

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* ASSOCIADOS AO MARACUJAZEIRO¹

JEFERSON MATEUS DARIVA², ADELICA APARECIDA XAVIER³, MARCIA REGINA COSTA³,
REGINA CÁSSIA FERREIRA RIBEIRO³, TIAGO VIEIRA SOUSA⁴

RESUMO-Determinou-se a variabilidade genética de 37 isolados de *Fusarium solani* e 13 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* patogênicos ao maracujazeiro por meio do uso de marcadores ISSR e RAPD. Os isolados foram obtidos de maracujazeiros com sintomas de murcha, encontrados nas principais regiões produtoras do Norte Mineiro e no município de Sebastião Laranjeira – BA. Após obtenção de culturas monospóricas, os isolados tiveram seus DNAs extraídos e submetidos à reação de PCR. Foram selecionados nove primers ISSR e nove primers RAPD, e a análise de dados foi realizada, utilizando-se do coeficiente de similaridade de Jaccard. A partir da amplificação com os primers ISSR e RAPD, foram obtidos 121 e 126 locos, respectivamente, sendo que todos apresentaram polimorfismo entre, pelo menos, dois isolados. Demonstraram-se, por meio das análises ISSR, índice de similaridade genética interespecífica de 0,15 e índices de variabilidade intraespecífica de 0,27 a 0,92 para *F. solani* e de 0,30 a 0,89 para *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Já, por meio das análises RAPD, foram gerados índice de similaridade genética interespecífica de 0,11 e índices de variabilidade intraespecífica de 0,17 a 0,79 para *F. solani* e de 0,21 a 0,73 para *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. solani* agruparam-se em dois clusters distintos, e observou-se uma alta variabilidade intraespecífica nas duas espécies.

Termos para indexação: ISSR, RAPD, *Passiflorae edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., doenças de raiz.

GENETIC VARIABILITY OF *Fusarium solani* AND *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* ISOLATED ASSOCIATED WITH PASSION FRUIT

ABSTRACT - The diversity of 37 isolates of *Fusarium solani* and 13 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* was evaluated using ISSR and RAPD molecular markers. The isolates were obtained from passion fruit plants with wilt symptoms, found in the main producing regions of the Northern of Minas Gerais and Sebastião Laranjeira - BA. Molecular fingerprinting were obtained using DNA extract from mycelium of monosporic culture and nine ISSR and RAPD primers. Amplification with ISSR and RAPD primers generated 121 and 126 bands, respectively, all of which showed polymorphism between at least two isolates. ISSR analysis showed interspecific genetic similarity index of 0.15. The intraspecific variability was large, ranging from 0.27 to 0.92 for *F. solani* and from 0.30 to 0.89 for *F. o. f. sp. passiflorae*. The RAPD analysis generated interspecific genetic similarity index of 0.11 and intraspecific variability indices ranging from 0.17 to 0.79 for *F. solani* and from 0.21 to 0.73 for *F. o. f. sp. passiflorae*. The isolates of *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* and *F. solani* were clustered into two distinct groups. The intraspecific variability within the two species was high.

Index terms: ISSR; RAPD; *Passiflorae edulis* Sims f. *flavicarpa*, root diseases .

¹(Trabalho 119-14). Recebido em: 01-04-2014. Aceito para publicação em: 29-11-2014.

²Eng Agr. M. Sc Produção Vegetal no Semi-árido –UNIMONTES, Avenida Reinaldo Viana, 2.630, Bico da Pedra, CP 91, CEP: 39440-000 - Janaúba/MG, Brasil. E-mail: jmdariva@gmail.com

³Professora D.Sc–UNIMONTES, Avenida Reinaldo Viana, 2.630, Bico da Pedra, CP 91, CEP: 39440-000 Janaúba/MG, Brasil. E-mails: adelica@unimontes.br; regina.ribeiro@unimontes.br; marciarcosta2003@yahoo.com.br

⁴Doutorando em Genética e Melhoramento - UFV, Edifício Arthur Bernardes, sala 12, Viçosa-MG.CEP 36570-000. E-mail: tiago.vieira@ufv.br

INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro é afetada por um grande número de doenças, causadas por vírus, bactérias, nematoides e fungos. A podridão do colo e a murcha de *Fusarium* causadas por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (*Haematonectria haematococca* Berk e Br.) e *Fusarium oxysporum* Schelecht. f. sp. *passiflorae* Purss., respectivamente, constituem problemas fitossanitários de grande importância econômica nesta cultura no Brasil (FISCHER; REZENDE, 2008). Estes fungos são habitantes de solo e sobrevivem de forma eficiente na forma de clamidósporos no solo (AGRIOS, 2005), inviabilizando o cultivo sucessivo de maracujá na mesma área.

