

**DENISE DE SANTANA SILVA**

**Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*  
em helicônia utilizando ARDRA e RAPD**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Fitopatologia-  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
mestre em Fitopatologia.**

**RECIFE  
JANEIRO, 2009**

**Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*  
em helicônia utilizando ARDRA e RAPD**

**DENISE DE SANTANA SILVA**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciane Vilela Resende – Orientadora**

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Neilza Reis Castro – Co-orientadora**

**Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara – Co-orientador**

**RECIFE  
JANEIRO, 2009**

**Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*  
em helicônia utilizando ARDRA e RAPD**

**DENISE DE SANTANA SILVA**

Dissertação \_\_\_\_\_ e \_\_\_\_\_ pela Banca Examinadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**ORIENTADORA:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciane Vilela Resende**

**EXAMINADORES:**

---

---

---

---

**Aos meus pais José Martins e Ivonete Damião,  
e irmão, Gilson Santana, que estão  
sempre ao meu lado.**

**OFEREÇO COM AMOR**

**A todos da família Martins e Damião Santana,  
que sempre me deram força.**

**DEDICO**

**Aos Professores  
Rildo Sartori e Neilza Castro  
AGRADEÇO EM ESPECIAL**

Muitas vezes, as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.  
Perdoe-lhes assim mesmo.  
Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.  
Seja gentil assim mesmo.  
Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos  
verdadeiros.  
Vença assim mesmo.  
Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.  
Seja honesto e franco assim mesmo.  
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora  
para outra.  
Construa assim mesmo.  
Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.  
Seja feliz assim mesmo.  
O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.  
Faça o bem assim mesmo.  
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.  
Dê o melhor de você assim mesmo.  
Veja você que, no final das contas, é entre você e Deus.  
Nunca foi entre você e as outras pessoas.

**Madre Teresa de Calcutá**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me confortar nas horas difíceis e me alegrar nos momentos divertidos, estando de prontidão quando eu precisava de uma “ajuda divina”.

Aos meus pais, José e Ivonete, e o meu irmão, Gilson, pela dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação oferecida através dos cursos de Engenharia Agrônoma, Licenciatura em Ciências Agrícolas e Mestrado em Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À orientadora Luciane Vilela, pela orientação.

Ao Professor Rildo Sartori, pelos ensinamentos transmitidos, contribuindo para minha formação fitopatológica, para mim será sempre um exemplo de pessoa e profissional.

À Neilza, pela Co-orientação, a pessoa responsável pela conclusão desse trabalho, além da grande amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade pelos conhecimentos, experiências e ensinamentos transmitidos, contribuindo dessa forma, para a minha formação profissional.

Aos amigos Manuela e José Carlos, pela ajuda na realização dos trabalhos, amizade e pelos bons momentos de descontração no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia/Fitotecnia Allison, Horáce, Helen, Ana Luiza, Ana Verônica, Adônis, Cláudio, Renato, pelas conversas e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Genômica do IPA pela colaboração na realização do trabalho.

Aos amigos de turma Márcio, Saulo, Thiago e Liliane pelos difíceis e bons momentos durante o curso.

Aos bons amigos da fitopatologia Valéria, Alba Valéria, Kátia, Isadora, Clêidio, Frank, Adriana, Juliana, Leonardo Jean, Robson, Cíntia, Marcelo, Paulo Henrique, Erick, Rinaldo, Wagner, Eddy, Zilderlânia, Lílian, Sandra, Daniele e Haílson pela boa convivência.

Às amigas Janaína, Solange, Gheysa, Mabel e Anailza que me acolheram em suas casas, sempre com muito carinho e pelos momentos de descontração e festas.

À amiga Albaneide por sempre escutar meus dilemas durante o curso, confiança e amizade, além das caronas, almoços e compras no shopping.

Aos sempre amigos, Gustavo Jonnas, Alberto, Ana Luiza, Eurides, Virgínia, André, Gerlúrcio e Edimilson, Renata, Mariana, Ednaldo, Ricardo, Genoveva, Gina, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do IPA, Claudemir, Thiago Ferraz, José Carlos, Abinadabe, José Willins, João Isidoro, Kaisa, Karina, Cristiane, Cristina, Renata, Bartolomeu, Luís Otávio, Josimar, Pricila, Júlio Mesquita e todos os demais, por todos os bons momentos e amizade.

Aos funcionários da área de Fitossanidade Darci Martins, Romildo, Luís Coelho, Sr. Luís, Adelmo pela paciência e atenção.

À todos, minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>CAPÍTULO I – Introdução Geral</b> .....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
<b>CAPÍTULO II – Diversidade genética de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> em helicônia utilizando ARDRA</b> .....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
<b>CAPÍTULO III – Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>, agente causal da murcha de fusário em helicônia</b> .....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	70

## RESUMO

As helicônias são as flores mais cultivadas dentro da floricultura tropical no Nordeste brasileiro, devido a características como beleza, exotividade, cores exuberantes e rusticidade, porém a produção de várias espécies vem sendo afetada pela murcha de fusário, causada pelo fungo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética existente entre os isolados de *F.oxysporum* f. sp. *cubense*, coletados em helicônias e bananeiras através da análise da região ITS do rDNA utilizando ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis) e marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Para a amplificação da região do rDNA, foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 que foram digeridos pelas enzimas de restrição *Hae* III, *Xho* I, *Hind* III e *Eco* IV a 37°C. Porém apenas a enzima *Hae* III, neste trabalho mostrou ser um marcador molecular eficiente, utilizada na técnica de ARDRA para estudos de diversidade genética dos isolados. Para o marcador RAPD realizou-se a Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizando-se dez oligonucleotídeos de seqüência arbitrária, onde apenas sete oligonucleotídeos geraram um total de 44 bandas polimórficas com fragmentos que variaram de 100pb a 700pb. As duas técnicas utilizadas no estudo de diversidade genética evidenciaram alta variabilidade genética do fungo, não relacionada com as regiões geográficas onde foram coletados os isolados.

Palavras-chaves: helicônias, murcha de fusário, diversidade genética



## ABSTRACT

Heliconias are the most cultivated flowers in tropical floriculture of the Brazil northeast, due to its characteristics like beauty, exotic, exuberant colors and rusticity, but its yield has being affected by Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. The present study had how objective to determine the genetic diversity existing between the isolates of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* collected in heliconia and banana through the ITS region of rDNA using ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), markers like RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). In the ARDRA analysis products amplified by ITS1 and ITS4 primers were digested by restriction enzymes *Hae* III, *Xho* I, *Hind* III and *Eco* IV by 37°C. But only enzyme *Hae* III showed to be efficient a molecular marker, to analysis genetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* to RAPD marker was realized the Polymerase Chain Reaction (PCR) using ten oligonucleotides follow arbitrary up, only seven oligonucleotides generated a total 44 bands polymorphic with fragments varying from 100 pb to 700 pb. The two techniques used in the study genetic diversity showed high genetic variability of fungal, don't related to with geographical region where were colleted the isolates.

Additional Keywords: heliconias, Fusarium wilt, genetic diversity

**CAPÍTULO I**

---

**INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Floricultura**

A floricultura no Brasil apresenta uma área cultivada estimada em 8,4 mil hectares. A sustentabilidade econômica da atividade é garantida pelo vigor do mercado interno que atingiu em 2007, a movimentação anual de US\$ 1,3 bilhão. As exportações giram em torno US\$ 35 milhões em vendas anuais, ou o equivalente a 2,7% do valor da produção com crescentes embarques para Holanda, EUA, Japão, Espanha e França, e mais outros 30 diferentes destinos em todo mundo (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

Neste contexto estão envolvidos 5.152 produtores, em toda a cadeia produtiva, são gerados 120 mil empregos, dos quais 58 mil estão localizados na produção. A produção é desenvolvida em pequenas propriedades, cuja média nacional de área cultivada é de 3,5 hectares (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

No Brasil, o cultivo de flores tropicais é realizado, principalmente, nos estados de Pernambuco, Alagoas, Ceará, Bahia, Sergipe, Pará, Amazonas, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (JUNQUEIRA; PEETZ, 2005). Na região Nordeste destacam-se os estados de Pernambuco, Alagoas e Ceará que atuam como principais exportadores de flores tropicais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2007). Esta peculiaridade pode ser explicada pelas condições climáticas favoráveis e pela facilidade de exportação aliada a proximidade em relação a posição geográfica dos centros consumidores como a Europa e os Estados Unidos (BEZERRA, 1997).

O estado de Pernambuco apresenta uma área de produção de flores tropicais em torno de 54,03 hectares, responsável por 28,67% do total da floricultura do estado e tem apresentado nos últimos anos uma ampliação em área plantada (SEBRAE, 2005).

Os principais municípios produtores de flores tropicais em Pernambuco são: Ribeirão, Primavera, Paulista, Água Preta, Camaragibe, Paudalho, São Lourenço da Mata, Jaboatão dos Guararapes, Barra de Guabiraba e Petrolina. No âmbito nacional, o estado comercializa 70% das flores tropicais. A produção é destinada para floriculturas, buffets, funerárias, decoradores e público em geral (CASTRO, 2007).

### **Espécies de Flores Tropicais Cultivadas**

Na produção de flores tropicais, destacam-se cinco famílias de maior aceitação comercial: Musaceae (*Musa coccinea* Ander., *M. ornata* Ander. e *M. velutina* Ander.), Zingiberaceae (*Alpinia purpurata* Vieill. Schum., *Etilingera elatior* Jack. R.M. Smith e *Zingiber spectabiles* Griff.), Costaceae (*Costus spicatus* Susseng. e *Tapeinochilos ananassae* Hassk.), Marantaceae (*Calathea* spp.) e Heliconiaceae (*Heliconia* spp.) (CASTRO, 2007).

Dentre as flores tropicais, as helicônias são as mais comercializadas, devido a características como beleza, exotividade, apresentar cores exuberantes, rusticidade, boa resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita. Até a década de 80, o principal aproveitamento dado ao cultivo de helicônia era o paisagismo, a partir de então, iniciaram-se cultivos comerciais para a produção de flores de corte (LAMAS, 2001). Em 1985, com a fundação da “International Heliconia Society” (Sociedade Internacional de Helicônia), vários aspectos sobre o gênero *Heliconia* começaram a ser estudados, tornando suas espécies importantes também como plantas cultivadas em vasos (COSTA, 2005). As helicônias são utilizadas como flores de corte, paisagismo, ou ainda, como planta de vaso para interiores (ABALO, 1999). Algumas espécies têm maior aceitação no mercado consumidor, como as *H. bihai* L., *H. wagneriana* Peters.,

*H. psittacorum* L., *H. stricta* Huber, *H. rostrata* Ruiz e Pavan, *H. chartacea* Lom. E os híbridos originados das *H. psittacorum* L. x *H. spathocircinata* Aristiguieta.

