

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. ISOLADOS DE SOLOS
E DE BANANEIRAS COM SINTOMAS DO MAL-DO-PANAMÁ.**

DENISE NAKADA NOZAKI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. ISOLADOS DE SOLOS
E DE BANANEIRAS COM SINTOMAS DO MAL-DO-PANAMÁ.**

DENISE NAKADA NOZAKI

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Eurya Kuramae

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia - Área de Concentração em Proteção
de Plantas.

BOTUCATU - SP
Janeiro – 2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - FCA
UNESP - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Nozaki, Denise Nakada, 1972-
N961v Variabilidade genética de *Fusarium* spp. isolados de
solos e de bananeiras com sintomas do mal-do-panamá /
Denise Nakada Nozaki. -- Botucatu, [s.n.], 2003.
viii, 53 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual Pau-
lista, Faculdade de Ciências Agronômicas.
Orientador: Eiko Eurya Kuramae.
Inclui bibliografia.

1. Fungos fitopatogênicos 2. Genética molecular I.
Kuramae, Eiko Eurya II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculda-
de de Ciências Agronômicas III. Título

Palavras-chave: *Fusarium* spp.; Variabilidade genética; RAPD;
ITS-5.8S rDNA

**Aos meus pais Hiroyuki Nozaki e
Auria Nakada Nozaki pela educação,
amor e incentivo que me são dedicados.**

OFEREÇO

**A minhas irmãs Gisele Nozaki, Cristiane Nakada Nozaki e
Priscila Nakada Nozaki pela existência
em minha vida.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas concessões nem sempre percebidas e/ou compreendidas.

À Profa. Dra. **Eiko Eurya Kuramae** pela orientação, ensinamentos, e amizade.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro, através de concessão de bolsa de Mestrado.

A **FAPESP**, pela concessão do Auxílio Projeto.

Ao Dr. **Mário Sergio Carvalho Dias** pelo envio dos isolados coletados analisados neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni**, por ceder os isolados do fungo utilizados neste trabalho.

Aos **professores e funcionários** do Departamento de Produção Vegetal da FCA – UNESP, pelos ensinamentos e colaboração.

Ao **Cesar Augustus Bruneli Mari**, pela compreensão, paciência, incentivo, colaboração e companheirismo.

A **Maísa Boff Ciamp** pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos e colegas **Ricardo, Michelle, Viviane, Márcia Aparecida, Roseli, Alniusa, Cesar, Deine, Cristiane, Rosana, Renata, Juliano,**

Alexandre, Janaína, Maurício, Daniel, Samantha, Andéia, Juliana pela diversão, companheirismo e amizade.

À **Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP**, pela formação e oportunidades concedidas.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Ciências Agrônomicas.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS.....	17
LISTA DE FIGURAS.....	18
1 RESUMO.....	<u>1</u>
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1. LOCAL E ÉPOCA DE PESQUISA.....	13
5.2. COLEÇÃO DE ISOLADOS.....	13
5.3. PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS	21
5.4. ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO.....	21
5.5 ESTUDO DA VARIABILIDADE DOS ISOLADOS DE ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES RAPD.....	22
5.5.1 Reação de RAPD.....	22
5.5.2 Análise da variabilidade entre os isolados de <i>Fusarium</i> sp.	24
5.6 PCR E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS - 5,8S rDNA	24
5.6.1 Reação de PCR.....	24
5.6.2 Sequenciamento das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA	25
5.6.3 Análise das seqüências ITS-rDNA dos isolados de <i>Fusarium</i> sp.	27
6 RESULTADOS.....	29
6.1 CARACTERÍSTICAS DA COLÔNIA DA COLEÇÃO DE ISOLADOS	29
6.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL	29
6.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>FUSARIUM</i> SP. DE TECIDO, SOLO E PADRÕES GERADOS ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD.....	30
6.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>FUSARIUM</i> SP. DE TECIDO, SOLO E PADRÕES ATRAVÉS DE SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO ITS – 5,8S rDNA	37

7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO.....	47
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE QUADROS

Quadros	Página
1. Relação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. retirados de tecidos.....	15
2. Relação de isolados de <i>Fusarium</i> sp. coletados de solo no norte de Minas Gerais.....	16
3. Relação de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu–SP	19
4. Sequências dos “primers” utilizados na reação de RAPD neste presente estudo, para estudo de variabilidade genética entre os isolados de <i>Fusarium</i> sp.	23
5. Sequências dos “primers” ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5 utilizados nas reações de PCR e reações de sequenciamento de isolados de <i>Fusarium</i> sp. utilizados neste estudo.....	26
6. Matriz de similaridade genética, gerada pelo coeficiente Simple Matching, a partir de bandas obtidas por RAPD, de isolados de <i>Fusarium</i> sp. de tecido, solo e padrões.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mapa representativo dos locais de coleta dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. retirados de tecidos e solo. A região Norte de Minas Gerais foi dividida em dois pólos administrativo (em vermelho), Pólo Vale do São Francisco e Pólo Caminho Norte de Minas representado respectivamente por A e B.....	20
2. Localização dos “primers” ITSs no DNA ribossomal nuclear.....	26
3. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o “primer” OPA-03, entre os isolados de <i>Fusarium</i> sp. de tecido, solo e padrões.....	35
4. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os “primers” OPA-03, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-18, OPB-10 e OPP-06, em análises de isolados de <i>Fusarium</i> sp. de tecido, solo e padrões	36
5. Amplificação de rDNA de isolados de <i>Fusarium</i> sp. de tecido, solo e padrões utilizando os pares de “primers” ITS4 e ITS5.....	38
6. Dendrograma do alinhamento das seqüências obtidas da região ITS 1 e ITS 2 e o gene 5.8S do rDNA de <i>Fusarium</i> sp. de tecido, solo e padrões. Alinhadas pelo programa ClustalX 1.8 juntamente com alguns isolados do Gen Bank.....	39
7. Local nas seqüências de nucleotídeos da região do gene 5.8S rDNA, onde ocorreram substituições, deleções ou inserções de bases. O nucleotídeo está destacado em itálico e negrito.	41
8. Local nas seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA, onde ocorreram substituições ou inserções de bases. O nucleotídeo está destacado em itálico e	

negrito.....	41
9. Local onde a seqüência de “primers” de F.o.v. desenhado por Moricca et al., começa nas regiões ITS1 e ITS2 nos isolados do grupo 1.	
Seqüência de “primer” destacado em negrito e	46
itálico.....	

1 RESUMO

O mal-do-panamá causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen é um dos problemas fitossanitários mais sérios da bananicultura mundial. Devido a esta doença, um dos manejos culturais recomendados para o cultivo da bananeira, é a formação da cultura em locais onde o patógeno ainda não foi detectado. Visando fornecer subsídios para futuros programas de manejo da cultura, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética entre isolados monospóricos do gênero *Fusarium* sp., presentes em tecidos de plantas e em diferentes tipos de solo do norte de Minas Gerais. Foram utilizados 19 isolados de tecidos de bananeira, tomateiro, coqueiro e tamareira, e 63 isolados obtidos de solo. Também foram incluídos neste trabalho, 5 isolados de *F. oxysporum* de diferentes *formae speciales* (2 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e 4 de *F. solani* de feijoeiro. Através de polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) e análise das seqüências de nucleotídeos dos espaços transcritos internos (ITS1/ITS2) do DNA ribossomal (5.8S rDNA), avaliou-se a variabilidade genética dos isolados. Foi utilizado o método RAPD com a combinação de sete “primers”, o que resultou 72 bandas polimórficas. Através desta análise foi possível obter 3 grupos geneticamente distintos, com ponto de ramificação superior a 50% de similaridade. No

sequenciamento, os produtos de PCR foram realizados com os “primers” ITS4 e ITS5 para o rDNA, obtendo fragmentos de 550 a 600 pb em todos os isolados. A análise do consenso das seqüências da região ITS e do gene 5.8S do rDNA foram comparadas com seqüências do GenBank. Os dendrogramas gerado por agrupamento UPGMA com os de RAPD e de seqüências de nucleotídeos, foram bastante semelhantes. Não houve correlação dos grupos formados nos dendrogramas quanto à localização geográfica e planta hospedeira. Os resultados possibilitaram a separação dos isolados apenas por seção, separando isolados da seção *Elegans* (*F. oxysporum*), da seção *Martiella* (*F. solani*) e da seção *Liseola* (*F. graminum*, *F. venenatum*). Através desses marcadores moleculares não foi possível separar as “*formae speciales*” dos isolados.

Palavra-chave: Variabilidade genética, *Fusarium*, RAPD, ITS-5.8S rDNA.

GENETIC VARIABILITY OF *Fusarium spp.* ISOLATES OF SOIL AND BANANA PLANT WITH PANAMÁ DISEASE. Botucatu, 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DENISE NAKADA NOZAKI

Adviser: EIKO EURYA KURAMAE

2 SUMMARY

Panamá disease caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen is one of the most serious phytosanitary problems of banana culture worldwide. Due to this disease, culture formation in locals where the pathogen has not been detected yet is one of the culture management recommended for banana plant culture. Aiming at providing subsidies for future culture management programs, this work evaluated the genetic variability among monosporous isolate of *Fusarium sp.* present in plant tissues and in different types of soil in north of Minas Gerais state. Nineteen tissue isolates of banana plant, coconut tree and date palm, and 63 isolates of soil were used. It was also included in this work 5 isolates of *F. oxysporum* of different *formae speciales* (2 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, 1 of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 1 of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and 1 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) and 4 of *F. solani* of bean plant. Through polymorphism of DNA amplified at random (RAPD) and nucleotides sequence analysis of ribosomal DNA (5.8SrDNA) internal transcribed spaces (ITS1/ITS2), isolates genetic variability was assessed. It was used the RAPD method with combination of seven "primers", what resulted in 72 polymorphic ribbons. Through such analysis, it was possible to obtain 3 genetically different groups, with ramification point over 50% of similarity. In the sequence, PCR products were carried out with the "primers" ITS4 and ITS 5 for rDNA, obtaining fragments of 550 to 600 pb

in all isolates. Sequences analysis of ITS region and gene rDNA 5.8S was compared to GenBank sequences. The dendrographs generated by UPGMA grouping with the RAPD ones and those of nucleotides sequences were much similar. There was no correlation of the groups formed in the dendrographs concerning geographic location and host plant. The results enabled isolates separation only by section, separating isolates of sections *Elegans* (*F. oxysporum*), *Martiella* (*F. solani*) and *Liseola* (*F. graminum*, *F. veneratum*). Through these molecular markers, it was not possible to separate "*formae speciales*" from isolates.

Keywords: genetic variability, *Fusarium*, RAPD, ITS-5.8S rDNA.

3 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.), uma das frutas consumidas praticamente em todos os países do mundo, originou-se no continente Asiático, tendo evoluído a partir de espécies diplóides selvagens *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla.

Em decorrência do clima, da altitude e de todas as condições básicas necessárias, o Brasil pode ser considerado um país ideal para a produção em larga escala de banana.

Mundialmente a banana possui uma grande importância comercial, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, logo depois da Índia, com uma produção estimada de 7 milhões de toneladas por ano (Banana, 2001). Entretanto, a maior parte da banana produzida é consumida dentro do próprio país, sendo exportada apenas 1,2% da produção. No Brasil, no ano de 2000, os maiores estados produtores de banana foram Pará, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (Banana, 2001).

Durante o desenvolvimento, a bananeira e seus frutos são afetados por problemas patológicos causados por fungos, bactérias, vírus e nematóides. O sucesso na produção da banana depende, em grande parte, de cuidados dispensados ao controle de doenças e nematóides. O nível de produtividade e qualidade dos frutos será tanto melhor quanto menor for a incidência desses problemas.

A Fusariose, mal-do-panamá ou murcha-de-fusarium, causada por *Fusarium oxysporium* Schlecht. f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen (F.o.c.), é um dos problemas fitossanitários mais sérios da bananeira, provocando mudanças radicais no seu cultivo e nos hábitos dos consumidores de todo o mundo. A prova disso, é que cultivares suscetíveis como a Gros Michel e a Maçã foram necessariamente substituídas por variedades resistentes ou tolerantes.

Um dos manejos culturais recomendados para o cultivo da banana, para controle de F.o.c. é a formação da cultura em local onde nunca tenha ocorrido plantação desta fruta (Cordeiro, 1997).

