

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina**

Cristiane Maria da Silva

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marciel João Stadnik

Co-orientador: M.Sc. Robert Harri Hinz

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA – BRASIL
2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586a Silva, Cristiane Maria da
Análise da diversidade genética por marcadores RAPD
e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado
de Santa Catarina [dissertação] / Cristiane Maria
da Silva ; orientador, Marciel João Stadnik. -
Florianópolis, SC, 2009.
65 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Banana. 3. Marcador
molecular. 4. Mal-do-Panamá. I. Stadnik, Marciel Joao. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTIANE MARIA DA SILVA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES RAPD e SSR DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Dissertação julgada e aprovada em 22/12/2009, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Comissão Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marciel João Stadnik
Presidente e Orientador (CCA/UFSC)



Prof. Dr. Fernando Adami Tcacenco
Membro (EPAGRI/SC)



Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
Membro (CCA/UFSC)



Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis
Coordenador do Programa

Florianópolis, dezembro de 2009

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,

Ao professor e orientador Marciel João Stadnik pela orientação, oportunidade e pelos conhecimentos a mim repassados;

Ao pesquisador e co-orientador Robert Harri Hinz, pelos ensinamentos a mim repassados, orientação, carinho e incentivo,

A todos os professores e funcionários do Programa em Recursos Genéticos Vegetais;

A Bernadete, secretária do curso de Pós-Graduação- RGV, pela amizade e dedicação;

Ao Mestre, amigo, conselheiro, Lucas Miura, pelo carinho, incentivo e participação em todas as etapas de minha formação.

A Pesquisadora Adriana Pereira que me acompanhou ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos a mim repassados, pelo grande carinho e pela amizade construída,

Ao Pesquisador Fernando A. Tcacenco, pelo carinho, incentivo e por estar sempre presente contribuindo com seus conhecimentos,

Ao Pesquisador José Maria Milanez, pela sua compreensão, carinho, para que eu pudesse concluir o mestrado;

Aos Pesquisadores Klaus K. Schermann e Rubens Marchalek, Ester Wickert pela amizade e disposição em repassar os seus conhecimentos;

Aos Pesquisadores, José Ângelo Rebelo, Francisco Carlos Deschamps e Gilmar Roberto Zaffari pelas palavras de incentivo, carinho e amizade;

A todos os funcionários da Estação Experimental de Itajaí

A Associação dos Bananicultores de Santa Catarina pela bolsa concedida;

A UNIVALI, em especial ao Professor Moisés e ao técnico Tiago pelo apoio;

A minha grande amiga e mãe Valquiria Merlo da Silva, pela dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida. Por ser pai e mãe ao longo desses anos.

Ao meu Pai (*in memoriam*) onde estiver... *tenho certeza que torce por mim;*

Ao meu esposo Wendell, que sempre esteve muito presente, me dando todo apoio e carinho para continuar;

A minha avó Olga que sempre rezou para que eu conseguisse chegar ate o fim

A todos meus familiares que me incentivaram no decorrer desses anos

Aos amigos Christiane Lazzaris, Henri Stuker, Izabel Krieger, Graziela Baldo, Everson Cunha, Susana Testoni, Gabriel Fernandes, Morgana Maciel, Aloisio Coelho, pelo incentivo, amizade, apoio e carinho;

Aos amigos e colegas, Luciane Malinowski, Camila Cordeiro, Maycon, Gustavo, Eloi, Max, Gisele, Aline, Juliana, Dilnei, Val, Alexandre, Aurélio, Maria, Alécio, Leonardo, Mateus, Leandro, que me ajudaram em algum momento desta trajetória e pela amizade;

A Todos de uma forma geral que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

“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
(1997)

Dedico

“A Deus, a minha mãe, meu esposo esta conquista”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A BANANICULTURA	2
2.2 A DOENÇA MAL-DO-PANAMÁ	3
2.3 SINTOMAS DA DOENÇA	4
2.4 ETIOLOGIA DO PATÓGENO	5
2.5 CONTROLE DA DOENÇA	6
2.6 VARIABILIDADE EM <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	8
2.7 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES	9
2.7.1 Variabilidade Genética Via RAPD (<i>Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso</i>)	10
2.7.2 Variabilidade Genética Via SSR (<i>sequência simples repetida</i>)	10
2.8 ANÁLISES DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DE GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA	12
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 AMOSTRAGEM	15
4.2 ISOLAMENTO	15
4.2.1 Obtenção de culturas monospóricas	17
4.2.2 Conservação do patógeno	18
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	18
4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE	18
4.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES	20
4.5.1 Crescimento do fungo em meio líquido	20
4.5.2 Extração do DNA	20
4.5.3 Amplificação do DNA RAPD	21
4.5.4 Amplificação do DNA por SSR	22
4.6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DOS GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA	23
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25

5 RESULTADOS	26
5.1 TESTE DE PATOGENICIDADE.....	26
5.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	26
5.3 ANÁLISE VARIABILIDADE GENÉTICA.....	28
5.3.1 Marcador Molecular RAPD	28
5.3.2 Marcador Molecular SSR.....	33
5.3.3 Compatibilidade Vegetativa	36
6 DISCUSSÃO	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos de identificação e coordenadas geográficas dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> coletados em municípios do Estado de Santa Catarina.	16
Tabela 2 - Identificação dos iniciadores utilizados para estudo RAPD seguido da sequência de nucleotídeos	21
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para estudo SSR seguido da sequência de nucleotídeos.	22
Tabela 4 - Classificação dos isolados de <i>FOC</i> de acordo com a cor e origem, avaliados no décimo quarto dia de crescimento em meio de cultura BDA.....	27
Tabela 5 - Iniciadores de RAPD selecionados neste estudo e o número de fragmentos de DNA amplificados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Etapas de obtenção dos isolados. A) Identificação de plantas adultas de bananeira da cultivar Enxerto com sintomas do mal-do-panamá. B) Corte do pseudocaule próximo a inserção do rizoma. C) Observação de necroses no rizoma de coloração pardo avermelhado; sintomas típicos de fusariose. D) Obtenção de colônia isolada de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em meio de cultura BDA..... 17
- Figura 2 - Etapas do Teste de patogenicidade. A) Remoção de mudas dos tubetes. B) Corte das raízes a 5cm de base. C) Inoculação dos patógenos. D) Transplante das mudas para sacos plásticos com substrato. E) Acclimação das mudas em área de telado protegido..... 19
- Figura 3 - Fluxograma para determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa: Etapas para obtenção dos nit mutantes. B) Pareamento dos NitA e NitB de todos os isolados (A,B,C,D). 24
- Figura 4 - Avaliação do Teste de Patogenicidade: A) Testemunha: Rizomas de bananeira da cultivar Enxerto sem infecção do fungo no sistema vascular. B e C) Rizomas de bananeira infectado por *FOC* com sintomas característicos da doença (pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular no rizoma. 26
- Figura 5 - Características morfológicas: Coloração das Colônias de *FOC* cultivadas por 14 dias em meio de cultura BDA a 26°C e fotoperíodo 12h. Variação das colônias em relação à cor, variando do branco ao roxo. 27
- Figura 6 - Padrões de ampliações de RAPD, em gel de agarose 1,5%, obtidos com o iniciador R1(A), OPAX -10 (B), R3 (C) para isolados de *FOC*. M1: marcador de peso molecular 100pb. M2: marcador de peso molecular 1kb..... 29

- Figura 7 - Dendograma de similaridade genética dos 64 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e dos “out groups” Pg. (*Pyricularia grisea*) e Fg. (*Fusarium graminearum*), utilizando os iniciadores RAPD R1 e OPF05.....31
- Figura 8 - Dendograma de similaridade genética dos 64 isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* utilizando iniciadores RAPD.32
- Figura 9 - Padrões de amplificação de SSR, em gel de poliacrilamida 6%, obtidos com o iniciador MB02 para isolados de *FOC* coletados dos Municípios de Corupá (CO) e Jaraguá do Sul (JS). M: marcador de peso molecular 50pb. Os números assinalados referem-se aos tamanhos dos fragmentos amplificados.....34
- Figura 10 - Dendograma de similaridade genética dos 66 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizando os iniciadores SSR MB2 e MB11.35
- Figura 11 - A) Obtenção de Nit mutantes em meio mínimo com clorato de potássio. A seta indica a formação de setores. B) Pareamento dos nit mutantes dos quatro isolados de *FOC* selecionados para este estudo em meio mínimo.37

Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina

RESUMO

O Mal-do-Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) é um dos principais problemas fitossanitários da bananicultura. Para esta doença, o uso da resistência genética é o método de controle recomendável. Porém, sua eficiência depende tanto de genes de resistência disponíveis como da presença de patótipos do patógeno. Assim este estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade genética de isolados de FOC por meio de descritores morfológicos e marcadores moleculares (RAPD, SSR). Para tanto, foram avaliados 66 isolados coletados em regiões produtoras de Santa Catarina. Os resultados de patogenicidade revelaram que 100% dos isolados foram patogênicos à bananeira da cultivar Enxerto. Quanto às características morfológicas dos isolados não se observou diferenças significativas com relação à taxa de crescimento das colônias, que variaram de 4,4 a 6,6 mm.dia⁻¹. A coloração das colônias sobre meio de cultura BDA variou de branco, salmão e roxo. Os resultados utilizando marcadores moleculares RAPD apresentaram uma variabilidade considerável entre os isolados de FOC, com estimativas de similaridade que variaram de 35 a 98%. Baseado nos 10 marcadores selecionados de RAPD, os 66 isolados foram agrupados em cinco grupos distintos, sendo que o número de indivíduos provenientes das regiões norte e sul do Estado foi igualmente distribuído no primeiro grupo, onde 58 indivíduos foram agrupados. Nos outros quatro grupos formados teve-se somente isolados provenientes do norte do Estado, os quais apresentaram uma maior distância genética quando comparados ao grupo um. A técnica de marcador molecular SSR separou os isolados em três grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído de 59 indivíduos provenientes dos diversos municípios onde as coletas foram feitas. O segundo grupo, composto por dois isolados (CO16, JS23), caracterizou-se por apresentar alelo nulo para o marcador MB11. Já o terceiro grupo, formado por quatro isolados (JS26, SI53, SI54, SI55, SI56), apresentou um alelo extra no marcador MB02. No estudo de compatibilidade vegetativa não foi possível observar o pareamento entre os quatro isolados testados não havendo, portanto compatibilidade vegetativa entre os mesmos. Não houve associação dos agrupamentos RAPD e SSR com origens geográficas e características morfológicas da colônia de FOC, visto que os isolados foram distribuídos indistintamente nos grupos.

Analysis of the genetic diversity by RAPD and SSR markers in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* in the State of Santa Catarina

ABSTRACT

Panama disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (*FOC*) is one of the main constraints in banana production. For this disease, the use of genetic resistance has been usually recommended as efficient control method. However, its efficiency depends on available genes for resistance or presence of pathogen pathotypes. This study aimed to characterize the genetic diversity of isolates of *FOC* by means of morphological descriptors and molecular markers. For this purpose, 66 isolates were collected in the producing regions of Santa Catarina state. The pathogenicity of the *FOC* isolates revealed that 100% of them were pathogenic to banana cv. Enxerto. In regard to morphological characteristics, there was no significant difference among growth rates ranging from 4.4 to 6.6 mm day⁻¹ as well as and color of colonies on culture medium that were white, salmon or purple. The molecular markers showed considerable variability among *FOC* isolates with similarity estimates varying between 98 and 35%. Based on 10 RAPD markers, 66 isolates were grouped into five distinct groups. In the first group, 58 individuals were grouped with the same number of individuals from north and south regions. The further four groups were composed only by isolates from the northern state and showed a higher genetic distance compared to the first group. SSR analysis separated individuals into three distinct groups showing low variability among them. The first group consisted of 59 individuals from the various municipalities where the collections were made. The second group composed of two isolates (CO16, JS23) was characterized by presenting null allele for the marker MB11. The third group comprising four strains (JS26, SI53, SI54, SI55, SI56) was characterized by presenting an extra marker allele MB02. In the study of vegetative compatibility was not possible to observe the compatibility among the four isolates tested. There was no association among groups with RAPD, SSR markers, geographic origins and morphological characteristics of isolates collected from the different municipalities, since they were indistinctly grouped.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre as frutíferas tropicais cultivada a bananeira (*Musa* spp.) se destaca apresentando o segundo maior volume de produção e o primeiro em consumo mundial. Devido ao seu alto valor nutritivo e por estar disponível durante todo o ano, é uma fruta de suma importância. A bananicultura é uma das atividades agrícolas de grande importância social e na geração de empregos. Estima-se que em Santa Catarina esta atividade seja explorada por, aproximadamente, 25 mil produtores rurais, sendo que parte destes tem na bananicultura sua principal fonte de renda. Na posição de terceiro maior produtor de bananas do Brasil, o Estado tem uma área cultivada de aproximadamente 31 mil hectares e uma produção anual de 683 mil toneladas. (SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA, 2007/2008).

Entre os principais problemas fitossanitários da bananeira, destaca-se o mal-do-panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que ocorre, principalmente, nos bananais da cultivar Prata e ultimamente vem atacando cultivares do grupo Cavendish. A doença causa a morte de plantas e dificulta, e até mesmo impede, a implantação de novos plantios, pois o fungo pode sobreviver no solo durante muitos anos (CORDEIRO & MATOS, 2005). Devido às peculiaridades dessa doença, o uso de fungicidas é pouco eficiente no controle. Assim, tem sido preconizado o uso de cultivares resistentes como a forma de controle mais eficiente. Porém, sua eficiência depende tanto dos genes de resistência disponíveis como da presença de patótipos do patógeno.

Um dos maiores obstáculos para a manutenção da resistência da bananeira reside na variabilidade dos patógenos. Portanto, é importante e fundamental conhecer as raças e/ou patótipos predominantes em um determinado local e sua epidemiologia, para contribuir com os programas de melhoramento. Neste sentido, técnicas de biologia molecular têm sido apresentadas para diagnosticar e estudar os patógenos, e têm contribuído para conhecer a sua diversidade.

Os tipos distintos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de cepas do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, isoladas de bananeiras cv. Enxerto provenientes de diferentes municípios de Santa Catarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A BANANICULTURA

A bananeira (*Musa* spp.) pertence à família botânica Musaceae e é originária da região sudoeste da Ásia. A planta se caracteriza por apresentar caule suculento e subterrâneo (rizoma), cujo "falso" tronco é formado pelas bases superpostas das folhas, folhas grandes e flores em cachos que surgem em série à partir do chamado "coração" da bananeira. É uma planta tipicamente tropical, exige calor constante, precipitações bem distribuídas e elevada umidade para o seu bom desenvolvimento e produção. Sua altura pode variar de 1,8m a 8,0m. Dada a característica de emitir sempre novos rebentos, o bananal é permanente na área, porém com as plantas se renovando ciclicamente. A banana está entre as frutas mais consumidas no mundo e no Brasil, sendo um alimento energético, rico em carboidratos, sais minerais, como sódio, magnésio, fósforo e, especialmente, potássio. Apresenta predominância de vitamina A e C, contendo também as vitaminas B1, B2 e B6, contém pouca proteína e gordura (CROUCH, 1999).