### **Origem, histórico e distribuição das helicônias**

O nome *Heliconia* é derivado de “Helicon”, uma montanha da Grécia Meridional, entendido pelos antigos gregos como a casa das Musas, assim sugerindo o relacionamento entre estas plantas e as bananeiras (gênero *Musa*) (BERRY; KRESS, 1991), já que antes de pertencerem à família Heliconiaceae, as helicônias eram classificadas como Musaceae. Conhecidas popularmente como bananeira-de-jardim, bananeirinha-de-jardim, bico-de-guará, falsa-ave-do-paraíso, bico-de-papagaio e paquevira, estão botanicamente classificadas na ordem Zingiberales (ATEHORTUA, 1998). Estas plantas pertencem ao gênero *Heliconia* L., único da família Heliconiaceae, associado, erroneamente, à família da bananeira (Musaceae) e da flor “ave-do-paraíso” (Strelitziaceae) (BERRY; KRESS, 1991).

Quanto ao número de espécies, existe grande divergência (BERRY; KRESS, 1991). Estima-se que o gênero possua aproximadamente 250 espécies distribuídas inicialmente nos neotrópicos, mas apenas 180 foram descritas até o momento (BERRY; KRESS, 1991).

Estas plantas de origem tropical apresentam ampla distribuição na América Central e na América do Sul, sendo nativas dos trópicos americanos, do Trópico de Câncer no México Central até o Trópico de Capricórnio na América do Sul, incluindo o Caribe (BERRY; KRESS, 1991). Atualmente, têm sido produzidas em quase toda a região tropical do mundo, inclusive África e Ásia. Em áreas, como por exemplo, Havaí e Fiji, algumas espécies têm sido cultivadas e estão agora naturalizadas neste habitat

exótico (BERRY; KRESS, 1991). Sendo atribuído à popularização das helicônias como flor de corte e para paisagismo (COSTA, 2005).

Conforme a espécie, as helicônias ocorrem em altitudes que variam de zero a 2000m, embora sejam poucas aquelas restritas às regiões mais altas (CASTRO, 1995). A maioria habita regiões úmidas, mas algumas estão presentes em áreas periodicamente secas. Ocorrem predominantemente nas bordas das florestas e matas ciliares e nas clareiras ocupadas por vegetação pioneira, desempenhando um importante papel ecológico dentro dos ecossistemas, atuando no processo de regeneração natural da vegetação e restauração de solos degradados. Essas características indicam rusticidade e adaptação a condições adversas, o que tornam as helicônias aptas a serem utilizadas em jardins de residências e de condomínios, parques, praças públicas, áreas de recreação, entre outros (LOGES, 1999).

### **Botânica e propagação das helicônias**

As helicônias são plantas herbáceas, rizomatosas, perenes, com caule ereto, aéreo, formado pela sobreposição das bainhas das folhas, sendo chamado de pseudocaule (CRILEY; BROCHAT, 1992), e emitem perfilhos, formando touceiras. Os perfilhos podem ser emitidos próximos à planta ou mais afastados, o que caracteriza a capacidade de expansão de cada espécie. Apresentam-se com altura variando de 0,5 a 10 m de altura e no ápice do pseudocaule forma-se apenas uma inflorescência terminal, ereta ou pendente, com brácteas dísticas, espaçadas e coloridas (BERRY; KRESS, 1991), que aparecem após a emissão de quatro ou cinco folhas (CASTRO, 1995).

A inflorescência é composta pelo pedúnculo (parte da planta que une o pseudocaule à base da bráctea), folhas modificadas com colorações variadas (brácteas)

unidas através da ráquis, podendo estar dispostas em um plano ou mais de um plano devido à torção da ráquis, ficando assim, com forma espiralada (COSTA, 2005). As inflorescências podem ficar expostas ou quase escondidas entre a folhagem das touceiras. As cores variam nas brácteas do (amarelo, amarelo-alaranjado, alaranjado, vermelho-alaranjado e vermelho) produzem impressão de harmonia (SANTOS, 1975), além de conferir exotividade às helicônias, caracterizando-as como plantas de jardins tropicais. O período de florescimento varia conforme a espécie e é afetado pelas condições edafo-climáticas (CASTRO, 1995).

A bráctea inferior apresenta-se freqüentemente sem flores e as demais mostram flores que variam em comprimento, forma e cor, conforme a espécie, e ainda, exsudam uma grande quantidade de néctar, tornando-se atrativas para pássaros e morcegos (CASTRO, 1995). Os principais polinizadores das helicônias nos Trópicos Americanos são os beija-flores e os morcegos (BERRY; KRESS, 1991). Os pássaros, roedores e esquilos são responsáveis por dispersarem sementes quando os frutos ficam maduros (ABALO, 1999). As folhas são grandes com lâminas possuindo nervuras transversais e várias tonalidades de verde. Algumas espécies possuem pêlos ou cera nas folhas, conferindo diversos tons de verde. Segundo GALLO et al. (2002), a cerosidade e pilosidade se enquadram como uma causa morfológica de resistência de plantas a insetos. Quanto à disposição das folhas, as helicônias são classificadas como: musóides, quando as folhas são orientadas verticalmente em relação ao pseudocaule e possuem pecíolos longos (maioria das espécies); zingiberóides, quando as folhas são dispostas mais ou menos horizontalmente e as lâminas têm pecíolos curtos; e canóides, aquelas de folhas com pecíolos curtos ou de médio comprimento, com posição oblíqua à haste (BERRY; KRESS, 1991). As helicônias podem ser multiplicadas tanto por via sexuada,

através de sementes, como por via assexuada ou vegetativa, através de seus rizomas (CASTRO, 1995). A propagação sexuada não é recomendada comercialmente, pois a germinação e o início da produção são mais demorados.

A forma de propagação mais utilizada pelos produtores de helicônias é a multiplicação através de rizomas que são caules especializados que crescem horizontalmente, tanto acima como abaixo da superfície do solo. As helicônias apresentam rizoma do tipo simpodial (ramificado) e são consideradas geófitas, isto é, que se perpetuam não somente pelas suas sementes, mas também por seus órgãos subterrâneos especializados, cuja função principal é servir como fonte de reservas, nutrientes e água para períodos longos de estiagem ou de baixas temperaturas, assegurando a sobrevivência da espécie (CASTRO, 1995).

As helicônias são cultivadas em relevo com topografia suavemente ondulada, solo areno-argiloso, clima tropical e úmido, precipitação pluviométrica em torno de 1700 mm/ano, umidade relativa de 70 a 95% e temperatura média anual em torno dos 25°C (CHAGAS, 2000). Quanto ao manejo adotado para a cultura, o espaçamento que varia de acordo com a espécie e/ou cultivar utilizada, geralmente fica em torno de 1,0 a 3,0 m x 1,0 a 2,0 m. O plantio dos rizomas deve ocorrer, preferencialmente, após a época mais fria do ano, a uma profundidade de 10 cm. A adubação deve obedecer às recomendações de acordo com as exigências da cultura e análise química do solo, geralmente a fórmula NPK usada é 18-6-12. Para a irrigação são utilizados métodos como o gotejamento e a microaspersão, deve ser abundante, porém evitando encharcamento do solo. Os tratos culturais estão relacionados ao replantio e uso de tutoramento às vezes é recomendado (CASTRO, 1995). A colheita de cada espécie



depende do mercado consumidor, geralmente quando a inflorescência apresenta de duas a cinco brácteas abertas (CHAGAS, 2000).

### **Principais Problemas Fitossanitários nas Helicônias**

O cultivo das flores tropicais no estado de Pernambuco vem sendo afetado pela ocorrência de problemas fitossanitários, devido a fatores predisponentes relacionados a precipitação, umidade, temperatura e densidade de plantio, comprometendo a produtividade e a qualidade do produto. As doenças em helicônias são causadas por diversas classes de fitopatógenos, destacando-se aqueles induzidos por fungos - *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (Sacc.), *Bipolaris incurvata* (Nisik.) Shoemaker, *Cercospora* sp., *Curvularia lunata* (P.Henn) Meyer, *Cladosporium herbarum* Link. causando manchas foliares e *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E. F. Smith) Sn & Hansen causando murcha vascular; bactérias - *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith raça 2 (COÊLHO; WARUMBY, 2002). Quanto aos nematóides, constatou-se ocorrência freqüente dos gêneros: *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*. Sintomas da meloidoginose foram constatados em 100% das áreas de plantio de flores tropicais. Entre as espécies de *Meloidogyne* foram detectadas *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (ASSIS, 2006).

Para o desenvolvimento sustentável da cultura, existe a necessidade de pesquisas, tanto a nível técnico quanto científico. Ocorrem alguns entraves que impedem que a atividade atinja o verdadeiro potencial, citando dentre estes a instabilidade da demanda e perspectivas de exportações, a falta de pesquisas tecnológicas que orientem os produtores, necessidade de investimento em capacitação e

alto custo de implantação. Quanto às pesquisas, alguns trabalhos têm auxiliado a atividade, como a descrição de doenças e pragas (COÊLHO; WARUMBY, 2002).

No cultivo comercial algumas recomendações de manejo podem ser adotadas para minimizar os efeitos provocados pelas doenças, destacando-se o plantio em áreas livres da doença, material propagativo sadio, limpeza dos rizomas com a eliminação dos que apresentarem sintomas, análise e correção do pH do solo, plantio em solos com alto teor de matéria orgânica, controle de nematóides que possam agravar a doença e erradicação de plantas infectadas no plantio (CORDEIRO et. al, 2005).

### **A murcha de fusário e o agente causador**

O gênero *Fusarium* (E.F. Smith) é caracterizado pelo crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso (DOMSCH et al., 1980). A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos habitantes de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que algumas espécies/isolados parasitas das plantas. As duas principais formas de esporos de *Fusarium* são os microconídios e os macroconídios. Os microconídios são unicelulares e uninucleados; os macroconídios mais comuns são multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um macroconídio, contudo, são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto geneticamente idênticos (PUHALLA, 1981).

Inúmeros fatores, incluindo a perda da clara distinção das espécies através de características morfológicas, levam a conceitos que são amplos e juntamente com a variação e mutação dentro da cultura, tem conspirado para criar um sistema taxonômico

que não reflete a diversidade das espécies. Isto tem gerado resultados controversos na aplicação de nomes de espécies para isolados patogênicos e toxigênicos (GEISER et al., 2004).

Devido à plasticidade e variações de características fenotípicas encontradas neste fungo, a taxonomia baseada somente em conceitos morfológicos não é confiável (SUMMERELL; LESLIE, 2003). O gênero ainda apresenta uma série de variações de características morfológicas e patogênicas, resultando em uma classificação complexa dividida em seções, *forma speciales* e raças (OLIVEIRA; COSTA, 2002). O conceito *forma speciales* foi aplicado por SNYDER; HANSEN (1953) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofiticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formae speciales* e raças.

