & Neto, R. D. V. **Cultivo da Banana para o Ecossistema dos Tabuleiros Costeiros. Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistema de Produção**, 4 ISSN 1678-8796 Versão eletrônica jan/2003. Site <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaTabCo steiros/mercado.htm> visitado em 10 de novembro de 2005.

Suzuki, DT *et al.* **Introdução a genética**. 6 ed. Guanabara Koogan. 1998.

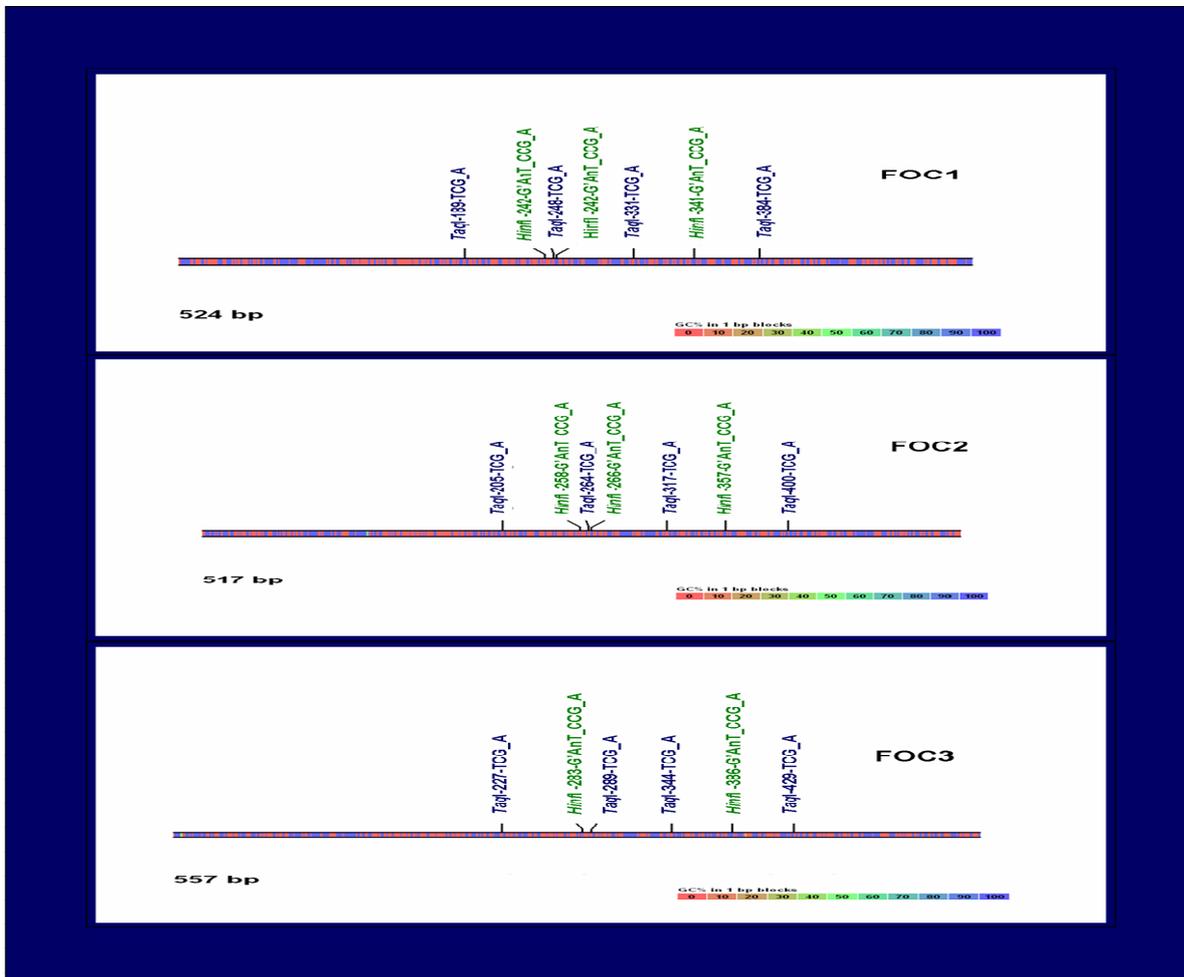
TEXEIRA, H., VIEIRA, M. G G. C. & MACHADO, J. C. **RAPD markers in the genetic diversity analysis of *Acremonium strictum* isolates**. *Fitopatol. bras.* [online]. Nov./Dec., vol.29, no.6. 2004 [cited 06 February 2006], p.651-655. Available from World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-4158200400600009&lng=en&nrm=iso. ISSN 0100-4158. Visitado em 12 de novembro de 2005.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR Protocols**, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEX, S.V. **DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic Acid Research* 18:6531-6535. 1990

VI - APÊNDECE



Apêndice 1. Mapa físico de restrição eletrônico dos isolados seqüenciados, gerado através do programa pDraw32, das seqüências FOC1, FOC2 e FOC3.