Dentre as frutíferas tropicais explorada em todo o mundo, ela se destaca apresentando o segundo maior volume de produção e o primeiro em consumo. Sua produção tornou-se uma atividade principalmente de subsistência, sendo que maioria dos produtores a produz para consumo próprio e para venda em mercados locais. Devido ao seu alto valor nutritivo e por estar disponível durante todo o ano, é uma fruta de suma importância para qualquer sistema sustentado. Ela constitui o quarto produto alimentar mais consumido no mundo, precedido pelo arroz, trigo e milho (SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA, 2007/2008).

Nos anos mais recentes, a banana tem apresentado um aumento significativo no volume produzido, com 81,0 milhões de toneladas, é superada apenas pela melancia 97,5 milhões de toneladas, seguida da uva com 66,2 milhões de toneladas, maçã com 62,2 milhões de toneladas e laranja com 61,2 milhões de toneladas. O consumo mundial de banana é de aproximadamente 9,1kg/habitante/ano, e, segundo a FAO, cresce a cada ano, graças ao empenho do setor produtivo na qualificação da produção e do setor mercadológico nos aspectos que envolvem a apresentação do produto e a divulgação dos benefícios para quem o consome.

Santa Catarina é o terceiro maior produtor de bananas do Brasil; a bananicultura ocupa a maior área cultivada de fruteiras do Estado, com

31.076 hectares e uma produção anual de 683.156 toneladas (SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA, 2007/2008). A produtividade média dos pomares catarinense tem sido sempre crescente, fazendo com que o Estado continue sendo referência nacional nessa cultura. No Estado, a exploração da cultura se caracteriza pela utilização do tipo Caturra (também conhecida como banana d'água). Na Região Norte Catarinense a um cultivo predominante das cultivares Nanica e Nanicão, enquanto que na região Sul, as cultivares mais usadas são Enxerto e a Branca, componentes do tipo Prata. São mais de oitenta municípios que exploram a cultura da banana no Estado. Entretanto, quinze deles respondem por cerca 90% da produção catarinense. Desses apenas dois Corupá com 22,6% e Luis Alves com 17,3% perfazem juntos 40% do volume total estadual.

2.2 A DOENÇA MAL-DO-PANAMÁ

O mal-do-panamá é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras de banana do mundo, sendo citada como uma das seis mais importantes doenças de plantas cultivadas e responsável por perdas econômicas na ordem de bilhões de dólares (PLOETZ, 2006)

A primeira constatação da doença foi em 1876, na Austrália, seguindo-se relatos de ocorrência da doença no Panamá e na Costa Rica em 1890. Posteriormente, foi disseminada, para todos os países da América Central e do Sul (STOVER, 1972; WARDLAW, 1972).

Existem duas hipóteses em relação à origem do fungo. A primeira é que o fungo teria surgido na Ásia e se dispersado para a África e Américas através do transporte de rizomas e/ou plantas infectadas. Em outra hipótese o fungo teria se originado em várias regiões e que co-evoluíram independentemente. BENTLEY *et al.* (1998) sugerem que estas duas hipóteses podem ocorrer pela formação de grupos com isolamento genético e distribuição geográfica limitada bem como, grupos que coevoluiram independentemente dentro e fora do centro de origem do hospedeiro. A ocorrência mundial do fungo, por enquanto, está localizada de 30° N a 30° S, não havendo ainda registros nas Ilhas do Pacífico Sul, Somália e Mediterrâneo (PEREZ & VICENTE, 2004; PLOETZ, 2006).

Sua primeira constatação no Brasil foi em 1930, no município de Piracicaba, São Paulo, na cultivar Maçã. Em apenas 3-4 anos foram dizimados cerca de um milhão de plantas de banana naquele município paulista (GOES & MORETO, 2001).

2.3 SINTOMAS DA DOENÇA

A infecção inicia-se pelas radículas, atingindo o sistema vascular da bananeira, num processo sistêmico. As radículas e extremidades das raízes são os sítios iniciais de infecção. Nos genótipos resistentes, a infecção é paralisada devido à formação de géis e tiloses nos vasos do xilema, enquanto nas cultivares suscetíveis, a colonização dos vasos continua, estendendo-se aos tecidos parenquimatosos anexos. Em estádios mais avançados da doença, ocorre a colonização do tecido parenquimatoso adjacente, com a produção de elevada quantidade de conídios e clamidósporos (STOVER, 1972)

Os sintomas exibidos pelas plantas atacadas iniciam-se de 2 a 5 meses após a infecção e podem ser observados interna ou externamente no corte do rizoma e do pseudocaule (CODEIRO *et al.*, 2005).

De acordo com VENTURA & HINZ (2002), externamente observa-se um amarelecimento progressivo, das folhas mais velhas para as folhas mais novas, começando pelos bordos do limbo em direção à nervura principal. Progressivamente ao amarelecimento, ocorre murcha, com posterior quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, que dá à planta o aspecto típico de um guarda-chuva fechado. Além disto, pode ser observado estreitamento do limbo nas folhas mais novas, engrossamento das nervuras secundárias da folha e, ocasionalmente, necrose do cartucho. Um sintoma bastante típico e freqüentemente encontrado é a rachadura do pseudo-caule, próximo ao solo, cujo tamanho varia com a área afetada no rizoma. Os sintomas são mais comuns em plantas adultas, mas podem ser encontrados também em plantas jovens. Como sintomas internos observam-se pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular ao se realizarem cortes transversais ou longitudinais no pseudocaule ou rizoma. As pontuações pardo-avermelhadas provavelmente surgem em função da oxidação de fenol quando na presença do patógeno. A descoloração vascular no pseudocaule concentra-se mais periféricamente, mantendo-se o centro claro. No rizoma, a descoloração é mais pronunciada na área de densa vascularização, onde o estelo se junta ao córtex, podendo-se observar a evolução dos sintomas do rizoma para as brotações a ele aderidas (VENTURA & HINZ (2002); CORDEIRO *et al.*, 2005). O desenvolvimento do mal-do-panamá em banana está relacionado com a interação patógeno e genótipo da planta e parece ser fortemente influenciado pelas condições ambientais (GROENEWALD *et al.*, 2006).

2.4 ETIOLOGIA DA DOENÇA

O agente etiológico do mal-do-panamá é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, não se conhecendo seu estágio sexuado. De um modo geral, as *formas speciales* de *Fusarium oxysporum* não podem ser distinguidas morfológicamente. Devido a plasticidade e variações de características fenotípicas encontradas neste fungo, a taxonomia baseada somente em conceitos morfológicos não é confiável (SUMMERELL & LESLIE, 2003). As colônias crescem 4 a 7mm.dia⁻¹ sobre agar batata dextrose a 24°C, com abundante micélio aéreo, com coloração que vai do branco ao violeta (PLOETZ, 2006). As duas principais formas de esporos de *Fusarium* são os microconídios e os macroconídios. Os microconídios são unicelulares ovais a reniformes e hialinos e uninucleados; os macroconídios mais comuns sendo fusiformes, falcados 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, *formae speciales* e raças (OLIVEIRA & COSTA, 2002). O conceito *formae speciales* foi aplicado por SNYDER & HANSEN (1953) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formas speciales* e raças.

São conhecidas quatro raças fisiológicas do patógeno, sendo que as raças 1, 2 e 4 são importantes à bananeira. A raça 3 ocorre apenas em *Heliconia* sp. (JONES, 1999). No Brasil, de acordo com a estrutura dos grupos de compatibilidade vegetativa dos isolados de *Fusarium oxyspo-*

rum f. sp. *cubense* analisados, presume-se a prevalência da raça 1 (GOES & MORETTO, 2001). A forma mais simples de diferenciação das raças seria mediante o uso de variedades indicadoras, onde a variedade Gros Michel é indicadora da raça 1, a Bluggoe, indicadora da raça 2 e as variedades do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão e Grande Naine) são indicadoras da raça 4 (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Recentemente foi reportada a ocorrência de um novo biótipo da Raça 4, a Raça Tropical 4 ou TR4, que está devastando plantações comerciais de banana em Taiwan, Malásia, Sumatra, Sulawesi, Filipinas, Vietnam, China e Austrália. A disseminação da TR4 para os países produtores de banana dos continentes africano e americano representa uma séria ameaça para a bananicultura mundial, pois além do subgrupo Cavendish, afeta as cultivares que geram 80% da produção mundial de bananas (PLOETZ, 2009).

Baseado no fato de existirem no solo linhagens não patogênicas de *F. oxysporum*, morfologicamente idênticas a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, é possível que a sobrevivência ocorra também em estado saprofítico. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato de que linhagens não patogênicas são capazes de formar heterocários com linhagens patogênicas. Assim, os núcleos da forma patogênica persistem no micélio de crescimento saprofítico, voltando a atuar quando em presença da planta hospedeira (CORDEIRO & MATOS, 2000).

A disseminação do patógeno pode ocorrer de diversas formas. Os rizomas, raízes e pseudocaule de plantas doentes liberam grande quantidade de inóculo na superfície do solo e a transmissão do patógeno depende do contato de raízes de plantas saudáveis com este inóculo. Outras formas frequentes de disseminação são a água de irrigação, de drenagem e de inundação, animais, homem, equipamentos, ferramentas e material de plantio infectado (VENTURA & HINZ, 2002). No Brasil, a disseminação via mudas infectadas assume grande importância, uma vez que são utilizadas em novos plantios. São do tipo convencional, sem os devidos cuidados na seleção do bananal fornecedor. Gradativamente, tem havido o crescimento no uso de mudas micropropagadas que elimina essa via de disseminação (CORDEIRO *et al.*, 2005). A disseminação da doença para novas áreas está estritamente relacionada com a introdução de material propagativo suscetível (STOVER, 1972).

2.5 CONTROLE DA DOENÇA

A busca de variedades resistentes é hoje uma das principais linhas de ação visando no controle do mal do Panamá. De acordo com ALVEZ

(1985), é possível a utilização de novas variedades no melhoramento genético da bananeira, visando à obtenção de híbridos tetraplóides, não só com relação à resistência à doença, mas também com boas características agrônômicas, principalmente com nível de nanismo desejável.

A dificuldade em controlar a fusariose, assim como outras doenças fúngicas, tem estimulado as pesquisas com controle biológico em diferentes culturas (HINZ, 1991, CAVAGLIERI *et al.*, 2004; GARMENDIA *et al.*, 2004; SILVA & BETTIOL, 2005). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), importantes componentes da microbiota do solo, formam associações simbióticas estáveis com as plantas e podem beneficiá-las de diferentes formas, sendo uma delas a bioproteção contra fungos patogênicos como *Fusarium* e *Phytophthora*. Este efeito pode ocorrer por meio dos seguintes fatores: melhor nutrição da planta hospedeira; competição por fotossintatos do hospedeiro; competição por infecção/competição local; mudanças morfológicas no sistema radicular; mudanças microbianas na população rizosférica e indução a mecanismos de defesa da planta (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; SMITH *et al.*, 1999). Os efeitos protetores da inoculação de FMA podem ser sistêmicos ou localizados (LINDERMAN, 1994). A associação micorrízica ocorre naturalmente em plantios de bananeira (YANO-MELO *et al.*, 1997) e beneficia as plantas sob diferentes condições (TRINDADE *et al.*, 2003), nas quais a interação entre FMA e *FOC* pode ocorrer, representando um potencial a ser explorado no biocontrole do mal-do-panamá. Vários fatores necessitam ser estudados nessa interação para permitir sua manipulação. As mudas micropropagadas no sistema atual podem ir a campo com diversos percentuais de colonização micorrízica, eventualmente até sem a presença do fungo. O estabelecimento do FMA antes do ataque do patógeno pode induzir aumento da resistência da planta. A efetividade do potencial de um agente de controle biológico depende da virulência e do potencial de inóculo dos patógenos no solo (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1996). Uma alta densidade de inóculo de patógeno na rizosfera pode inviabilizar qualquer forma de biocontrole. Assim, o conhecimento do fator potencial de inóculo de cada microrganismo é importante para a manipulação correta do sistema. O único controle efetivo para o mal-do-panamá é o plantio de clones e cultivares tolerantes a essa enfermidade (CORDEIRO & KIMATI, 1997). Porém, a introdução de fungos micorrízicos pré-selecionados pode contribuir num programa de controle integrado da doença.

Os métodos mais utilizados no controle de *Fusarium oxysporum* incluem: a utilização de cultivares resistentes, desinfestação do solo com fungicida químico, e rotação de cultura utilizando plantas não hospedei-

ras (AGRIOS, 1988). A utilização de cultivares resistentes seria uma alternativa, porém dificuldades como a identificação de genes de resistência ou a habilidade de adaptação dos patógenos e novos genótipos podem tornar a resistência uma solução temporária (SUTTON, 2000).

O controle biológico de doenças causadas por fungos de solos tem sido investigado e, em banana, a utilização de microrganismos antagonistas constitui-se em uma alternativa promissora para reduzir as populações destes fitopatógenos no solo (AMORIM *et al.*, 2002). O controle biológico, considerado como natural, constitui uma estratégia de grande interesse e importância para viabilizar a redução ou substituição do uso de pesticidas. Ele pode ser obtido pela manipulação do ambiente, de forma a favorecer a população dos microrganismos benéficos presentes, ou pela introdução massal de antagonistas previamente selecionados. Espécies do gênero *Trichoderma/Hypocrea* encontram-se entre os agentes de biocontrole de doenças mais estudados no mundo, pois não são patogênicos; estão presentes em praticamente todos os tipos de solos, quando há matéria orgânica; são facilmente isolados, cultivados e multiplicados; e colonizam com eficiência o sistema radicular de diversas plantas (BENITEZ *et al.*, 2004).

2.6 VARIABILIDADE EM *FUSARIUM OXYSPORUM*

O conhecimento da diversidade genética da população do patógeno é um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, pois gera informação sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região. Populações de fungos com alto nível de diversidade genética são difíceis de controlar, uma vez que podem adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, seja química ou através da introdução de hospedeiro resistente (CARLIER *et al.*, 2003). Outros fatores, tais como a natureza de dispersão do patógeno e a seleção imposta pelo hospedeiro resistente, também podem influenciar a variabilidade genética encontrada na população dos patógenos.

A resistência à doença vai depender diretamente dos mecanismos envolvidos no processo de defesa da planta e também da variabilidade do patógeno. Esta variabilidade torna-se uma característica importante a ser levada em consideração nos estudos de resistência, uma vez que alguns patógenos possuem uma grande capacidade de variação através de recombinações de genes dentro de uma população proporcionando uma vantagem dos mesmos contra o hospedeiro (LUCAS, 1998).

A agressividade do patógeno também é bastante utilizada na ca-

racterização da diversidade de *Fusarium oxysporum*. Este método deve servir como mais uma alternativa, uma vez que a mesma também pode ser influenciada por variáveis como temperatura, idade do hospedeiro e até o método de inoculação empregado (KRAFT & HAGLUND, 1978). Um dos trabalhos que constataram variação na agressividade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foi realizado por WAITE (1977) que verificou, após inoculação de doze isolados das raças 1 e 2 nas cultivares de banana ‘Gros Michel’ e ‘Bluggoe’, um espectro da severidade da doença variando de leve a severo.