A murcha de fusário é uma doença amplamente distribuída em vários hospedeiros e regiões geográficas do mundo. Entre estas, tem sido detectada em plantios de flores tropicais, afetando algumas espécies de helicônias. A doença é causada pelo *Fusarium oxysporum* (Schlech.) f. sp. *cubense* (teleomorfo desconhecido), que apresenta microconídios abundantes, geralmente unicelulares, ovais a reniformes e hialinos. Os macroconídios também são abundantes, fusiformes, falcados, isolados e multicelulares. Os Clamidósporos esféricos são produzidos nas extremidades dos conidióforos ou intercalados nas hifas ou em macroconídios (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). São identificadas quatro raças diferentes deste fungo, porém apenas a raça 3 tem sido detectada em helicônias (CORDEIRO et al., 2005). Em Pernambuco este fungo foi

primeiramente detectado em *H. chartacea* cv. Sex Pink, cultivar considerada bastante suscetível (LINS; COELHO, 2004).

Os sintomas em plantas infectadas podem ser observados externa e internamente. Como sintoma externo, ocorre o amarelecimento e seca progressiva das folhas. Como sintomas internos observam-se um escurecimento vascular, mais acentuado nas partes laterais no pseudocaule (WARUMBY et. al., 2004).

O conhecimento do patógeno é um pré-requisito importante para o uso estratégico do controle genético, podendo a variabilidade ser estudada através da análise molecular.

### **Caracterização Molecular auxiliada por Marcadores**

No estudo de variabilidade genética dos fitopatógenos, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar, proporcionando o complemento do estudo de diversidade e ampliando o conhecimento de outros aspectos que não envolvam somente a patogenicidade. O polimorfismo do DNA tem sido utilizado com sucesso na diferenciação de espécies e raças de vários fitopatógenos e entre as vantagens apresentadas, destacam-se a rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (GOODWIN et al., 2003).

Um dos grupos de genes mais utilizados para estudos taxonômicos e de variabilidade genética em fungos é o que codifica o RNA ribossômico. A maior razão da popularidade do rDNA para análises filogenéticas é que este é um gene de múltiplas cópias, que não codifica proteínas, muito conservado e presente em todos os organismos, servindo como referência para estudos de divergência evolutiva, e que é considerado, muitas vezes, como um gene de locus simples (GUARRO et. al., 1999).

**ARDRA (Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado)**

Os métodos mais recentes e amplamente utilizados para a taxonomia de fungos têm sido as técnicas de seqüenciamento e os métodos eletroforéticos (GUARRO et. al., 1999). Dentro dos métodos eletroforéticos destaca-se a utilização da técnica de RFLP. Esta técnica envolve a digestão de amostras de DNA por enzimas de restrição (GUARRO et. al., 1999). Uma variação desta técnica é conhecida como ARDRA e consiste da digestão enzimática do rDNA amplificado por PCR (VANEECHOUTTE et al., 1992). Os fragmentos de rDNA gerados e observados em gel de agarose podem ser tabulados e utilizados para o agrupamento de diversidade genética.

A unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear consiste de uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). Entre estes genes encontram-se as regiões variáveis ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico. Estas regiões apresentam muitas mutações durante o processo de evolução podendo ser mais utilizado para a classificação intraespecífica (FUNGARO, 2000). O fato das regiões ITS serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (SKOUBOE et al., 1999; LEAL-JUNIOR, 2002). Análise destas regiões espaçadoras do rDNA e estudos comparativos de seqüências de nucleotídeos de genes do rDNA, através da técnica ARDRA têm sido utilizados, devido a rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análises em vários níveis de classificação, até mesmo em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (JORGENSEN; CLUSTER, 1989).

Neste contexto, OLIVEIRA e COSTA (2002), estudando a variabilidade genética de *Fusarium solani*, conseguiram, através da técnica, diferenciar *formae speciales* em soja e feijoeiro. MARTINS (2005), trabalhando com isolados de *Fusarium* spp. observou em seus estudos uma grande variabilidade genética, com a presença de 19 haplótipos em 83 isolados estudados. Sendo assim, tais técnicas mostram-se de extrema utilidade em estudos de variabilidade genética de *Fusarium* spp. e sobretudo capaz para elucidar controvérsias quanto a classificação taxonômica dentro de *formae speciales*, ampliando o nível de conhecimento da diversidade e estrutura destas comunidades fúngicas.

#### **RAPD (Polimorfismo de DNA amplificação ao acaso)**

A técnica RAPD é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, onde a estratégia é utilizar um único oligonucleotídeos de 10-15 bases de sequência arbitrária, que ao se emparelhar às sequências complementares dispersas no genoma do fungo, é amplificado por ação da enzima Taq polimerase (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os produtos da amplificação são separados em gel de agarose, onde cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento no outro genótipo, que podem ser devido a diversos fatores como deleção, duplicação ou mutação no sítio de anelamento do primer (WILLIAMS et al., 1990). Esta técnica requer pequenas quantidades de DNA, é de rápida execução e permite trabalhar com um número grande de isolados de uma população de patógeno (MANNERS et al., 1992). Marcadores como

RAPD, permitem a identificação de raças e alguns aspectos que permitam conhecer melhor a questão evolutiva das espécies, bem como a diferenciação e caracterização de raças fisiológicas (ALZATE-MARIN et al., 1997). GALVÃO (2005), analisando a diversidade genética e patogênica de *F. guttiforme* através de RAPD, revelou a presença de DNA polimórfico entre os isolados e que estes estavam relacionados com suas origens geográficas, mas não a patogenicidade. Levantamentos da diversidade genética utilizando RAPD com marcador foram conduzidos com sucesso por ALZATE-MARIN et al. (1997), FALEIRO et al. (1998). SILVA-MANN et al. (2002) associaram informações de teste de patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando a identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram utilizados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Na análise de RAPD, o valor de similaridade encontrado para os dois grupos foi de 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos. Neste contexto, diversos trabalhos tem sido realizados com RAPD no gênero *Fusarium* envolvendo análise da variabilidade, mapeamento genético, diferenciação de isolados, estudo de populações, dentre outros. BENTLEY et al. (1995), utilizaram a técnica de RAPD em estudos com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* para avaliar a variação genética de uma coleção mundial de isolados das raças 1, 2, 4 e 11 com diferentes grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs). Por meio desta técnica foi possível subdividir os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em dois grupos, não havendo contudo, correlação entre o padrão de RAPD e a raça. A comparação dos padrões de bandas do RAPD foi semelhante ao agrupamento obtido pelos VCGs, mostrando que a

identificação por raças pode não expressar uma relação filogenética. O RAPD também tem sido utilizado para distinguir isolados de diferentes espécies de *Fusarium*. AMOAH et al. (1995) determinaram as características genéticas dos isolados de *F. verticillioides* coletados de milho, arroz e sorgo de diferentes regiões de Gana, usando as técnicas de RAPD e RFLP. CASTRO (2007), analisou a diversidade genética de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de helicônias verificando alta variabilidade genética utilizando ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Marcadores genéticos baseados em polimorfismo do DNA têm sido utilizados com sucessos na diferenciação de espécies de vários fitopatógenos, destacando-se pela rapidez, confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (FALEIRO et al., 2003).

O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno envolvido em um patossistema pouco conhecido como *Heliconia* spp. versus *F. oxysporum* f. sp. *cubense* é de fundamental importância, pois resulta em informações essenciais aos programas de melhoramento genético de plantas que visem a resistência às doenças. Estas informações obtidas ainda podem dar um indicativo na eficiência do controle, uma vez que populações com alta diversidade genética se adaptam mais rapidamente às medidas de controle.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALO, J. E. Heliconias for the ornamental industry. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 486, p.313-315, 1999.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p.85-88, 1997.

AMOAHA, B. K. Variation in *Fusarium* section Liseola: pathogenicity and genetic studies of isolates of *Fusarium moniliforme* Sheldon from different hosts in Ghana. **Plant Pathology**, v.44, p.563-572, 1995.

ASSIS, T. C. de. **Fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais em Pernambuco: estimativa do número de amostras para monitoramento, efeito de indutores de resistência e avaliação de mecanismos envolvidos**. 2006, 84f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2006.

ATEHORTUA, L. **Aves del paraiso, Gingers, Heliconias**. Santafé de Bogotá, D.C., Colômbia: HortiTecnia Ltda., 1998, 66 p.

BENTLEY, S. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, v. 99, p. 1378-1384, 1995.

BERRY, F.; KRESS, W. J. **Heliconia**: An identification guide. Smithsonian Institution Press. Washington and London, 1991, 334 p.

BEZERRA, F. C. **Curso de floricultura**: aspectos gerais e técnicas de cultivo para flores tropicais. EMBRAPA/CNPAT, 1997, 39 p.

CASTRO, C. E. F. **Helicônia para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA, 1995, 43 p.

CASTRO, N. R. **Murcha de *Fusarium* em *Helicônia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética**. 2007, 98f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, 2007.

CHAGAS, A. J. C. **Floricultura tropical na Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: SEBRAE/PE, 2000, 24 p.

COÊLHO, R. S.; WARUMBY, J. F; B. **Doenças de plantas ornamentais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco**, Sebrae, Recife, 2002, 98p.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. **Doenças da Bananeira**. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 5. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 99-117, 2005.

COSTA, A. S. **Características agronômicas e genéticas de helicônias na Zona da Mata de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 72p.

CRILEY, R. A.; BROCHAT. T. K. Heliconia: botany and horticulture of a new floral crop. **Horticultural Reviews**, New York, v. 14, p. 1-55, 1992.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. New York: Academic Press, 1980, 859 p.

FALEIRO, F. G. et al. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores de podridão parda do cacaueteiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.312-315, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996, 220p.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.12-16, 2000.

GALLO, D. et. al. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002. 649p.

GALVÃO, A. L. B. **Diversidade genética e patogênica de *Fusarium guttiforme* através de RAPD e ARDRA e Bioinformática**. 2005, 100p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Alagoas – Alagoas, 2005.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. *Fusarium-id v. 1.0*. A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, p.473-479, 2004.

GOODWIN, P. H. KIRKPATRICK, B. C.; DUNIWAY, J. M. Cloned DNA probes for the identification of *Phytophthora parasitica*. In: FALEIRO, F. G.; LUZ, E. D. M. N.; CERQUEIRA, A. O.; ROCHA, C. S. S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacaueteiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.312-315, 2003.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL A. M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribossomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 75, p.1238-1247, 1989.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Comercialização: aspectos de mercado e manuseio pós-colheita. In: TERAQ, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. (Ed.).

**Flores tropicais.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.173-181, 2005.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Las exportaciones brasileñas de flores y plantas ornamentales crecen más del 124% entre 2001 y 2006. **Horticultura Internacional**, Espanha, v.56, p.76-78, 2007.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, p. 37-52, 2008.

LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo.** Recife: SEBRAE/PE, 2001. 88p.

LEAL-JUNIOR, G. A. **Diagnóstico de *Crinipellis pernicioso*, em tecidos de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros.** Piracicaba, 2002. 136f.. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 332-335, 2004.

LOGES, V. **Versatilidade das plantas da Ordem Zingiberales para o paisagismo.** Monografia. Funeso, Olinda, 1999, 72 p.

MANNERS, J. M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A. G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.) ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CABI, p.250-268, 1992.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 1993, 277 p.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.631-634, 2002.