Mesmo com os avanços da biotecnologia, que permitem a produção de mudas via cultura de tecidos, livres de F.o.c. e de outros patógenos do sistema vascular da planta, em pouco tempo será praticamente impossível o cultivo de banana 'Maçã' no Brasil, devido F.o.c. ser considerado uma doença que não tem controle (Pereira et al., 1999). Na região de Janaúba, estado de Minas Gerais foi observado que há algum tempo após a formação da cultura com plantas sadias da variedade Prata anã, em terrenos nunca cultivados com a bananeira, ocorreu o aparecimento do mal-do-panamá (comunicação pessoal, Dr. Mário Sérgio Carvalho Dias– Eпамig). Desta forma, em função da importância econômica da banana, e no intuito de gerar conhecimento sobre esta doença e fornecer subsídios para futuras pesquisas com *Fusarium* sp. foi desenvolvido o presente trabalho. O objetivo foi avaliar a variabilidade genética existente entre isolados do gênero *Fusarium* presentes em tecido de bananeira e de solo, através de polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) e, da análise das seqüências de nucleotídeos dos espaços transcritos internos (ITS1/ITS2) do DNA ribossomal 5.8S rDNA.

4 REVISÃO DE LITERATURA

O mal-do-panamá foi constatado pela primeira vez sobre bananeiras, em 1904, em Honolulu no Havaí, por Higgens, citado por Stover (1972). No mesmo ano, Kenny, também citado por Stover (1972), relatou os primeiros graves prejuízos ocasionados por essa doença no Panamá. A partir daí, com a expansão da bananicultura na Jamaica, e nas Américas Central e do Sul, em 1912 a doença espalhou-se sobre 'Gros Michel', principal variedade de banana cultivada para exportação, naquela época, e altamente suscetível ao patógeno, causando perdas elevadas na produção e praticamente dizimando a cultura (Moreira, 1987).

A disseminação do mal-do-panamá por todas as regiões produtoras de banana do mundo, deu-se certamente através de mudas infectadas e do intercambio internacional de material propagativo, tanto para fins de pesquisa, como, principalmente, para exploração comercial (Pereira et al., 1999).

A primeira constatação do mal-do-panamá no Brasil, data de 1930, no município de Piracicaba, em São Paulo (Cordeiro & Kimati, 1997).

A doença está presente em todos os Estados brasileiros produtores de banana, sendo particularmente importante sobre as cultivares Maçã, altamente suscetível, Prata, Pacovan e Prata-anã, moderadamente suscetíveis, todas de grande aceitação popular

(Cordeiro et al,1991). Desde sua constatação em território brasileiro, todas as grandes plantações comerciais da banana 'Maçã', do estado de São Paulo, foram dizimadas pelo mal-do-panamá, acontecendo o mesmo em todas as regiões produtoras de Minas Gerais e Goiás. Há alguns anos, o plantio deslocou-se para os estados do Pará e Rondônia. Nessas regiões, a destruição de bananais pelo mal-do-panamá vem ocorrendo rapidamente devido ao uso de mudas infectadas (Pereira et al., 1999). O cultivo da banana 'Maçã' no Brasil ainda é feito, em razão da expansão das fronteiras agrícolas, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste, onde são instalados novos plantios dessa cultivar (Pereira et al., 1999).

Dada sua alta suscetibilidade ao mal-do-panamá, a cultivar Gros Michel, apesar da grande aceitação no mercado internacional, foi substituída por cultivares do subgrupo Cavendish, como a 'Nanicão', 'Valery' e 'Nanica', resistentes ao patógeno da raça 1 e 2, mas suscetível a raça 4.

O mal-do-Panamá é causado por *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyd. e Hansen (fase teleomórfica *Gibberella* sp.), fungo habitante de solo, no qual desenvolve alta capacidade de sobrevivência por longos períodos, na ausência do hospedeiro, este fato deve-se à formação de estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (Agrios, 1997, Cordeiro & Kimati, 1997). Existem relatos de sua permanência no solo, por mais de 20 anos, na ausência do hospedeiro (Stover, 1972). Outra hipótese de sobrevivência é a ocorrência do ciclo parassexual, que se inicia com a formação de heterocário. O ciclo parassexual constitui o mecanismo principal, através do qual os fungos imperfeitos, como *F. oxysporum*, podem obter alta variabilidade, além de garantir sua longa sobrevivência (Leslie, 1990).

Quatro raças de F.o.c são relatadas mundialmente, sendo para a banana as raças 1, 2 e 4 as mais importantes, variando sua patogenicidade de acordo com a variedade de bananeira. Raças 1 e 2 estão distribuídas no mundo todo e os cultivares suscetíveis são os dos subgrupos “Gros Michel” (AAA), “Silk” (AAB) e “Bluggoe” (ABB). A raça 3 é importante para Helicônia (Gowen, 1997). Os cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), representante do grupo nanica, nanicão, grande nine e Williams, são resistentes a raça 1, e são usados para substituir os cultivares suscetíveis. SUN et al. (1978) identificou o aparecimento de uma nova raça, a raça 4, a qual ataca cultivares dos subgrupos Cavendish. O aparecimento da raça 4 deu novo destaque aos problemas sanitários, enfatizando a necessidade

de pesquisas na busca de novas alternativas genéticas ou culturais para o controle da doença (Cordeiro, 1997).

O fungo desenvolve-se no sistema vascular da bananeira, após ter infestado as radículas e o patógeno ter invadido o rizoma, causando, gradativamente, o depauperamento da planta e a sua morte (Medina, 1995). Os sintomas típicos do mal-do-panamá nas plantas de bananeira são um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas. O amarelecimento começa pelos bordos foliares e evolui no sentido da nervura principal. Mais tarde, ocorre um colapso no pecíolo junto com o pseudocaule. Internamente, através de corte transversal ou longitudinal do pseudocaule, observa-se uma descoloração pardo-avermelhada provocada pela presença do patógeno nos vasos (Gowen, 1997).

As principais formas de disseminação da doença é o contato do sistema radicular de plantas sadias com microconídios liberados por plantas doentes e, em muitas áreas, o uso de material de plantio contaminado. O fungo também é disseminado por água de irrigação, drenagem, inundação, assim como pelo homem, animais e equipamentos. Em bananais já formados, a difusão da doença evolui em ritmo acelerado em certos casos. Os fatores que exercem influência são: condições do terreno como fertilidade, pH e drenagem, aliada a susceptibilidade dos cultivares, condições climáticas e manejo do solo (Ploetz, 1994).

Mudanças nas práticas culturais bem como medidas sanitárias rígidas têm mantido o controle da doença dentro de certos limites, mas não se tem conseguido a erradicação da mesma. Ultimamente, tem sido observado que em áreas onde nunca ocorreram plantações de bananeira, até mesmo antes da emissão do primeiro cacho, estas apresentavam sintomas de mal-do-panamá (comunicação pessoal Dr. Mário Sérgio – Epamig).

Espécies de *Fusarium* são geralmente identificadas usando combinações microscópicas como características de colônias, presença ou ausência de microconídios, forma ou localidade dos clamidósporos (intercalar ou terminal), forma do macroconídio e comprimento de fiálides. No entanto, tal diferenciação requer certa habilidade e conhecimento (Nelson, 1991; Ouellet & Seifert, 1993). O baixo número de características taxonômicas (morfológicas e fisiológicas), torna a diferenciação entre isolados de fungos da mesma espécie bastante difícil (Silva et al., 2000). Kistler (1997) atribui que a dificuldade da

identificação taxonômica baseada na morfologia é a alta variabilidade fenotípica que o fungo *Fusarium* apresenta em meios de cultivo.

Segundo Nelson (1991), Wollenweber e Reinking (1935) após 40 anos de pesquisa das características das espécies de *Fusarium*, em diferentes meios de cultura, publicaram a primeira revisão, “Die Fusarien”, onde agrupava 65 espécies, 55 variedades e 22 formas especialis em 16 seções (*Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella* e *Ventricosum*). Baseando-se nesta publicação ocorreram muitas mudanças e correções na classificação das espécies do gênero *Fusarium*, fazendo com que surgissem vários sistemas taxonômicos. Em 1983, Nelson, Toussoun e Marasas, descreveram uma chave de identificação de *Fusarium* sp. sendo a mais recente publicação (Windels, 1991).

Fusarium oxysporum foi incluído dentro da seção *Elegans* por Wollenweber e Reinking (1935). Nesta seção estão descritos três subseções: *Orthocera*, *Constrictum*, *Oxysporum*. Estas subseções são separadas baseando-se no tamanho do macroconídio e na presença ou ausência do esporodóquio (Nelson, 1990).

Atualmente dentro do complexo de *F. oxysporum* existe cerca de 150 *formae speciales* publicadas (Pfenning, 2002). *Formae speciales* de isolados de *oxysporum* não são distinguidos morfologicamente, e a divisão da subespécie é geralmente, baseado no hospedeiro específico, na patogenicidade, reações fisiológicas da raça em grupos de cultivares diferentes ou por determinação de grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs), com obtenção de formação de heterocáριο. Desvantagens desta técnica são: a *formae speciales* de alguns *oxysporum* pode ser amplamente distribuído, como o caso de *F.o. f. sp. vasinfectum* (Atk.) Snyd. & Hans., que causa murcha-de-fusarium em algodão, também ataca plantas da família Solanaceae, Fabaceae e outras Malvaceae (Windels, 1991); o tempo para o desenvolvimento da patogenicidade sujeito a variação do meio ambiente e; as condições do crescimento da cultura durante o experimento (Woo et al., 1996). Apesar da existência da correlação entre VCG e patogenicidade de isolados de F.o.c., um determinado VCG pode abrigar mais de uma raça desse patógeno, bem como a mesma raça pode ser classificada em mais de uma VCG, o que evidencia a dificuldade do uso da técnica de VCG, para identificar patótipos (Cordeiro et al., 1997).

A identificação e caracterização genética de fungos fitopatogênicos tem apresentado grande importância no diagnóstico e no controle de diversas doenças que atingem as plantas. Entre os métodos de análise genética, é conhecido o uso da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), descrita por Williams et al. (1990). O uso de iniciadores (“primers”) na reação de RAPD permite amplificar sequências casuais distribuídas no genoma, gerando perfis únicos para linhagens ou espécie. Estes testes moleculares têm sido usados com sucesso para caracterizar outras formas especiais (Kuramae-Izioka & Souza, 1998), variabilidade de *Fusarium* (Ouellet & Seifert, 1993, Achenbach et al., 1996, Silva et al., 2000), caracterizar raça (Grajal-Martin, 1993) e para determinar a correlação e diversidade genética com a patogenicidade (Kelly et al., 1994, Woo et al., 1996).

Achenbach et al. (1996) realizaram análise de alguns isolados que causam síndrome da morte súbita da soja (*F. solani*) através de RAPD comparados com *F. solani* f. sp. *phaseoli*, que causa podridão da haste em feijoeiro. Os resultados obtidos em laboratório exibiam 100% de associação com os resultados de teste de virulência realizado em casa de vegetação.

Através de análise de RAPD, Kelly et al. (1994) conseguiram distinguir *F. o. ciceris*, agente causal de fusariose em grão de bico (*Cicer arietinum* L.), de outras formas especiais e de outras espécies de *Fusarium* que ocorrem na cultura. Com a mesma análise separaram os isolados que causam amarelecimento, seca e os não patogênicos.

Outro método de análise eficiente, aplicado para variabilidade de fungos, é a região que codifica o gene RNA ribossômico (rDNA). A função básica dos ribossomos é a de traduzir mRNA em peptídeos. Desta forma, genes que codificam para RNA ribossomais estão presentes universalmente em sistema vivo, em número repetitivo de cópias, que podem atingir cerca de 100 a 430 vezes por genoma haplóide, dependendo da espécie fúngica (White et al., 1990). Cada repetição dos genes rRNA é constituída por uma unidade transcripcional, composta de três subunidades; 18S, 28S e 5,8S rDNA. Essas subunidades são separadas por espaçadores internos transcritos, denominados ITSs (Internal Transcribed Spacers). Classificadas em ITS1 e ITS2, a subunidade 5,8S está localizada entre estas duas regiões espaçadoras e estas se encontram entre o 3’ do gene 18S e 5’ do gene 28S do rDNA. As subunidades são altamente conservadas, enquanto que os ITSs são mais variáveis. Por ser constituídos por regiões que evoluem em velocidades diferentes, 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).

Informações de seqüências de regiões conservadas permitem a síntese de “primers” para a sua amplificação a partir de genomas diversos. As análises podem ser obtidas da presença ou ausência de produto, clivagem dos produtos PCR gerando RFLPs, assim como sequenciamento direto dos mesmos. A presença de seqüências conservadas nos genes rDNA (18S, 5.8S e 28S) permite que “primers” sejam sintetizados e utilizados para uma ampla gama de espécie fúngicas. Estes são denominados de “primers” universais, que flanqueiam as regiões variáveis ITS e IGS. Desta forma, “primers” podem ser selecionados da forma que amplifiquem a região desejada (White et al, 1990).