2.7 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES

Marcadores genéticos baseados em polimorfismo do DNA têm sido utilizados com sucesso na diferenciação de espécies de vários fitopatógenos e entre as vantagens apresentadas com o uso, destacam-se a rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (FALEIRO *et al.*, 2003). A sua utilização tem aumentado a cada ano, exercendo papel de ferramenta complementar para o estudo da diversidade em virulência e possibilitando o conhecimento dos outros aspectos da diversidade genética dos fitopatógenos (DUTECH *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, várias metodologias moleculares têm sido desenvolvidas, contribuindo significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a variabilidade genética de microorganismos. A técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido apresentada como uma ferramenta robusta para diagnosticar e detectar fungos fitopatogênicos e tem contribuído grandemente para o manejo de doenças de plantas. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: RAPD (Polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso), AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificado) e Microsatélites (BELABID *et al.*, 2004; ZAMANI *et al.*, 2004; GROENEWALD *et al.*, 2006; DUTECH *et al.*, 2007).

Marcadores “inter simple sequence repeat” (ISSR) é outra técnica que vem sendo utilizada, em substituição aos outros métodos, apresentando vantagem de ser mais eficiente, oferecer um menor custo e determinar um alto grau de polimorfismo, além de ter alta reprodutibilidade. Esta técnica tem sido bastante aplicada em estudos de genética de populações e biologia evolucionária de muitos organismos, incluindo as espécies fúngicas (MISHRA *et al.*, 2004; BALMAS *et al.*, 2005).

Medidas de diversidade em fungos com reprodução assexuada

são complicadas e requerem a combinação de ferramentas que avaliem o fenótipo e o genótipo. Estudos prévios conduzidos em diversas partes do mundo estudando *FOC* incluem métodos de PCR como RAPD, DNA amplificação fingerprinting (DAF) e seqüenciamento de DNA. Embora estas técnicas apresentem bons resultados de diversidade genética de *FOC*, elas nem sempre concordam em termos de parentesco genético entre linhagens clones destes patógenos que se reproduzem assexuadamente (GROENEWALD *et al.*, 2006).

2.7.1 Variabilidade Genética Via RAPD (*Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso*)

A técnica de RAPD é baseada no princípio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), escrita por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & MCCLELLAND (1990). Esta técnica envolve a amplificação de regiões anônimas dispersas pelo genoma, cuja estratégia é a utilização de iniciadores ou primers curtos e aleatórios que se anelam a diferentes locais no DNA genômico (FUNGARO, 2000). Os marcadores de RAPD permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética. Em geral, os dados são obtidos na forma de matriz composta por um certo número de genótipos que podem ser variedades, isolados ou clones, genotipados para dezenas ou centenas de marcadores RAPD, obtidos com um ou mais primers. O número de marcadores permite uma análise extensiva dos genomas de interesse diretamente da molécula de DNA, conseqüentemente sem influência do ambiente (FERREIRA & GRATAPLAGLIA, 1996).

Esta técnica apresenta a vantagem de ser rápida e de baixo custo, permitindo uma alta densidade de mapeamento, abrangendo todo o genoma, sem envolver hibridização ou radioatividade. Além disso, não há necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a região de DNA de interesse para a construção de iniciadores para a amplificação (MICHELMORE *et al.*, 1991).

Desde a sua descrição o uso de marcadores RAPD tem tido uma difusão extremamente rápida, sendo utilizado para estudos de identificação taxonômica (LIU *et al.*, 1995; GUZMAN *et al.*, 1999), caracterização de raças (BELABID *et al.*, 2004), e também para diferentes estudos da diversidade genética de fungos (VAKALOUNAKIS & FRAGKIA-DAKIS, 1999; MOSTAFA *et al.*, 2002).

2.7.2 - Variabilidade Genética Via SSR (*sequência simples repetida*)

Os microssatélites, também chamados de SSR, são regiões do genoma que possuem repetições em cadeia de mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos, que se repetem várias vezes no DNA. As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies relacionadas. A região genômica que corresponde às seqüências repetitivas são amplificadas, via PCR (KARAOGLU *et al.*, 2005). A amplificação é feita utilizando iniciadores específicos de 20-30 bases, complementares às seqüências que flanqueiam uma determinada seqüência repetitiva. Os segmentos amplificados a partir destes sítios de anelamento de iniciadores apresentam um elevado polimorfismo, produto da presença de diferenças no número de elementos repetidos. Desta forma, cada seqüência repetitiva, independentemente do elemento repetitivo (CA, GC, TG, ATC), constitui-se num *locus* gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo locus dentro da população (DUTECH *et al.*, 2007).

Os SSR são muito mais freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Estas e outras características fazem com que marcadores baseados em SSR sejam marcadores ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos, e para estudos de genética de populações (FERREIRA & GRATAPLAGLIA, 1996). As seqüências das regiões que flanqueiam os SSRs são conservadas em indivíduos da mesma espécie. Dessa maneira, os SSRs são amplamente distribuídos em todo genoma de eucariotos e podem ser amplificados por oligos específicos sintetizados a partir destas regiões flangeadoras (DUTECH *et al.*, 2007).

É crescente a popularidade de SSR em vista do número de artigos publicados sobre o isolamento de locos microssatélites em vários organismos. Embora eles representem uma poderosa ferramenta em muitos campos da Biologia, microssatélites têm sido isolados em poucas espécies de fungos. Microssatélites em fungos parecem ser mais difíceis de isolar e exibem menor polimorfismo do que em outros organismos (DUTECH *et al.*, 2007). Microssatélites têm sido isolados com freqüência de diversos organismos, mas poucos trabalhos têm sido apresentados com fungos (ZANE *et al.*, 2002). BOGALE *et al.* (2005) descreveram nove marcadores de SSR desenvolvidos para o estudo de *Fusarium oxysporum*.

O maior problema de *loci* microssatélites é que eles frequente-

mente necessitam ser isolados de novo em função de cada espécie e isto representa maior custo. A amplificação de *loci* provenientes de outras espécies, das quais eles foram clonados, é geralmente possível somente entre espécies do mesmo gênero e em alguns casos a percentagem de amplificação é baixa, gerando alelos nulos que podem influenciar na análise genética (DUTECH *et al.*, 2007).

2.8 ANÁLISES DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DE GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA

Uma técnica bastante utilizada na caracterização de isolados de *F. oxysporum* é o estudo de grupamento por compatibilidade vegetativa (VCG), um método eficiente no estudo de relacionamento entre fungos assexuais, como no caso de *FOC*. Foi primeiramente desenvolvido por PUHALLA (1985) com o objetivo de distinguir por características genéticas, e não morfológicas ou de patogenicidade, as raças de *F. oxysporum*. Em genética, os testes de compatibilidade vegetativa têm sido úteis para a caracterização da diversidade entre isolados, podendo diferenciar populações patogênicas e não-patogênicas (ROSALEE *et al.*, 1999). Consistem no pareamento de mutantes incapazes de utilizarem nitrato como fonte de nitrogênio e a formação do heterocáriorio.

A fusão de hifas de dois mutantes indica que os isolados pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade. Cerca de vinte e um VCGs já foram determinados para *FOC* e são bastante utilizados em estudos de caracterização genética, são os VCGs 0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0125, 0126, 0127, 0128, 0129, 01210, 01211, 01212, 01213, 01214, 01215, 01216, 01217, 01218, 01219 e 01220. (PUHALLA, 1985). Alguns destes VCGs encontram-se exclusivamente em determinados países ou regiões, como no caso do VCG 01210 presente somente na Flórida e Cuba, o VCG 01220 no oeste Australiano e o VCG 01214 encontrado somente no Malawi (PÉREZ-VICENTE, 2004). Estudos detalhados indicam que isolados de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa tipicamente possuem multilocus muito similares ou até idênticos e possivelmente pertencem a uma mesma linhagem clonal. Por essa razão os VCGs são bons indicadores de similaridade (KISTLER *et al.*, 1998). BENTLEY *et al.* (1998) analisaram 208 isolados pertencentes diferentes regiões e puderam verificar a ocorrência de 100% de similaridade entre os isolados de *FOC* pertencentes a um mesmo VCG. JONES (1995) verificou através de VCGs que isolados da raça 1 e 2 ocorrem em países asiáticos e que os da raça 4 concentram-se no sudoeste Asiático e no triângulo Malásia – Indonésia – Filipinas, onde pôde constatar uma mai-

or diversidade na Malásia e Indonésia devido a ocorrência do grande número de VCGs.

A ocorrência de determinadas raças também pode estar relacionada a VCGs. PLOETZ & CORRELL (1988), analisaram isolados oriundos da Austrália, Ilhas Canárias, Honduras, Jamaica, Malásia, Filipinas, África do Sul, EUA e Taiwan e constataram onze VCGs, dos quais seis foram compostos por isolados de uma única raça e cinco grupos possuíam isolados pertencentes a duas raças.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a diversidade genética dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* provenientes de municípios produtores de banana do Estado de Santa Catarina, através de descritores morfológicos e marcadores moleculares RAPD e SSR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar morfológicamente as colônias de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*;
- Analisar a variabilidade genética de isolados através do uso do marcador molecular RAPD;
- Analisar a variabilidade genética de isolados através do uso do marcador molecular SSR;
- Verificar a Compatibilidade Vegetativa de quatro isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*;
- Identificar o grau de similaridade entre os isolados coletados no Estado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no período de janeiro de 2008 a agosto de 2009 nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia Molecular da Estação Experimental de Itajaí - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

4.1 AMOSTRAGEM

Foram coletadas 66 amostras de rizoma de bananeira provenientes, da cultivar Enxerto, com sintomas do mal-do-panamá em 9 municípios catarinenses (Jacinto Machado, Santa Rosa do Sul, Siderópolis, situados no Sul do Estado e Corupá, Jaraguá do Sul, Luís Alves, Massaranduba, São João do Itaperiú, Schroeder, no norte do Estado). A localização exata da coleta foi registrada utilizando um aparelho GPS, modelo Garmim. Os isolados utilizados no experimento estão listados de acordo com seu local de origem na Tabela 1.

As amostras foram retiradas de plantas adultas, antes da floração e com, no mínimo, duas folhas sadias. Para tanto, o pseudocaule foi cortado com um facão próximo à inserção no rizoma, retirando-se em seguida aproximadamente 300g da área sintomática sem encharcamento. Os fragmentos de rizomas apresentando os sintomas típicos da doença foram transportados em sacos de papel ao laboratório, onde foram mantidos à sombra na condição do ambiente por 24 horas até o isolamento do patógeno (Figura 1).

4.2 ISOLAMENTO

Após a eliminação da sua camada externa, os fragmentos do rizoma foram imersos em hipoclorito de sódio (1%) durante 10 minutos. Na câmara de fluxo laminar, com auxílio de um bisturi esterilizado, removeu-se outra camada externa do fragmento de rizoma e, em seguida, fragmentos infectados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, Agar). Na preparação deste meio utilizou-se 39g de BDA (Merck) para 1 litro de água destilada. As culturas foram incubadas por sete dias a 25 °C sob luz contínua (Figura 1).

Tabela 1 - Códigos de identificação e coordenadas geográficas dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* coletados em municípios do Estado de Santa Catarina.

CI	COORDENADAS	CI	COORDENADAS
LA01	26°39'42,4"S/48° 50'26"O	MA34	26°57'48,0"S/48°95'04,6"O
LA02	26°38'27,4"S/48°49'22,8"O	LA35	26°41'24,7"S/48°49'9,56"O
LA03	26°40' 51,1"S/48°48'05,3"O	LA36	26°39'31,5"S/48°54'30,24"O
LA04	26°39'33,1"S/48°49'42,6"O	JM37	29°02'28,7"S/48° 45'87,0"O
LA05	26°39'33,2"S/48°49'42,6"O	JM38	29°02'23,1"S/49°45'74,9"O
LA06	26° 74' 17,5"S/48° 84' 46,4"O	JM39	29°02'29,4"S/49°48'21,7"O
LA07	26°40'52,0"S/48° 53' 42,5"O	JM40	29°04'15,1" S/49°47'68,0"O
LA08	26°43'35,2"S/48° 52' 22,0"O	JM41	29°03'79,1"S/49°47' 86,4"O
CO09	26°23'32,11"S/49°13'27,8"O	JM42	29°01'37,8"S/49°49' 07,2"O
CO10	26°26'43,62"S/49°19'7,13"O	JM43	29°03'03,4"S/49°49' 85,3"O
CO11	26°23'42,72"S/49°16'22,81"O	JM44	28°59'75,3"S/49°51'79,6"O
CO12	26°24'34,34"S/49°14'1,83"O	SR45	29°07'16, 3"S/49°43' 9,9"O
CO13	26°24'19,60"S/49°17'36,04"O	SR46	29°07'14,9"S/49°43'48,7"O
CO14	26°25'37,80"S/49°17'93,6"O	SR47	29°06'80,2"S/49°43'40,9"O
CO15	26°25'57,30"S/49°17'12,30"O	SR48	29°05'59,9"S/49°44' 47,9"O
CO16	26°28'57,38"S/49°14'35,28"O	SR49	29°05'63,6"S/49°43'36,5"O
SJ17	26°35'13,8"S/48° 49'89,4"O	SR50	29°06'32,7"S/49°43'35,7"O
SJ18	26°35'12,8"S/48°49'97,2"O	SR51	29°06'00,4"S/49°41'75,6"O
SJ19	26°37'10,8"S/48°46'65,4"O	SR52	29°06'65,3"S/49°44'84,4"O
SJ20	26°36'62,5"S/48° 51'13,9"O	SI53	28°37'29,7"S/49°28' 15,3"O
JS21	26°29'28,39"S/49°10'16,99"O	SI54	28°37'32,3"S/49° 27'15,4"O
JS22	26°28'57,26"S/49°10'19,93"O	SI55	28°32'59,8"S/49°25'17,5"O
JS23	26°30'39,37"S/49°10'03"O	SI56	28°33'16,1"S/49°26'15,4"O
JS24	26°24'24,64"S/49°10'8,5"O	SI57	28°33'00,2"S/49°26'15,4"O
JS25	26°26'51,98"S/49°03'22,82"O	SI58	28°33'00,2"S/49°24'54,8"O
JS26	26°31'04,05"S/49°13'42,44"O	SC59	26°23'34,2"S/49°01'17"O
JS27	26°24'24,64"S/49°10'08"O	SC60	26°23'14,9"S/49°02'16"O
JS28	26°26'51,98"S/49°03'22,82"O	SC61	26°22'36,7"S/49°05'18"O
MA29	26°71'68,7"S/49°03'22,5"O	SC62	26°23'34,2"S/49°01'17"O
MA30	26°67'61,0"S/49°01'63,5"O	SC63	26°23'14,9"S/49°02'16"O
MA31	26°61'30,0"S/48°87'72,4"O	SC64	26°22'31,2"S/49°05'18"O
MA32	26°60'91,0"S/49°00'29,7"O	SC65	26°22'36,7"S/49°05'19"O
MA33	26°59'45, 3" S/48°86'93,2"O	SC66	26°22'55,4"S/49°04'12"O

Código dos municípios: LA: Luis Alves, CO: Corupá, SJ: São João Itaperiú, JS: Jaraguá do Sul, MA: Massaranduba, JM: Jacinto Machado, SR: Santa Rosa do Sul, SI: Siderópolis, SC: Schroeder.