PUHALLA, J. E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P. E.; Toussoun, T.A.; Cook, R. J. (Ed) ***Fusarium: diseases, biology, and taxonomy***. Pennsylvania: Pennsylvania State University, p.291-305, 1981.

SANTOS, M. C. **Manual de jardinagem**. 2 ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1975. 456p.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. **Serviço Brasileiro de Apoio às micro e Pequenas Empresas**. Brasília: Gráfica Ipiranga, 2005.

SILVA-MANN, R. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p27-32, 2002.

SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.C., TAYLOR J.W., LAURITSEN, D.; BOYSEN M.; ROSSEN, L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, p.873-881, 1999.

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

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.117-128, 2003.

VANEECHOUTTE, M.; ROSSAU, R.; DEVOS, P.; GILLIS, M.; JANSSENS, D.; PAEPE, N.; DeROUCK, A.; FIERS, T.; CLAEYS, G.; KERSTERS, K. Rapid identification of bacteria in the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 93, p.227-234, 1992.

WARUMBY, J. F.; COÊLHO, R. S. B.; LINS, S. R. O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. Sebrae, Recife, 2004, 98p.

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



## CAPÍTULO II

---

**Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* em helicônia utilizando ARDRA**

**Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*  
em helicônia utilizando ARDRA**

Denise de Santana Silva<sup>1\*\*</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>2</sup>, Neilza Reis Castro<sup>3</sup>, Rildo Sartori  
Barbosa Coêlho<sup>4</sup>, José Carlos da Costa<sup>1</sup>, Manuela Xavier Bezerra Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Agronomia/Fitossanidade, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: [deniufupe@gmail.com](mailto:deniufupe@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Departamento de Agronomia/Fitotecnia, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE/UAST, Estrada para Fazenda Saco, s/n, CEP 56000-000, Serra Talhada, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto Agrônomo de Pernambuco, IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco. Bolsista CNPq.

Data de chegada: Aceito para publicação em:

Autor para correspondência: Denise de Santana Silva

---

**RESUMO**

Silva, D.S.; Resende, L.V.; Castro, N.R.; Coêlho, R.S.B.; Costa, J.C.; Alves, M.X.B.

Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em helicônia utilizando ARDRA *Summa Phytopathologica*

A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, vem sendo diagnosticada em áreas produtoras de helicônias, uma das plantas ornamentais mais apreciadas dentro da floricultura tropical. O objetivo do trabalho foi determinar a diversidade genética existente entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, coletados em diferentes espécies helicônias, e ainda, diferenciá-los de dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* provenientes de *Musa* cv. Maçã por meio da região ITS do rDNA utilizando ARDRA. Foram obtidos colônias monospóricas para estudos de caracterização. O DNA total de cada isolados foi extraído e realizado a Polymerase Chain Reaction (PCR) com os primers ITS1 e ITS4 para analisar a região ITS1 5.8S e ITS2 do rDNA. Os produtos foram digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III, *Xho* I, *Hind* III e *Eco* IV. Os padrões de bandas gerados pela digestão com a enzima *Hae* III permitiu observar de um a três fragmentos por isolados, estes formaram cinco grupos. Os grupos formados não se relacionam com as áreas geográficas de coleta. A técnica utilizada mostrou alta variabilidade genética e não correlação geográfica dos isolados, observada através da composição dos grupos distintos. Estes resultados reforçam a importância de medidas de controle que impeçam a disseminação do patógeno através de material propagativo infectado.

Palavras-chave: Análise molecular, flores tropicais, murcha de fusário

## ABSTRACT

Silva, D.S.; Resende, L.V.; Castro, N.R.; Coêlho, R. S. B.; Costa, J.C.; Alves, M.X.B.  
Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates in heliconia using  
ARDRA. *Summa Phytopathologica*

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, have been observed production fields of heliconias flowers, one of the most appreciated plants within the in tropical flowers. The objective of this study was to determine the genetic diversity existing between the isolates of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* collected species different heliconias, so that, difference themselves of two isolates *F. oxysporum* f. sp. *cubense* coming from *Musa* cv. Maçã by ITS region rDNA using ARDRA. It was obtained monosporic colonies for characterization studies. Total DNA of each isolate was obtained and realized Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers ITS1 and ITS4 to analysis the region ITS1 5.8S and ITS2 rDNA. Products were digested with the restriction enzymes *Hae* III, *Xho* I, *Hind* III and *Eco* IV. The standarts bands created by digest of enzymes *Hae* III allowed to observ one to thee fragments by isolates, it was made five groups. The groups made don't relate with geographical areas of collection. The techniques used showed high genetic variability and negative geographical correlation of isolates, observed by groups composition different. These results are important for effort control manners that oppose pathogen dissemination by vegetative material infected.

Additional Keywords: Molecular analyse, tropical flowers, fusarium wilt

---

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd. & Hans., é o agente causal da murcha de fusário - doença que possui ampla distribuição geográfica e várias plantas hospedeiras. Entre estas, tem sido detectada em plantios de flores tropicais, afetando algumas espécies de helicônias. Na floricultura tropical a família da Heliconiaceae constitui uma das mais importantes e a ocorrência da murcha de fusário tem se apresentado como principal problema fitossanitário no cultivo de espécies suscetíveis (21). A doença foi descrita pela primeira vez por Waite (20) que detectou a ocorrência em *Heliconia caribaea* Lam em Honduras, América Central. Em Pernambuco este fungo foi primeiramente detectado em *H. chartacea* cv. Sex Pink, cultivar considerada bastante suscetível (12). Os sintomas em plantas infectadas ocorrem com o amarelecimento e seca progressiva das folhas. Em corte longitudinal do pseudocaule, verifica-se um escurecimento vascular, mais acentuado nas partes laterais (21).

São identificadas quatro raças fisiológicas que afetam as espécies de *Musa* e *Heliconia*, baseadas na patogenicidade a cultivares hospedeiras em campo (raça 1, cultivar “Gros Michel”; raça 2, “Bluggoe”; raça 3, *Heliconia* spp.; e raça 4, grupo “Cavendish” e todas as cultivares suscetíveis às raças 1 e 2 (15). A raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* é detectada em todas as áreas produtoras de banana, enquanto que a raça 4 só foi confirmada em alguns países como a Indonésia, Taiwan, Malásia, China e norte da Austrália. Na década de 90 a raça 4 devastou cerca de 5000 ha plantados com a cultivar “Cavendish” na Indonésia, sendo portanto considerada a mais agressiva (5)

Atualmente existem duas teorias para a origem deste patógeno, a primeira indica que o mesmo coevoluiu com a cultura da bananeira na Ásia, sendo disseminado por

todo o mundo através de rizomas contaminados ou solos infestados aderidos ao material propagativo (18), e a segunda hipótese indica uma coevolução independente de populações locais em diferentes regiões. De acordo com Bentley et al. (3) estas duas hipóteses podem ocorrer pela formação de grupos com isolamento genético e distribuição geográfica limitada e grupos que evoluíram independentemente dentro e fora do centro de origem do hospedeiro.

Normalmente a caracterização de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* é feita através de reações de cultivares a doença, porém é uma prática demorada e a expressão de sintomas nas diferenciadoras é influenciada pelas condições ambientais, local de instalação do experimento e material propagativo utilizado (16).

Vários métodos para caracterização de espécies podem ser utilizados, como o agrupamento por compatibilidade vegetativa (2, 16), produção de substâncias voláteis (10), análise moleculares por RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) (1, 4, 6, 7, 8) RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) e ISSR (“*Inter Simple Sequence Repeat*”) (4,11). Castro (5) utilizando marcadores de ISSR, observaram uma alta diversidade genética entre isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, inclusive com alguns isolados testados neste trabalho.

Os métodos mais recentes e amplamente utilizados para a taxonomia de fungos têm sido as técnicas de seqüenciamento e os métodos eletroforéticos (9). Dentro dos métodos eletroforéticos destaca-se a utilização da técnica de RFLP. Esta técnica envolve a digestão de amostras de DNA por enzimas de restrição (14). Uma variação desta técnica é conhecida como ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) e consiste da digestão enzimática do DNA amplificado por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (19).

A técnica vem sendo bastante utilizada para o estudo de variabilidade genética, permitindo a distinção de espécies intimamente relacionadas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar a diversidade genética existente entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, coletados em diferentes espécies helicônias, e ainda, diferenciá-los de dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* oriundos de *Musa* cv. Maçã por meio da região ITS do rDNA utilizando ARDRA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios dos Departamentos de Fitossanidade e Fitotecnia/Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados no estudo 31 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, preservados em Castelani, cedidos da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Prof(a). Maria Menezes-UFRPE, provenientes de diversas espécies de helicônias e coletados em propriedades produtoras em várias regiões dos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, sendo dois isolados provenientes de *Musa* cv. Maçã, coletados em Pernambuco e Alagoas. A repicagem dos isolados foi realizada com auxílio de uma alça de platina flambada, fragmentos de colônias dos isolados, preservados em Castelani foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas sob luz fluorescente (12h/12h) em temperatura ambiente ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Após sete dias de incubação, fez-se novamente a transferência dos isolados para tubos de ensaio contendo BDA com finalidade de preservação a curto prazo.

### **Obtenção de culturas monospóricas**

A partir de culturas fúngicas com sete dias de cultivo em BDA, foram transferidos discos com 5 mm de diâmetro da colônia para tubos de ensaios contendo 10 mL de água destilada esterilizada e agitou-se a suspensão, em seguida colocou-se 0,1 mL da suspensão de cada isolado na superfície do meio agar-água (AA) contido em placas de Petri. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, a suspensão foi uniformemente distribuída sobre a superfície do meio. As placas foram mantidas sob temperatura ambiente e alternância luminosa. Após 24 h, utilizando-se lupa estereoscópica, os conídios germinados foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e cultivadas por um período de sete dias e posteriormente, foi realizada transferência para tubos de ensaio com BDA para fins de preservação.

### **Caracterização Molecular de isolados *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

#### **Extração do DNA total**

A extração do DNA dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Weising *et al.* (22) através da raspagem do micélio crescido em placas de Petri contendo BDA. Foram macerados 100 mg do micélio em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL na presença de nitrogênio líquido, até formar um pó fino. Em seguida foi adicionado 600 µL de tampão de extração SDS (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) e agitou-se por 30 s em vortex. Em seguida os tubos foram incubados a 90°C por 10 min, adicionando-se 300 µL de acetato de sódio (3M) os tubos foram homogeneizados por inversão incubados por 20 min a -20°C. Posterior a este processo, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 15000 rpm, 700 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, onde



adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol, as amostras foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 min a 15000 rpm. Após esta fase, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e etanol absoluto. O precipitado foi posto para secar por 1 hora em câmara de fluxo laminar e por fim ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura para posterior estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para o tratamento com RNase, foram adicionados às amostras 1  $\mu\text{L}$  de RNase pura por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Para quantificação, pequenas alíquotas de DNA (1 $\mu\text{L}$ ) foram submetidas à corrida eletroforética por 30 min, em gel de agarose a 0,8% contendo 2  $\mu\text{L}$  Syber Gold em cada poço e 5  $\mu\text{L}$  do corante azul de bromofenol na presença do marcador lambda 50 ng e visualizado em transluminador UV. Todos os géis foram fotodocumentados.