A estratégia mais segura para o controle destas doenças é a utilização de cultivares ou de porta-enxerto resistentes a estes patógenos. A seleção de genótipos dentro da espécie *Passiflora edulis* Simmonds tem sido relatada em diversos trabalhos (SILVA et al., 2013a). Entretanto, há uma grande variabilidade dentro do gênero *Passiflora* quando se estuda sua resposta à infecção por *Fusarium* spp. em condições controlada e de campo. Além da variabilidade intraespecífica do maracujazeiro, alguns estudos têm mostrado a ampla variabilidade de *Fusarium* spp. associado a este hospedeiro. Para seleção de espécies ou variedades resistentes, é essencial o conhecimento sobre a variabilidade da população do patógeno. Entretanto, estudos da variabilidade de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e de *F. solani* são escassos no Brasil. Miranda e Oliveira (2001) estudaram a variabilidade genética de 15 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* por meio de marcadores moleculares RAPD e verificaram alta variabilidade entre os isolados testados. Da mesma forma, Silva et al. (2013b), usando marcadores AFLP, observaram alta variabilidade entre os 14 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizados. Para *F. solani* oriundo de maracujá, Bueno et al. (2013) estudaram a variabilidade interespecífica de oito isolados por meio da inoculação em cinco diferentes hospedeiros, do sequenciamento da região ITS-5,8S e do fator de alongação 1 α (EF-1 α). Os autores observaram agrupamento distinto destes isolados quando comparados a outros isolados de *formae speciales* dentro da espécie, e sugerem a denominação de *F. solani* f. sp. *passiflorae* para os isolados de maracujá.

Os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados como ferramentas para a detecção de variabilidade genética em diferentes espécies fúngicas (GURJAR et al., 2009; SANTOS et al.,

2011; JEEWON et al., 2013; ZHENG et al., 2013; RAMPERSAD, 2013). Para a análise de variabilidade genética em fungos, diversos trabalhos têm mostrado uso de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) como técnicas complementares. O uso destes marcadores para analisar a variabilidade genética de uma população tem-se mostrado eficiente (BAYRAKTAR et al., 2008; BAYSAL et al., 2010; DUBEY; SINGH, 2008). Assim, este trabalho avaliou a variabilidade genética de isolados de *F. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* oriundos de maracujazeiros por meio de marcadores moleculares dos tipos RAPD e ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 13 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e 37 de *F. solani* da coleção de isolados do laboratório de Fitopatologia da Unimontes-MG. Os isolados monospóricos foram obtidos de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* nos municípios de Espinosa, Jaíba, Januária e Nova Porteirinha, no Estado de Minas Gerais e no município de Sebastião Laranjeira, na Bahia (Tabela 1).

Para a extração do DNA, os isolados foram multiplicados em meio de cultura Malte-Ágar (MA: 20 g de Malte; 20 g de Ágar) por 15 dias, a 25 °C, no escuro. O micélio aéreo foi retirado da placa e foi transferido para um tubo de microcentrifuga, e com o auxílio de bastão metálico foi triturado na presença de nitrogênio líquido e misturado com 100 μ L de tampão de extração (55 mM CTAB; 100 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl) e 2 μ L de β -mercaptoetanol. A mistura foi incubada a 65° C durante 30 minutos e, posteriormente, foi acrescentado 66,6 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para centrifugação, por 5 minutos, a 18.400 g (temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual se adicionaram 66,6 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se conforme descrito anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 100 μ L de isopropanol, incubado no gelo por 10 minutos e centrifugado a 18.400 g por 5 minutos. A precipitação ocorreu com isopropanol (100 μ L) em gelo por 10 minutos e centrifugado a 18.400 g por 5 minutos. O precipitado, após lavado com etanol a 70% duas vezes e seco à temperatura ambiente, foi ressuspenso em 40 μ L de água ultrapura.

Para a amplificação do DNA dos isolados de *Fusarium* spp., foram utilizados nove *primers* ISSR. Os *primers* utilizados para a amplificação foram da coleção UBC (*Primers* desenvolvidos

pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Columbia Britânica, coleção nº 9). Para cada *primer*, testaram-se as temperaturas de anelamento, entre 54 e 60°C, e foi utilizada a temperatura de anelamento que gerou maior número de bandas nítidas, em testes preliminares.