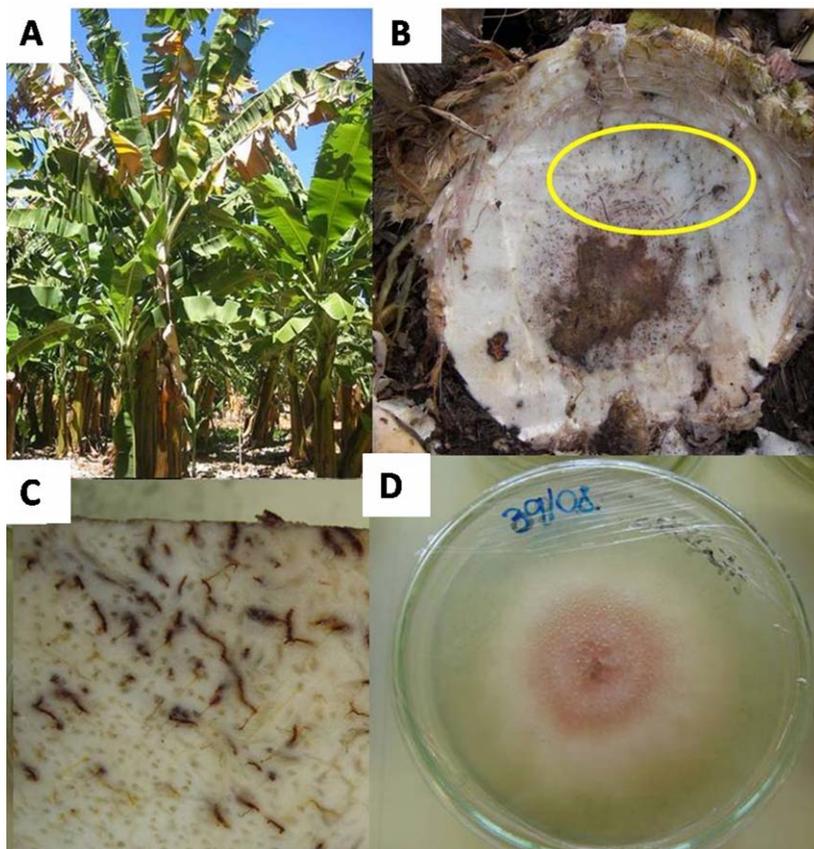


Figura 1- Etapas de obtenção dos isolados. A) Identificação de plantas adultas de bananeira da cultivar Enxerto com sintomas do mal-do-panamá. B) Corte do pseudocaule próximo a inserção do rizoma. C) Observação de necroses no rizoma de coloração pardo avermelhado; sintomas típicos de fusariose. D) Obtenção de colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolada em meio de cultura BDA.

4.2.1 Obtenção de culturas monospóricas

Fragmentos de colônias crescidas em meio BDA com sete dias de idade foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10ml de água destilada estéril. Após agitação, 20 μ l da suspensão de cada isolado foram transferidos e espalhados com espátula de Drigalsky, na superfície do meio agar - água (AA) em placas de Petri. As placas foram mantidas sob temperatura ambiente e luz intermitente (Fotoperíodo 12h). Após 24 horas, sob lupa estereoscópica, transferiu-se um único conídio para uma

placa de Petri contendo meio BDA. Colônias crescidas a partir deste conídio foram consideradas monospóricas e usadas nas etapas subsequentes deste trabalho.

4.2.2 Conservação do patógeno

Os fungos foram mantidos em tubo de ensaio contendo meio de cultura BDA conforme descrito por CASTRO (2007). Durante o desenvolvimento do trabalho prático, os isolados foram repicados para meio de cultura líquido BDE (200g batata + 20g dextrose + 20g extrato de levedura) segundo REBELO (2003), para os estudos moleculares. Além disso, para possibilitar estudos futuros, os fungos foram preservados em papel de filtro (LESLIE & SUMMERELL, 2006) e depositados na mi-coteca da Estação Experimental de Itajaí – EPAGRI.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os isolados monospóricos foram repicados em placas de Petri com 9cm de diâmetro para meio de cultura BDA em duplicata e incubados a 26°C e fotoperíodo de 12h. A taxa de crescimento diária foi obtida com medidas do diâmetro das colônias com auxílio de um paquímetro no sétimo e no décimo quarto dias de cultivo. No décimo quarto dia de crescimento, avaliou-se também a coloração utilizando uma escala de notas variando do branco ao violeta, sendo, branco=0, salmão=1, violeta=2. Sob microscópio de luz foram observadas também a formação de clamidósporos, macroconídios e microconídios típicos de *Fusarium oxysporum* (NELSON *et al.*, 1983).

4.4 - TESTE DE PATOGENICIDADE

A patogenicidade de cada isolado foi testada em mudas de banana da ‘Enxerto’ com 12 semanas de idade, obtidas no viveiro do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da EPAGRI. As plantas foram removidas dos tubetes e suas raízes foram cortadas a 5cm da base. A inoculação foi realizada através da imersão do sistema radicular das plantas numa suspensão de conídios (2×10^6 conídios.mL⁻¹) por 2 horas com quatro repetições. O sistema radicular das testemunhas foi imerso apenas em água destilada estéril. Após este período, as plantas foram transplantadas em sacos plásticos de 10 x 15cm, contendo como substrato casca de arroz carbonizada esterilizada. Em seguida, as mesmas foram então, depositadas em caixas de madeira, e acomodadas sobre o

piso da casa de vegetação, forrado com lona plástica, isoladas entre si através de lona plástica, permanecendo inclinadas num ângulo de 15° para permitir a drenagem de água excedente. As plantas foram mantidas em telado protegido durante 35 dias, em temperatura ambiente, com irrigação controlada (dois ciclos diários de 2 minutos). As plantas foram mantidas em telado protegido durante 35 dias com auxílio de um estilete, onde se observou o desenvolvimento de sintomas internos no rizoma, caracterizados pela necrose no sistema vascular (Figura 2).

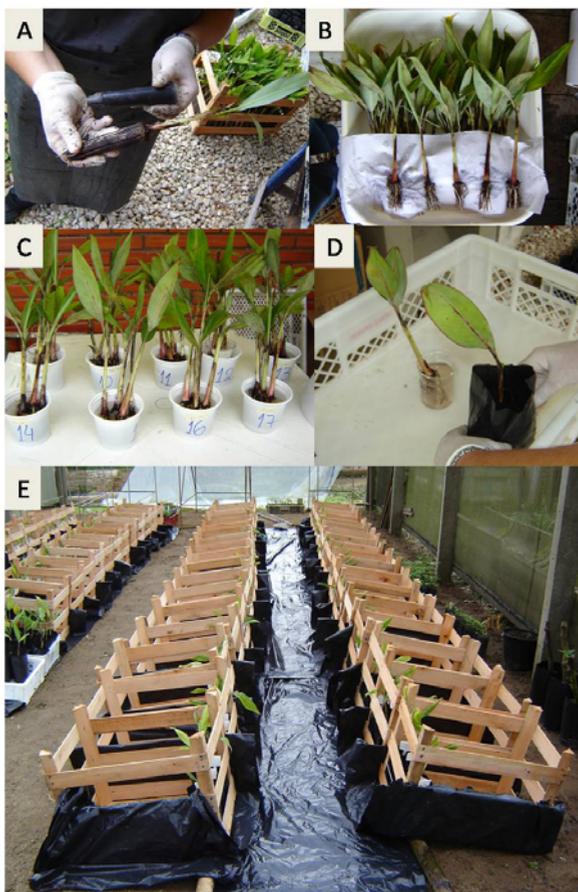


Figura 2 - Etapas do Teste de patogenicidade. A) Remoção de mudas dos tubetes. B) Corte das raízes a 5cm de base. C) Inoculação dos patógenos. D) Transplante das mudas para sacos plásticos com substrato. E) Aclimação das mudas em área de telado protegido.

4.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES

4.5.1 Crescimento do fungo em meio líquido

Para obtenção de massa micelial e subsequente DNA fúngico, transferiu-se para meio BDE batata (200g) + dextrose (20g) + extrato de levedura (20g), os 66 isolados de *FOC* e 2 isolados provenientes do Banco de Cepas da EPAGRI/EEI/Laboratório de Fitopatologia, utilizados como *out groups* (*Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*). Todos os isolados foram repicados em duplicata e incubados por sete dias a 25°C, sob agitação contínua (SM Edmund Buhler). Após este período, a massa micelial de cada isolado foi filtrada e seca por 2 horas em câmara de fluxo laminar para a extração do DNA.

4.5.2 Extração do DNA

Um grama da massa micelial foi macerada com nitrogênio líquido e transferida para cápsulas de plástico do tipo Eppendorf (XML) onde se procedeu à extração DNA baseada na metodologia de SCOTT *et al.* (1993) alterada por TCACENCO *et al.* (2005) em relação a concentração de SDS. Para tanto, adicionou-se 700µL de tampão (Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 100mM, NaCl 250mM) e 700µL de SDS 10% ao micélio triturado. O macerado foi mantido em banho Maria a 65°C, sendo agitado a cada 10 minutos por 40 minutos. Para a purificação do DNA e eliminação de proteínas, polissacarídeos e restos de membrana celular, acrescentou-se lentamente 300µL de solução de acetato de potássio (acetato de potássio, 3M e ácido acético, 2M). Esta mistura foi mantida em freezer comercial a -20°C por 15 minutos sendo posteriormente centrifugada durante 15 minutos a 11000 rpm em Centrifuga Eppendorf 5804R. Foram retirados 750µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 750µL de Isopropanol gelado. O material foi incubado em freezer por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos a 11000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o pellet (precipitado) foi lavado com 1mL de etanol 70% e em seguida, centrifugado por 2 minutos a 11000 rpm. Ao final, o etanol foi descartado e o pellet foi secado em câmara de fluxo laminar por 30 minutos, até ficar com aspecto transparente. Na sequência, as amostras foram diluídas em 50µL de TE.

Para verificação da qualidade do DNA, utilizou-se gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. A quantidade do DNA foi estima-

da por espectrofotometria (FEMTO/700 plus) a 260nm. A partir de então, realizou-se a diluição e calibrou-se a quantidade de DNA para 20ng μL^{-1} .

4.5.3 Amplificação do DNA RAPD

As reações de amplificação pela técnica RAPD foram realizadas em duplicata em volumes de 25 μL contendo tampão PCR 1X, MgCl_2 2mM, dNTP 0,25 mM, 0,4 mM de iniciadores, 20ng de DNA molde, 1 U. μL^{-1} da enzima Taq polimerase. Foram utilizados 29 iniciadores RAPD, de acordo com MARTINS (2005); MOSTAFA *et al.* (2002) e VAKALOUNAKIS & FRAGKIADAKIS (1999), conforme Tabela 2. Todas as reações de amplificação foram realizadas segundo Martins (2005) em termociclador (modelo e marca PTC-100) programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos. Cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação (1 minuto a 92°C), uma etapa de anelamento (1 minuto a 35°C), e uma etapa de alongamento (2 minutos a 72°C), por fim, foi feita uma extensão final (5 minutos a 72°C).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 60v, durante 4 horas. Em seguida foram tratados com brometo de etídeo, visualizados em transluminador de luz ultravioleta (Wilber Lourmart) e fotografados com fotodocumentador.

Tabela 2 - Identificação dos iniciadores utilizados para estudo RAPD seguido da sequência de nucleotídeos

Identificação Iniciador	Sequência	Identificação Iniciador	Sequência
OPAX 10	5'-CCAGGCTGAC-3'	R3	5'-ACGATCGCGG-3'
OPAX 12	5'-GGTCGGGTCA-3'	PU1	5'-AGATGCAGCC-3'
OPC 06	5'-GAACGGACTC-3'	PU2	5'-ACGGATCCTG-3'
OPP 12	5'-AAGGGCGAGT-3'	PU3	5'-ACTGGGACTC 3'
OPX 11	5'-GGAGCCTCAG-3	OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPP 16	5'-CCAAGCTGCC-3'	OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'
OPW 08	5'-GACTGCCTCT-3'	OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'
81	5'-ACGGTCTTGG-3'	OPB-03	5'-CATCCCTTG-3'
82	5'-GGCGTAGCA-3'	OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'
171	5'-GAAACAGCGG-3'	OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'
172	5'-GGAGCCCAC-3'	OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'
173	5'-GGAGGTGTT-3'	OPB-14	5'-TCCGCTCTGG-3'
174	5'-ACGATCGCGG-3'	OPB-20	5'-GGACCCTTAC-3'
R1	5'-CGCCACCCT-3'	OPF-05	5'-CCGAATCCCC-3'
R2	5'-CGCGTGCCAG-3'		

4.5.4 Amplificação do DNA por SSR

As reações de amplificação pela técnica SSR foram realizadas em duplicata em volume de 25uL, seguindo a metodologia citada por BOGALE *et al.* (2005) com adição de 2,5mM de cada dNTP. Os ciclos de PCR foram realizados em termociclador PTC-100 programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 72°C, cada ciclo de 30 segundos, e por fim uma extensão final de 10 minutos. As temperaturas de anelamento foram específicas para cada iniciador (Tabela 3).

Os produtos resultantes da amplificação foram separados por eletroforese em géis de Poliacrilamida 6%, 3000v, 45w, por 3 horas. Os fragmentos amplificados foram corados com nitrato de prata seguindo quatro passos: 3 minutos em solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 0,5%), 10 minutos em solução de impregnação (Nitrato de Prata 0,1%), 20 minutos em solução de revelação principal gelada (hidróxido de sódio 0,1% e formaldeído 0,15%), e 10 minutos em solução de revelação secundária (carbonato de sódio 0,75%). Após a etapa de revelação os géis foram fotografados com câmara digital (Panasonic DMC-FX12)

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para estudo SSR seguido da sequência de nucleotídeos.

Iniciadores	Sequência dos nucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)
MB2	F: TGCTGTGTATGGATGGATGG R:CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG	57
MB5	F:ACTTGAGGAAATGGGCTTC R:GGATGGCGTTTAATAAATCTGG	54
MB9	F:TGGCTGGGATACTGTGTAATTG R:TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG	51
MB11	F:GTGGACGAACACCTGCATC R: AGATCCTCCACCTCCACCTC	68
MB 13	F:GGAGGATGAGCTCGATGAAG R:CTAAGCCTGCTACACCCTCG	68
MB17	F:ACTGATTCACCGATCCTTGG R:GCTGGCCTGACTTGTATCG	57

4.6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DOS GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA

O estudo de agrupamento de compatibilidade vegetativa foi baseado na metodologia descrita por PUHALLA (1985). Utilizaram-se quatro isolados, sendo dois provenientes da região norte do Estado (CO16, MA32) e dois coletados na região sul (JM40, SI52).

Os meios de cultura utilizados foram: Meio basal (MB) - 30 g de sacarose, 1g de KH_2PO_4 , 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g de KCl, 10mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20g de agar, 1000mL de água destilada e 0,2mL de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes continha para cada 95mL de água destilada, 5g de ácido cítrico, 5g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 250mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50mg de H_3BO_4 e 50mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O meio mínimo (MM) continha 2g de NaNO_3 em 1000mL de meio basal (MB) e o meio de indução da formação de setores (possíveis mutantes) (MMC) continha 1000mL de meio basal (MB), 15g de KCLO_3 , 1,6g de L-asparagina e 2g de NaNO_3 (23).