### **Amplificação da região ITS do rDNA**

A amplificação das regiões ITS1 5.8S e ITS2 do rDNA foi realizada utilizando-se os iniciadores oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') conforme White *et al.* (23) em termociclador programado para 39 ciclos nas seguintes sequências:  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 min (desnaturação),  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $58^{\circ}\text{C}$  por 1 min e  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min (anelamento) e  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min (extensão final). Para a reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA molde, 10 mM de cada iniciador, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,08 mM de cada dNTP, 0,2U/ $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 20 mM de KCl em 25  $\mu\text{L}$  de volume final. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,0%(m/v) contendo 5  $\mu\text{L}$  do corante azul de bromofenol e 2  $\mu\text{L}$  de Syber gold. O marcador utilizado foi o de 100 pb. O gel foi submerso em tampão TBE 0,5X. Após a

corrida eletroforética, por um período de 3 h, as amplificações foram visualizadas sob luz ultra violeta em um transluminador e os géis foram fotodocumentados.

### **Restrição dos fragmentos amplificados por PCR**

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram incubados a 37°C por 12 h, com as endonucleases de restrição *Hae* III, *Xho* I, *Hind* III e *Eco* IV. De um total de 25 µL do produto amplificado (em torno de 800 pb), 15µL foram digeridos utilizando-se 2,5U de enzima diluídas em 2,5 µL de tampão e 7µL de água Milli-Q esterilizada. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 1,5% submerso em tampão TBE 0,5X, a 80 volts por 2 h. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com o marcador molecular de 100 pb. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta em um transluminador e os géis foram fotodocumentados.

### **Análise de agrupamento**

Após a restrição, foi construída uma matriz binária, com os dados obtidos da análise do universo total de fragmentos, do perfil gerado pela enzima *Hae* III. Para cada posição de migração dos fragmentos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento. Os valores gerados, pela posição de migração, para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard, onde  $J = a/(n-d)$ , sendo **a** o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, **d** é o número de combinações de ausência de fragmentos e **n** é o número de combinações possíveis. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias e representados,

graficamente, por um dendrograma (NTSYS-pc versão 2.1, Exeter Software, USA). Para avaliação da diversidade dos isolados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos de PCR obtidos na amplificação das regiões ITS1 5.8S e ITS2 do rDNA dos 31 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ubense*, oriundos de helicônia e bananeira, apresentaram uma banda com peso molecular em torno de 800 pb. Das quatro enzimas testadas, apenas a enzima *Hae* III, originou fragmentos com tamanho acima de 100 pb que foram considerados na presente análise. De acordo com o padrão de clivagem obtido com a enzima foi possível observar de 1 a 3 fragmentos por isolado. Considerando a similaridade média de 61% observou-se a formação de cinco grupos, observado na Figura 1 onde os isolados F32 (helicônia) oriundo do município de Camaragibe e Foc C (bananeira) proveniente do município de Bonito, se posicionaram separadamente dos outros isolados, formando dois grupos distintos. Os dois maiores grupos formados foram constituídos por 16 isolados que pertencem aos municípios de Rio Largo (F1, F14), Paulista (F2, F13), Goiana (F4, F5, F7, F26, F27), Jacuípe (FocAL 18), Ribeirão (F33), Paudalho (F8), Paripueira (F10), Marechal Deodoro (F18) e Camaragibe (F12, F15). Os isolados pertencentes aos municípios de Rio Largo (F21, F31), Paulista (F6, F19), Camaragibe (F3, F11, F16, F30), Cabo de Stº Agostinho (F28) e Boquim (F9) sendo o segundo maior grupo com dez isolados. E o quinto grupo formado por três isolados oriundos dos municípios de Paulista (F22), Goiana (F24) e Camaragibe (F25) conforme a Tabela 1.

(Inserir Figura 1 e Tabela)

O agrupamento observado não se relaciona com as áreas geográficas de coleta dos isolados, visto que isolados da mesma microrregião se posicionaram em grupos

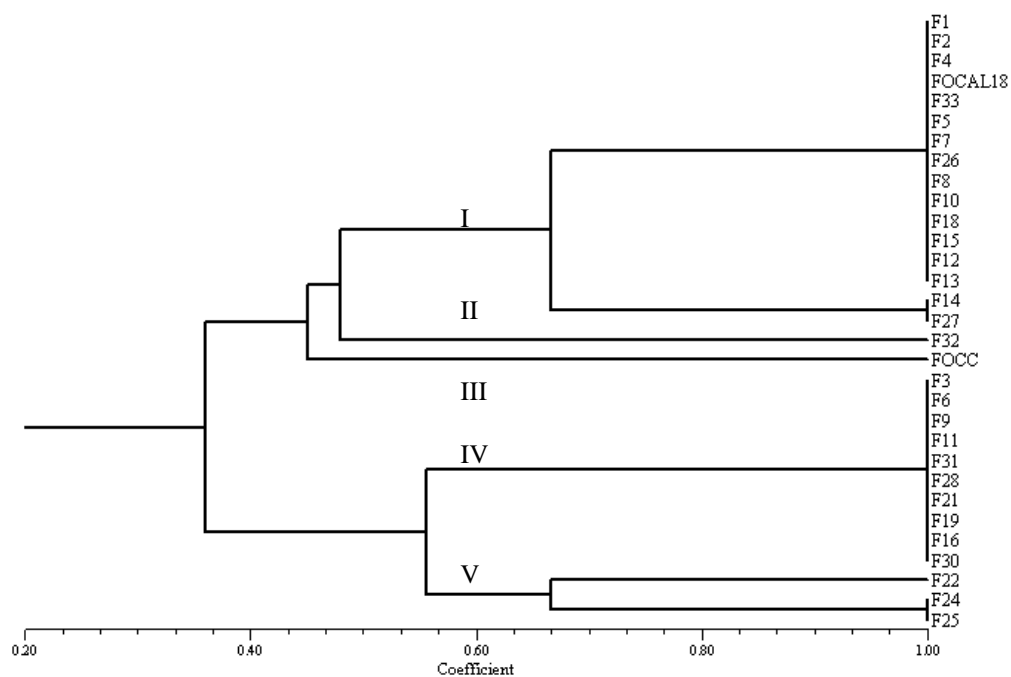
diferentes, assim como isolados de regiões distintas se posicionaram dentro de um mesmo grupo. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos por meio da técnica ARDRA não foi possível relacionar os isolados com as áreas geográficas de coleta. Castro (5), estudando os mesmos isolados através da técnica de ISSR, observou que os isolados apresentaram uma alta variabilidade genética, como também à não correlação geográfica dos isolados, observada através da composição dos grupos por isolados de regiões distintas. A alta diversidade observada entre os isolados de regiões próximas comprova a alta complexidade do patógeno, mesmo considerando a intensa troca de material de propagação entre produtores da região. Outro fator que pode ser usado para explicar a baixa similaridade entre os isolados estudados, pode estar ligada à co-evolução, que considera a grande diversidade genética do patógeno no centro de origem do hospedeiro, uma vez que encontramos com frequência populações nativas de *Heliconia* spp., no Nordeste brasileiro (5). A composição de grupos contendo isolados de regiões distintas pode estar relacionada a circulação de material propagativo contaminado, uma vez que ocorreu uma expansão agrícola da atividade da floricultura tropical.

Em relação a outras espécies de *Fusarium*, a técnica de ARDRA tem possibilitado a caracterização de alta diversidade genética em *Fusarium* spp. (13,14).

Martins (13), analisando por meio de ARDRA a variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp., observou a distinção de 83 isolados em 19 haplótipos apresentando uma grande diversidade dentro de cada haplótipo. De forma geral os isolados patogênicos e não patogênicos não puderam ser discriminados. Oliveira & Costa (14) utilizando ARDRA, para relacionar geneticamente isolados de *F. solani* f.sp.

*phaseoli* e *F. solani* f.sp *glycines* patogênicos ao feijão e/ou soja, conseguiram discriminar estas duas *formae speciales*.

A enzima *Hae* III, neste trabalho mostrou ser um marcador eficiente, pois dentre as enzimas testadas, nos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foi possível observar o produto da restrição enzimática. Portanto, sugere-se a utilização desta enzima como marcador para fitopatógenos. Sendo assim, mais uma técnica adicional de estudo para a complexa classificação taxonômica de *Fusarium* spp. (17). Com base nestes resultados e em outros trabalhos, os marcadores moleculares provam ter tanta importância quanto os métodos baseados na morfologia e fisiologia, ampliando o nível de esclarecimento na identidade e variabilidade do fitopatógeno.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade dos isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, provenientes de helicônia e bananeira produto da digestão da enzima de restrição *Hae* III, o agrupamento foi gerado pela análise de UPGMA, baseado no coeficiente de Jaccard.

**Tabela 1.** Agrupamento de isolados de *F.oxysporum* f. sp. *cubense*

Coleção	Isolado	Origem
CMM-2127	F1	Rio Largo-AL <sup>1,1</sup>
CMM-2128	F2	Paulista-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2130	F4	Goiana-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2157	Foc AL18	Jacuípe-PE <sup>6,1</sup>
CMM-2155	F33	Ribeirão-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2131	F5	Goiana-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2133	F7	Goiana-PE <sup>3,1</sup>
CMM-2149	F26	Goiana-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2134	F8	Paudalho-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2136	F10	Paripueira-AL <sup>1,1</sup>
CMM-2143	F18	M. Deodoro-AL <sup>1,1</sup>
CMM-2141	F15	Camaragibe-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2138	F12	Camaragibe-PE <sup>4,1</sup>
CMM-2139	F13	Paulista-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2140	F14	Rio Largo-AL <sup>1,1</sup>
CMM-2150	F27	Goiana-PE <sup>1,1</sup>
CMM-2154	F32	Camaragibe-PE <sup>5,II</sup>
CMM-2156	Foc C	Bonito-PE <sup>6,III</sup>
CMM-2129	F3	Camaragibe-PE <sup>2,IV</sup>
CMM-2132	F6	Paulista-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2135	F9	Boquim-SE <sup>1,IV</sup>
CMM-2137	F11	Camaragibe-PE <sup>2,IV</sup>
CMM-2153	F31	Rio Largo-AL <sup>1,IV</sup>
CMM-2151	F28	Cabo de Stº Agostinho-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2145	F21	Rio Largo-AL <sup>4,IV</sup>
CMM-2144	F19	Paulista-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2142	F16	Camaragibe-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2152	F30	Camaragibe-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2146	F22	Paulista-PE <sup>1,V</sup>
CMM-2147	F24	Goiana-PE <sup>1,V</sup>
CMM-2148	F25	Camaragibe-PE <sup>1,V</sup>

Espécies hospedeiras: <sup>1</sup>*H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. Alan Carle,

<sup>2</sup>*H. stricta* cv. Tagami, <sup>3</sup>*H. wagneriana*, <sup>4</sup>*H. chartacea* cv. Sexy Pink, <sup>5</sup>*H.*

*orthotricta* cv. Eclipse Total, <sup>6</sup>*Musa* cv. Maçã.