A amplificação foi a partir de 2,5ng de DNA; 1X Tris-HCl/KCl pH 8,3 (10 mM/50 mM), MgCl₂ (25 mM), 0,2 µM dNTPs de cada, 0,4 µM do *primer*, Taq DNA polimerase 0,6 U e água ultrapura para completar o volume de 10 µL. As reações foram constituídas de uma fase inicial de desnaturação a 94 °C, por 4 minutos, seguida por 35 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, anelamento (1 minuto na melhor temperatura para cada *primer*) e extensão a 72 °C, por 2 minutos, e uma fase de extensão final de 72 °C, por 7 minutos. Logo após, a temperatura foi reduzida a 10° C até a retirada das amostras. A amplificação foi realizada em termociclador TECHNE Modelo TC-412.

Nas análises de RAPD, foram utilizados nove *primers* RAPD. As reações de amplificação seguiram as seguintes concentrações finais: DNA genômico (30 ng/µl); 1X Tris-HCl/KCl (10mM/50mM); MgCl₂ (2,8 mM); dNTPs (0,1 mM de cada); *primer* (5 µM); Taq DNA polimerase (1 U), e água ultrapura para completar 25 µL. As amplificações foram efetuadas sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C, por 3 minutos; 40 ciclos de 94°C, por 15 segundos; 35°C, por 30 segundos, e 72°C, durante 1 minuto; e finalmente, um ciclo a 72°C por 7 minutos. Logo após, a temperatura foi reduzida a 10° C até a retirada das amostras. Os *primers* foram tomados ao acaso e adquiridos do Kit Operon®.

Os produtos amplificados nas reações de RAPD e ISSR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 100 V, em tampão TBE 1X, por aproximadamente duas horas, e corados em solução de brometo de etídeo a 0,2 mg/L, por 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de Fotodocumentação UVP® *Life Science software*.

Os dados obtidos por meio da eletroforese foram registrados na forma de presença e ausência de bandas nos géis fotografados. O cálculo de similaridade genética entre os genótipos foi realizado com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, conforme a seguinte fórmula:

$$S_{ij} = a/(a+b+c).$$

em que, a é o número de locos comuns aos genótipos i e j; enquanto b e c são os números de

locos presentes apenas em cada um dos genótipos. A partir das distâncias genéticas foi realizada a análise de agrupamento, um dendrograma utilizando-se do Método da Ligação Média entre Grupo (UPGMA). A correlação entre as matrizes de distâncias genéticas geradas pelos marcadores RAPD, foi estimada pelo teste de Mantel, com 1.000 permutações. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico Genes (CRUZ, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nove *primers* ISSR utilizados nas reações de PCR geraram 121 locos polimórficos, entre os 50 isolados de *Fusarium* spp. testados (Tabela 2). Os *primers* UBC880 e UBC873 (Figura 1) geraram maior número de locos, e os *primers* UBC810 e UBC807 amplificaram menor número.

Observaram-se dois *cluster* com 15% de similaridade entre eles no dendrograma gerado pelo método de agrupamento, baseado nos marcadores ISSR (Figura 2). Em cada *cluster*, foram agrupados os isolados pertencentes à *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. solani*. Resultados semelhantes foram obtidos por Bayraktar e Dolar (2011) ao analisarem a diversidade genética de 70 isolados de *Fusarium* spp., associados às doenças radiculares e do disco basal de cebola (*Allium cepa* L.). Por meio da utilização de *primers* ISSR, os autores obtiveram sete grupos distintos de isolados, compostos por *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. proliferum*, *F. redolens*, *F. acuminatum*, *F. culmorum* e *F. solani*, revelando a potencialidade da técnica em distinguir indivíduos de espécies diferentes, contribuindo de forma adicional ao processo de identificação de isolados.