Para obtenção e pareamento dos nit mutantes, discos de colônia fúngica (5mm de diâmetro), removidos dos isolados selecionados para este estudo, crescidos em meio MM por 3-4 dias a 26C e alternância luminosa (Fotoperíodo 12h luz/12h escuro), foram transferidos para placas de Petri contendo MMC (meio mínimo com clorato) e incubados por 15 dias. Em cada placa foram colocados quatro discos miceliais de cada isolado. Os cultivos foram observados diariamente para a verificação do crescimento e formação dos setores. Os setores foram transferidos para o meio MM (meio mínimo) e incubados por sete dias. Um setor foi denominado arbitrariamente Nit A, colocado no centro da placa e os outros distribuídos na placa a uma distância de aproximadamente 15mm do centro da placa. Outro nit mutante, que desenvolveu um denso crescimento entrando em contato com o Nit A, foi designado Nit B. Os quatro isolados de *Fusarium* testados nesta etapa do projeto foram pareados sobre o meio mínimo em todas as possíveis combinações com os Nit mutantes obtidos. A compatibilidade vegetativa foi inferida quando houve a formação de denso micélio aéreo, juntando as duas colônias dos isolados (Figura 3).

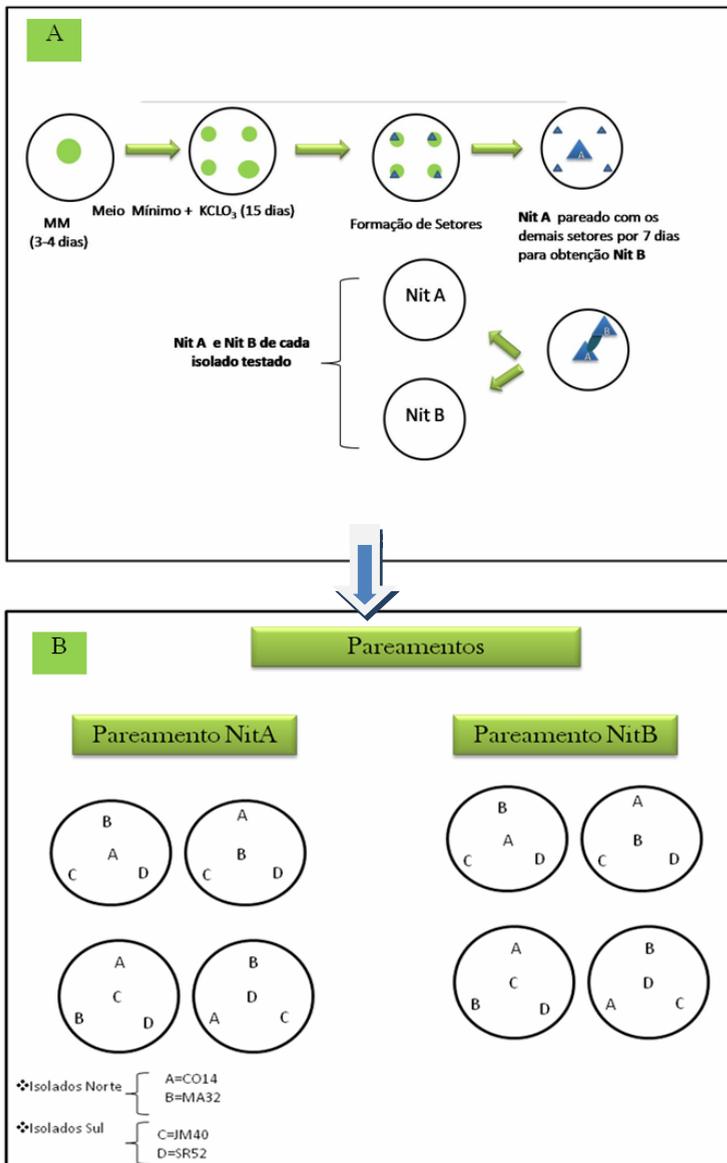


Figura 3 - Fluxograma para determinação dos Grupos de Compatibilidade Vegetativa: Etapas para obtenção dos nit mutantes. B) Pareamento dos NitA e NitB de todos os isolados (A,B,C,D).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de RAPD e SSR foram submetidos à análise de similaridade e agrupamento utilizando programa NTSYS – PC 2.1 (ROLHF, 2000). Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas presentes nos isolados. As estimativas de similaridade genética foram efetuadas pelo coeficiente Jaccard. O dendograma foi obtido por meio de análise de agrupamento de similaridades, utilizando-se o método da média das similaridades (UPGMA).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE PATOGENICIDADE

Dos 66 isolados testados, 100% foram patogênicos apresentando sintomas internos de pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular no rizoma, surgidas pela oxidação de fenol (Figura 4). Embora não se tenha avaliado os níveis de infecção dos isolados testados, pôde-se observar que a virulência dos isolados foi variável entre os 66 isolados testados, sendo que em alguns infectaram de forma mais virulenta, ocupando praticamente todo o rizoma da bananeira, enquanto que outros isolados causaram apenas uma necrose pequena e limitada na parte basal do rizoma.

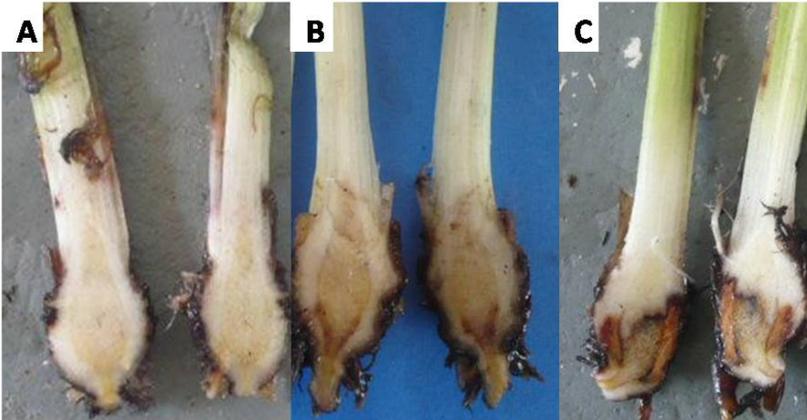


Figura 4 - Avaliação do Teste de Patogenicidade: A) Testemunha; Rizomas de bananeira da cultivar Enxerto sem infecção do fungo no sistema vascular. B e C) Rizomas de bananeira infectado por *FOC* com sintomas característicos da doença (pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular no rizoma).

5.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O crescimento das colônias variou entre 4,4 a 6,6 mm.dia⁻¹, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os isolados. Após 14 dias dos isolados em meio de cultivo BDA, foi possível observar a formação característica de macroconídios e microconídios abundantes.

Avaliou-se também aos 14 dias a coloração de cada isolado variando do branco, salmão ao roxo, conforme apresentado na Figura 5. Destes 66 isolados, 41 apresentaram cor salmão (sendo 29 isolados do

norte do Estado e 12 região Sul), 19 cor branca (sendo 13 da região Norte e 06 do Sul), e 6 isolados eram de cor roxa (sendo 3 do norte do Estado e 3 da região Sul), conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação dos isolados de *FOC* de acordo com a cor e origem, avaliados no décimo quarto dia de crescimento em meio de cultura BDA.

Cor	Isolado	Região
Branco	LA05,CO11,CO13,CO14,CO15,JS21,JS25, MA28,MA31,MA34,LA35, SC62,SC63	Norte
	JM37JM40,JM43, SR46,SR47,SI57	Sul
Salmão	LA01, LA02, LA03, LA04, LA06 LA07, LA08,CO09,CO10,CO12,CO16,SJ17, SJ18, SJ19, SJ20, SJ22, J23,SJ24, SJ27,MA30,MA32,MA33,LA36,JM38,SC60,SC62,SC61,SC64,SC65	Norte
	,JM39,JM41,JM42,JM44,SR45,SR48,SR49,SR50,SR51,SR52,SI53,SI55	Sul
Roxo	JS26,JS29,SC59	Norte
	SI54,SI56,SI58	Sul

Legenda: LA: Luís Alves, CO: Corupá, JS: Jaraguá do Sul, MA: Massaranduba, JM: Jacinto Machado, SC: Schroeder, SJ: São João Itaperiú, SI: Siderópolis, SR: Santa Rosa Sul

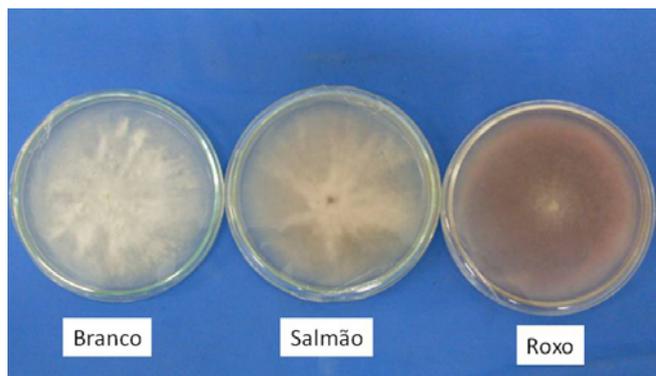


Figura 5 - Características morfológicas: Coloração das Colônias de *FOC* cultivadas por 14 dias em meio de cultura BDA a 26°C e fotoperíodo 12h. Variação das colônias em relação à cor, variando do branco ao roxo.

5.3 ANÁLISE VARIABILIDADE GENÉTICA

5.3.1 Marcador Molecular RAPD

Dos 66 isolados utilizados para análise RAPD, duas amostras foram descartadas (SJ18 e SH61) por não amplificarem bandas nos dez iniciadores. Dos 29 iniciadores utilizados, dez foram selecionados por exibirem padrões de ampliações definidos e elevado polimorfismo dentre os 64 isolados de *Fusarium* analisados. Dois iniciadores foram utilizados para reações nas quais os out groups foram incluídos.

Os iniciadores utilizados para este estudo amplificaram 99 fragmentos, sendo destes 81 polimórficos, gerando em média 8,1 bandas polimórficas por iniciador (Tabela 5). O tamanho de fragmentos de DNA amplificados variou de 0,25 a 2,2 Kb aproximadamente. Os iniciadores que amplificaram o maior número de bandas polimórficas foram R1 e R3 e os que amplificaram um menor número foram OPB 03 e OPF 05. Na Figura 6 pode-se visualizar padrões de ampliações de RAPD, em gel de agarose 1,5%, obtidos através dos iniciadores R1, OPAX 10 e R3, respectivamente.

Tabela 5 - Iniciadores de RAPD selecionados neste estudo e o número de fragmentos de DNA amplificados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Identificação Iniciadores	Sequência	Fragmentos amplificados	Fragmentos Polimórficos
OPAX 10	5'-CCAGGCTGAC-3'	10	7
OPAX 12	5'-GGTCGGGTCA-3'	8	8
OPP 16	5'-CCAAGCTGCC-3'	6	6
174	5'-ACGATCGCGG-3'	14	13
R1 (*)	5'-CGGCCACCCT-3'	20	17
R3	5'-ACGATCGCGG-3'	18	16
PU2	5'-ACGGATCCTG-3'	8	5
OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'	2	1
OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'	5	5
OPF-05 (*)	5'-CCGAATCCCC-3'	8	3
Total		99	81

(*) Iniciadores utilizados também para testes de RAPD nos quais os out groups foram incluídos

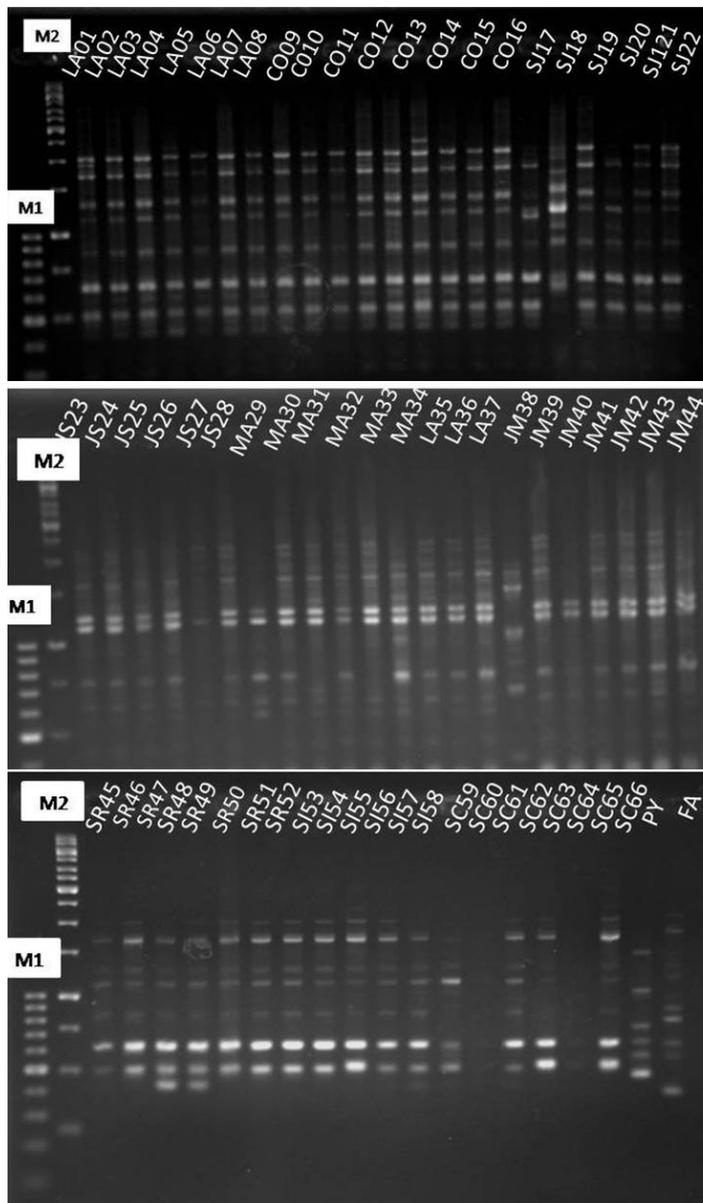


Figura 6 - Padrões de ampliações de RAPD, em gel de agarose 1,5%, obtidos com o iniciador R1(A), OPAX -10 (B), R3 (C) para isolados de *FOC*. M1: marcador de peso molecular 100pb. M2: marcador de peso molecular 1kb.

A análise de conglomerados feita com o *out groups* separou os isolados de *P. grisea* e *F. gramineanum* dos demais isolados em nível de dissimilaridade de aproximadamente 80% (Figura 7). Isto demonstra a eficiência desses iniciadores em separar os “out groups” dos demais.

A análise feita com os 64 isolados de *FOC* e os dez iniciadores testados, considerando-se apenas as bandas polimórficas, e levando-se em consideração em nível de similaridade de 85%, separou os isolados em cinco grupos distintos (Figura 8). O primeiro grupo engloba 58 indivíduos, destes 30 apresentaram similaridade interna de 100% e os demais componentes do grupo apresentaram variabilidade entre eles de 2 a 15%.

Um segundo grupo, composto por três isolados (SJ19, JS25 e JS28), apresenta um alto nível interno de similaridade, mas uma similaridade de apenas 75% com o grupo anterior. Os demais isolados (CO16, JS23 e JS26) apresentam alto nível de dissimilaridade tanto entre si quanto com os dois outros grupos formados.

