

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RÊCONCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO PARA  
RESISTÊNCIA À FUSARIOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
AGENTE PATOGENICO**

**ALINE DOS SANTOS SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MARÇO DE 2011**

**AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO PARA  
RESISTÊNCIA À FUSARIOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
AGENTE PATOGENICO**

**ALINE DOS SANTOS SILVA**

ENGENHEIRA AGRÔNOMA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

Co-Orientador: Dr. Fernando Haddad

Co-Orientador: Prof. Dra Maria Angélica P. de C. Costa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586

Silva, Aline dos Santos.

Avaliação de germoplasma de maracujazeiro para resistência à fusariose e caracterização do seu agente patogênico / Aline dos Santos Silva. – Cruz das Almas, BA, 2011.

81f.; il.

Orientador: Eder Jorge de Oliveira.

Co-Orientadores: Fernando Haddad e Maria Angélica P. de C. Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Maracujá – Melhoramento genético. 2.Maracujá – Doenças. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 634.425

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RÊCONCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ALINE DOS SANTOS SILVA**

---

Dr. Eder Jorge de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)

---

Dr. Francisco Ferraz Laranjeira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

Prof. Dra. Simone Alves Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação (ou tese) homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em  
Recursos Genéticos Vegetais em  
..... Conferindo o Grau de Mestre  
em Recursos Genéticos Vegetais em  
.....

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, o autor da minha vida e meu companheiro de todos os momentos.

Aos meus pais, Ilza e Alcino, grandes responsáveis por minha formação, pelo amor, compreensão, incentivo e carinho durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Aliane, Daiany, Alessandro e Ronie, a quem amo muito, pelo apoio nas horas difíceis desde o começo da minha caminhada profissional.

A Diêgo e família, pelo amor, carinho e ajuda indispensável durante esse período.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, em especial:

Ao Dr. Eder Jorge de Oliveira, pelos valiosos ensinamentos, por toda confiança, compreensão, paciência e exemplo profissional que admiro muito.

Ao Dr. Fernando Haddad pela paciência e disposição nos momentos finais deste trabalho.

A Profa. Maria Maria Angélica P. de C. Costa pela co-orientação.

Ao Dr. Onildo Nunes de Jesus, pelas sugestões e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Epaminondas e Raimundo por toda ajuda essencial para o desenvolvimento deste estudo.

Aos amigos do mesmo laboratório, em especial Kika e Juliana, pela amizade valiosa e conversas muito especiais.

A equipe Mamão e Maracujá, em especial Zé Luiz, Pastelzinho e Recife por todas as vezes em que solicitei e fui atendida em trabalhos fundamentais para o sucesso deste.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura por permitir a realização desta dissertação e a seus funcionários que de alguma forma influenciaram nessa jornada e pelos momentos de descontração.

Aos professores do curso de pós-graduação de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESB e CNPq pelo apoio financeiro.

# AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO PARA RESISTÊNCIA À FUSARIOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO AGENTE PATOGENICO

**Autora:** Aline dos Santos Silva

**Orientador:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Orientador:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dra Maria Angélica P. de C. Costa

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo identificar fontes de resistência e promover estudos sobre a variação genética de um dos principais patógenos da cultura do maracujazeiro (*Passiflora* sp.) que é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). Para isso utilizaram-se acessos da espécie *P. cincinnata* Mast., *P. alata* Curtis e de *P. edulis* Sims. As inoculações foram realizadas pelo método de imersão das raízes em uma suspensão de macroconídios ( $10^6$ .ml<sup>-1</sup>) e as avaliações foram realizadas por meio da contagem de plantas mortas até o 120º dia após a inoculação (DAI). Os dados foram analisados pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e pelo agrupamento gerado. A variabilidade genética de 14 isolados de FOP foi analisada com marcadores do tipo AFLP. Observaram-se grandes diferenças na resistência dos acessos de maracujazeiro, inclusive no início de manifestação dos sintomas. O índice de mortalidade variou de 0 a 100% e a AACPD variou de 0 a 6.350,63. Os genótipos foram classificados em resistentes (25%), moderadamente resistentes (21,88%), suscetíveis (43,75%) e altamente suscetíveis (9,37%). Com relação à estimativa da variabilidade genética dos isolados de FOP, a dissimilaridade média foi de 0,25, com variação de 0,04 a 0,48. Observou-se a formação de quatro grupos principais, com a alocação de 5, 7, 1 e 1 isolados de FOP nos Grupos 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Os resultados demonstraram ampla diversidade nas fontes de resistência, bem como nos isolados de FOP, que deve ser levada em consideração durante a implementação das melhores estratégias para o melhoramento do maracujazeiro em busca de cultivares resistentes.