Neste trabalho, as análises com marcadores ISSR, além de auxiliar na confirmação da classificação morfológica das espécies, mostraram alta variabilidade genética intraespecífica. Dentre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, o índice de similaridade variou de 0,30 a 0,89, enquanto para os isolados de *F. solani* variou de 0,27 a 0,92. Aproximadamente 54% dos isolados dentro de cada espécie apresentaram acima de 60% de similaridade. Bayraktar et al. (2008) analisaram 74 acessos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolados de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) provenientes de 13 províncias da Turquia, por meio do uso de *primers* ISSR e RAPD, e verificaram valores médios de similaridade genética superiores a 60%. Armegol et al. (2010) utilizaram *primers* ISSR e também encontraram valores de similaridade genética intraespecífica superiores a 60% para 17 isolados de *Rosellinia necatrix*. Entretanto, neste

trabalho, observou-se alto percentual de isolados com similaridade inferior a 55%, como ocorreu entre o isolado FOP 30 e os demais isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* que apresentaram valores médios de 30% de similaridade. Da mesma forma, valores de similaridade de 27% foram observados entre FS 19, FS 21 e FS 23 e outros 34 isolados de *F. solani*. Estes valores podem ser considerados baixos se comparados aos valores encontrados na literatura que geralmente são superiores a 50%, quando a comparação é feita dentro de uma espécie. A baixa similaridade genética entre isolados da mesma espécie evidencia a existência de alta variabilidade intraespecífica. No trabalho de Silva et al. (2013b), 14 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* da Bahia foram agrupados por meio de marcadores AFLP. Os autores observaram alta diversidade entre os isolados, e dois não foram agrupados aos demais isolados.

Nove dos 20 *primers* de RAPD testados apresentaram padrões de amplificação bem definidos em testes preliminares com dois isolados de *F. oxysporum* e dois de *F. solani*. Estes foram utilizados para a análise de variabilidade dos isolados e amplificaram 126 fragmentos, sendo todos locos polimórficos (Tabela 3).

Da mesma forma que na análise de ISSR, o agrupamento por RAPD separou em dois cladogramas os isolados pertencentes às duas espécies estudadas. No dendrograma (Figura 3), houve a formação de dois ramos distintos, uma para os isolados de *F. oxysporum* e outro para *F. solani*. Resultados semelhantes foram obtidos por Chiocchetti et al. (1999), utilizando marcadores RAPD. Os autores diferenciaram *F. oxysporum* f. sp. *basilici* de outros *F. oxysporum* testados.

Os dados gerados pela análise RAPD também demonstram alta variabilidade intraespecífica dos isolados estudados. Os índices de similaridade genética dentro de cada uma das espécies, gerados por estes marcadores, foram ainda menores do que aqueles gerados pelos marcadores ISSR, acusando maior variabilidade. Para os isolados de *F. solani* os índices de similaridade variaram de 17 a 79%, e para *F. oxysporum* f. sp. *Passiflorae*, de 21 a 73%. Da mesma forma que observado neste trabalho, Miranda e Oliveira (2001) verificaram alta variabilidade entre os 15 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* oriundos de maracujazeiro cultivado em Pernambuco. A presença de índices de similaridade mais baixos, gerados no agrupamento de RAPD, pode estar relacionada com o fato de este marcador utilizar *primers* de sequência arbitrária, enquanto os marcadores ISSR se baseiam em sequências repetidas de nucleotídeos que amplificam

regiões conservadas do DNA, localizadas entre as sequências microssatélites (ZIETKIEWICZ et al., 1994; NAYAKA et al., 2011).

Os resultados das análises com marcadores ISSR e RAPD foram muito semelhantes, pois apresentaram clara distinção entre as duas espécies de *Fusarium* spp., além de revelar alto grau de variabilidade intraespecífica dos isolados. A correlação entre as matrizes formadas pelos marcadores RAPD e ISSR foi positiva (0,82) e significativa a 1% de probabilidade. Além disso, não houve o agrupamento de isolados de acordo com a região geográfica da qual são provenientes, não havendo, portanto, neste estudo, correlação entre variabilidade genética e origem geográfica dos isolados de *Fusarium* spp. Entretanto, em maracujazeiro, essa correlação foi observada por Munhoz et al. (2011) ao estudarem a diversidade genética de 87 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* por meio de AFLP. Os autores observaram aproximadamente 50% de variabilidade entre os isolados de diferentes regiões, e 36% de variabilidade dentro da região de origem.

O alto grau de variabilidade intraespecífica observado entre isolados de *F. oxysporum* é frequentemente relacionado com parassexualismo e mutação, mecanismos de extrema importância na geração de variabilidade genética em populações de fungos anamórficos (AGRIOS, 2005).

A alta variabilidade genética encontrada entre os isolados de *F. solani* pode estar associada a dois fatores principais. Primeiro, porque *F. solani* possui uma fase sexuada, pertencente ao gênero *Haematonectria*, onde há a recombinação genética e a possibilidade de cruzamento entre indivíduos diferentes, gerando variabilidade genética. Segundo, porque *F. solani* tem sido considerado por muitos autores como um complexo de espécies (O' DONNELL, 2000; NAYAKA et al., 2011) e, neste caso, o grupo de isolados identificados morfológicamente como *F. solani* pode pertencer a espécies biológicas distintas. Entretanto, não há relatos da existência de espécies distintas pertencentes a este complexo de espécies, que sejam patogênicas ao maracujazeiro.