Análises individuais para todos os iniciadores (resultados não mostrados) indicam um comportamento muito similar ao que foi exposto acima, particularmente para a separação que ocorreu entre os três isolados mais distintos (CO16, JS23 e JS26) e os demais, dando assim um bom nível de confiabilidade nos grupos formados.

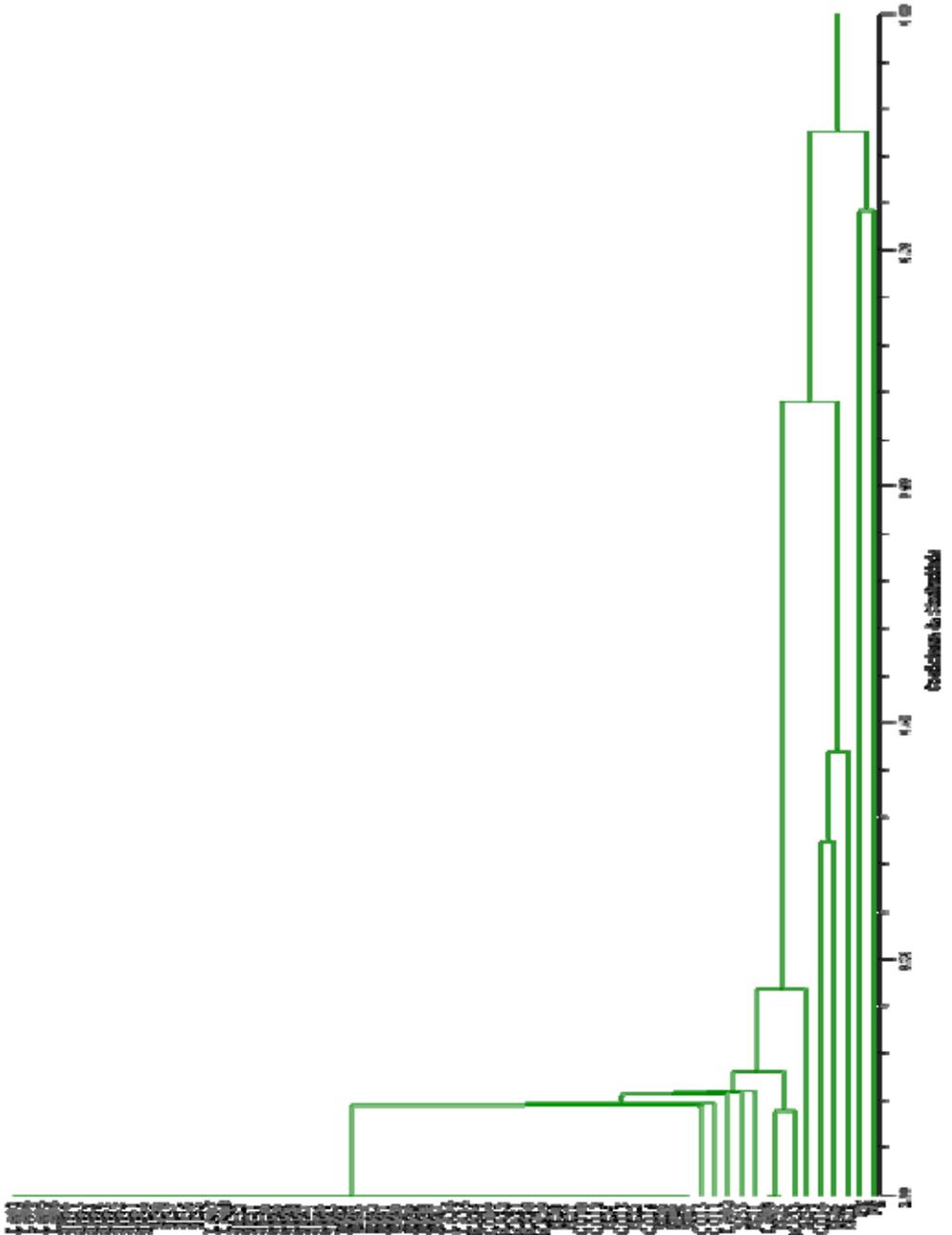


Figura 7 - Dendrograma de similaridade genética dos 64 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e dos “out groups” *Pg* (*Pyricularia grisea*) e *Fg* (*Fusarium graminearum*), utilizando os iniciadores RAPD R1 e OPF05.

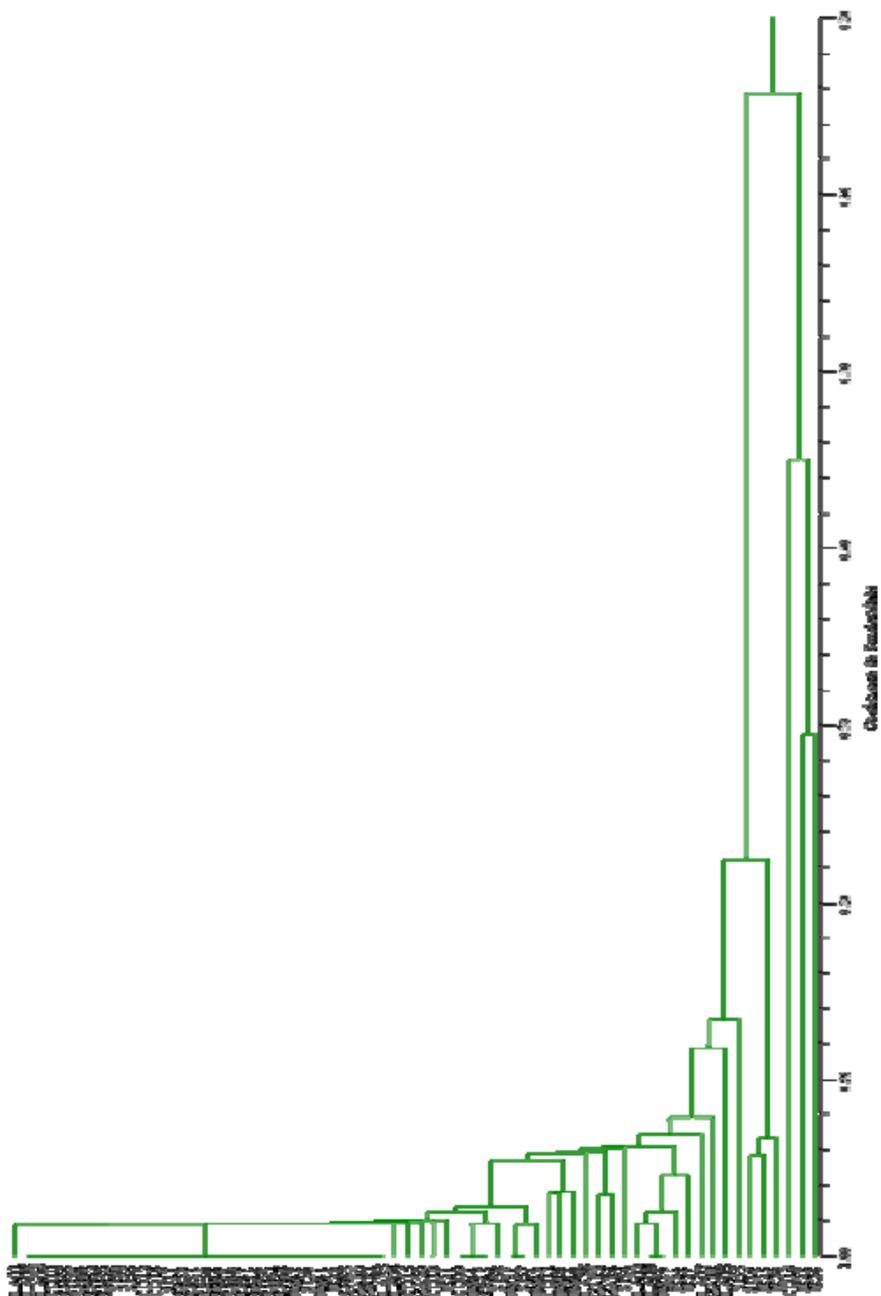


Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética dos 64 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizando iniciadores RAPD.

5.3.2 Marcador Molecular SSR

Dos seis iniciadores utilizados para a análise de 66 isolados de *FOC*, dois foram selecionados por exibirem padrões de ampliações definidos na literatura. O iniciador MB02 amplificou duas bandas, sendo uma de tamanho 240 pb nos isolados CO16, SJ23, JS26, SI53, SI54, SI55, SI56 e uma de tamanho 260 pb para todos os isolados. O iniciador MB11 amplificou uma única banda de tamanho 175 pb em todos os isolados analisados, com exceção dos isolados CO16 e SJ23, nos quais não houve amplificação, sendo considerado alelo nulo. Na figura 9 pôde-se visualizar padrões de amplificação de SSR, em gel de poliacrilamida 6%, revelados com nitrato de prata obtidos com o iniciador MB02.

A análise feita com os 66 isolados de *FOC* e os dois iniciadores testados, considerando-se todas as bandas amplificadas, separou os isolados em três grupos distintos apresentado no dendograma (Figura 10), com similaridade interna de 100%, ou seja, os isolados de cada um dos grupos foram idênticos entre si. Os dois isolados utilizados como controle (*Pyricularia* e *Fusarium*) formaram um grupo a parte (dados não apresentados).

O primeiro grupo englobou 59 indivíduos provenientes dos diversos municípios onde as coletas foram feitas. O segundo grupo, composto por dois isolados (CO16, JS23), caracteriza-se por apresentar alelo nulo para o marcador MB11. Já o terceiro grupo, formado por quatro isolados sendo um isolado proveniente do município de Jaraguá do Sul e os demais provenientes do município de Siderópolis (JS26, SI53, SI54, SI55, SI56), caracterizou-se por apresentar um alelo extra no marcador MB02.

O segundo e terceiro grupo uniram-se entre si a um nível de similaridade de cerca de 65%, enquanto que este novo conglomerado uniu-se aos demais isolados a um nível de similaridade de 57%.

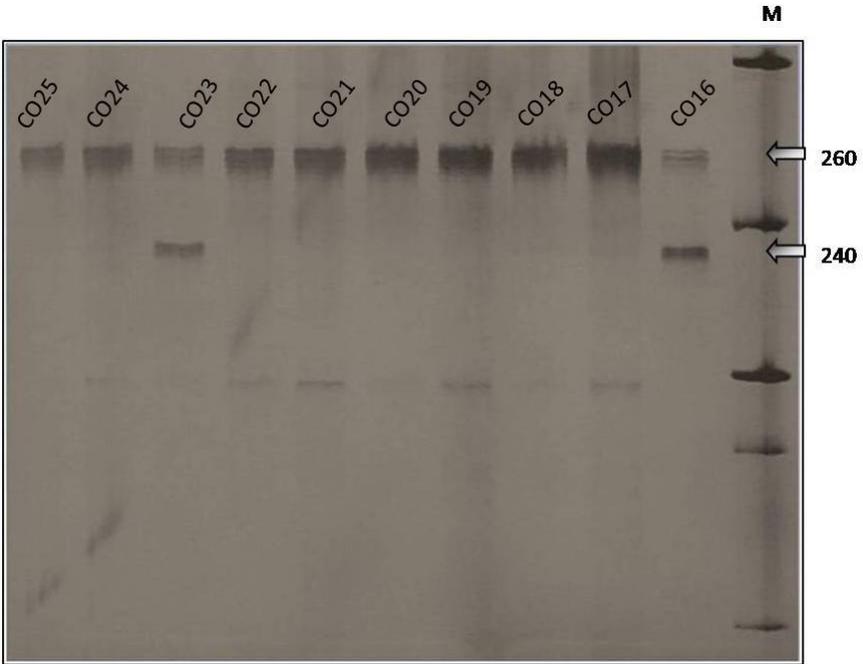


Figura 9 - Padrões de amplificação de SSR, em gel de poliacrilamida 6%, obtidos com o iniciador MB02 para isolados de *FOC* coletados dos Municípios de Corupá (CO) e Jaraguá do Sul (JS). M: marcador de peso molecular 50pb. Os números assinalados referem-se aos tamanhos dos fragmentos amplificados.

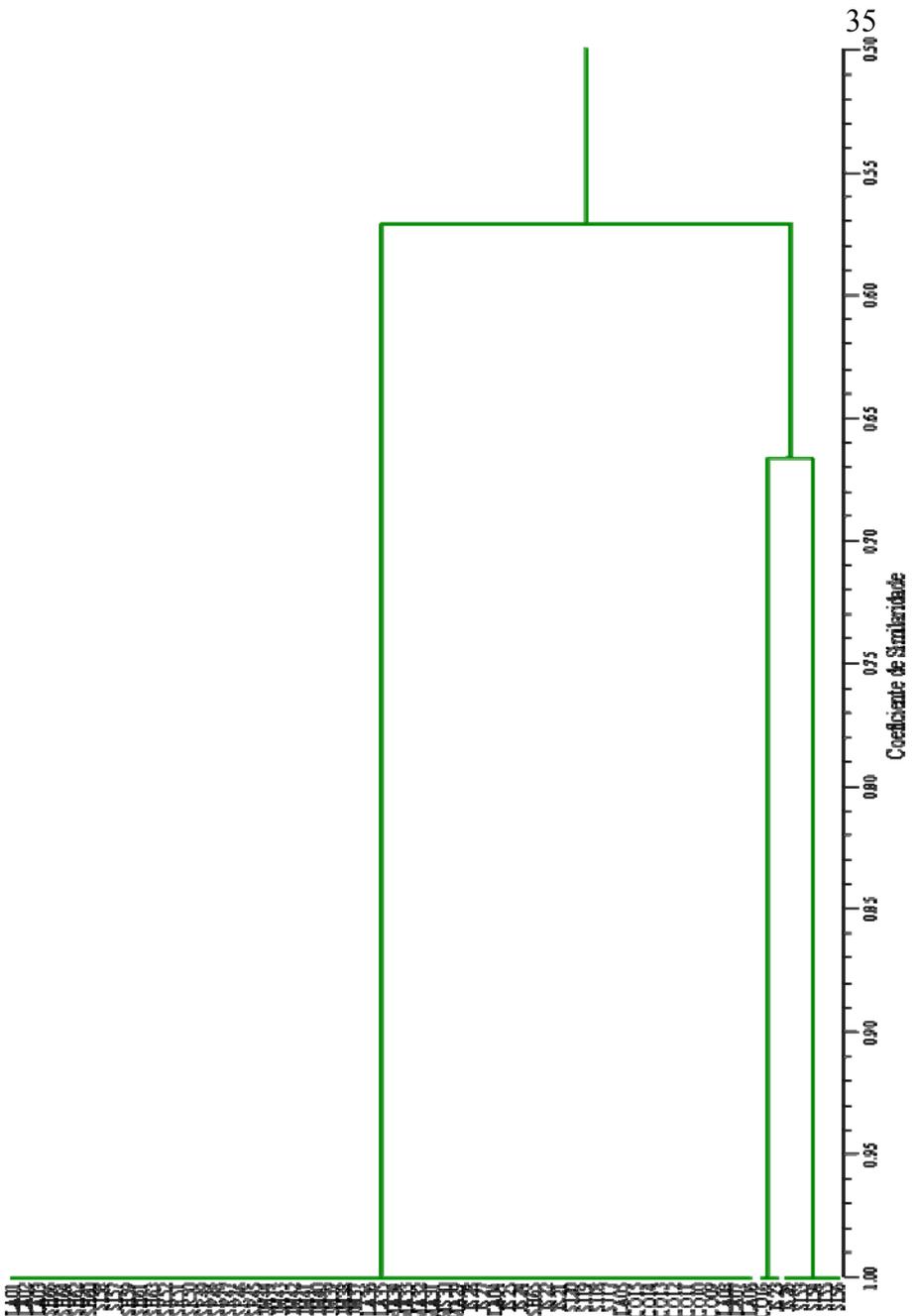


Figura 10 - Dendrograma de similaridade genética dos 66 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* utilizando os iniciadores SSR MB2 e MB11.