FreeTree - [C:\Documents and Settings\Jaqueline\Desktop\sequenciamento\RAPD\NOVA MATRIZ DE RAPD.txt]

File Window Help

Data input Distance/similarity matrix Reference tree Trees Resampling methods

B - Jaccard

Tree construction method
 UPGMA Neighbor-joining

	FDC1-AL	FDC2-AL	FDC3-AL	FDC4-AL	FDC5-AL	FDC6-AL	FDC7-AL	FDC8-AL	FDC9-AL	FDC10-AL	FDC11-P	FDC12-P	FDC13-P	FDC14-P	FDC15-P	FDC16-A	FDC17-P	FDC18-B	FDC19-P	FDC20-P	FDC21-T	FDC22-O	FDC23	FDX-AL	F0Y-AL
FDC1-AL	0,41935	0,35000	0,46154	0,40000	0,39394	0,41176	0,44828	0,40741	0,41379	0,46154	0,37500	0,37500	0,35135	0,37500	0,21212	0,30303	0,29125	0,30000	0,14286	0,26571	0,30556	0,14706	0,22222	0,23333	
FDC2-AL	0,41935		0,46341	0,51724	0,65517	0,73333	0,74194	0,77778	0,57143	0,51613	0,57143	0,56250	0,44444	0,64706	0,56250	0,35294	0,40000	0,34286	0,45161	0,26667	0,50000	0,51429	0,32353	0,25806	0,38710
FDC3-AL	0,35000	0,46341		0,35000	0,38095	0,55000	0,52281	0,48718	0,42105	0,39024	0,31707	0,39535	0,25641	0,50000	0,33333	0,30223	0,34091	0,29545	0,30952	0,26316	0,35556	0,36957	0,30952	0,19512	0,23256
FDC4-AL	0,46154	0,51724	0,35000		0,68000	0,48387	0,45455	0,50000	0,40741	0,51852	0,52000	0,46667	0,50000	0,47059	0,46667	0,37931	0,34375	0,29125	0,34483	0,18519	0,36364	0,46875	0,21875	0,26923	0,42308
FDC5-AL	0,40000	0,65517	0,38095	0,68000		0,66667	0,62500	0,58621	0,55556	0,50000	0,51538	0,50000	0,48000	0,63636	0,54839	0,37500	0,42424	0,32353	0,38710	0,24138	0,40000	0,50000	0,26471	0,27586	0,32258
FDC6-AL	0,39394	0,73333	0,55000	0,48387	0,66667		0,80645	0,85185	0,48387	0,58065	0,48387	0,57576	0,41379	0,70588	0,48571	0,33333	0,45714	0,36111	0,42424	0,25000	0,43243	0,48649	0,38235	0,24242	0,36364
FDC7-AL	0,41176	0,74194	0,52381	0,45455	0,62500	0,80645		0,79310	0,50000	0,59375	0,50000	0,58824	0,38710	0,66667	0,45946	0,28025	0,39474	0,30769	0,44118	0,27273	0,41026	0,46154	0,32432	0,22857	0,30956
FDC8-AL	0,44828	0,77778	0,48718	0,50000	0,58621	0,85185	0,79310		0,50000	0,66667	0,55556	0,60000	0,48000	0,63636	0,45455	0,29412	0,38235	0,32353	0,38710	0,20000	0,40000	0,45714	0,30303	0,19355	0,32258
FDC9-AL	0,40741	0,57143	0,42105	0,40741	0,55556	0,48387	0,50000	0,50000		0,32258	0,65217	0,33333	0,50000	0,42857	0,37500	0,21212	0,30303	0,24242	0,34483	0,23077	0,32353	0,30556	0,14706	0,22222	0,19355
FDC10-AL	0,41379	0,51613	0,39024	0,51852	0,50000	0,58065	0,59375	0,66667	0,32258		0,41379	0,46875	0,28571	0,51429	0,42424	0,38710	0,39394	0,29412	0,35484	0,20690	0,45455	0,56250	0,35484	0,24138	0,37931
FDC11-P	0,46154	0,57143	0,31707	0,52000	0,61538	0,48387	0,50000	0,55556	0,65217	0,41379		0,51724	0,65000	0,47059	0,46667	0,21212	0,30303	0,32258	0,34483	0,18519	0,40625	0,38235	0,14706	0,32000	0,27586
FDC12-P	0,37500	0,56250	0,39535	0,46667	0,50000	0,57576	0,58824	0,60000	0,33333	0,46875	0,51724		0,34483	0,55556	0,47059	0,24324	0,25641	0,38235	0,36364	0,22581	0,41667	0,43243	0,32353	0,34483	0,30303
FDC13-P	0,37500	0,44444	0,25641	0,50000	0,48000	0,41379	0,38710	0,48000	0,50000	0,28571	0,65000	0,34483		0,36364	0,39286	0,12903	0,25667	0,28571	0,25926	0,12500	0,29032	0,23529	0,09677	0,21739	0,18519
FDC14-P	0,35135	0,64706	0,50000	0,47059	0,63636	0,70588	0,66667	0,63636	0,42857	0,51429	0,47059	0,55556	0,36364		0,64706	0,40541	0,48649	0,43243	0,45714	0,25714	0,54054	0,68571	0,50000	0,32353	0,36111
