

OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE MOLECULAR COM AFLP PARA *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

Camila Santiago Hohenfeld¹; Eder Jorge de Oliveira², Aline dos Santos Silva³, Onildo Nunes de Jesus⁴

⁽¹⁾Estudante de Licenciatura em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Universitários, 44380-000 Cruz das Almas - BA. E-mail: chohenfeld@gmail.com;

⁽²⁾Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n – CP00744380-000 Cruz das Almas - BA, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br;

⁽³⁾Mestranda do curso de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, E-mail: lineagro@yahoo.com.br; ⁽⁴⁾Bolsista PNPd – CAPES/Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, E-mail: onildo@cnpmf.embrapa.br

Introdução

O gênero *Fusarium* compreende várias espécies de fungos distribuídos no solo e substratos orgânicos. Uma das espécies mais importante é o *Fusarium oxysporum* que causa a murcha vascular e a podridão da raiz de diversas culturas de importância econômica. A especialização desse fungo a um hospedeiro permite sua classificação em *forma specialis* (f.sp.). Entre elas encontra-se o *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (McKnight, 1951) (FOP), agente etiológico da fusariose ou murcha do maracujazeiro. Além de atacar grupos específicos de plantas estes fungos são divididos em raça de acordo com a habilidade de infectar cultivares específicas indicando a elevada plasticidade genética deste patógeno. O mecanismo desta variabilidade é pouco conhecido, sabe-se que mecanismo que promova alta taxa de mutação possa estar relacionado (Langin et al., 1995).

Para a cultura do maracujá pouco se sabe a respeito da variabilidade genética deste fungo, sendo este estudo não apenas importante para conhecimento do fungo, mas também para ações de melhoramento, visando identificar fontes de resistência a este fitopatógeno. Os marcadores AFLP por combinar o polimorfismo de restrição com a capacidade de detecção do PCR, alto polimorfismo e maior cobertura do genoma torna-se um marcador ideal para a caracterização deste fungo. Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar a técnica AFLP para estudos de divergência genética em isolados de FOP.

Materiais e Métodos

Foram utilizados dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, FOP013 e FOP071, obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e

Fruticultura Tropical. O DNA dos isolados foi extraído pelo método CTAB, descrito por Zolan & Pukilla (1986). A qualidade e a concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Foram testados dois protocolos de amplificação, o primeiro empregando a metodologia descrita por Vos et al. (1995) e o segundo utilizando o AFLP[®] Core Reagent Kit (Invitrogen) para as etapas de digestão e ligação dos adaptadores, com as posteriores etapas seguindo o protocolo anterior. Para a reação de digestão, 250ng de DNA genômico foi digeridos utilizando a combinação *EcoRI* / *MseI*, por 2 horas a 37°C e posteriormente, a 70°C por 15 minutos. Os fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores e diluídos na proporção 1:10 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na reação de pré-amplificação foram utilizados iniciadores *EcoRI* e *MseI*, com extensão de um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (*EcoRI* + A e *MseI* + C); O produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na etapa de amplificação os iniciadores *EcoRI* e *MseI* possuíram duas e três pares de bases adicionados na extremidade 3', respectivamente (Tabela 1). Os produtos foram separados em gel desnaturante de 6% poliacrilamida e corado com prata (Creste et al., 2001). O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (Biolabs).

Resultados e Discussão

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

Na etapa de amplificação utilizando apenas o protocolo desenvolvido por Vos et al. (1995) os resultados obtidos não foram satisfatórios. Entretanto, o uso do kit comercial (AFLP[®] Core Reagent Kit) apresentou os melhores resultados. A amplificação utilizando as 32 combinações de AFLP mostrou-se altamente polimórfica. Estas combinações permitiram a obtenção de 913 bandas com média de 28,5 fragmentos por *primers*, com peso molecular variando de 35 a 916pb (Tabela 1). A combinação mais polimórfica foi a *EcoRI* + CT / *MseI* + AAA com 38 bandas. A combinação *EcoRI* + A / *MseI* + C não produziu fragmentos nítidos, sendo excluída da análise.