Recentemente, Silva-Hanlin et al. (1999) sequenciaram a regiões ITS e a subunidade 5,8S e rDNA de espécies de *Fusarium* e observaram que não há correlação entre os isolados do mesmo grupo, não podendo relacionar com a cultivar hospedeira e nem com a localização geográfica, mas estas regiões se mostraram variáveis o suficiente para separar *F. oxysporum* de *F. subglutinans*.

O’Donnell e Gray (1995) sequenciaram a região ribossomal ITS e parte da região 28S do rDNA, e analisando o mapeamento das seqüências observaram que isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, causador da síndrome da morte súbita (SDS) da soja podem ser agrupados com *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, que causa podridão da haste em feijoeiro. Concluindo que os isolados que causam SDS, pode representar uma população distinta dentro de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, indicando também um ancestral comum para ambos.

Waalwijk et al (1996) com dados de seqüências ITS distinguiram facilmente, duas espécies da seção *Elegans*, *F. oxysporum* e *F. redolens*, os quais a distinção através de características morfológicas era difícil, devido à similaridade.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e época da pesquisa

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do Departamento de Produção Vegetal (setor de Defesa Fitossanitária), Laboratório de Biologia Molecular / Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu – S.P, no período de março de 2000 a agosto de 2002.

5.2 Coleção de isolados

Foram utilizados isolados monospóricos de *Fusarium* spp. obtidos de tecido de bananeira, tomateiro, coqueiro e tamareira. Também utilizou-se isolados monospóricos coletados de solo de diferentes localidades do norte do estado de Minas Gerais

(Quadros 1 e 2), cedidos pelo pesquisador Mário Sérgio Carvalho Dias¹. A Figura 1 ilustra a distribuição dos locais de coleta dos isolados de *Fusarium* spp. retirados de tecidos e solo.

Os 5 isolados de *F. oxysporum* de diferentes *formae speciales* (Quadro 3) utilizados neste trabalho, foram obtidos da micoteca do Departamento de Produção Vegetal - Setor Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Botucatu-SP.

Os isolados de *F. solani* (Quadro 3) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Maringoni², em forma de cultura pura, preservados em solo e mantidos geladeira.

Para verificar a característica de crescimento da colônia, todos os isolados obtidos foram transferidos para meio BDA (batata-dextrose-agar) + oxitetraciclina (50 µg/mL) e mantidos em câmara de crescimento tipo B.O.D a 26°C com 12/12 horas luz/escuro, por 7 dias.

¹EPAMIG/Centro Tecnológico Norte de Minas, Caixa Postal 12, CEP 39440-000, Nova Porteira-MG

²Departamento de Produção Vegetal– FCA/ UNESP, CP237, CEP 18603-970 - Botucatu-SP

Quadro 1. Relação de isolados de *Fusarium* spp. retirados de tecidos.

Isolado	Cultura	Localidade	Resumo/Histórico	Data de coleta
T-1	Banana Prata-anã	Janaúba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-2	Banana Prata-anã	Janaúba	Isolado de planta com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-3	Banana Prata-anã	Epamig/Janaúba	Isolado de planta com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-4	Banana Prata-anã	Faz. Fertinorte /Nova Porteirinha	Planta com apresentou sintoma inicial de murcha, ocorreu recuperação e produziu cacho.	13/11/00
T-5	Banana Prata-anã	Mocambinho /Jaíba	Isolado de planta com o sintoma da fusariose	30/11/00
T-6	Banana Prata-anã	Epamig Col. II/ Nova Porteirinha	Isolado de planta com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-7	Tâmara	Epamig/ Janaúba	Cacho com podridão e crescimento micelial superficial	30/11/00
T-8	Banana Prata-anã	Epamig Col II/ Nova Porteirinha	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-9	Banana Prata-anã	Área F-SIII, Planta 2/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-10	Banana Prata-anã	Mocambinho/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-11	Banana Prata-anã	Mocambinho/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-12	Tomate	Janaúba	Isolado de planta com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-13	Banana Prata-anã	Projeto Gorutuba/ Nova Porteirinha	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-14	Côco	Femo/Jaíba	Isolado de lesões nas folhas do coqueiro.	30/11/00
T-15	Banana Prata-anã	Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-16	Banana Prata-anã	Área F-SIII Planta 3/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-17	Banana Prata-anã	Área F-SIII Planta 2/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-18	Banana Qualidade Total	Área F-SIII/ Jaíba	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose.	30/11/00
T-19	Banana Maçã	Cruz das Almas/Bahia	Isolado de bananeira com o sintoma da fusariose	30/11/00

Quadro 2. Relação de isolados de *Fusarium* sp. coletados de solo no norte de Minas Gerais.

Isolados	Cultura no local	Localidade	Resumo/Histórico	Data de coleta
S-1 _{II 2} S-1 _A S-1 _B	Banana Prata-anã	Verdelândia	Plantio comercial com 6 anos de implantação.	28/03/00
S-2 _{III 2}	Vegetação nativa	Varzelândia	Vegetação nativa (mata seca) localizada em região distante de bananais.	28/03/00
S-3 _{III 2} S-3 _{III 2 A}	Pastagem nativa	Jaíba	Localizada dentro de zona produtora de banana.	28/03/00
S-4 _{I 2} S-4 _{III 1 A}	Banana Prata-anã	Matias Cardoso	Bananal com 3,5 anos sem histórico de fusariose, localizado próximo de bananal infectado com doença.	28/03/00
S-5 _{I 3}	Vegetação nativa	Manga	Mata seca onde ocorreu várias queimadas, localizada distante de bananais.	28/03/00
S-6 _{II 2}	Banana Prata-anã	Juvenilha	Bananal com 2 anos de implantação. Sem histórico de fusariose e sem nenhum tratamento fitossanitário. Único plantio da região.	29/03/00
S-7 _{I 3}	Mamona/Coco/Feijão	Juvenilha	Cultura consorciada com três anos de implantação, próximo ao bananal da amostra anterior.	29/03/00
S-8 _{IV 2} S-10 _{I 5}	Sorgo Capim Colonião	Montalvânia Nhandutiba	Plantio isolado, localizado distante de bananais. Extensa área de pastagem localizada distante de bananais.	29/03/00 29/03/00
S-11 _{II 5}	Vegetação nativa	Manga	Local entre os municípios de Manga e Itacarambi, próximo de bananais. Vegetação nativa (mata seca) nunca foi cultivado.	29/03/00
S-12 _{I 4}	Banana Prata-anã	São Sebastião dos Poções	Bananal cultivado em quintal com 3 anos, sem histórico de fusariose.	29/03/00
S-13 _{II 1}	Banana Prata-anã	Itacarambi	Plantio comercial com 6 anos de implantação. Mudanças provenientes de rizoma, sem histórico de fusariose.	29/03/00
S-15 S-15 _{III 2}	Banana Prata-anã	Itacarambi Icil	Plantio comercial com 3 anos de implantação. Mudanças provenientes de cultura de tecido, sem histórico de fusariose.	29/03/00
S-16 _{I 4 A} S-16 _{I 4 B} S-16 _{I 4}	Mata virgem	Itacarambi	Localizada no Vale do Peruaçu, próximo de bananais.	29/03/00
S-17 _{III 1A}	Banana 'Mysori'	Januária	Bananal com 7 anos de implantação sem histórico de fusariose. Anteriormente havia banana maçã afetada pela doença. Localizado em região sem grandes cultivos.	30/03/00
S-18 _{II 2}	Banana Ouro	Januária	Bananal com 10 meses de implantação, localizado próximo ao bananal da amostra anterior. Sem histórico de fusariose.	30/03/00
S-19 _{I 5}	Banana Ouro	Januária	Bananal com 3 anos de implantação, localizado próximo ao bananal da amostra anterior. Sem histórico de fusariose.	30/03/00

Quadro 2 (continuação)

Isolados	Cultura no local	Localidade	Resumo/Histórico	Data de coleta
S-20 _{IV 1}	Pastagem	Pedras de Maria da Cruz	Extensa área desmatada, com indícios de queimada.	30/03/00
S-21 _{I 2} S-21 _{I 2 A}	Maracujá	São Francisco Escola Rural	Plantio com 2 anos de implantação com histórico de fusariose.	30/03/00
S-22 _{II 4}	Banana Prata-anã	São Francisco Escola Rural	Bananal com 2 anos, sem histórico de fusariose. Alta incidência de Sigatoka Amarela e sem irrigação.	30/03/00
S-23 _{III 1A}	Banana Prata-anã	Luislândia	Bananal erradicado por apresentar fusariose. Algumas plantas rebrotaram e apresentaram sintomas da doença.	30/03/00
S-24 _{III 1}	Brachiária	Brasília de Minas	Pastagem localizada distante de bananais.	30/03/00
S-25 _{I 2}	Eucalipto	Coração de Jesus	Cultura com 10 anos de implantação, localizada em área distante de bananais.	31/03/00
S-26 _{I 4}	Banana Prata-anã	Coração de Jesus	Bananal com 2,5 anos de implantação. Bastante isolado de outros bananais. Apresentava focos isolados com suspeita de fusariose. Anteriormente havia vegetação natural.	31/03/00
S-29 _{V 2}	Algodão	Mato Verde	Área cultivada por 10 anos com a cultura. Apresentava focos de plantas com fusariose coincidindo com áreas sujeitas ao encharcamento.	12/06/00
S-30 _{III 3}	Pastagem nativa	Monte Azul	Localizado distante de plantios de bananeira.	12/06/00
S-31 _{III 1}	Banana Prata-anã	Montezuma	Bananeira cultivada em quintal. Fora de zona de cultivo.	13/06/00
S-32 _{I 3} S-32 _{III 1}	Pastagem nativa	Montezuma	Cerrado desbravado com pastagem natural. Bastante distante de zona produtora de banana	13/06/00
S-33 _{IV 3}	Eucalipto	Montezuma	Área cultivada a 15 anos com eucalipto, totalmente isolada dos cultivos comerciais de banana. Anteriormente havia cerrado no local.	13/06/00
S-34 _{II 2}	Eucalipto	São João do Paraíso	Extensa área cultivada com eucalipto. anteriormente havia cerrado. Região totalmente isolada dos cultivos comerciais de banana.	13/06/00
S-35 _{III 2}	Maracujá	Taiobeiras Rio Dourado	Área de 130 ha cultivada a 2 anos com maracujá. Anteriormente cultivada com milho.	13/06/00
S-36 _{I 5}	Goiaba	Taiobeiras	Área cultivada a 6 anos com cultivar Paluma. Anteriormente era cultivada com soja, milho, arroz e ervilha.	13/06/00
S-37 _{IV 4}	Banana Prata-anã	Salinas	Cultivo de 2 anos sem histórico de fusariose. Anteriormente era cultivada com tomate.	14/06/00
S-38 _{IV 2}	Tomate	Salinas	Cultura com 20 dias do transplantio. Anteriormente era cultivado sorgo.	14/06/00
S-39 _{III 5}	Cana-de-açúcar	Salinas	Cultivada a vários anos para a produção de cachaça.	14/06/00
S-40 _{I 4}	Cerrado	Grão Mogol	Mata natural de cerrado onde nunca foi cultivado.	15/06/00
S-41 _{II 3 A} S-41 _{I 5}	Banana Prata-anã	Itacambira	Cultivo em quintal, distante de zona produtora.	15/06/00

Quadro 2 (continuação)

Isolados	Cultura no local	Localidade	Resumo/Histórico	Data de coleta
S-42 ^{III 2}	Eucalipto	Itacambira	Plantio comercial onde anteriormente havia cerrado.	15/06/00
S-44 ^{I 3}	Vegetação nativa	Porteirinha	Vegetação nativa (mata seca) localizada próximo de zona produtora. Local nunca antes cultivado.	26/06/00
S-45 ^{I 5}	Banana Prata-anã	Porteirinha	Cultura comercial com 4 anos de implantação. Sem histórico da doença.	26/06/00
S-46 ^{III 5}	Brachiária	Porteirinha	Pastagem de 3 anos, onde anteriormente era cultivado milho. Localizado próximo de bananal.	26/06/00
S-47	Banana Prata-anã	Área C2 Lote 10 m / Jaíba	Cultivo de 2 anos com mudas provenientes de cultura de tecido, sem histórico de fusariose.	06/07/00
S-48 ^{I 4}	Banana Prata-anã	Área C2 Lote 10 m / Jaíba	Cultivo de 2 anos com mudas provenientes de cultura de tecido, área de coleta com foco de fusariose. Anteriormente havia mata nativa.	06/07/00
S-49 ^{I 3}	Banana Prata-anã	Pirapora	Cultivo sem histórico de fusariose.	11/07/00
S-50 ^{I 3}	Banana Prata-anã	Pirapora	Local de coleta com foco de fusariose.	11/07/00
S-51 ^{III 5}	Banana Prata-anã	Várzea da Palma	Amostragem em área sem histórico da fusariose.	11/07/00
S-52 ^{I 4}	Banana Prata-anã	Várzea da Palma	Amostragem em área com foco da fusariose.	11/07/00
S-53 ^{III 4}	Banana Prata-anã	Área C2 lote 77/ Jaíba	Amostragem realizada em área sem foco da fusariose.	19/07/00
S-54 ^{I 2}	Banana Prata-anã	Área C2 Lote 77/ Jaíba	Amostragem realizada em área com foco da fusariose.	19/07/00
S-55 ^{II 4}	Mandioca	São João do Paraíso	Área cultivada de 14 ha, com 6 meses de plantio.	27/06/00
S-56 ^{III 5}	Mandioca	São João do Paraíso	Área cultivada de 20 ha, com 7 meses de plantio.	27/06/00
S-57 ^{IV 1}	Marmelo	São João do Paraíso	Área cultivada de 1 ha, com 10 anos do plantio.	26/06/00
S-58 ^{IV 2 B}	Banana Prata-anã	São João do Paraíso	Bananal de 1 ha com 8 anos de implantação. Sem histórico de fusariose.	26/07/00

Quadro 3. Relação de isolados de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* mantidos na micoteca do Departamento de Produção Vegetal – Setor Defesa Fitossanitária, FCA, UNESP, Botucatu–SP.