5.3.3 Compatibilidade Vegetativa

Dos 66 isolados analisados, quatro destes foram selecionados para o estudo de Compatibilidade Vegetativa. Estes isolados foram selecionados em função de serem distintos tanto pela origem como pela virulência assim, dois isolados da região Norte (CO14, MA32) e dois isolados da região Sul (JM40, SR52) do Estado, sendo um menos virulento e o outro mais virulento em cada região.

Após os quatro isolados terem sido cultivados em meio mínimo com clorato (MMC), observou-se a formação de setores, sendo que esta formação variou entre os isolados. Alguns apresentaram um único setor por colônia e outros apresentaram mais de um. Foram considerados mutantes nit os setores que apresentaram crescimento ralo sem micélio aéreo em MMC, apresentado na Figura 11a.

Neste estudo não foi possível observar o pareamento entre os quatro isolados testados não havendo com isso compatibilidade vegetativa entre estes isolados (Figura 11b). Estes resultados obtidos com VCGs de *FOC* devem ser considerados preliminares, uma vez que seria necessário outras tentativas na obtenção de mutantes nit adicionais.

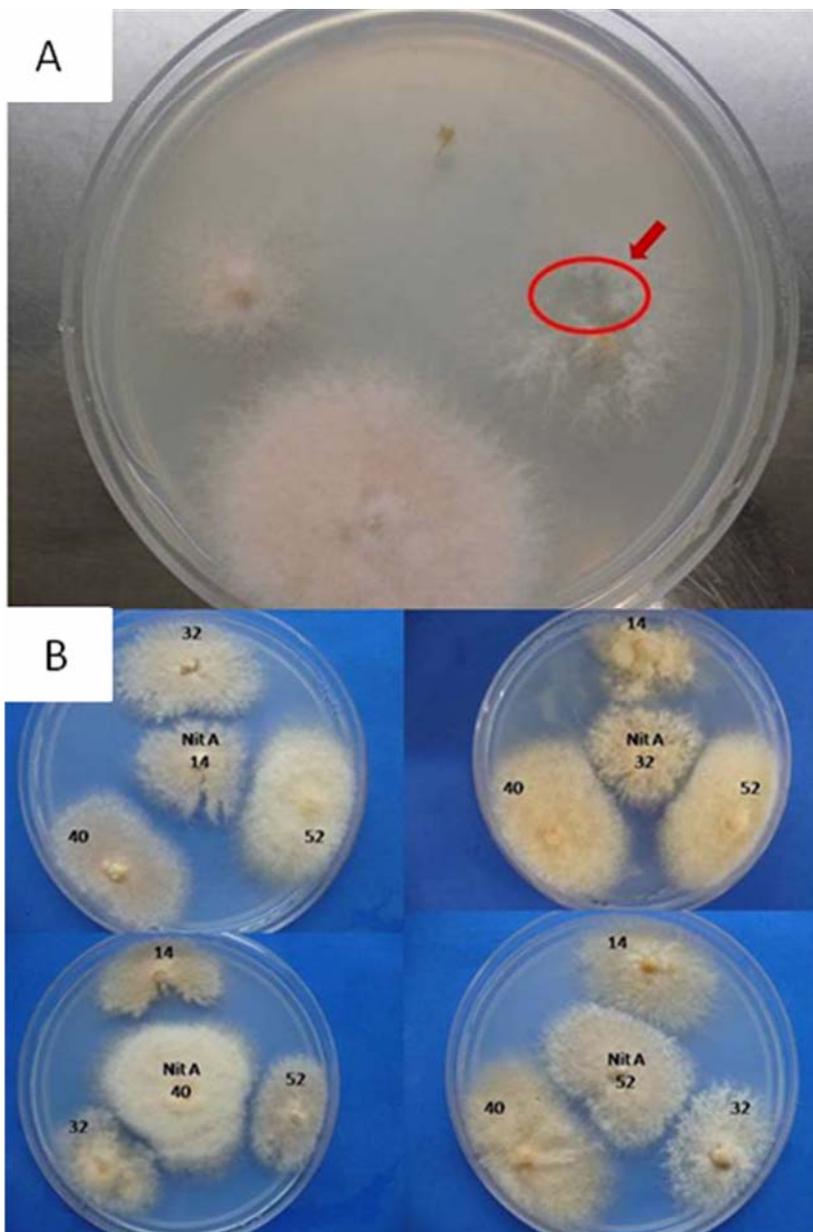


Figura 11 - A) Obtenção de Nit mutantes em meio mínimo com clorato de potássio. A seta indica a formação de setores. B) Pareamento dos nit mutantes dos quatro isolados de *FOC* selecionados para este estudo em meio mínimo.

6 DISCUSSÃO

Os resultados de patogenicidade dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) revelaram que os 66 isolados analisados, todos foram patogênicos à bananeira da cultivar Enxerto. O fungo foi sempre isolado de plantas adultas, antes do período da floração, com sintomas típicos do mal-do-panamá, ou seja; daquelas plantas que apresentavam externamente um amarelecimento das folhas mais velhas para as folhas mais novas, e também rachadura do pseudo-caule próximo ao solo (CORDEIRO *et al.*, 2005; PLOETZ, 2006). Esses sintomas, descritos por VENTURA & HINZ (2002), são mais comuns em plantas adultas, mas podem ser encontrados em plantas jovens. Além dos sintomas externos, o cuidado na retirada de fragmentos do rizoma fora da área de encharcamento, durante a coleta das amostras foi fundamental para a validação da metodologia utilizada neste trabalho. Nem sempre o método de coleta utilizado resulta no sucesso de obtenção do patógeno de interesse. APPEL & GORDON (1994) coletaram 197 amostras de *Fusarium oxysporum* isolados de solo e de raízes do hospedeiro de duas propriedades agrícolas, sendo que somente 115 isolados foram identificados como *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Os demais isolados não apresentaram sintomas ao hospedeiro, sendo considerados não patogênicos. LESLIE & SUMMERELL (2006) relatam que o protocolo de isolamento tem um significativo impacto sobre a recuperação de espécies de *Fusarium* provenientes de plantas doentes. As técnicas de isolamento selecionadas devem maximizar a recuperação do patógeno de interesse e restringir a recuperação de patógenos secundários e saprófitas.

Embora não se tenha avaliado a severidade da doença no teste de patogenicidade, observou-se uma variação da agressividade dos isolados patogênicos frente aos clones de bananeira provenientes da cultivar Enxerto nas mesmas condições. Alguns isolados de maior agressividade foram provenientes dos municípios de Massaranduba (MA32), Santa Rosa do Sul (SR52), Siderópolis (SI54) e Schroeder (SC63, SC66). Os demais isolados, tanto da região Norte quanto da região Sul, apresentaram uma menor agressividade, causando sintomas de uma forma menos severa. De acordo com MOORE *et al.* (1991), o desenvolvimento da doença do mal-do-panamá depende fortemente da interação entre patógeno e genótipo da planta, e parece ser influenciado diretamente pelas condições ambientais. WAITE (1962) observou que 12 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* oriundos de *Heliconia caribaea* apresentaram variações quanto à agressividade em *Heliconia librata* Griggs e *Heliconia irassa* R.R. Smith. Posteriormente, WAITE (1963) relatou uma vari-

ação de agressividade de 12 isolados de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* provenientes de Honduras, Filipinas, Venezuela, Austrália, Jamaica, Costa Rica, Malásia e Tailândia. Quando inoculados nas cultivares de bananeira Gros Michel e Bluggoe, e os isolados provocaram sintomas que variaram de leve a severo. CASTRO *et al.* (2008) estudando *FOC* em Helicônia nas regiões produtoras do Nordeste do Brasil, classificou os isolados analisados em três diferentes níveis de agressividade, verificando que não ocorreu correlação geográfica. Isolados de uma mesma região apresentaram níveis de agressividade diferentes, classificados em maior agressividade, agressividade intermediária e menor agressividade. Com base nos relatos de WAITE (1962, 1963); MOORE *et al.* (1991) e CASTRO *et al.* (2008), bem como nas observações relatadas do presente estudo, é provável que haja diferença nos níveis de agressividade dos isolados de *FOC* provenientes de Santa Catarina, porém estudos adicionais devem ser realizados para complementação e avaliação dos isolados.

Quanto às características morfológicas dos isolados analisados neste estudo, não se observou diferenças significativas com relação à taxa de crescimento das colônias que variaram de 4,4 a 6,6mm.dia⁻¹. Quando se avaliou a coloração das colônias em meio de cultura BDA a 24°C no sétimo e décimo quarto dia, classificou-se os isolados em três grupos distintos (branco, salmão e violeta), que foram relacionados à origem (Figura 5). Esses resultados estão de acordo com PLOETZ (2006) e LESLIE & SUMMERELL (2006), que descreveram que as colônias crescem de 4 a 7 mm/dia em BDA a 24°C com abundante micélio aéreo, de cor variando de branco ao violeta. KUMAR *et al.* (2006), estudando a variabilidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* na Índia, verificaram diferenças consideráveis na taxa de crescimento de sete isolados analisados, sendo que quatro deles cresceram mais rápido ($8,0 \pm 0,2\text{mm/dia}^{-1}$), dois foram intermediários ($7,0 \pm 0,2\text{mm/dia}^{-1}$), e um deles foi mais lento ($6,6 \pm 0,2\text{mm/dia}^{-1}$). Estes autores também obtiveram coloração das colônias variando de branco a violeta. Em geral, tipos de *Fusarium oxysporum* não podem ser distinguidos morfológicamente, uma vez que as condições ambientais e nutricionais podem alterar as características das colônias, como coloração e taxas de crescimento, havendo por isso, a necessidade de confirmação de diagnósticos com utilização de técnicas moleculares (PLOETZ, 2006; LEONG *et al.*, 2009).

Os resultados por marcadores moleculares RAPD revelaram uma variabilidade considerável entre os isolados de *FOC*, com estimativas de similaridade que variaram de 98 a 35 % (Figura 8). Com base nos 10

marcadores selecionados de RAPD, os 66 isolados foram agrupados em cinco grupos distintos.

VAKALOUNAKIS & FRAGKIADAKIS (1999), estudando a diversidade genética de 121 isolados, verificaram que o marcador molecular RAPD foi efetivo, ou seja, revelou variabilidade para estudos de população de *Fusarium oxysporum* em pepino. KURAMAE & SOUZA (2002) utilizaram marcadores moleculares RAPD para estimar a variabilidade genética existente entre quatro *formas speciales* de *Fusarium oxysporum*, obtendo resultado satisfatório na diferenciação dos isolados com o uso 10 iniciadores. Geraram-se um total de 74 fragmentos, dos quais 68 foram polimórficos e apenas 6 monomórficos. Como conclusão, estima-se uma variabilidade genética a nível de DNA genômico entre *formas speciales* de 50%; os autores concluíram que este marcador pode servir para diferenciar isolados de espécies de diferentes hospedeiro. PARK *et al.* (2006) fazendo análise filogenética de *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* provenientes da Coreia, utilizaram dez marcadores RAPD, sendo que estes, geram um total de 125 bandas, das quais, 124 foram polimórficas, relatando ser um bom marcador para estudo de diversidade genética. Usando também o marcador RAPD, MOSTAFA *et al.* (2002) detectaram polimorfismo entre os oito isolados de *Fusarium oxysporum* coletados de grão-de-bico. Estudo realizado por BELABID *et al.* (2004), com 32 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* verificou que o RAPD tem um excelente potencial para resolver a dinâmica de população e evolução deste fungo.

A análise com marcador molecular SSR separou os isolados em três grupos distintos (Figura 10). Este resultado pode estar relacionado ao número de iniciadores utilizados, o que gerou um baixo polimorfismo nos isolados amostrados. Baseado no trabalho realizado por BOGALE *et al.* (2005), utilizou-se para este estudo seis iniciadores de SSR, dos quais obteve-se somente a amplificação com bandas específicas em dois destes. Embora ultimamente tenha sido relatado com bastante frequência o uso de marcadores moleculares SSR em pesquisas, principalmente em função de seu alto nível de codominância, polimorfismo e locus específicos (YANG & ZHONG, 2008), o SSR tem sido muito pouco utilizado para espécies de fungo, uma vez que a obtenção desses marcadores com aceitável nível de polimorfismo é geralmente mais difícil em fungos do que em outros organismos (DUTECH *et al.*, 2007).

A formação dos grupos conforme o dendograma de similaridade ocorreu principalmente porque considerou-se no iniciador MB11 a presença de alelo nulo e no iniciador MB02, a presença de um alelo extra em alguns indivíduos. Como se utilizou SSR desenvolvidos para *Fusa-*

rium oxysporum, não se esperava a presença de alelos nulos. As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies geneticamente relacionadas, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. A grande limitação dos SSR é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie. A amplificação de loci provenientes de outras espécies, das quais eles foram clonados, é geralmente possível somente entre espécies do mesmo gênero e em alguns casos, a percentagem de amplificação é baixa, gerando alelos nulos, que podem influenciar na análise genética (DUTECH *et al.*, 2007).

Sendo o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* um fungo haplóide com reprodução assexuada (BENTLEY *et al.*, 1998), esperava-se que com o uso da técnica de SSR ocorresse apenas a amplificação de uma banda para cada isolado em cada iniciador utilizado. A ocorrência da amplificação de duas bandas para alguns indivíduos pode ter ocorrido em função da anastomose, ou seja, fusão de hifas que forma heterocários, onde o mesmo micélio pode conter núcleos de origem distinta. Esta hipótese é fundamentada pelo trabalho de PUHALLA (1985), que observou formação de heterocários quando estudou as características genéticas de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. KISTLER (1997), em sua revisão sobre diversidade genética de *Fusarium oxysporum* em plantas, relata também este comportamento do fungo.

De acordo com a literatura, os microssatélites apresentam vantagens sobre o marcador RAPD, porque são co-dominantes e facilmente reproduzíveis. Além destas características, os microssatélites parecem ter uma distribuição freqüente e aleatória permitindo assim, uma ampla cobertura do genoma (LEHMANN *et al.*, 1996). Quando se comparou os resultados obtidos pelas duas técnicas moleculares utilizadas neste estudo, verificou-se que houve uniformidade dos dados obtidos, sendo a técnica RAPD também viável para detectar a variabilidade genética de *FOC*. Em ambas as metodologias, obteve-se a formação de um grande grupo com mais de 80% dos isolados originários dos diferentes municípios estudados. Devido os isolados C016, JS23 e JS26, provenientes da Região Norte do Estado de Santa Catarina, apresentarem-se mais distantes geneticamente no dendograma de similaridade, sugere-se estudo mais aprofundado futuramente com os mesmos.