Observa-se, pelo dendrograma formado nas análises com marcadores ISSR, que dentro da ramificação que engloba os isolados de *F. solani* existe uma subdivisão que separa os isolados FS19, FS21 e FS23 dos outros 34 isolados, com média de 27% de similaridade entre estes grupos. O mesmo ocorre nas análises RAPD para o isolado FS19, diferindo-o dos outros 36 isolados de *F. solani*, com índice de similaridade de apenas 17%. O fato de

o isolado FS19 apresentar esta distinção genética pode ser um indício para a existência de espécies biológicas distintas dentro do grupo de isolados

identificados morfologicamente com *F. solani*, na cultura do maracujazeiro. Entretanto, novas pesquisas devem ser realizadas, para investigar a existência desta distinção.

TABELA 1 - Identificação dos isolados relacionados com o município de origem.

Isolado	Município	Espécie
FOP 10	Januária – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 13	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 17	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 25	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 30	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 32	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 33	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 35	Jaíba – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 26	Nova Porteirinha – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 27	Nova Porteirinha – MG	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 70	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 77	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FOP 78	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. oxysporum</i> . f. sp. <i>passiflorae</i>
FS 39	Espinosa – MG	<i>F. solani</i>
FS 40	Espinosa – MG	<i>F. solani</i>
FS 41	Espinosa – MG	<i>F. solani</i>
FS 42	Espinosa – MG	<i>F. solani</i>
FS 43	Espinosa – MG	<i>F. solani</i>
FS 14	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 19	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 21	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 23	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 31	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 34	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 36	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 37	Jaíba – MG	<i>F. solani</i>
FS 01	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 05	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 07	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 08	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 28	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 29	Januária – MG	<i>F. solani</i>
FS 44	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 45	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 46	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 47	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 48	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 50	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 52	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 53	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>

Isolado	Município	Espécie
FS 55	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 57	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 65	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 67	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 71	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 72	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 75	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 79	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 80	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>
FS 82	Sebastião Laranjeira – BA	<i>F. solani</i>

TABELA 2 - Sequência de *primers* e temperatura de anelamento utilizados nas reações de ISSR, com o número total de fragmentos utilizados para determinar a similaridade genética entre os isolados de *Fusarium* spp.

Primers ISSR	Sequência (5'→3')	TA(°C)	NFP ¹	NFA ²
UBC 807	AGAGAGAGAGGAGAGT	46	10	10
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAT	56	4	4
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAA	46	10	10
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGYT	46	13	13
UBC 861	ACCACCACCACCACC	50	11	11
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	46	19	19
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	46	25	25
UBC 889	DBDACACACACACAC	50	15	15
UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	46	14	14
Total	-	-	121	121

¹Número de fragmentos polimórficos; ² Número de fragmentos amplificados.

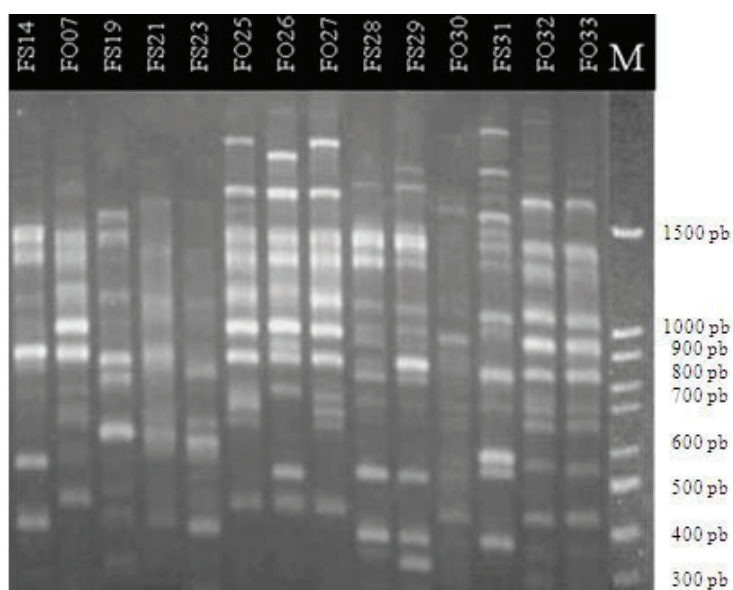


FIGURA 1- Padrão de amplificação de DNA dos isolados de *Fusarium oxysporum* (FO) e *Fusarium solani* (FS) com o *primers* ISSR UBC873. M: Marcador de peso molecular (100 pb).