Isolado	Hospedeiro	Isolados	Histórico	Data de coleta
F.o.c.1	Banana maçã	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Planta com sintoma de fusariose	1992
F.o.c.2	Banana maçã	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Planta com sintoma de fusariose	2001
F.o.v.	Algodoeiro	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Planta com sintoma de fusariose	1997
F.o.p.	Feijoeiro	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Planta com sintoma de fusariose	1997
F.o.l	Tomateiro	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Planta com sintoma de fusariose	1997
Fe2235	Feijoeiro	<i>Fusarium solani</i>	Planta com sintoma de fusariose	1995
Cp2236	Feijoeiro caupi	<i>Fusarium solani</i>	Planta com sintoma de fusariose	1995
Fe2302	Feijoeiro	<i>Fusarium solani</i>	Planta com sintoma de fusariose	1995
Fe2080	Feijoeiro	<i>Fusarium solani</i>	Planta com sintoma de fusariose	1993

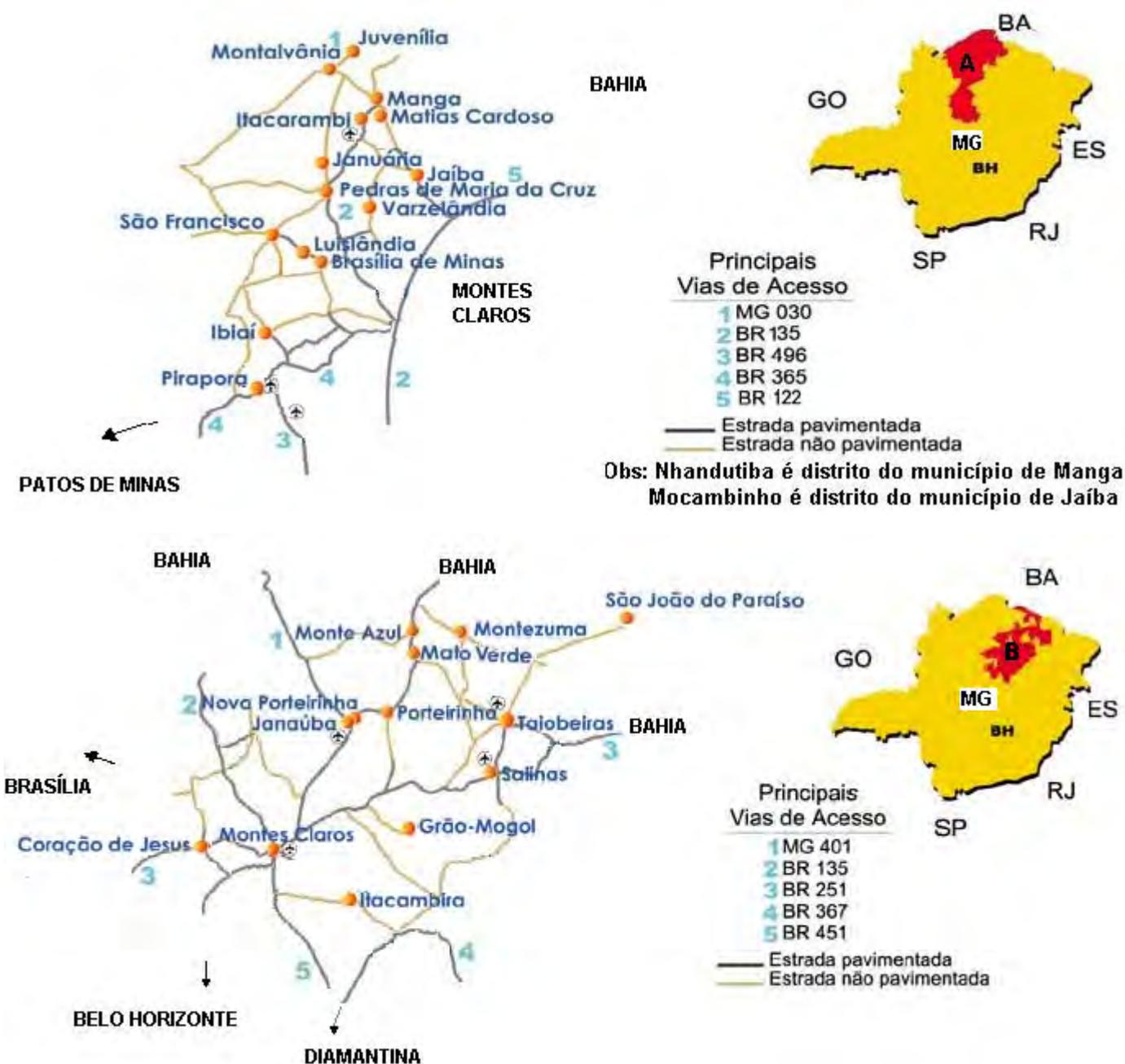


Figura 1: Mapa representativo dos locais de coleta dos isolados de *Fusarium* spp. retirados de tecidos e solo. A região Norte de Minas Gerais foi dividida em dois pólos administrativo (em vermelho), Pólo Vale do São Francisco e Pólo Caminho Norte de Minas representado respectivamente por A e B.

5.3 Preservação dos fungos

Os isolados obtidos de tecidos e solos, bem como, os isolados utilizados como padrão, estão preservados em tubos de cultura de 20mL, contendo 5mL de meio BDA e óleo mineral esterilizado (Tuite, 1969) e também em frascos de penicilina com água destilada estéril (Figueiredo, 1967).

5.4 Isolamento do DNA genômico

Os isolados dos Quadros 1, 2 e 3 desenvolveram-se em meio de BDA + oxitetraciclina (50 µg/mL), e mantidos a temperatura de 26°C, no escuro, por 7 dias para a formação de colônias. Visando obter massa micelial dos isolados de *Fusarium*, 3 discos de micélio de 5 mm de diâmetro de cada isolado foram retirados e colocados em tubos de 50 mL contendo 25 mL do meio líquido batata-dextrose. Estes foram incubados, no escuro, durante 14 dias a 26°C.

A extração de DNA genômico total de todos os isolados foi realizada utilizando-se o método de Kuramae-Izioka (1997).

Os micélios dos isolados foram filtrados em bomba a vácuo, utilizando-se papel filtro Whatman N°1, lavados 3 vezes com água destilada e autoclavada, colocados em tubos “Eppendorf” com capacidade de 2000µL e macerados com nitrogênio líquido até a formação de pó fino. Em seguida, cada amostra de micélio triturado foi ressuspensa com 700µL de tampão de extração (100mM Tris-HCl pH8,0, 50mM EDTA pH8,0, 500mM NaCl, 20% dodecil sulfato de sódio), e incubada em banho-maria à 65°C por 30 min, sob agitação. Adicionou-se 500µL de acetato de potássio 5M às amostras e incubou-se no gelo por 30 minutos, sendo realizada a inversão à cada 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rcf durante 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se 650µL do

sobrenadante, o qual foi submetido a extração com 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (25:1). Em seguida, adicionou-se à cada amostra um volume de isopropanol absoluto, a fim de precipitar o DNA. Centrifugou-se novamente a 12.000 rcf por 10 minutos. Logo após, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante sem remover o “pellet” e lavou-se com 700µL de etanol 70% centrifugando por 5 minutos. As amostras foram secas à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a secagem, ressuspendeu-se o “pellet” adicionando-se 50µL de TE (10mM Tris e 1mM EDTA pH 8.0) contendo RNase (40µg RNase/mL) e incubou-se por 3 hora a 37°C.

A qualidade e concentração do DNA foram verificados colocando-se alíquotas de 4µl de cada amostra de DNA, misturadas com 4µL de tampão carregamento (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02mM EDTA pH 8,3). O gel foi submetido a eletroforese por 5 V/min, as bandas foram coradas com brometo de etídio (10 mg/ml) (Sambrook et al., 1989) e observadas através de transluminador UV.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro GenQuant (Pharmacia). A razão A_{260}/A_{280} de todas as amostras de DNA foi determinada para verificar a pureza dos ácidos nucléicos. A solução estoque de DNA foram diluídas numa concentração final de 5ng/µL e estocadas em freezer a -20°C, afim de evitar a degradação do DNA, sendo descongeladas no momento das reações de RAPD e PCR.

5.5 Estudo da variabilidade dos isolados através de marcadores moleculares RAPD

5.5.1 Reação de RAPD

A técnica de RAPD foi realizada com os DNAs de todos os isolados estudados (Quadros 1,2 e 3).

Os “primers” utilizados para a reação de RAPD foram OPA-03, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-18, OPB-10, OPC-01, OPP-06 (Quadro 4), todos selecionados ao acaso dos “kits” da Operon Technologies Inc (Alameda, CA, USA).

Quadro 4. Seqüências dos “primers” utilizados na reação de RAPD neste presente estudo, para estudo de variabilidade genética entre os isolados de *Fusarium* sp.

Código-OPERON	Seqüências do primer (5' → 3')
OPA-03	5' AGTCAGCCAC3'
OPA-08	5' GTGACGTAGG3'
OPA-10	5' GTGATCGCAG3'
OPA-13	5' CAGCACCCAC3'
OPA-18	5' AGGTGACCGT3'
OPB-10	5' CTGCTGGGAC3'
OPC-01	5' TTCGAGCGAG3'
OPP-06	5' GTGGGCTGAC3'

Os procedimentos para a reação de RAPD foram seguidos conforme o protocolo descrito por Williams et al. (1990). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, onde cada poço continha 10 mM de tampão 10x (10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 2mM de cada dNTPs, 0,4mM “primer”, 50ng de DNA genômico e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Gibco Life Technologies Inc.), completadas com água estéril para um volume total de 20μL. Cada reação foi coberta com 25μL de óleo mineral para evitar a evaporação. A amplificação foi realizada em termocicladores (MJ Research PTC-100 thermocycler ou Perkin-Elmer/Cetus 9600) programados para uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 35°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e, mais uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Em cada poço contendo 20 μL de reação de RAPD e em 200 ng do marcador molecular Ladder 1Kb (Gibco) foi adicionado 4,0 μL de tampão de carregamento.

Os produtos de RAPD bem como o marcador molecular foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE numa voltagem de aproximada de 5V/cm de gel. Os géis foram observados em transluminador UV, fotografados e impressos em aparelho “Eagle Eye” (Stratagene, USA).

5.5.2 Análise da variabilidade entre os isolados de *Fusarium* sp.

Os dados de RAPD foram analisados considerando-se a presença ou ausência de bandas no gel, codificando de forma binária (1 para presença e 0 para ausência). A análise dos dados obtidos foram realizadas no programa computacional NTSYS-pc 1.70 (Numerical Taxonomy System, Applied Biostatistic) (ROHLF, 1992).