A história da bananicultura em Santa Catarina apresenta-se de forma diferente nas regiões Norte e Sul do Estado. No Norte, houve o predomínio das cultivares Maçã e Prata, que foram substituídas pela

cultivares do sub-grupo Cavendish, Nanica, Nanicão e Grande Naine, em função do ataque intenso do mal-do-panamá. Já na região Sul do Estado, há mais de um século, predomina o plantio da cultivar Enxerto (MOREIRA & CORDEIRO, 2006). Mesmo havendo uma maior diversidade de hospedeiro na região Norte do Estado, de uma maneira geral, não ocorreu um aumento da variabilidade do patógeno. Isto pode ser explicado por GROENEWALD *et al.* (2006), onde relatam que os clones de *FOC* são estáveis e que não ocorre facilmente mutações no genoma do patógeno, independentemente dos grupos genômicos do hospedeiro.

Analisando-se os resultados, observa-se que não houve associação dos agrupamentos RAPD e SSR com origens geográficas, pois isolados coletados nos municípios selecionados para este estudo, ficaram distribuídas nos diferentes grupos. Resultados semelhantes sobre a falta de correlação com a origem geográfica foram obtidos por SANTOS *et al.* (2008) estudando a variabilidade genética de *FOC* nos bananais do norte de Minas Gerais e por GHERBAWY (1999), onde utilizou marcadores RAPD para analisar a diversidade genética de 20 isolados de 14 *formae specialis* de *F. oxysporum* e também não encontrou correlação com origem geográfica.

No estudo de análise genética através de Grupos de Compatibilidade Vegetativa, o principal objetivo foi aplicar a metodologia descrita por PUHALLA (1985) para dar início ao entendimento desta técnica. O estudo de grupos de compatibilidade é muito importante principalmente para o gênero *Fusarium*, tendo bastante aplicabilidade, uma vez que isolados que pertencem a um mesmo VCG apresentam alta similaridade genética (CASTRO, 2007).

Verificou-se que os quatro isolados foram capazes de produzir nit mutantes. Segundo CORREL (1987), mutantes *nit* não são capazes de assimilar nitrato no meio, apresentando assim, crescimento ralo e só apresentam crescimento robusto quando ocorre a complementação com outro isolado mutante do mesmo VCG. Por não apresentar forma sexuada descrita, o VCG de *Fusarium* busca estabelecer uma relação da similaridade genética com a possibilidade de fusão das hifas para a formação de um heterocário entre as linhagens avaliadas (O'DONNELL, 1998). Neste estudo não foi evidenciado crescimento robusto quando pareamos os nit mutantes, indicando a não compatibilidade vegetativa entre esses isolados (Figura 11). Os resultados obtidos com VCGs de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* são preliminares e devem servir como base para novos estudos futuramente. LODWIG *et al.* (1999), trabalhou na distinção de isolados de *FOC* e relatou, a existência de compatibilidade na maioria

dos isolados, entretanto, destacou dois isolados como não compatíveis.

Com esse estudo conclui-se que não houve associação dos agrupamentos por descritores morfológicos e moleculares com a origem geográfica dos isolados avaliados. As técnicas moleculares RAPD e SSR aplicadas foram eficientes em separar os isolados em grupos distintos, os membros de cada grupo, em cada uma das técnicas em geral foram coincidentes. Três dos isolados (CO16, JS23, JS26), mostraram-se diferentes dos demais em ambas as técnicas merecendo estudos futuros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 3ed. New York. Academic Press, p. 803.1988.

ALVES, E.J. A Variabilidade Genética e o Melhoramento da Banana e de outras Plantas Cultivadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.7, p.7-29, 1985.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.565-568, 2002.

APPEL, D.J. & GORDON, T.R. Local and Regional Variation in Populations of *Fusarium oxysporum* from Agricultural Field Soils. **Phytopathology**, v.84, p.786-791, 1994.

AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, v.6, p.457-464, 1996.

BALMAS, V.; SCHERM, B.; PRIMO, P. di, RAU, D.; MARCELLO, A.; MIGHELI, Q. Molecular characterization of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and f. sp. *lycopersici* by random amplification of polymorphic DNA and microsatellite-primed PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.111, p.1-8, 2005.

BELABID, L.; BAUM, M.; FORTAS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. **American Journal of Biotechnology**, v.3, p.25-31, 2004.

BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, v.7, p.249-260, 2004.

BENTLEY, S.; PEGG, K.G.; MOORE, N.Y.; DAVIS, R.D.; BUD-DENHAGEN, I.W. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. **Phytopathology**, Paul, v.88, p.1283-1293, 1998.

BOGALE, M.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; STEENK-AMP, E.T. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. **Molecular Ecology**, v.5, p.622-624, 2005.

CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M.-F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mucosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, INIBAP, p.123-129, 2003.

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

CASTRO, N.R.; COELHO, R.S.B.; LARANJEIRA, D.; COUTO, E.F.; SOUZA, M.B.R. Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.127-130, 2008.

CAVAGLIERI, L.R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M.G. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. **Biological Control**, v.31, p.259-267, 2004.

CORDEIRO, Z.J.M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp). In: KIMATI, H. *et al.* Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo. **Agronômica Ceres**, v.2, p.112 -153, 1997.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. Doenças fúngicas e bacterianas. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 36-64, 2000.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.) In: Doenças Da Bananeira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. **Agronômica Ceres**, v.2, p.99-117, 2005.

CORRELL, J.C.; KLITTICH, C.J.; LESLIE, J.F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, v.77, p.1640-1646, 1987.

CROUCH, J.H.; CROUCH, H.K. TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. Based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, p.99-108, 1999.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; FRANÇOIS, D.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. Science Direct. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, p.933-949, 2007.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E. D. M.N.; CERQUEIRA, A. O.; C. ROCHA, 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.

FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores na análise genética. Brasília: Embrapa, Cenargen, p.220, 1996.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biocombustíveis**, v.14, p.12-16, 2000.

GARMENDIA, I.; GOECOICHEA, N.; AGUIRREOLEA, J. Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against *Verticillium* wilt. **Biological Control**, v.31, p.296-305, 2004.

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

GOES, A.; MORETTO, K.C.K. Mal-do-Panamá. In: RUGGIEIRO, C. **Bananicultura**. v.2, p.122-128, 2001.

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

GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG, N.; MARASAS, W.F.O.; VILJOEN, A. The application of high-throughput, AFLPs in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, p.297-305, 2006.

GUZMAN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MIKANDAWIRE, A.B.C.; GILBERTSON, R.L. Detection on differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, v.83, p.37-42, 1999.

HINZ, R.H. Germinação de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen em areia incorporada com manipueira. Botucatu, SP, Dissertação (Mestrado em Agronomia com Concentração em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas do Campus de Botucatu. p.58-65, 1991.

JONES, D.R. The characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Ásia. **Infomusa**, Montpellier, v.4, p.3-4, 1995.

JONES, D.R. Diseases of banana, abacá and enset. Reading: CABI Publications, p.544, 1999.

KARAOGLU, H.; LEE, M.Y.; MEYER, W.; Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomas. **Molecular Biology**, v.22, p.639-649, 2005.

KISTLER, H.C.; ALABOUVETTE C.; BAAYEN R.P.; BENTLEY S. BRAYFORD D.; CODDINGTON A.; CORRELL J.; DABOUSSI, M.J.;

ELIAS K.; FERNANDEZ D.; GORDON T. R.; KATAN T.; KIM H. G.; LESLIE J. F.; MARTYN R. D.; MIGHELI Q.; MOORE N. Y.; O'DNNOEL, K, I, R.; PLOETZ C.; RUTHERFORD M. A.; SUMMERELL B.; WAALWIJK, C. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.88, p.30-32, 1998.

KISTLER, H.C. Genetic Diversity in the Plant: pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.87, p.474-479, 1997.

KRAFT, J.M.; HAGLUND, W.A. A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, **Phytopathology**, v.68, p.273-275, 1978.

KUMAR, B.H.; SHANKAR, U.A.C.; KINI, R.K.; PRAKASH, S.H.; SHETTY, S.H. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* isolates based on random amplified polymorphic DNA and intergenic spacer. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.39, p. 151-160, 2006.

KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. Variabilidade genética entre formas especiais de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* através de RAPD e sequencias de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v.24, p.1481-1485, 2002.

LEHMANN, T.; HAWLEY, W.A.; COLLINS, F.H. An Evaluation of Evolutionary Constraints on Microsatellite Loci Using Null Alleles. **Genetics Society of America**. v.144, p.1155-1163, 1996.

LEONG, S.K.; LATIFFAH, Z.; BAHARUDDIN, S. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. **American Journal of Applied Sciences**, v.6, p.1301-1307, 2009.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Livro, 2006.

LINDERMAN, R.G. Role of VAM fungi in biocontrol. In: Pflieger, F.L.; Lindermann, R.G. **Mycorrhizae and plant health**. p.1-26. 1994.

LIU, D.; VAN HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFOTTE, T.; PA-

NACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.133, p.95-98, 1995.

LODWIG, E.M.; BRIDGE, P.D.; RUTHERFORD, M.A.; KUNG, J.; JEFFRIERES, P. Molecular differences distinguish clonal lineages within East African populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.71-77, 1999.

LUCAS, J.A. Plant pathology and plant pathogens. 3. ed. London: **Blackwell Science**, p.274, 1998.

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

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science**, v.88, p.828-982, 1991.

MISHRA, P.K.; TEWARI J.P.; CLEAR, R.M.; TURKINGTON T. K. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. **Annals of Applied Biology**, v.145, p.299-307, 2004.

MOORE, N.Y. HARGREAVES, P.A.; PEGG, K.; IRWIN, J.A.G. Characterization of strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* by production of volatiles. **Australian Journal of Botany**, v.39, p.61-166, 1991.

MOREIRA, R.S.; CORDEIRO, Z.J.M. A história da banana no Brasil. **XVII Reunião Internacional ACORBAT**, v.1, p.65-69, 2006.

MOSTAFA, M.; REZA, M.Z.; OMID, J.; JAVAD, H.M. Use of RAPD, enzyme activity staining, and colony size to differentiate phytopathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from Iran. **Journal Microbiology**, v.33, p.299-303, 2002.

NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W. F. O. *Fusarium Species*. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University, p.142-145, 1983.

O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogis. **Applied Biological Sciences**, v.95, p.2044-2049, 1998.

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**, v.27, p. 631-634, 2002.

PARK, J.M.; KIM, G.Y.; LEE, S.J.; HUH, M.K.; LEE, T.H.; LEE, J.D. Comparison of RAPD, AFLP, and EF-1 α Sequences for the Phylogenetic Analysis of *Fusarium oxysporum* and *formae specialis* in Korea. **Mycrobiology**, v. 34, p. 45-55, 2006.

PÉREZ-VICENTE, L. *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. In: **Reunion International ACORBAT**, v.16, p.1-15, 2004.

PLOETZ, R.C.; CORRELL, J.C. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Plant Disease**, v.72, p.325-328, 1988.

PLOETZ, R.C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R.C.; Generacion de la raza Tropical 4 del mal de panamá: Evaluación de riesgo y um plan de acción para evoluar El problema. **Reunion de grupos de interes sobre los riegos de La raza tropical 4 de Fusarium**, BBTV y otras plagas de musáceas para La región Del Oirsa, Amareica Latina y El Caribe. p.31, 2009.

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 State University, p.291-305, 1981.

PUHALLA, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compability. **Canadian Journal of Botanic**, v.63, p. 179-183, 1985.

REBELO, J.A. Mancha reticulada *Leandria momordicae* Rangel em cucurbitáceas. Porto Alegre, Tese (Doutorado em fitossanidade com concentração em fitopatologia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Porto Alegre. p.230, 2003.

ROSALEE, A.; COELHO, N.; DHINGRA, O.D. Grupos de compatibilidade vegetativa entre insolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.546-548, 1999.

ROHLF, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **New York: Exeter Software**, p.38, 2000.

SANTOS, T.M.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M.R.; XAVIER, A.A.; PEREIRA, G.V.; FERNANDES, T.P. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* em bananais do Norte de Minas Gerais. 2008. **XX Congresso brasileiro de Fruticultura**. Vitória Espírito Santo, p.98-99, 2008.

SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for mini-scale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. **International Rice Research Notes**, v.8, p.47-48, 1993.

SILVA, J.C.; BETTIOL, W. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.409-412, 2005.

SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA. 2007/2008. Epagri/Cepa. Florianópolis Banana p. 56-68, 2008.

SMITH, L.J.; SMITH, M.K.; HAMILL, S.D.; HUNTER, M.N.; PEGG, K.G.; GALEA, V.J. Towards improving resistance of micropropagated bananas to *Fusarium* wilt using bacteria and bacteria and mycorrhizae. I. Bioassay development. In: Molina, A.B.; Nikmasdek, N.H.; Liew, K.W. Banana *fusarium* wilt management: towards sustainable cultivation. Malásia: Inibap, p.224-233, 1999.

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

STOVER, R.H. Banana Plantain and Abaca Diseases. Commonwealth **Mycological** Institute, p.316, 1972.

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

SUTTON, J.C. Strategies for biological control of necrotropic pathogens in perennial crops. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.235-238, 2000.

TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A.; NICOLETTI, M.E.; SCOZ, L.B. Diversidade genética de raças de *Pyricularia grisea* (Cook) Saac no estado de Santa Catarina, Brasil. In: **Simpósio de recursos genéticos para America Latina y el Caribe**, v.5, p. 124, 2005.

TRINDADE, A.V.; LINS, G.M. de L.; MAIA, I.C.S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.137-142, 2003.

VAKALOUNAKIS, D.J.; FRAGKIADAKIS G.A. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Isolados from Cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility, and RAPD Fingerprinting, **America Phytopathological Society**, v.89, p.161-169, 1999.

VENTURA, J.A.; HINZ, R.H. Controle das doenças da bananeira. In: Zambolim, L. et al. **Controle de doenças de plantas – FRUTEIRAS**. Suprema Gráfica e Editora Ltda. Viçosa, Minas Gerais, v.2, p.839-937, 2002.

WAITE, B.H. *Fusarium* wilt of *Heliconia* and its relation to Panama disease of bananas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 52, p. 287, 1962.

WAITE, B.H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 3. **Tropical Agriculture**, v.40, p.299-305, 1963.

WAITE, B.H. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Plant Disease Report**, v.61, p.15-19, 1977.

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

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

YANG, B.J.; ZHONG, S.B. Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.910-912, 2008.

YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C.; MORGADO, L.B. Fungos micorrízicos arbusculares em bananeiras cultivadas no Vale do Submédio São Francisco. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, p.115-121, 1997.

WARDLAW, C.W. **Banana diseases**, including plantains and abaca. London: Longman, p.878, 1972.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 1-16, 2002.

ZAMANI, M.R.; MOTALLEBI, M.; ROSTAMIAN, A. Characterization of Iranian Isolates of *Fusarium oxysporum* on the Basis of RAPD Analysis, Virulence and Vegetative Compatibility. **Phytopathology**, v. 152, p.449-453, 2004.