Agrupamento dos isolados gerado pela enzima de restrição *Hae* III: I, II,

III, IV, e V.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alzate-Marin, A.L.; Baía, G.S.; Faleiro, F.G.; Carvalho, G.A.; Paula Júnior, T.L. de; Moreira, M.A.; Barros, E.G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, nº 1, p.85-88, 1997.
2. Bentley, S.; Pegg, K. G.; Moore, N.Y.; Davis, R.D.; Buddenhagen, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, nº 12, p.1283-1293, 1998.
3. Bentley, S.; Pegg, K.G.; Dale, J.L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, v. 99, nº 11, p.1378-1384, 1995.
4. Bentley, S.; Pegg, K. G.; Dale, J.L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyze genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 142, nº1, p.64-78, 1994.
5. Castro, N.R. **Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética**. 2007. 113p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.



6. Faleiro, F.G.; Ragagnin, V.A.; Mesquita A.G.G.; Vinhadell, W.S.; Paula Júnior, T.L. de; Moreira, M.A.; Barros, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus*, utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, nº 3, p.386-390, 1998.
7. Gherbawy, Y.A.M.H. RAPD analysis of isolates belonging to different *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **Cytologia**, v. 64, nº 3, p.269-276, 1999.
8. Grajal-Martin, M.J.; Simon, C.J.; Muehlbauer, F.J. Use of Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, nº 6, p.612-614,1993.
9. Guarro, J.; Gene, J.; Stchigel A.M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, nº 3, p.454-500, 1999.
10. Guzmán, P.; Gepts, P.; Temple, S.; Mkandawire, A.B.C.; Gilbertson, R.L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, nº 1, p.37-42, 1999.
11. Jiménez-Gasco, M.; Pérez-Artés, W.; Jiménez-Díaz, R.M. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, nº 2, p.237-248, 2001.

12. Lins, S.R.O.; Coêlho, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, nº 3, p. 332-335, 2004.
13. Martins, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
14. Oliveira, V.C.; Costa, J.L.S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, nº 6, p.631-634, 2002.
15. Persley, G.J.; De Langle, E.A. Summary of Discussion and Recommendations. In: Bentley, S.; Pegg, K. G.; Moore, N.Y.; Davis, R.D.; Buddenhagen, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, nº 12, p.1283-1293, 1998.
16. Ploetz, R.C. Correll, J.C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, nº 4, p.325-328, 1988.
17. Sivaramakrishnan, S.; Kannan, S.; Singh, S.D. Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. **Mycopathologia**, v. 155, nº 3, p.171-178, 2002.

18. Vakili, N.G. Fusarium wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, n° 7, p.135-140, 1965.
19. Vaneechoutte, M.; Rossau, R.; Devos, P.; Gillis, M.; Janssens, D.; Paepe, N.; De Rouck, A.; Fiers, T.; Claeys, G.; Kersters, K. Rapid identification of bacteria in the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 93, n° 1, p.227-234, 1992.
20. Waite, B.H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 3. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.40, n° 4, p.299-305, 1963.
21. Warumby, J. F; Coêlho, R.S.B; Lins, S.R.O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. SEBRAE, Recife, 2004. 98p.
22. Weising, K.; Nybom, H.; Wolh, K.; Meyer, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Perss, Flórida, 1995, 336p.
23. White, T. J.; Bruns, T.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Inns, M. A.; Gelfand, D. H.; Shinsky, J. J.; White, T. J. (Eds.) **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. New York. Academic Press, p. 315-322, 1990.

### **CAPÍTULO III**

---

**Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal da murcha de fusário em helicônia**

**MARCADORES RAPD NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE ISOLADOS DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP.  
*CUBENSE*, AGENTE CAUSAL DA MURCHA DE FUSÁRIO EM  
HELICÔNIA**

DENISE DE SANTANA SILVA<sup>1\*\*</sup>, LUCIANE VILELA RESENDE<sup>2</sup>, NEILZA REIS  
CASTRO<sup>3</sup>, RILDO SARTORI BARBOSA COELHO<sup>4</sup>, JOSÉ CARLOS DA COSTA<sup>1</sup>,  
MANUELA XAVIER BEZERRA ALVES<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, fax: (81) 3320-6205, e-mail: deniufprpe@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE/UAST, CEP 56000-000, Serra Talhada, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto Agrônômico de Pernambuco, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil.

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009).

\*\*Bolsista CNPq.

---

**RESUMO**

A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, é uma doença vascular que afeta espécies do gênero *Musa* e *Heliconia* spp. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* coletados em espécies de helicônia e bananeira, assim como relacionar tal aspecto com a origem geográfica, por meio de marcadores RAPD. Foram obtidas colônias monospóricas para estudos de caracterização. O DNA total de cada isolado foi extraído e realizado a amplificação com os oligonucleotídeos decâmeros. O produto das

reações do DNA dos 31 isolados com cada um dos oligonucleotídeos testados foi aplicado em gel de agarose a 2%. Destes, apenas sete oligonucleotídeos (OPA4, OPH5, OPA6, OPH9, OPH10, OPC 11 e OPH13) amplificaram, gerando um total de 44 fragmentos polimórficos. O método de UPGMA construiu um dendrograma, onde foram observados diferentes níveis de similaridade (91% a 38%). Considerando a similaridade média de 60%, observou-se a formação de cinco grupos. O agrupamento dos isolados observados não se relacionar com as áreas geográficas de coletas. A técnica mostrou alta diversidade genética entre os isolados. Estes resultados reforçam a importância de medidas de controle que impeçam a disseminação do patógeno através de material propagativo infectado.

Palavras-chave: Análise molecular, flores tropicais, murcha de fusário

#### **ABSTRACT**

**RAPD MARKERS IN THE GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* ISOLATES, CAUSAL AGENT OF FUSARIUM WILT IN HELICONIA.**

Fusarium wilt, caused by fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is a vascular disease affects species of the genus *Musa* and *Heliconia* spp. The objective of this study was to characterize the genetic diversity of isolates *F. oxysporum* f. sp. *cubense* collected from species of helicônia and banana, and relate this aspect to their geographical origin by means of RAPD markers. It was obtained monosporic colonies for characterization studies. Total DNA of each isolate was obtained and realized the amplification with oligonucleotides decâmeros. The product of the reactions of the DNA of 31 isolates with each oligonucleotides tested was applied in agarose gel the 2%.

Of these, only seven oligonucleotides (OPA4, OPH5, OPA6, OPH9, OPH10, OPC 11 e OPH13) amplified, generating a total of 44 polymorphic fragments. The method resulted in a UPGMA dendrogram, which were different levels of similarity (91% a 38%). Considering the average similarity of 60%, we observed the formation of five groups. The grouping of isolates found not to relate to the areas of collect. The technique has high debt genetic among isolates. These results are important for effort control manners that oppose pathogen dissemination by vegetative material infected.

Additional Keywords: Molecular analysis, tropical flowers, fusarium wilt

## INTRODUÇÃO

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd & Hans, agente causal da murcha de fusário, é patógeno habitante do solo. Ocorre em regiões de cultivo da bananeira e detectado também nos cultivos de flores tropicais, principalmente em *Heliconia* spp.

O patógeno provoca sintomas como amarelecimento e seca progressiva das folhas. Em corte longitudinal do pseudocaule, verifica-se um escurecimento vascular, mais acentuado nas partes laterais (Warumby, 2004).

São conhecidas quatro raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, distinguidas através de cultivares diferenciadoras. As raças 1, 2 e 4 atacam as cultivares de bananeira “Gros Michel” “Bluggoe” e “Cavendish” e a raças 3 *Heliconia* spp. (Stover e Waite, 1962). Em helicônia, o fungo foi primeiramente reportado na Costa Rica, em estudos realizados com a murcha bacteriana, diagnosticado em plantas originadas em Honduras, Costa Rica, Panamá e Colômbia na década de 60. A murcha de fusário vem sendo

detectada nas áreas produtoras de flores tropicais, principalmente no Nordeste, uma vez que a atividade vem se destacando no agronegócio brasileiro (Castro, 2007).

Com o advento dos métodos moleculares baseados na análise de DNA, estes têm sido ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de *Fusarium* e na diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados. Dentre os vários métodos existentes, a adoção de marcadores do tipo RAPD na detecção, diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, a sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados gerados. A técnica RAPD tem-se mostrado útil para medir e caracterizar a variabilidade genética (Fungaro, 2000). Levantamento da diversidade genética utilizando este marcador foi conduzido com sucesso por Alzate-Marin et al. (1997), Faleiro et al. (1998). Diversos trabalhos têm sido realizados com RAPD no gênero *Fusarium* envolvendo análise da variabilidade, diferenciação de isolados e estudo de populações, entre outros. Bentley et al. (1995), utilizaram a técnica de RAPD em estudos com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* para avaliar a variação genética de uma coleção mundial de isolados das raças 1, 2, 4 com diferentes grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs). Por meio desta técnica foi possível subdividir os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em dois grupos, porém não conseguiram correlacionar o padrão de RAPD com a raça. Entretanto Grajal-Martin et al. (1993) conseguiram diferenciar a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* de três outras raças por marcadores RAPDs, utilizando oligonucleotídeos comerciais. O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é uma importante ferramenta nos programas de melhoramento genético de plantas, que visam resistências às doenças. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo determinar a diversidade genética de isolados *F. oxysporum* f. sp. *cubense* coletados em espécies de helicônia, por meio de



marcadores RAPD, relacionar tal aspecto com a origem geográfica, e ainda, diferenciá-los de dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, provenientes de *Musa* cv. Maçã por meio da técnica citada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios dos Departamentos de Fitossanidade e de Fitotecnia/Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados no estudo 31 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, preservados em Castelani, cedidos da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Prof(a). Maria Menezes-UFRPE, provenientes de diversas espécies de helicônias e coletados em propriedades produtoras em várias regiões dos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, sendo dois isolados provenientes de *Musa* cv. Maçã, coletados em Pernambuco e Alagoas. A repicagem dos isolados foi realizada com auxílio de uma alça de platina flambada, fragmentos de colônias dos isolados, preservados em Castelani foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas sob luz fluorescente (12h claro/12h escuro) em temperatura ambiente ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Após sete dias de incubação, fez-se novamente a transferência dos isolados para tubos de ensaio contendo BDA com finalidade de preservação a curto prazo.