O agrupamento foi através de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging) e a distância genética entre os isolados de *Fusarium* de tecido, solo e padrões foi determinada pelo coeficiente Simple Matching. A matriz da distância foi transformada em dendrograma pelo SAHN Clustering (Sequential Agglomerative, Hierarchical and Nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging) e a visualização do dendrograma foi através do programa Tree G.

5.6 PCR e Sequenciamento da região ITS - 5,8S rDNA

5.6.1 Reação de PCR

A reação de PCR para amplificação do espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2) e do gene 5,8S rDNA foi realizada com todos os isolados de *Fusarium*

utilizados nas reações de RAPD. Os “primers” utilizados na reação de PCR foram os pares ITS4 e ITS5 (Quadro 5) conforme White et al. (1990). Para a amplificação do DNA, realizou-se uma reação de 20µL em tubos Eppendorf de 250 µL contendo 2µL de tampão de reação 10X (Gibco Life Technologies Inc.), 0,6µL de MgCl₂ (1,5mM), 1,6µL de dNTPs a 2,5mM, 4µL do “primer” ITS4 (5ng/µL), 4µL do “primer” ITS5 (5ng/µL), 0,32µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL - Gibco Life Technologies Inc.), 100 ng do DNA genômico extraído e 6,88µL de água ultrapura. No termociclador foi adotado uma programação de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e, mais uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Uma alíquota de 5µL da reação de PCR de cada amostra foi misturada com 4µL de tampão de carregamento e separada em gel de agarose 1%. Como marcador de peso molecular para quantificação de produtos de PCR, foi utilizado DNA λ na concentração de 50, 100 e 150 ng/µL e para observar o tamanho do fragmento, 200 ng de Ladder 1Kb. Os fragmentos foram separados por eletroforese 5V/min e observados em transluminador UV.

5.6.2 Sequenciamento das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA

As amostras resultantes da reação de PCR foram purificadas em coluna Micro Spin S-400HR (Amersham Pharmacia Biotech, USA), conforme o protocolo do fabricante.

O sequenciamento foi realizado com os “primers” ITS 4 (reverso) e ITS 5 (frente), e na necessidade de melhorar a qualidade das seqüências foram utilizados os “primers” ITS 2 e ITS 3 (Quadro 5 e Figura 2) como complementares.

Quadro 5. Seqüências dos “primers” ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5 utilizados nas reações de PCR e reações de sequenciamento de isolados de *Fusarium* sp. utilizados neste estudo.

“Primer”	Seqüências do primer (5’para 3’)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

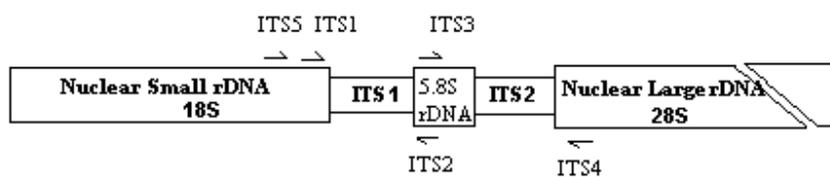


Figura 2. Localização dos “primers” ITSs no DNA ribossomal nuclear.

A reação de sequenciamento de 10µL cada, foi realizada utilizando-se 2µL de BigDye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5µL de DNA (50ng/µL), 2µL do “primer” ITS4 ou ITS5 (5pmol) e 3,5µL de água ultrapura. A programação utilizada para a reação de sequenciamento incluiu um ciclo de 35 vezes a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos em termociclador (MJ Research PTC-100 thermocycler ou Perkin-Elmer/Cetus 9600). Uma vez realizada a reação de sequenciamento, as mesmas foram precipitadas com a adição de 1 µL de acetato de sódio 1,5M/ 250mM EDTA e 40µL de isopropanol 95%, mantidas no escuro por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rcf a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, e os “pellets” lavados com 250µL de etanol 70%, centrifugados por 5 minutos a 12.000 rcf a temperatura ambiente, e os precipitados secados à temperatura

ambiente por 1 hora. Após a secagem das amostras, adicionou-se 3,4µL de tampão de Loading Dye (kit do Big Dye Terminator da Amersham pharmacia biotech, USA). As amostras foram previamente desnaturadas a 99°C por 3 minutos antes de serem aplicadas no gel de sequenciamento.

As seqüências dos fragmentos da região ITS do rDNA foram separadas através de eletroforese, em géis de acrilamida do Kit da FMC (Long Ranger) por 10 horas com tampão TBE filtrado no seqüenciador modelo ABI 377 (Perkin Elmer Applied Biosystems Model 377 DNA Sequencer, USA).

5.6.3 Análise das seqüências ITS-rDNA dos isolados de *Fusarium* sp.

Os quatro fragmentos de seqüências de cada isolado foram agrupados através do programa computacional Phred/Phrap (Ewing et al., 1998) e Consed (Gordon et al., 1998). Os consensos gerados foram de alta qualidade com valor Phred maior ou igual a 20. As seqüências do consenso foram aparadas de maneira a se obter somente as regiões ITS1-5.8S-ITS2 para serem analisadas.

As seqüências dos consensos de cada isolado foram comparadas entre si e com outras seqüências de isolados do gênero *Fusarium* do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *Nectria haematococca* (NHA317959), *F. solani* f. sp. batatas (AF178407), *F. solani* f. sp. *piperis* (AF178422), *F. solani* f. sp. *glycines* (AF178418), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (AF322074), *F. oxysporum* isolado de planta de tomate (AF440548), *F. oxysporum* isolado de cravo (U28159), *Nectria borneensis* (AF178415), *F. graminum* (AF111064), *F. venenatum* (AF006350), *F. robustum* (FRU85539), *F. flocciferum* (FFU85536), *Gibberella zae* (AF006344), *F. cerealis* (AF006340), *Gibberella avenacea* (GAU26737), *F. sambucinum* (FSITSA). As seqüências foram alinhadas no programa computacional Clustal X 1.8 (Thompson et al., 1997). A árvore que mostra a relação filogenética entre os isolados de *Fusarium* foi construída com os valores da distância matriz pelo método neighbor-joining e 1000 valores de bootstrap (Figura 6). A análise computacional

para gerar a árvore filogenética entre os isolados é realizada utilizando-se o PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b5a, Swafford, 2001) usando o algoritmo branchswapping com pesquisa heurística com 50 replicas com árvore-bisseccionado-reconectadas (TBR).

6. RESULTADOS

6.1. Características da colônia da coleção de isolados

As características morfológicas das colônias dos isolados de *Fusarium* de tecido, solo e os padrões foram muitos variáveis. Foram observados o aspecto da colônia e a coloração. Os micélios apresentaram variações entre cotonoso e aveludado. Alguns isolados produziram pigmentação arroxeadada, outros variaram a coloração de branco a amarelo. A morfologia dos isolados não apresentou relação com seus hospedeiros.

6.2. Extração de DNA genômico total

Por ocasião da quantificação de DNA genômico total em espectrofotômetro, foram observados valores da razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ variando entre 1,630 e

1,873, caracterizando boa qualidade de DNA e ausência de proteínas e carboidratos. O grau de pureza em todas as amostras foi superior a 95%.

6.3. Análise da variabilidade dos isolados de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões gerados através de marcadores RAPD

Oito ampliações independentes foram realizadas com cada um dos oito “primers” selecionados ao acaso e com o DNA extraído dos 91 isolados de *Fusarium* de tecido, solo e padrões (Quadros 1, 2 e 3). Somente foram analisadas as bandas nítidas. Os “primers” OPA-03, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-18, OPB-10 e OPP-06, geraram marcadores que variaram de 1kb a 300 bp nos 91 isolados utilizados. O “primer” OPC-01 não amplificou todos os isolados, portanto, não foi utilizado na análise. Exemplo de bandas obtidas em uma das reações de RAPD com o “primer” OPA-03 é ilustrada na Figura 3.

A análise de variabilidade genética dos 91 isolados foi realizada com a combinação dos setes “primers”. Foram detectadas bandas polimórficas entre os isolados de *Fusarium* sp. de tecido, *Fusarium* sp. de solo e padrões, no qual cada isolado se diferenciaram por pelo menos uma banda diferente. Foram analisados 72 produtos de amplificação polimórficos, não sendo verificada nenhuma banda monomórfica entre todos os isolados. A similaridade genética, baseado na amplificação dos fragmentos é ilustrada na forma de dendrograma (Figura 4). Através desta análise foi permitido obter 3 grupos geneticamente distintos, com ponto de ramificação superior a 50%. Analisando cada grupo separadamente foi possível observar 12 bandas monomórficas no grupo 1, 7 bandas no grupo 2 e 20 bandas no grupo 3. No entanto, nas análises realizadas com o “primer” OPA-03 (Figura 3) foi observado que as bandas forte de 1.636 bp e 1000 bp que apresentaram-se nos isolados do grupo 1 não apresentaram-se nos isolados dos demais grupos.

No primeiro grupo ficaram todos os isolados de *F. oxysporum* usados como padrão (F.o.c.1, F.o.l, F.o.c.2., F.o.v) e dois de *F. solani* (Fe2235 e Cp2236) também usado como padrão e 70 isolados de tecidos e solos, com similaridade genética entre eles acima de 69%. No segundo grupo, dois isolados retirados de tecidos, um de banana e outro de

coco e 13 isolados de diferentes solos, com similaridade acima de 58,5% e no terceiro grupo, agruparam os isolados de *F. solani* (Fe2302 e Fe2080), um de tecido retirado de cachos de tâmaras e 3 isolados de solos, apresentando 57% de similaridade entre eles (Figura 4).

Os isolados Fe2235 e Cp2236 classificados como *F. solani*, por características morfológicas de colônias, pelos resultados de RAPD, apresentaram-se similaridade próximo aos isolados de *F. oxysporum*. O isolado Fe2235 exibiu maior porcentual de similaridade com o isolado F.o.v. com 83,7% e Cp2236 com os isolados F.o.c.1, F.o.v., F.o.l. com 82,6% de similaridade e entre os dois isolados (Fe2235 e Cp2236) foi observado similaridade de 85% (Quadro 6)

Os isolados de tecido de banana prata T-15, T-16, T-17, T-18, todos da região de Jaíba, apresentaram similaridade alta entre eles de 97,7%. Alta similaridade genética, foi também observado entre os isolados de solos da mesma região e com mesmo hospedeiro, exemplificando, isolados onde havia pastagem natural, S-3_{III2} e S-3_{III2A}, da região de Jaíba apresentaram 92% de similaridade, S-16_{I 4 A}, S-16_{I 4 B} e S-16_{I 4} isolados de mata virgem de Itacarambi (90%) e isolados S-21_{I 2} e S-21_{I 2 A} onde a cultura era maracujá em São Francisco apresentaram similaridade entre eles de 97,7% (Quadro 2 e 6). Localidades próximas com mesma cultura, no caso de São João do Paraíso onde cultivavam mandioca, os isolados de solo S-55_{II 4} e S-56_{III 5}, apresentaram entre eles similaridade genética de 85%.

Quadro 6: Matriz de similaridade genética, gerada pelo coeficiente Simple Matching, a partir de bandas obtidas por RAPD, de isolados de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões (citados na Quadro 1, 2 e 3, respectivamente).

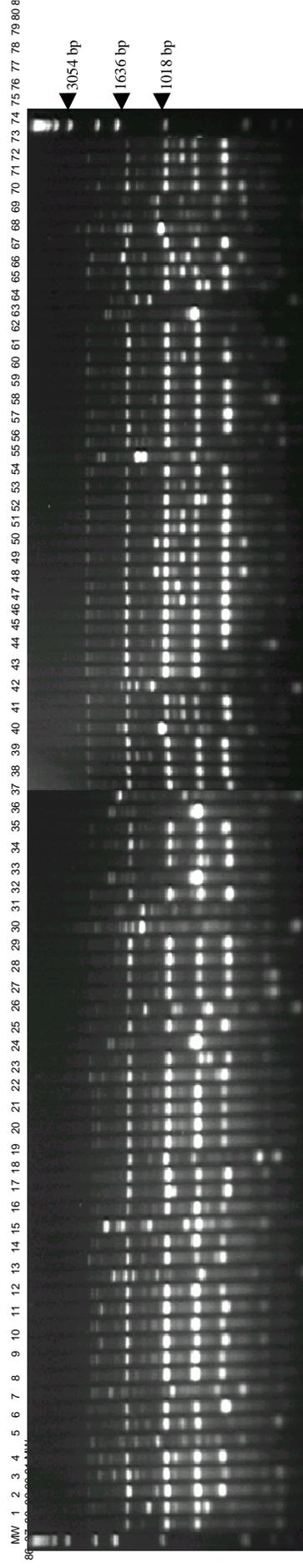


Figura 3: Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o “primer” OPA-03, entre os isolados de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões. MW= marcador de peso molecular Ladder 1 kb, 1= *F.o.cubense*, 2= *F.o. vasinfectum*, 3= *F. o. phaseoli*, 4= *F. o. lycopersici*, 5= *F. solani* (Fe 2302), 7= *F. solani* (Fe 2235), 8= *F. solani* (Cp2236), 9= *F. solani* (Fe 2080), 10 a 91 = isolados de *Fusarium* de tecido e solo listados nos quadros 1, 2 e 3.