FDC15-P	0,37500	0,56250	0,33333	0,46667	0,54839	0,48571	0,45946	0,45455	0,37500	0,42424	0,46667	0,47059	0,39286	0,64706		0,53333	0,53125	0,46875	0,40625	0,26667	0,54545	0,60606	0,40625	0,39286	0,38710
FDC16-A	0,21212	0,35294	0,30223	0,37931	0,37500	0,33333	0,28205	0,29412	0,21212	0,38710	0,21212	0,24324	0,12903	0,40541	0,53333		0,45161	0,34375	0,29125	0,25926	0,34286	0,48485	0,36667	0,25000	0,39286
FDC17-P	0,30303	0,40000	0,34091	0,34375	0,42424	0,45714	0,39474	0,38235	0,30303	0,39394	0,30303	0,25641	0,26667	0,48649	0,53125	0,45161		0,39394	0,29412	0,23333	0,38889	0,48571	0,41935	0,31034	0,35484
FDC18-B	0,29125	0,34286	0,29545	0,28125	0,32353	0,36111	0,30769	0,32353	0,24242	0,29412	0,32258	0,38235	0,28571	0,43243	0,46875	0,34375	0,39394		0,40000	0,25000	0,41176	0,47059	0,35484	0,33333	0,37931
FDC19-P	0,30000	0,45161	0,30952	0,34483	0,38710	0,42424	0,44118	0,38710	0,34483	0,35484	0,34483	0,36364	0,25926	0,45714	0,40625	0,29125	0,29412	0,40000		0,50000	0,43750	0,45455	0,33333	0,30769	0,31034
FDC20-P	0,14286	0,26667	0,26316	0,18519	0,24138	0,25000	0,27273	0,20000	0,23077	0,20690	0,18519	0,22581	0,12500	0,25714	0,26667	0,25926	0,23333	0,25000	0,50000		0,25806	0,24242	0,32000	0,35000	0,24000
FDC21-T	0,28571	0,50000	0,35556	0,36364	0,40000	0,43243	0,41026	0,40000	0,32353	0,45455	0,40625	0,41667	0,29032	0,54054	0,54545	0,34286	0,38889	0,41176	0,43750	0,25806		0,54286	0,48387	0,33333	0,33333
FDC22-O	0,30556	0,51429	0,36957	0,46875	0,50000	0,48649	0,46154	0,45714	0,30556	0,56250	0,38235	0,43243	0,23529	0,68571	0,60606	0,48485	0,48571	0,47059	0,45455	0,24242	0,54286		0,54839	0,40000	0,48387
FDC23	0,14706	0,32353	0,30952	0,21875	0,26471	0,38235	0,32432	0,30303	0,14706	0,35484	0,14706	0,32353	0,09677	0,50000	0,40625	0,36667	0,41935	0,35484	0,33333	0,32000	0,48387	0,54839		0,36000	0,35714
FDX-AL	0,22222	0,25806	0,19512	0,26923	0,27586	0,24242	0,22857	0,19355	0,22222	0,24138	0,32000	0,34483	0,21739	0,32353	0,39286	0,25000	0,31034	0,33333	0,30769	0,35000	0,33333	0,40000	0,36000		0,39130
F0Y-AL	0,23333	0,38710	0,23256	0,42308	0,32258	0,36364	0,30556	0,32258	0,19355	0,37931	0,27586	0,30303	0,18519	0,36111	0,38710	0,39286	0,35484	0,37931	0,31034	0,24000	0,33333	0,48387	0,35714	0,39130	

04:54

Apêndice 2. Matriz de similaridade genética, gerado pelo coeficiente de *Jaccard*, no programa *FreeTree* a partir de bandas obtidas por RAPD, de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense*.

SOLADOS	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10
F1 FOC1	100%									
F2 FOC2	98.3%	100%								
F3 F.o.melonis	98.9%	98.5%	100%							
F4 F.o.luffae	98.9%	98.5%	100.0%	100%						
F5 Fusarium_sp.	98.9%	98.5%	100.0%	100.0%	100%					
F6 F.o.lycopersici	98.9%	98.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100%				
F7 F.o.cubense	98.9%	98.0%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	100%			
F8 Fusarium_subglut	99.1%	98.3%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	100%		
F9 FOC3	97.0%	96.5%	97.6%	97.6%	97.6%	97.6%	97.2%	97.4%	100%	
F10 Fusarium oxyspor	43.3%	43.1%	43.5%	43.5%	43.5%	43.5%	43.5%	43.5%	43.6%	100%

Apêndice 3. Similaridades observadas entre os três isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense e outros isolados de *Fusarium* spp. cujas seqüências encontram-se depositadas no GenBank.