### **Obtenção de culturas monospóricas**

A partir de culturas fúngicas com sete dias de cultivo em BDA, foram transferidos discos com 5 mm de diâmetro da colônia para tubos de ensaios contendo 10 mL de água destilada esterilizada e agitou-se a suspensão, em seguida colocou-se 0,1 mL da suspensão de cada isolado na superfície do meio agar-água (AA) contido em

placas de Petri. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, a suspensão foi uniformemente distribuída sobre a superfície do meio. As placas foram mantidas sob temperatura ambiente e alternância luminosa. Após 24 h, utilizando-se lupa estereoscópica, os conídios germinados foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e cultivadas por um período de sete dias e posteriormente, foi realizada transferência para tubos de ensaio com BDA para fins de preservação.

### **Caracterização Molecular de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense***

#### **Extração do DNA total**

A extração do DNA dos isolados de *F. oxysporum* f. sp.  *cubense* foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Weising et al. (1995) através da raspagem do micélio crescido em placas de Petri contendo BDA. Foram macerados 100 mg do micélio em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL na presença de nitrogênio líquido, até formar um pó fino. Em seguida foi adicionado 600 µL de tampão de extração SDS (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) e agitou-se por 30 s em vortex. Em seguida os tubos foram incubados a 90°C por 10 min, adicionando-se 300 µL de acetato de sódio (3M) os tubos foram homogeneizados por inversão incubados por 20 min a -20°C. Posterior a este processo, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 15000 rpm, 700 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, onde adicionou-se 700 µL de isopropanol, as amostras foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 min a 15000 rpm. Após esta fase, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 300 µL de etanol 70% e etanol absoluto. O precipitado foi posto para secar por 1 hora em câmara de fluxo laminar e por fim ressuspensionado em 50 µL de água ultrapura para posterior estocagem a

- 20°C. Para o tratamento com RNase, foram adicionados às amostras 1 µL de RNase pura por 30 min a 37°C.

Para quantificação, pequenas alíquotas de DNA (1µL) foram submetidas à corrida eletroforética por 30 min, em gel de agarose a 0,8% contendo 2 µL Syber Gold em cada poço e 5 µL do corante azul de bromofenol na presença do marcador lambda 50 ng e visualizado em transluminador UV. Todos os géis foram fotodocumentados.

### **Reações de RAPD**

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL adaptado de Melo (2007), contendo tampão Tris-HCl (pH 8,4) 0,85X, MgCl<sub>2</sub> 2,9 mM, 100 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 16 µM de oligonucleotídeos, 0,2U da enzima Taq polimerase e aproximadamente, 25 ng de DNA. Foram utilizados os oligonucleotídeos decâmeros OPA4, OPH5, OPA6, OPH6, OPH9, OPH10, OPH11, OPC 11 e OPH13 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 35 ciclos nas seguintes sequências: Uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos a (95°C por 1 minuto, 40°C por 1 min, 72°C por 1 min) e uma extensão final por 5 min a 72°C. O produto das reações do DNA dos 31 isolados com cada um dos oligonucleotídeos testados foi aplicado em gel de agarose a 2%, submerso em tampão TBE 0,5X. A separação eletroforética foi de, aproximadamente, 2,5 h a 80 volts. Ao término da corrida, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta em um transluminador e fotodocumentados.

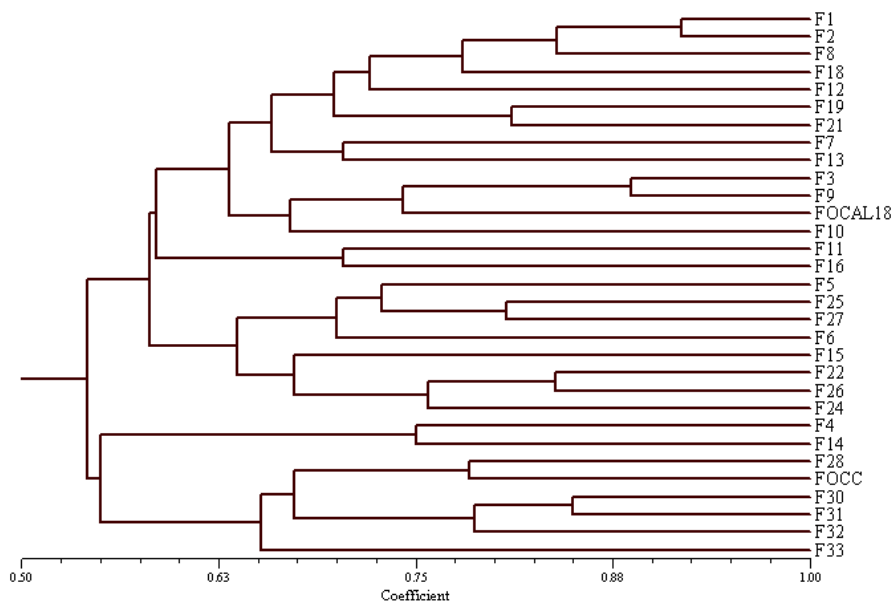
Todas as análises foram realizadas no programa computacional (NTSYS-pc versão 2.1, Exeter Software, USA). As análises dos padrões de RAPD foram realizadas para estimar a distância genética entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ubense*

provenientes de heliconias e bananeiras. Para essa finalidade foi obtida com base no coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultados da análise molecular por meio de RAPD foram utilizados dez oligonucleotídeos de seqüência arbitrária. Destes, apenas sete oligonucleotídeos (OPA4, OPH5, OPA6, OPH9, OPH10, OPC 11 e OPH13) amplificaram, gerando um total de 44 fragmentos polimórficos. Os tamanhos dos fragmentos variaram de 100 pb a 700 pb.

A análise do padrão de bandas gerado por cada oligonucleotídeo utilizado permitiu a construção de uma matriz de similaridade segundo o coeficiente de Jaccard. O método de UPGMA construiu um dendrograma, onde foram observados diferentes níveis de similaridade (91% a 38%). Considerando a similaridade média de 60%, observou-se a formação de cinco grupos conforme a Figura 1.



**Figura 1.** Agrupamento de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, obtidos de helicônia e bananeira, baseado nas distâncias genéticas entre os indivíduos. Dados obtidos pela análise do DNA genômico por meio da técnica de RAPD.

O primeiro grupo foi constituído por 13 isolados pertencentes aos municípios de Rio Largo (F1 e F21), Paulista (F2, F13 e F19), Paudalho (F8), Marechal Deodoro (F18), Camaragibe (F3 e F12), Goiana (F7), Boquim (F9), Jacuípe (FocAL 18) e Paripueira (F10). Os isolados o F11 e F16 ambos provenientes do município de Camaragibe formou um grupo distinto dos demais. No terceiro agrupamento ficaram os isolados dos municípios de Goiana (F5, F24, F26, e F27), Camaragibe (F15 e F25) e Paulista (F6 e F22). No quarto grupo ficaram os isolados F4 e F14 oriundos de Goiana e Rio Largo, respectivamente. E o quinto grupo formado por seis isolados oriundos dos municípios do Cabo de Stº Agostinho (F28), Bonito (Foc C), Camaragibe (F30 e F32), Rio Largo (F31) e Ribeirão (F33) de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1.** Agrupamento de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cupense*

Coleção	Isolado	Origem
CMM-2127	F1	Rio Largo-AL <sup>1,I</sup>
CMM-2128	F2	Paulista-PE <sup>1,I</sup>
CMM-2134	F8	Paudalho-PE <sup>1,I</sup>
CMM-2143	F18	M. Deodoro-AL <sup>1,I</sup>
CMM-2138	F12	Camaragibe-PE <sup>4,I</sup>
CMM-2144	F19	Paulista-PE <sup>1,I</sup>
CMM-2145	F21	Rio Largo-AL <sup>4,I</sup>
CMM-2133	F7	Goiana-PE <sup>3,I</sup>
CMM-2139	F13	Paulista-PE <sup>1,I</sup>
CMM-2129	F3	Camaragibe-PE <sup>2,I</sup>
CMM-2135	F9	Boquim-SE <sup>1,I</sup>
CMM-2157	Foc AL18	Jacuípe-AL <sup>6,I</sup>
CMM-2136	F10	Paripueira-AL <sup>1,I</sup>
CMM-2137	F11	Camaragibe-PE <sup>2,II</sup>
CMM-2142	F16	Camaragibe-PE <sup>1,II</sup>
CMM-2131	F5	Goiana-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2148	F25	Camaragibe-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2150	F27	Goiana-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2132	F6	Paulista-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2141	F15	Camaragibe-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2146	F22	Paulista-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2149	F26	Goiana-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2147	F24	Goiana-PE <sup>1,III</sup>
CMM-2130	F4	Goiana-PE <sup>1,IV</sup>
CMM-2140	F14	Rio Largo-AL <sup>1,IV</sup>
CMM-2151	F28	Cabo de Stº Agostinho-PE <sup>1,V</sup>
CMM-2156	Foc C	Bonito-PE <sup>6,V</sup>
CMM-2152	F30	Camaragibe-PE <sup>1,V</sup>
CMM-2153	F31	Rio Largo-AL <sup>1,V</sup>
CMM-2154	F32	Camaragibe-PE <sup>5,V</sup>
CMM-2155	F33	Ribeirão-PE <sup>1,V</sup>

Espécies hospedeiras: <sup>1</sup>*H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. Alan Carle,

<sup>2</sup>*H. stricta* cv. Tagami, <sup>3</sup>*H. wagneriana*, <sup>4</sup>*H. chartacea* cv. Sexy Pink, <sup>5</sup>*H.*

*orthotricta* cv. Eclipse Total, <sup>6</sup>*Musa* cv. Maçã.

Agrupamento dos isolados gerado pelos oligonucleotídeos: I, II, III, IV, e V.

De acordo com o dendrograma foi possível a formação de grupos mais homogêneos. A análise por meio de RAPD mostrou a alta diversidade dos isolados

analisados. Os dois isolados oriundos de bananeira ficaram entre os isolados de helicônia. A técnica não permitiu separar esses isolados dos demais. Com este resultado pôde-se verificar que não ocorreu uma correlação geográfica dos isolados com as áreas de coletas, visto que isolados de uma mesma microrregião de posicionaram em grupos distintos, assim como isolados de regiões distintas de posicionaram dentro de um mesmo grupo. Isto pode ser atribuído à circulação de material propagativo contaminado, Portanto, não foi possível correlacionar esses isolados com suas áreas de origem.

Castro (2007) estudando os mesmos isolados através da técnica ISSR não conseguiu relacionar os isolados com as áreas de coleta, atribuindo à complexidade que o patógeno apresenta como consequência da alta diversidade. Gherbawy (1999) utilizou marcadores RAPD para analisar a diversidade genética de 20 isolados de 14 *formae speciales* de *F. oxysporum*. Estes isolados foram alocados em três grupos, que não apresentaram nenhuma correlação com a origem geográfica. A alta diversidade observada entre os isolados de regiões próximas comprova o quanto complexo é o patógeno, mesmo considerando a intensa troca de material propagativo em ter os produtores da região. Resultados semelhantes foram observados por Jesus et al. (1995) quando analisaram dez isolados de *F.oxysporum* f. sp. *cubense* das raças 1 e 2 oriundos de várias regiões da Bahia, e comprovaram alta diversidade entres dos isolados utilizando marcadores RAPD, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Sivaramakrishnan et al. (2002) também avaliaram a variabilidade de 43 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, coletados de nove estados da Índia. Analisou similaridade desses isolados patogênicos, gerada pelos marcadores de RAPD resultou em três diferentes grupos sendo que dois destes representaram a raça 1 e 2 e o terceiro foi formado pelas raças 3 e 4. Os marcadores moleculares mostraram que as raças 1 e 2

apresentam grande diversidade quando comparada com as raças 3 e 4. Foi detectado um grande nível de variabilidade genética entre e dentro das raças de *F. oxysporum* f.sp. *ciceri*. Os autores consideram que as similaridades e diferenças nos padrões de bandas obtidos por RAPD poderiam ser uma ferramenta molecular útil em estudos evolutivos quanto a origens de diferentes raças.