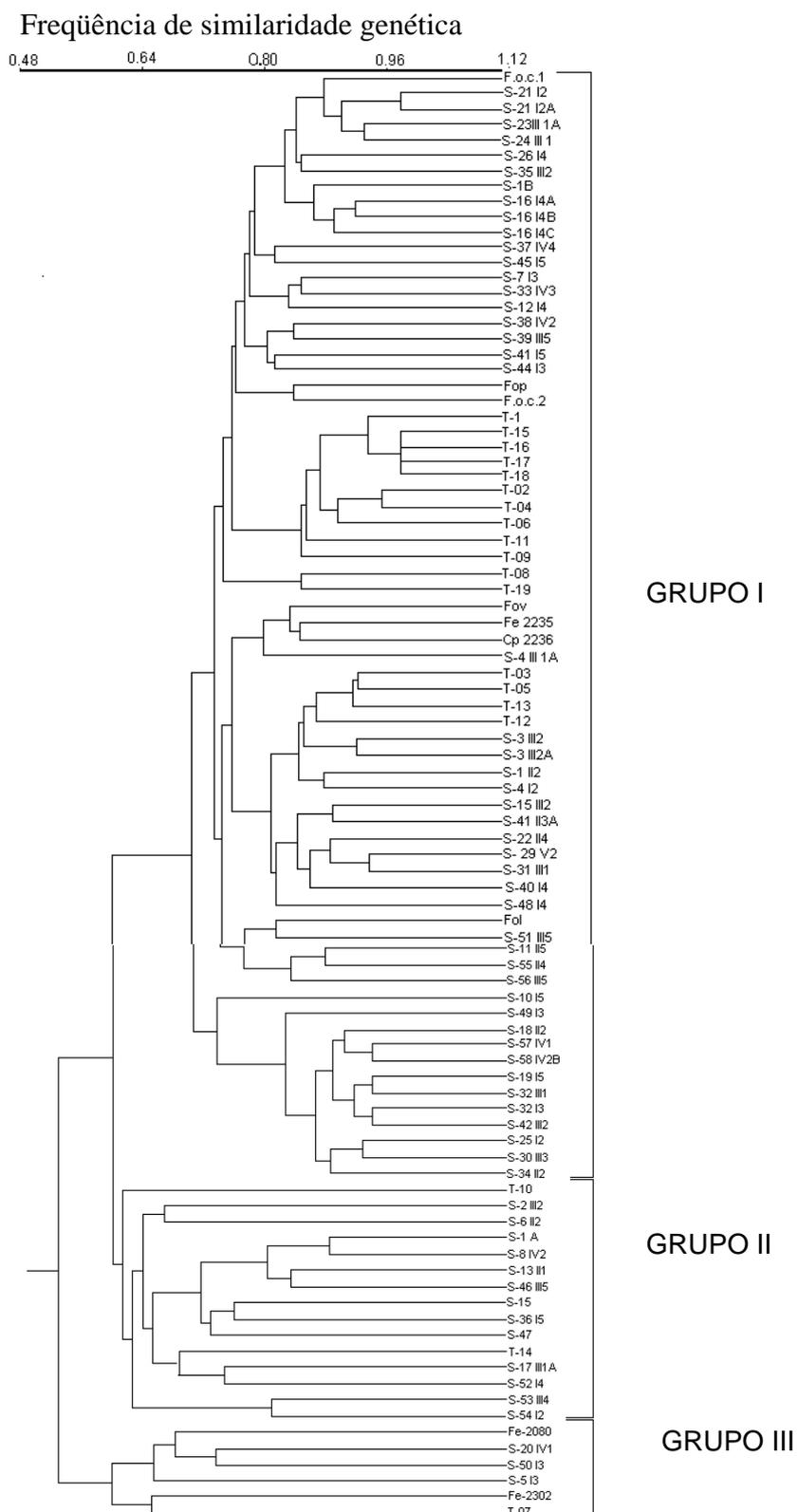


Figura 4: Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os “primers” OPA-03, OPA-08, OPA-10, OPA-13, OPA-18, OPB-10 e OPP-06, em análises de isolados de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões (citados na Quadro 1, 2 e 3).

6.4 Análise da variabilidade dos isolados de *Fusarium* sp. de tecido, de solo e dos padrões através de seqüências da região ITS – 5,8S rDNA

Os “primers” ITS4 e ITS5 utilizados na reação de PCR amplificaram fragmentos que incluem a região ITS e o gene 5,8S rDNA localizado entre os DNA ribossômico nuclear 18S e 28S (Figura 2). Foi amplificado um para cada isolado, de aproximadamente 600 a 650 bp (Figura 5).

Foi possível sequenciar com alta qualidade uma média de 530-600 pares de bases de cada isolado, o qual compreendia parte das regiões 18S e 28S, e no interior destas regiões seqüências completas de ITS 1, 5.8S rDNA e ITS 2. No entanto, para análise de similaridade genética e filogenia, utilizou-se apenas as seqüências completas de ITS 1, ITS 2 e 5.8S rDNA, no qual consistiam em média de 496 seqüências de nucleotídeos.

A análise de todas as seqüências de *Fusarium* utilizadas neste trabalho e mais as seqüências do GenBank geraram 3 grupos (Figura 6). O resultado da análise de seqüências de nucleotídeos demonstrou ser similar os resultados de RAPD. Em um primeiro grupo ficaram todos os isolados de *Fusarium oxysporum* (*F.o. cubense*, *F.o.vasinfectum*, *F.o.phaseoli*, *F.o.lycopersici*), isolados de *Fusarium oxysporum* oriundos do Gen Bank, 60 isolados de solo e tecido, e dois isolados de *F. solani* (Fe 2235 e Cp 2236) (Figura 6). Nos outros dois grupos encontram-se os isolados utilizados como padrões de *Fusarium solani*, 16 isolados de tecido e solo e os isolados de *F. solani* e *F. sp.* do GenBank (Figura 6).

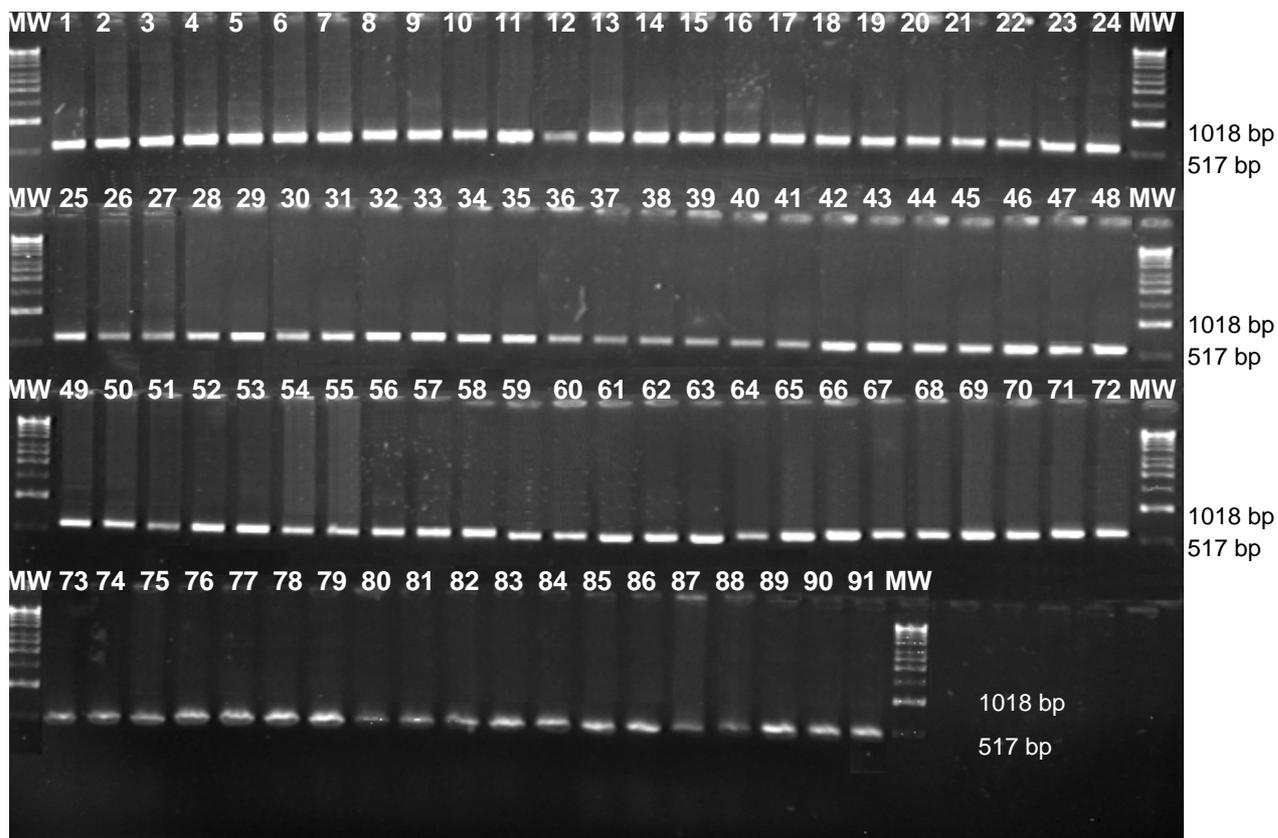


Figura 5: Amplificação de rDNA de isolados de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões utilizando os pares de "primers" ITS4 e ITS5. MW= marcador de peso molecular Ladder 1 kb, 1= *F.o.cubense*, 2= *F.o. vasinfectum*, 3= *F. o. phaseoli*, 4= *F. o. lycopersici*, 5= *F. o. cubense*, 6= *F. solani* (Fe 2302), 7= *F. solani* (Fe 2235), 8= *F. solani* (Cp2236), 9= *F. solani* (Fe 2080), 10 a 91 = isolados de *Fusarium* de tecido e solo listados nos quadros 1, 2 e 3.