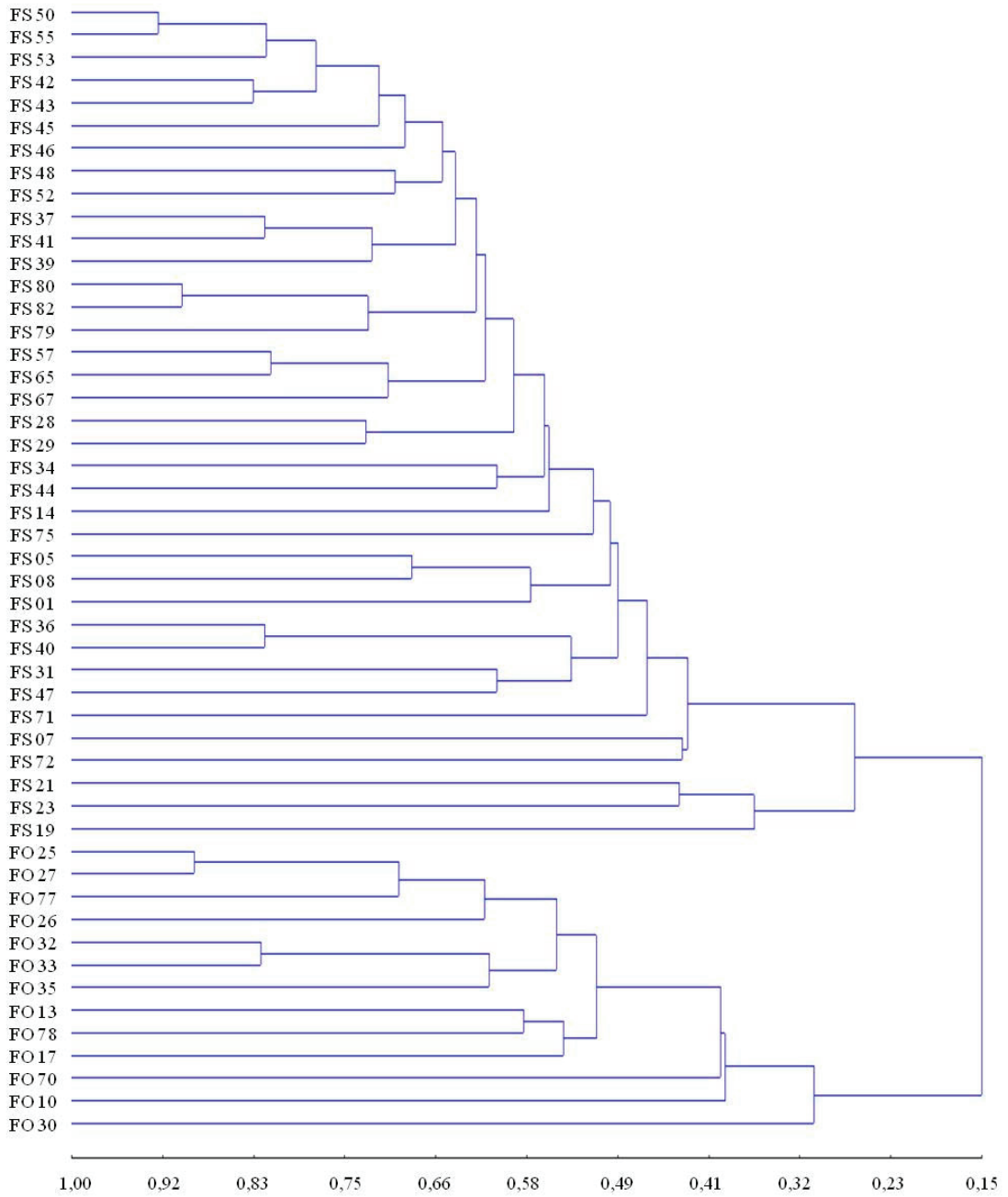


FIGURA 2 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA a partir de dados de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard, entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) e *Fusarium solani* (FS) baseados por marcadores ISSR.