Os resultados deste trabalho demonstram que a técnica de RAPD constitui um marcador eficiente na caracterização patogênica de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, podendo ser usado como ferramenta complementar na caracterização molecular de populações deste importante fitopatógeno.

### CONCLUSÕES

O estudo da diversidade genética por análise molecular de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* coletados em helicônia e bananeira indicou alta variabilidade genética do fungo, não relacionada com as regiões geográficas onde foram coletados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, G.A.; PAULA JÚNIOR, T.L. DE; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.85-88, 1997.



BENTLEY, S.; PEGG, K.G.; DALE, J.L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, v.99, p.1378-1384, 1995.

CASTRO, N.R. **Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética**. 2007. 113p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MESQUITAA.G.G.; VINHADELL, W.S.; PAULA JÚNIOR, T.L. DE; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus*, utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.386-390, 1998.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.12-16, 2000.

GHERBAWY, Y.A.M.H. RAPD analysis of isolates belonging to different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Cytologia**, v.64, p.269-276, 1999.

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**, Saint Paul, v.83, p.612-614, 1993.

JESUS, J.DE.; CASCARDO, J.C. DE M.; FIGUEIRA, A.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; CORDEIRO, Z.J.M. **Uso de marcadores RAPD no estudo de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense**. Magistra 7. 1995. (Resumo).

MELO, R. A. **Caracterização morfológica e molecular em genótipos de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e estudo da variabilidade genética em progênes de meios irmãos na cultivar Verdão**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de concentração: Melhoramento Genético) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; KANNAN, S.; SINGH, S.D. Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. **Mycopathologia**, v.155, p.171-178, 2002.

STOVER, R.H.; WAITE, B.H. Studies on *Fusarium* wilt of banana. VI Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 38, p. 985-994, 1962.

WARUMBY, J.F; COELHO, R.S.B; LINS, S.R.O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. SEBRAE, Recife, 2004. 98p.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLH, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Perss, Flórida, 1995, 336p.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo da diversidade genética por análise molecular de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* coletados em helicônia e bananeira indicou alta variabilidade genética entre os isolados, não relacionada com as regiões geográficas onde foram coletados os isolados;
- As técnicas ARDRA e RAPD separaram os isolados em cinco grupos com alta diversidade genética entre os isolados;
- A similaridade encontrada foi de 61% versus 60% para os marcadores moleculares estudados ARDRA e RAPD, respectivamente.
- Dos dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* provenientes de *Musa* cv. Maçã analisado, apenas um formou um grupo distinto pela técnica de ARDRA.

**ANEXOS**

---

**Tabela 3.** Matriz de similaridade entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* por ARDRA

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F18	F19	F21	F22	F24	F25	F26	F27	F28	F30	F31	F32	F33	FocC	FocAL18	
F1	1.00																															
F2	1.00	1.00																														
F3	0.33	0.33	1.00																													
F4	1.00	1.00	0.33	1.00																												
F5	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00																											
F6	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00																										
F7	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00																									
F8	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00																								
F9	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00																							
F10	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00																						
F11	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00																					
F12	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00																				
F13	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00																			
F14	0.66	0.66	0.25	0.66	0.66	0.25	0.66	0.66	0.25	0.66	0.25	0.66	0.66	1.00																		
F15	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.66	1.00																	
F16	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00																
F18	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.66	1.00	0.33	1.00															
F19	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00	0.33	1.00														
F21	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00													
F22	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.25	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	1.00											
F24	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.50	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	1.00										
F25	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.50	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	1.00	1.00									
F26	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.66	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.33	0.33	0.66	0.66	1.00								
F27	0.66	0.66	0.25	0.66	0.66	0.25	0.66	0.66	0.25	0.66	0.25	0.66	0.66	1.00	0.66	0.25	0.66	0.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.50	0.66	1.00							
F28	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	0.66	0.66	0.33	0.25	1.00							
F30	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	0.66	0.66	0.33	0.25	1.00	1.00						
F31	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.25	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	0.66	0.66	0.33	0.25	1.00	1.00	1.00					
F32	0.50	0.50	0.00	0.50	0.50	0.00	0.50	0.50	0.00	0.50	0.00	0.50	0.50	0.33	0.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.50	0.33	0.33	0.50	0.33	0.00	0.00	0.00	1.00				
F33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.66	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.33	0.33	0.66	0.66	1.00	0.66	0.33	0.33	0.33	0.50	1.00		
FocC	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.33	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00	0.33	0.33	0.50	0.33	0.50	0.50	0.50	0.00	0.50	1.00	
Foc18	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	1.00	0.66	1.00	0.33	1.00	0.33	0.33	0.33	0.33	0.66	0.66	1.00	0.66	0.33	0.33	0.33	0.50	1.00	0.50	1.00

**Tabela 4.** Matriz binária de similaridade entre os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* obtida pela técnica de RAPD

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F18	F19	F21	F22	F24	F25	F26	F27	F28	F30	F31	F32	F33	FOCC	FOCAL18							
F1	1.00																																					
F2	0.91	1.00																																				
F3	0.67	0.63	1.00																																			
F4	0.45	0.45	0.45	1.00																																		
F5	0.51	0.54	0.72	0.60	1.00																																	
F6	0.54	0.57	0.55	0.50	0.67	1.00																																
F7	0.72	0.75	0.52	0.60	0.56	0.55	1.00																															
F8	0.83	0.84	0.65	0.50	0.56	0.70	0.72	1.00																														
F9	0.70	0.65	0.88	0.45	0.65	0.52	0.54	0.68	1.00																													
F10	0.64	0.54	0.72	0.65	0.72	0.65	0.61	0.65	0.70	1.00																												
F11	0.56	0.59	0.63	0.50	0.63	0.52	0.56	0.61	0.75	0.63	1.00																											
F12	0.75	0.75	0.61	0.55	0.56	0.62	0.59	0.72	0.63	0.52	0.65	1.00																										
F13	0.71	0.72	0.59	0.65	0.68	0.57	0.70	0.75	0.52	0.63	0.63	0.70	1.00																									
F14	0.45	0.45	0.45	0.75	0.54	0.55	0.56	0.52	0.47	0.59	0.40	0.43	0.50	1.00																								
F15	0.41	0.52	0.47	0.60	0.56	0.65	0.68	0.59	0.54	0.56	0.56	0.50	0.52	0.70	1.00																							
F16	0.54	0.52	0.52	0.45	0.61	0.45	0.54	0.50	0.63	0.61	0.70	0.45	0.43	0.52	0.59	1.00																						
F18	0.80	0.78	0.72	0.31	0.62	0.63	0.59	0.75	0.70	0.62	0.59	0.64	0.56	0.48	0.54	0.62	1.00																					
F19	0.72	0.77	0.59	0.45	0.45	0.55	0.61	0.70	0.56	0.50	0.59	0.70	0.54	0.54	0.56	0.56	0.70	1.00																				
F21	0.66	0.72	0.56	0.55	0.56	0.60	0.64	0.70	0.59	0.62	0.59	0.59	0.56	0.59	0.59	0.56	0.67	0.81	1.00																			
F22	0.54	0.58	0.51	0.65	0.64	0.62	0.67	0.48	0.58	0.61	0.58	0.64	0.51	0.58	0.74	0.67	0.51	0.58	0.58	1.00																		
F24	0.51	0.54	0.59	0.60	0.59	0.50	0.61	0.61	0.52	0.59	0.54	0.52	0.54	0.54	0.56	0.56	0.62	0.68	0.67	0.67	1.00																	
F25	0.53	0.69	0.66	0.66	0.72	0.50	0.66	0.63	0.61	0.60	0.60	0.72	0.60	0.48	0.66	0.48	0.76	0.66	0.80	0.75	0.72	1.00																
F26	0.50	0.54	0.48	0.60	0.61	0.50	0.64	0.58	0.54	0.64	0.54	0.48	0.48	0.54	0.70	0.77	0.54	0.61	0.67	0.83	0.83	0.65	1.00															
F27	0.50	0.56	0.51	0.40	0.72	0.50	0.64	0.59	0.48	0.56	0.54	0.59	0.56	0.54	0.59	0.56	0.62	0.54	0.56	0.70	0.62	0.80	0.67	1.00														
F28	0.56	0.54	0.59	0.40	0.59	0.50	0.52	0.56	0.56	0.50	0.63	0.56	0.54	0.40	0.47	0.65	0.59	0.63	0.59	0.51	0.63	0.57	0.61	0.59	1.00													
F30	0.45	0.50	0.54	0.60	0.54	0.50	0.61	0.47	0.47	0.59	0.54	0.43	0.54	0.50	0.56	0.65	0.48	0.59	0.59	0.54	0.68	0.54	0.70	0.48	0.77	1.00												
F31	0.40	0.45	0.45	0.56	0.65	0.50	0.55	0.50	0.35	0.60	0.50	0.50	0.70	0.65	0.65	0.60	0.30	0.60	0.55	0.60	0.70	0.55	0.75	0.65	0.70	0.85	1.00											
F32	0.45	0.47	0.45	0.75	0.50	0.50	0.67	0.50	0.47	0.52	0.42	0.45	0.50	0.65	0.62	0.57	0.36	0.47	0.57	0.62	0.60	0.55	0.74	0.60	0.57	0.72	0.85	1.00										
F33	0.59	0.56	0.56	0.45	0.47	0.50	0.63	0.63	0.59	0.52	0.52	0.54	0.61	0.52	0.63	0.59	0.56	0.52	0.51	0.58	0.52	0.48	0.67	0.62	0.70	0.65	0.60	0.70	1.00									
FOCC	0.60	0.54	0.59	0.65	0.43	0.50	0.51	0.56	0.62	0.54	0.62	0.51	0.48	0.45	0.40	0.64	0.48	0.62	0.54	0.45	0.70	0.38	0.61	0.37	0.78	0.78	0.60	0.60	0.59	1.00								
FOCAL18	0.83	0.74	0.74	0.45	0.54	0.51	0.58	0.71	0.74	0.58	0.61	0.74	0.54	0.48	0.51	0.64	0.67	0.74	0.61	0.58	0.58	0.60	0.54	0.48	0.74	0.58	0.40	0.40	0.74	0.67	1.00							