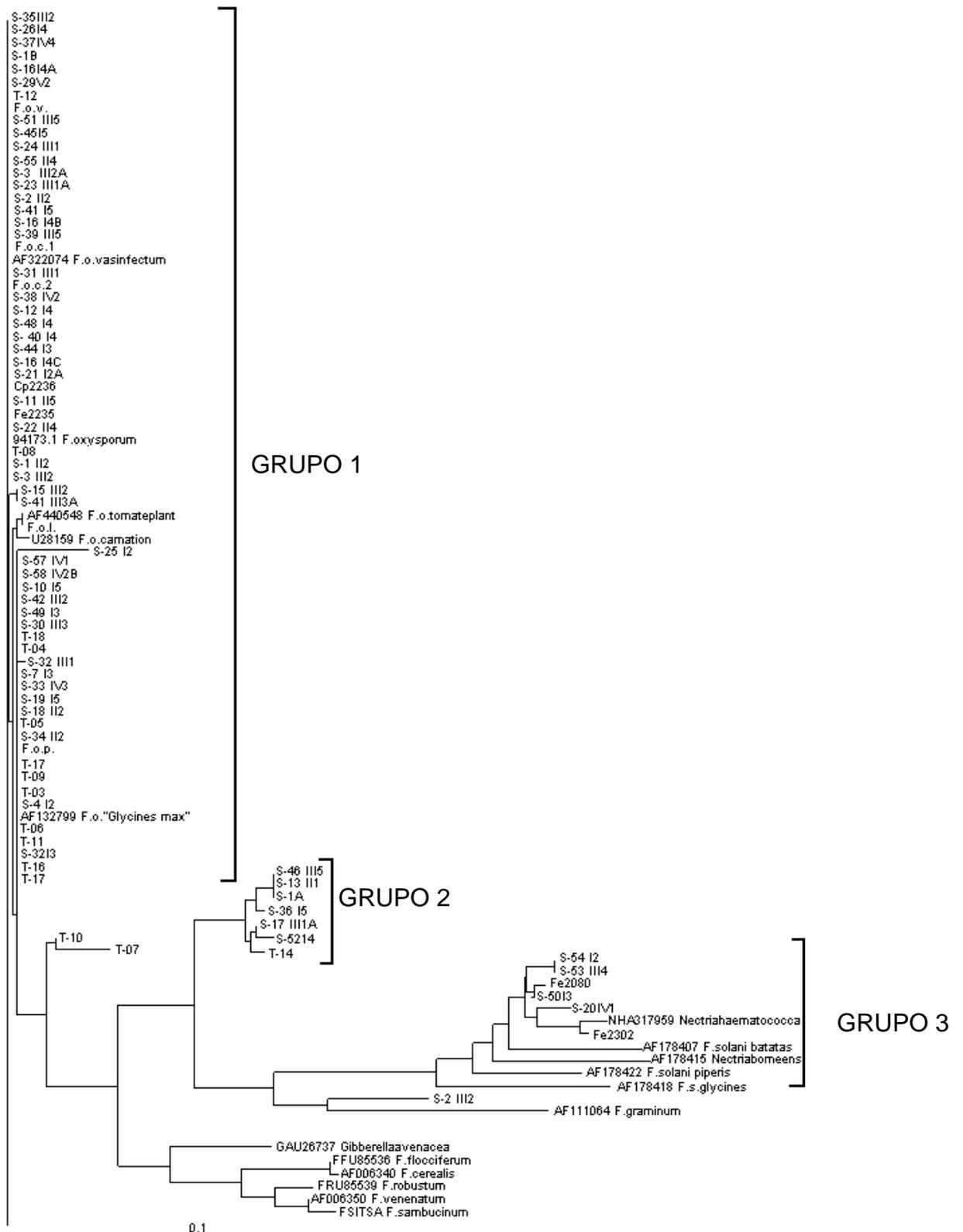


Figura 6: Dendrograma do alinhamento das seqüências obtidas da região ITS 1 e ITS 2 e o gene 5.8S rDNA de *Fusarium* sp. isolado de tecidos e solos, isolados padrões e isolados do GenBank.

O alinhamento das seqüências correspondente ao gene 5.8 rDNA entre todos os isolados, com 150 bp apresentaram 88,67% de homologia. Alinhamento somente com isolados do grupo 1, o gene 5.8S rDNA apresentou-se altamente conservados com 99,3% de homologia, havendo deleção da base C na posição 110 no isolado F.o. isolado de cravo (F.o.carnation “cravo” U28159) e substituição de bases C para T na posição 111 dos isolados de F.o.l., F.o. isolado de tomate (AF440548) e F.o. cravo (F.o.carnation “cravo” U28159) (Figura 7), enquanto que o gene 5.8S rDNA dos representantes de isolados de *F. solani* (grupo 2) apresentaram 96% de homologia, ocorrendo substituição de base T para C na posição 45 e 138 em *F. solani glycines* (AF178418) e no nucleotídeo da posição 81 de *Nectria borneensis* (AF178415) e base C para T em *F.s. glycines*, posição 74 e C para A em 82 de *Nectria haematocca* (NHA317959), neste isolado também houve a inserção da base A na posição 115 (Figura 6). No grupo 3, pôde-se observar a substituição de bases G para C nos isolados *F.robustum* (FRU85539) *Giberella avenacea* (GAU26737) na posição 21 e 107 respectivamente, do gene 5.8S rDNA.

O grupo 1 formado pelo alinhamento apresentou 155 pares de bases na região ITS 1, e todos apresentaram 100% de homologia, com exceção dos isolados S-25 I2 e t-18 que apresentaram homologia de 95,5% e 99,4% respectivamente. No isolado S-25 I2 houve substituição das bases CGAGAAA por T na posição 1, 2, 3, 4, 12, 13 e 14 e o isolado T-18 apresentou uma inserção do nucleotídeo C na posição 19 (Figura 8).

A região ITS 1 do grupo 2 apresentou 154 pares de bases com homologia de 99% entre os isolados deste grupo e 97,4% com isolados do grupo 1. O grupo 3 apresentou a região ITS 1 um pouco mais variada com 71% de homologia entre isolados do grupo e 68% com isolados do grupo 1, a variação ocorreu devido a substituição, inserção e deleção de bases, em vários da região ITS1.

A região ITS2 do grupo 1 apresentou 149 pares de base com 99,7% de homologia entre todos os isolados. O grupo 2 apresentou 91% de homologia com isolados do grupo 1 e o grupo 3,63% de homologia com o grupo 1.

Grupo 1

posição	110
	▼
Representante 1	TTGCGCCCGC
F.o.cravo(U28159)	TTGCGC- TGC
F.o.l.	TTGCGCC TGC
F.o.tomate (AF440548)	TTGCGCC TGC
	***** **

Grupo 2

posição	45	74	81	115	138
	▼	▼	▼	▼	▼
Representante 2	TGC	TCAGT	ATCAT	CA-GTA	GTT
<i>Nectria haematocca</i> (NHA317959)	TGC	TCAGT	ATA A T	CA A GTA	GTT
<i>Nectria borneensis</i> (AF178415)	TGC	TCAGT	A C CAT	CA-GTA	GTT
<i>F.s.glycines</i> (AF178418)	C GC	T TAGT	ATCAT	CA-GTA	G T C
	**	* **	* **	** **	**

Grupo 3

posição	21	66	106	114	122
	▼	▼	▼	▼	▼
Representante 3	TGGC	TG-CA	GCGCCCGCCA	CTGG	
<i>F.robustum</i> (FRU85539)	TG C C	TG-CA	GCGCCCGCCA	CTGG	
<i>Giberella avenacea</i> (GAU26737)	TGGC	TG G CA	G ACGCCCGCCA	CTGG	
<i>F.graminum</i> (AF111064)	TGGC	TG-CA	GCGCCCG C T G	C CGG	
	** *	** **	* ****	* **	

Figura 7: Local nas seqüências de nucleotídeos da região do gene 5.8S rDNA, onde ocorreram substituições, deleções ou inserções de bases. O nucleotídeo está destacado em itálico e negrito.

Grupo 1

Posição	1	4	1214	19
	▼	▼	▼	▼
Representante 1	CGAGT--TTACA A CTCCC-AAACCCC			
T_18	CGAGT--TTACA A CTCCC C AAACCCC			
S_25I2	T T T T --TTACT T T T TCCC-AAACCCC			

Figura 8: Local nas seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA, onde ocorreram substituições ou inserções de bases. O nucleotídeo está destacado em itálico e negrito.

7 DISCUSSÃO

Fusarium oxysporum Schlechtend é uma das espécies de maior variabilidade dentro do gênero *Fusarium*, possuindo populações patogênicas e não patogênicas, *forma specialis* para um único hospedeiro e para grupos de hospedeiro. A ocorrência da diversidade genética foi constatada entre os 82 isolados da coleção de *Fusarium* sp. de tecido e de solo da região norte de Minas Gerais, e 9 isolados adotados como padrão, baseando-se nos marcadores moleculares RAPD e sequências da região ITS-5.8S rDNA.

Os dendrogramas originados através do agrupamento UPGMA, a partir dos marcadores obtidos por RAPD e das seqüências obtidas da região ITSs e 5.8S rDNA de *Fusarium* sp. de tecido, solo e padrões, foram bastante semelhantes (Figura 4 e 6). Isolados pertencentes a cada grupo no RAPD, agruparam-se da mesma forma no sequenciamento de ITS - rDNA.

O resultado gerado através de RAPD mostrou a alta variabilidade genética entre todos os isolados de *Fusarium*, maior que 50%, isso ocorre por não conhecermos a *forma specialis* do fungo. Achenbach et al. (1996), através de RAPD, verificaram a baixa diversidade em 22 isolados de *F. solani* patogênico para soja, o qual apresentavam 100% de similaridade. Tantaoui et al. (1996), estudando *F.oxysporum* f. sp.

albedinis, causador de murcha em Tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) no Oásis de Morocco, encontraram uma baixíssima variabilidade genética, com distância genética de 0,11, e levantaram a hipótese de todos os isolados estudados derivarem de um único clone. Em contraste, Walker et al. (2001), trabalhando com *Fusarium graminearum*, causador da sarna do trigo no Norte da Carolina, através de RAPD encontrou uma alta variabilidade genotípica entre 66 isolados, os autores sugerem que a reprodução sexual está ocorrendo dentro da população de *Fusarium graminearum*, fungo homotálico, o que leva a alta diversidade genotípica e fenotípica em uma determinada área.

Assigbetse et al. (1994) através de análise por RAPD conseguiu separar 46 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, causador da murcha do algodoeiro, por raça e distribuição geográfica. Neste trabalho foi observado que os isolados pertencentes a mesma região geográfica e culturas idênticas teve similaridade muito alta (92,5%). Observou-se também, que alguns isolados espacialmente mais distantes (de acordo com o local de coleta) foram alocados num mesmo grupo. Possivelmente, isso ocorre devido a disseminação ocorrido nestes locais.

Nelson et al. (1997) estudando isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli*, causador da murcha de *Erythroxyllum coca* Lam var. *coca*, que estava ocorrendo de forma epidêmica na região de Huallaga Valley no Peru, verificaram a baixa variabilidade entre os isolados através de RAPD, separam os patogênicos dos não patogênicos e distinguiram a *forma specialis erythroxyli* das *formae speciales basilicum, lycopersici, melonis, niveum e acuminatum*. Em nossos resultados, através do RAPD foi possível observar a alta variabilidade genética entre os isolados de *Fusarium* de tecidos, solos e padrões. A análise de RAPD, com relação a patogenicidade, mostrou que o mesmo não pode se afirmar com a população dos isolados estudados, pois regiões de solo que apresentavam plantas com sintomas de murcha, ficaram em diferentes grupos no dendrograma gerado. Uma das hipóteses geradas é que ao fazer cultura monospórica pode-se ter isolado justamente o conídio não patogênico. Em *Fusarium oxysporum* não foi possível distinguir a *forma specialis cubense* das *formae speciales vasinfectum, lycopersici e phaseoli*.

A caracterização de *Fusarium* é bastante trabalhosa, requerendo prática nas observações microscópicas para identificação de espécies, para em seguida realizar inoculações em vários hospedeiros para distinguir a *formae speciales*. Baseando-se na

morfologia os isolados Fe2235 e Cp2236 foram classificados como *F. solani*, no entanto através de análise de DNA (RAPD e ITS-5.8S rDNA), foi verificada similaridade próximo aos isolados de *F. oxysporum*. Essa inconsistência entre a identificação taxonômica, morfológica e genética também foi relatada por Riveros et al. (2001), estudando isolados chilenos de *Fusarium* em melão (*Cucumis melo* L.), observaram que um isolado identificado através de metodologia convencional como *F. solani* era geneticamente similar com o grupo formado de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (F.o.m.), enquanto que alguns isolados identificados como *F. o. melonis* foram geneticamente similares com *F. semitectum*. Duggal et al (1997), estudaram 18 isolados representando seis espécies de *Fusarium* de diversos hospedeiros e origem geográfica e tiveram discordância de dois isolados, através de dados morfológicos um isolado se assemelhava a *Fusarium oxysporum* e o outro a *F. sambucinum*, após a análise da região ITS observou-se que o primeiro isolado era geneticamente muito diferente de *F. oxysporum*, e o segundo isolado apresentou similaridade a *F. torulosum*.

A análise das seqüências da região ITS - 5.8S rDNA dos isolados de *Fusarium* sp. de tecidos, solos, padrões e seqüências adquiridas no GeneBank, geraram dendrogramas que separaram todos os isolados de acordo com a classificação de Wollenweber e Reinking (1935) descrita por Nelson (1991). Isolados de *F. oxysporum* ficaram incluídos dentro de um grupo, e os isolados de *F. solani* dentro de outro grupo (Figura 6). Esses grupos correspondem à seção *Elegans*, subseção *Oxysporum*, seção *Martiella/Ventricosum*, no qual compõe os isolados de *F. solani* (fase teleomórfica *Nectria*) e seção *Discolor e Roseum*, onde se enquadram os *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. venenatum*, *F. avenaceum* (fase teleomórfica *Giberella*). Essa separação também pode ser observado no trabalho de Silva-Hanlin et al. (1999), onde através do sequenciamento da região ribossomal do DNA, não conseguiu separar *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, mas estes se mostraram variáveis o suficiente para separar de *F. subglutinans*.

Entre os isolados de cada grupo (1, 2 e 3), a diversidade genética foi bastante baixa, mostrando que a região 5.8S rDNA é conservada dentro da espécie mas altamente variável entre as espécies. No trabalho observou-se 100% de homologia entre os isolados do grupo 1, com exceção dos isolados F.o.cravo (U28159), F.o.l. e F.o.tomate (AF440548), que apresentaram substituição de uma base. Moricca et al. (1995) revelou que o gene 5.8S rDNA de *F. sambucinum* apresenta uma homologia de 100% com *F. oxysporum*.