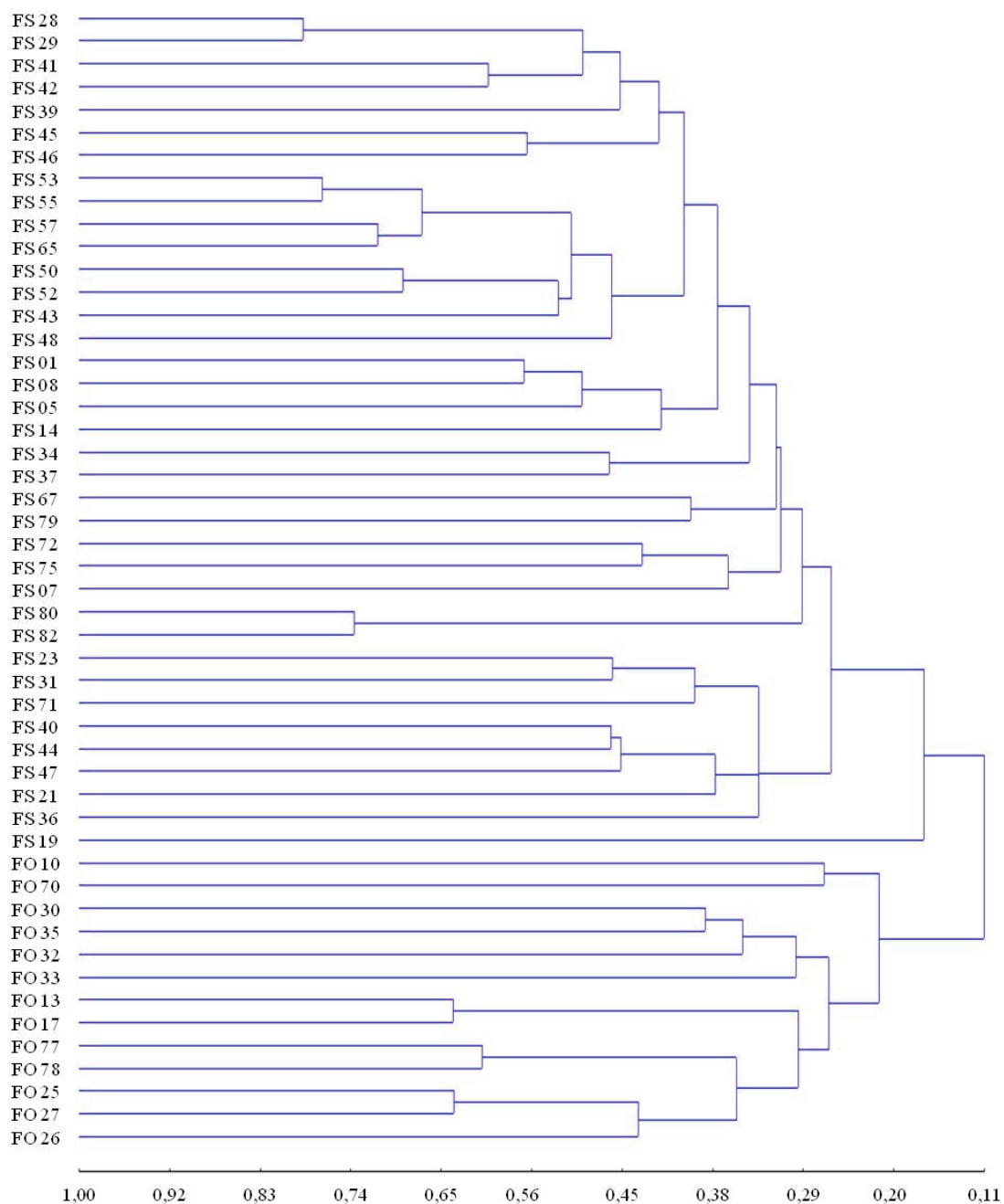


FIGURA 3 - Dendrograma obtido pelo agrupamento UPGMA a partir de dados de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard, entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FO) e *Fusarium solani* (FS) baseados por marcadores RAPD.

TABELA 3 - Sequência de *primers* usados nas reações de RAPD, com o número total de fragmentos utilizados para determinar a similaridade genética entre os isolados de *Fusarium* spp.