De maneira geral as combinações dos marcadores AFLP apresentaram alta capacidade informativa, possibilitando seu uso em pesquisas futuras com maior número de isolados, visando compreender a variabilidade do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* bem como definir subpopulações dentro das *forma specialis* permitindo sua identificação ou de novas raças. Aliado a compreensão genética do organismo este conhecimento é de grande

importância para o desenvolvimento de estratégias de controle desta doenças e para ações de melhoramento visando obtenção de cultivares resistentes ou tolerantes.

Tabela 1. Combinações de *primers* testadas e número de bandas geradas por combinação, com marcador AFLP.

Número	Combinações	Total	Número	Combinações	Total
1	CT/AAA	38	17	CA/ATC	29
2	CG/AAA	37	18	CT/AAG	29
3	CT/AAC	36	19	CC/ATT	29
4	CG/AAG	36	20	CC/AAG	28
5	CT/AAT	35	21	CC/ATC	27
6	CC/ATA	34	22	CT/ATG	26
7	CG/AAT	34	23	CC/AAA	26
8	CT/ATT	33	24	CG/ATA	26
9	CT/ATC	33	25	CA/ATA	25
10	CG/ATT	33	26	CA/AAG	24
11	CA/AAT	31	27	CA/ATG	24
12	CT/ATA	31	28	CA/ATT	22
13	CG/AAC	31	29	CC/ATG	20
14	CA/AAA	30	30	CC/AAT	19
15	CC/AAC	30	31	CA/AAC	18
16	CG/ATG	30	32	CG/ATC	9

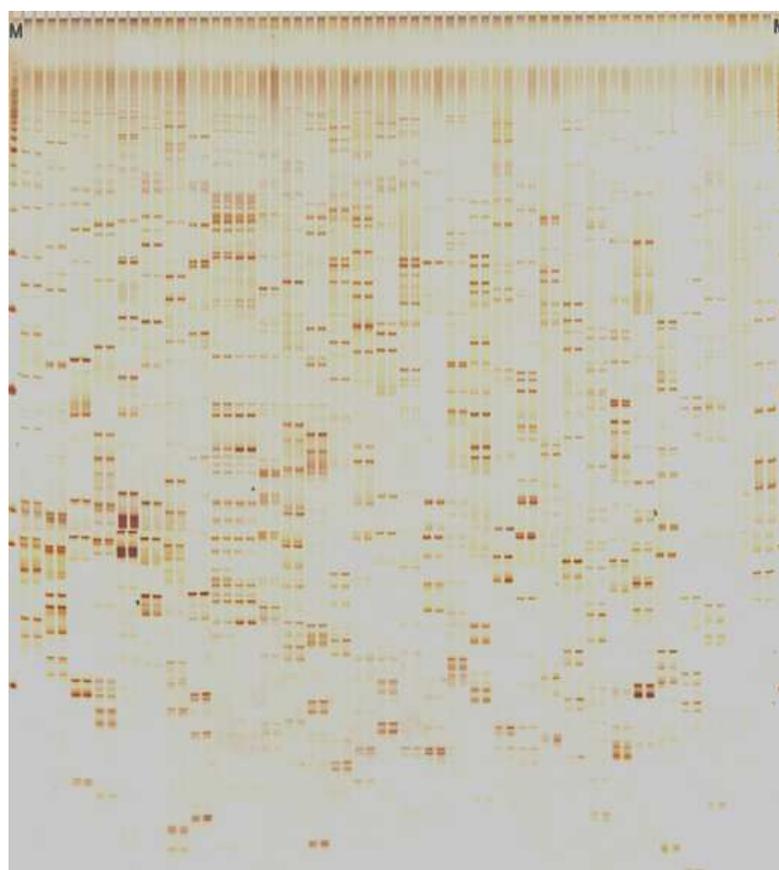


Figura 1: Produtos da amplificação utilizando 32 combinações de marcadores AFLP. A primeira e segunda amostra são os isolados FOP 013 e FOP071, respectivamente;. M: marcador de peso molecular 50 pb.

Conclusões

A adequação da técnica AFLP para o FOP permitiu análises moleculares da variabilidade genética deste agente patogênico. Estes resultados agregarão valor às futuras pesquisas de resistência à fusariose, permitindo a identificação de variantes do patógeno.

Agradecimentos

À Fapesb e ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

Referências Bibliográficas

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

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

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

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