Analisando as seqüências das regiões ITS1 e ITS2 separadamente, foi observada variabilidade interespecífica, no entanto, o dendrograma é semelhante ao da análise da região ITS1, ITS2 e gene ribossomal 5.8S rDNA juntos. Waalwijk et al (1996), comparou a região ITS de isolados de *Fusarium* da seção *Elegans*, *Liseola* e *Dlaminia*. Seis espécies (*F. fujikuroi*, *F. napiforme*, *F. proliferatum*, *F. sacchari* var. *sacchari*, *F. subglutinans* e *F. verticiloides*) tinham seqüências idênticas na região ITS 1, e todas estão próximas de *F. oxysporum*. Estas espécies também apresentam similaridade morfológica quando crescida em meio BDA. Entretanto, a região ITS2 apresentou variabilidade de seqüências entre os isolados.

Resultados deste presente estudo demonstra que a análise das seqüências da região ITS - 5.8S rDNA se assemelha com a classificação realizada por Snyder e Hansen (1953), conceitos aplicados através da morfologia e biologia das espécies, para *F. solani* e *Nectria*, o qual *Nectria* é a fase teleomórfica de *F. solani*, ambos geneticamente apresentaram similaridade bastante alta. (Figura 6, grupo3)

Moricca et al. (1998) baseando-se nas seqüências ITS1, ITS2 e gene ribossomal 5.8S rDNA, desenhou “primers” específicos para o patógeno *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* sintomático e assintomático, responsável pela murcha do algodoeiro. Os “primers” sintetizados Fov1 (5'-CCCCTGTGAACATACCTTACT-3') e Fov2 (5'-ACCAGTAACGAGGGTTTTACT-3'), foram testados com sucesso em isolados de outros fungos também causadores de murcha do algodoeiro, *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *F. moniliforme*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum* e *F. solani*, em isolados saprofítico do algodoeiro, *Aspergillus* sp., e em isolados de *F. o. vasinfectum* provindos da Angola, China, Brasil e USA. Conseguindo amplificar fragmentos apenas em isolados de *F. o. vasinfectum*. No entanto, comparando os “primers” Fov1 e Fov2 com os isolados de *F. oxysporum* (F.o.l, F.o.v., F.o.c., F.o.c.p., F.o.p.) seqüenciados neste trabalho (Figura 9), e com isolados de *F. o.* (AF440548, U28159, AF322074, FOX94173.1, AF132799) obtidos no GeneBank notou-se que o “primer” o Fov1 começa na posição 23 da região ITS1 e o “primer” Fov2 na posição 453 da região ITS2 (Figura 9). Observa-se no alinhamento a identidade de 100% dos “primers” (F.o.v.1 e F.o.v.2), portanto é possível a amplificação de todos os isolados do grupo 1, no entanto o “primer” desenhado para F.o.v. não é só específico para *F. o. vasinfectum*.

ITS 1 →	[5.8S]	← ITS 2
23	(172 a 322)	453
AF322074Fovasinfectum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
A_F.o.c.	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
65_S_3911I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
39_S_1614B	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
69_S_41I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
45_S_21I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
48_S_2311I1A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
25_S_3111I2A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
82_S_55I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
49_S_2411I1	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
72_S_45I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
78_S_5111I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
22_S_1B	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
B_F.o.v.	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_12	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
54_S_29V2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
38_S_1614A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
63_S_37IV4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
94173.1 Foxysporum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
G_Fe2235	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
33_S_111I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
H_Cp2236	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
61_S_3511I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
51_S_26I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
56_S_3111I1	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
E_F.o.c.p.	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
64_S_38IV2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
66_S_40I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
71_S_44I3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
40_S_1614C	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
46_S_21I2A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
34_S_12I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
47_S_22I14	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
20_S_11I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_08	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
75_S_48I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
24_S_31I12	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
67_S_4111I3A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
37_S_1511I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
U28159F.o.carnation	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
D_F.o.l.	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF440548Fotomatplant	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_18	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
58_S_3211I1	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
76_S_49I3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
84_S_57IV1	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_04	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_06	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
70_S_4211I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
57_S_32I3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
85_S_58IV2B	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
C_F.o.p.	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
43_S_19I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
55_S_3011I3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
30_S_7I3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
42_S_18I12	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
50_S_25I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_11	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
32_S_10I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_16	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_17	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_05	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
59_S_33IV3	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_13	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF132799Po*Glycinemax	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_09	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
60_S_341I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
26_S_4I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_03	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_07	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_10	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
FFU85536F.flocciferum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--T-TARGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF006340F.cerealis	<i>CCCTGTGAA-CATACC--T-TARGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF006350F.venenatum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TCTARGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
FSITSAF.sambucinum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TCTARGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
FRU85539F.robustum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TTTARGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
GAU26737Gib.avenacea	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TATAAGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
79_S_52I4	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
41_S_1711I1A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--ACT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
T_14	<i>CCCTGTGAA-CATACC--AAT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
35_S_1311I1	<i>CCCTGTGAA-CATACC--AAT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
73_S_4611I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--AAT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
21_S_1A	<i>CCCTGTGAA-CATACC--AAT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
62_S_36I5	<i>CCCTGTGAA-CATACC--AAT-TGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF111064Fgraminum	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TTAATGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
23_S_211I2	<i>CCCTGTGAA-CATACC--TTAATGTTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
77_S_50I3	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TATAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
I_Fe2080	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TATAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
80_S_5311I4	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TAAAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
81_S_54I2	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TAAAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
NHA317959Nec.haemato.	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TAAAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
F_Fe2302	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TAAAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
44_S_20IV1	<i>CCCTGTGAA-CTTACC-TATAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF178407Fsolanibatata	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-CA-AACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF178415Nec.borne.	<i>CCC-TGTGAA-CATACC-TACAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF178422Fsolanipiperi	<i>CCCTGTGAA-CTTTTACCCAAAGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
AF178418F.s.glycines	<i>CCCTGTGAA-CTTACC-TATAACGFTG</i>	AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAAC-CCTCGTTACTGGT
	*** **	*** **

Figura 9 : Local onde a seqüência de “primers” de F.o.v. desenhado por Moricca et al., começa nas regiões ITS1 e ITS2 nos isolados do grupo 1 formado após o sequenciamento. Seqüência de “primer” destacado em negro e itálico.

8 CONCLUSÕES

- 1) O marcador molecular RAPD detecta variação genética interespecífica e intraespecífica nos isolados de *Fusarium* de tecidos de plantas doentes e de solo.
- 2) Foram constatados isolados idênticos, através da distância genética gerado pelo marcador RAPD.
- 3) Com o sequenciamento da região ITS e do gene 5.8S rDNA, é possível observar apenas a variabilidade interespecífica dos isolados analisados.
- 4) Devido a baixa variabilidade genética dentro da população, o sequenciamento da região ITS e do gene 5.8S rDNA, possibilita a separação dos isolados apenas por seção taxonômica. Seção *Elegans* (*F. oxysporum.*), da seção *Martiella* (*F. solani*) e da seção *Liseola* (*F. graminum*, *F. venenatum*).
- 5) Através dos marcadores moleculares (RAPD e sequenciamento do gene ITS-5.8S rDNA) não é possível separar as “*formae speciales*” dos isolados.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACHENBACH, L.A.; PATRICK, J.; GRAY, L. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.11, p.1228-1232, 1996.

AGRIOS, G.B. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 653 p.

ASSIGBETSE, K.B. et al. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.6, p.622-1626, 1994.

BANANA: Fruta de qualidade para conquistar consumidor mais exigente. **Agrianual 2001: Anu. Estat. Agric. Bras.**, p. 194 - 200, 2000.

CORDEIRO, Z. J. M. Doenças e nematóides. In: ALVES, E. J. et al. **Banana para exportação**: aspectos técnicos da produção. 2.ed. ver. Atual. Brasília: Serviço de Produção de Informação / EMBRAPA, 1997. p.69-86.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA Faculdade de Ciências Agrônômicas.
Normas para elaboração de dissertações e teses. Botucatu, 2002.

- CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira – *Musa* spp. In: GALLI, F. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.112-135.
- CORDEIRO, Z. J. M. et al.. Reação de cultivares e clones de banana ao Mal-do-Panamá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n.4, p. 197-203, 1991.
- DUGGAL, A. et al. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. **Mycopathologia**, Netherlands, n.140, p.35-49, 1997.
- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Ottawa, n.8, p.175-185, 1998.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Ottawa, n.8, p.195-202, 1998.
- GOWEN, S.R. Bananas and plantains. In: HILLOCKS, R.J., WALLER, J.M. (Eds.) **Soilborne diseases of tropical crops.** Wallingford: CAB International, 1997. p. 175-179.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.6, p.612-614, 1993.
- KELLY, A. et al. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.11, p.1293-1298, 1994.
- KISTLER, H.C. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.4, p.475-479, 1997.
- 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.

KURAMAE-IZIOKA, E. E.; SOUZA, N. L. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to differentiate *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* and races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. In: **INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS**, 6., 1998, **Jerusalem**. Proceedings... Jerusalem, 1998. p.151.

LESLIE, J.F. Genetic exchange within sexual and asexual populations of the genus *Fusarium*. In: PLOETZ, R.C. **Fusarium wilt of banana**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p. 37-49.

MEDINA, J.C. Cultura. In: MEDINA, J.C et al. **Banana:cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. 2.ed.. Campinas: ITAL, 1995.

MOREIRA, R.S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. Cap. 9, p.289-326.

MORICCA, S. et al. The sequence of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 5.8S rRNA and adjacent ITS1 and ITS2 regions. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v.42, p.53-55, 1995.

MORICCA, S. et al. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, Oxford, v.47, p.486-494, 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 jun. 2002.

NELSON, A.J. et al. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.12, p.1220-1225, 1997.

NELSON, P.E. History of *Fusarium* systematics. In: Recent Advances in *Fusarium* systematics. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.9, p.1045-1048. 1991.

NELSON, P.E. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In: PLOETZ, R.C. **Fusarium wilt of banana**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p.27-35.

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.

OUELLET, T.; SEIFERT, K.A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.9, p.1003-1007, 1993.

PEREIRA, L.V. et al. Doenças da bananeira. In: **Banana: produção, colheita e Pós-colheita**. Belo Horizonte: Informe Agropecuário, v20, n.196, p.37-47, 1999.

PFENNING, L.H. O gênero *Fusarium*: novas tendências na sistemática e patossistemas emergentes. Mesa Redonda 1 – Taxonomia de Fungos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27 (suplemento) p.S20-S24, 2002.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt (Panama disease). In: PLOETZ, R.C. et al. **Compendium of tropical fruit diseases**. St.Paul: The American Phytopathological Society, p.10-11, 1994.

RIVEROS, B.F. et al. Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *Fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.). **Agricultura Técnica**, Chile, v.61, n.3, p.281-293, 2001.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Setauket: Exeter Software Publishers, 1992.

SAMBROOK, J.; MANIATS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor: Laboratory, 1989.

SILVA, J.F.V. et al. Análise de RAPD em isolados de *Fusarium* spp. parasitas de ovos de *Heterodera glycines* ou de plantas de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.491-496, 2000.

SILVA-HANLIN, D.M.W. et al. Ribossomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.4, p.534-539, 1999.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.44, n.03, p.338-342, 1953.

STOVER, R.H. **Banana, platin and abacá diseases**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 316 p.

SUN, E.J.; SU, H.J.; KO, W.H. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.11, p.1672-1673, 1978.

TANTAOU, A. et al. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* causing bayoud disease of date palm in Morocco. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.07, p.787-792, 1996.

THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Eynsham, v.24, p.4876-4882, 1997.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneápolis: Burgess, 1969. 239 p.

WAALWIJK, C., KONING, J.R.A., BAAYEN, R.P., GAMS, W. Discordant groupings of *Fusarium* spp. From sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlamia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. **Mycologia**, Bronx, v.88, n.3, p.361-368, 1996.

WALKER, S.L., LEATH, S., HAGLER, W.M. JR., MURPHY, J.P. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, n.4, p.404-410, 2001.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelgard, D.H.; Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WINDELS, C.E. Current Status of *Fusarium* taxonomy. In: Recent Advances in *Fusarium* systematics. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.9, p.1048-1051. 1991.

WOO, S.L. et al. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLP, and RAPD. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.9, p.966-973, 1996.