Primers RAPD	Sequência (5'→3')	NFP ¹	NFA ²
OPA 06	GGTCCCTGAC	11	11
OPC 10	TGTCTGGGTG	14	14
OPC 14	TGCGTGCTTG	10	10
OPH 11	CTTCCGCAGT	14	14
OPH 18	GAATCGGCCA	15	15
OPN 11	TCGCCGCAAA	18	18
OPV 17	ACCGGCTTGT	10	10
OPW 02	ACCCCGCCAA	20	20
OPY 20	AGCCGTGGAA	14	14
Total	-	126	126

¹Número de fragmentos polimórficos; ² Número de fragmentos amplificados.

CONCLUSÃO

As análises ISSR e RAPD revelam uma população com alta variabilidade genética intra e interespecífica e possibilitam agrupar os isolados por espécie, separando os isolados identificados como *F. solani* daqueles identificados como *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapemig pela concessão de bolsa de BIPDT e mestrado.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

ARMENGOL, J.; VICENT, A.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.. Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). **Plant Pathology**, oxford, v. 185, n.1, 2010.

BAYRAKTAR, H.; DOLAR, F. S. Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.159, n.1, p. 28–34, 2011.

BAYRAKTAR, H.; DOLAR, F. S.; MADEN, S. Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n.3, p. 146-154, 2008.

BAYSAL, O.; GUMRUKCU, M. E.; ZENGİN, S.; CARIMI, F.; SAJEVA, M.; SILVA, J.A.T. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. **Biochemical Genetics**, Heidelberg, v. 48, p. 524–537, 2010.

BAYSAL, O.; SIRAGUSA, M.; GUMRUKCU, M. E. et al. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, n. 5-6, p.524-537, 2010.

CHIOCCHETTI, A.; BERNARDO, I.; DABOUSSI, M.J.; GARIBALDI, A.; LODOVICA GULLINO, M.; LANGIN, T.; MIGHELI, Q. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. **Phytopathology**, Ithaca, v. 89, n.12, p. 1169-1175, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa genes. Diversidade genética**. Viçosa: Editora UFV, 2008.v.1, p. 278.

DUBEY, S. C.; SINGH, S. R. Virulence Analysis and Oligonucleotide Fingerprinting to Detect Diversity Among Indian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing Chickpea Wilt. **Mycopathologia**, The Hague, v. 165, n. 6, p. 389–406, 2008.

- FISCHER, I. H.; REZENDE, J.A. Disease of Passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, Kagawa, v.2, n.1, p.1-19, 2008. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0812/PT_2\(1\)1-19o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0812/PT_2(1)1-19o.pdf). Acesso em: 17 fev. 2014.
- GURJAR, G.; BARVE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. **Mycologia**, Lawrence, v.101, n.4, p. 480-491, 2009.
- JEEWON, R.; ITTOO, J.; MAHADEB, D.; FAKIM, Y. J.; WANG, H.-K.; LIU, A.-R. DNA based identification and phylogenetic characterisation of endophytic and saprobic Fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in mauritius. **Journal of Mycology**, New York, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- MIRANDA, I.R.; OLIVEIRA, N.T. Avaliação da variabilidade genética em isolados de *Fusarium oxysporum* f sp. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.4, p.375-378, 2001.
- MUNHOZ, C. F.; WEISS, B.; HANAI, L.R.; ZUCCHI, M.I.; FUNGARO, M.H.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VIEIRA, M.L.C. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, St Paul, v. 101, n. 4, p. 416-24, 2011.
- NAYAKA, S.C.; WULFF, E.G.; UDAYASHANKAR, A.C.; NANDINI, B. P.; NIRANJANA, S. R. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.90, p.1.625-1.639, 2011.
- O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, New York, v.92, p. 919-938, 2000.
- RAMPERSAD, S. N. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. **Phytopathology**, Ithaca, v. 103, n. 2, p.182-189, 2013.
- SANTOS, T. M. D.; COSTA, M. R.; XAVIER, A. A.; NIETSCHKE, S.; FERNANDES, T. P.; PEREIRA, G. V. N. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtidos de bananais do norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 437-445, 2011.
- SILVA, A. S.; OLIVEIRA, E.J.; HADDAD, F.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, S.A.S.; COSTA, M. A. P. Variação genética em isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* com marcadores AFLP. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.70, n.2, p.108-115, 2013.b.
- SILVA, A. S.; OLIVEIRA, E.J.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F.F.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, S. A. S.; COSTA, M.A.P.C.; FREITAS, P. X. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 236-242, 2013a.
- ZHENG, L.; SHI, F.; HSIANG, T. Genetic structure of a population of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB from *Agrostis stolonifera* revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Lethbridge, v.35, n.4, p.476-481, 2013.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p.176-183, 1994.