**Palavras-chaves:** maracujá, melhoramento genético, recursos genéticos, murcha do maracujazeiro, patógeno

# IDENTIFICATION OF RESISTANCE SOURCES TO FUSARIOSIS FROM PASSION FRUIT GERMPLASM

**Author:** Aline dos Santos Silva

**Adviser:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Adviser:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dr Maria Angélica P. de C. Costa

**ABSTRACT:** The objective of this work was to identify resistance sources and to study the genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP), one of the most important pathogens for the passion fruit crop. Accessions of *P. cincinnata* Mast., *P. alata* Curtis and *P. edulis* Sims species were evaluated. Roots of the genotypes were immersed in a suspension of  $10^6$  macroconidia.ml<sup>-1</sup> and the number of dead plants was registered daily until 60 days after inoculation (DAI). Data were analyzed using the number of dead plants to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC), and for further cluster analysis. AFLP markers were used to analyze the 14 isolates of FOP genetic variability of. Large differences in resistance among accessions of passion fruit were observed, since the beginning of the symptoms. The death index ranged from 0 to 100% and AUDPC from 0 to 6.350,63. Genotypes were classified into resistant (25%), slightly resistant (21.88%), susceptible (43.75%) and highly susceptible (9.37%). Regarding the genetic variability estimates among FOP isolates, the average of dissimilarity was 0.25 and ranged from 0.04 to 0.48. Four main branches were obtained, where 5, 7, 1 and 1 FOP isolates were clustered in Group 2, 3, 4 and 5, respectively. These results showed broad diversity among the resistance sources, as well as in the FOP isolates, which must be considered during implementation of better strategies for passion fruit breeding aiming the development of resistant cultivars.

**Key-words:** passion fruit, breeding, genetic resources, fusarium wilt, pathogen



## SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO .....1

CAPÍTULO 1 .....18

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À FUSARIOSE NO  
GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO

CAPÍTULO 2 .....46

VARIAÇÃO GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*  
COM BASE EM MARCADORES AFLP E PCR-RFLP DA REGIÃO ITS

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....81

## INTRODUÇÃO

A fruticultura representa uma importante parcela econômica da produção agrícola nacional. A produção mundial de frutas atingiu o volume de 705,90 milhões de toneladas em 2008 (FAO, 2008). O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, com produção estimada de 41,3 milhões de toneladas, o que representa 5% da produção mundial (IBGE, 2009), sendo superado apenas pela China e Índia. Cerca de 53% da produção brasileira é destinada ao mercado de frutas processadas e 47% ao mercado de frutas frescas (IBRAF, 2009). Atualmente, a produção brasileira está voltada para frutas tropicais, subtropicais e temperadas, graças a sua extensão territorial, posição geográfica, solo e condições climáticas. Essas condições favoráveis posicionam o Brasil como grande produtor de diversas culturas, dentre elas o maracujá.

O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo. A sua posição de destaque foi obtida com o desenvolvimento da passicultura nas últimas três décadas (Gonçalves & Souza, 2006). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2007, o maracujá foi plantado em uma área de 47,03 mil hectares, apresentando uma produção de 664,28 mil toneladas no valor de R\$ 396 milhões. Já em 2009, a área plantada foi de 50,79 mil hectares e produção de 718,79 mil toneladas. Nesse cenário, merecem destaque os Estados da Bahia (23,22 mil ha), Ceará (5,57 mil ha), Sergipe (4,70 mil ha), Pará (2,69 mil ha), Minas Gerais (2,42 mil ha) e Espírito Santo (1,55 mil ha) (IBGE, 2009). Em relação à produtividade, a média nacional está em torno de  $14 \text{ t.ha}^{-1}$ , porém, existem diferenças significativas entre as regiões ( $17,97 \text{ t.ha}^{-1}$  no Sudeste,  $14,29 \text{ t.ha}^{-1}$  no Nordeste,  $14,14 \text{ t.ha}^{-1}$  no Centro-Oeste,  $13,75 \text{ t.ha}^{-1}$  no Sul e  $8,06 \text{ t.ha}^{-1}$  no Norte) e entre Estados ( $27,22 \text{ t.ha}^{-1}$  no Espírito Santo,  $23,12 \text{ t.ha}^{-1}$  no Ceará,  $14,48 \text{ t.ha}^{-1}$  em Minas Gerais,  $13,9 \text{ t.ha}^{-1}$  na Bahia,  $9,95 \text{ t.ha}^{-1}$  no Pará e  $9,45 \text{ t.ha}^{-1}$  em Sergipe). As diferenças de produtividade entre estados como o Espírito

Santo e Bahia, onde o primeiro apresenta maior produtividade mesmo com menor área plantada, se deve principalmente a diferenças tecnológicas no sistema de produção.

As espécies de maracujazeiro mais utilizadas comercialmente são *Passiflora edulis* Sims, que possui duas formas: maracujá amarelo e maracujá-roxo; e o maracujá doce (*P. alata* Curtis). A principal forma cultivada é o maracujá amarelo (Matta, 2005), ocupando cerca de 95% dos pomares brasileiros, devido ao seu valor comercial e qualidade dos frutos, sendo utilizado para consumo *in natura* e indústrias.

O Nordeste brasileiro produz cerca de 74% da produção nacional de maracujá, plantados em 37 mil hectares. Somente o Estado da Bahia, responde por cerca de 34% da produção nacional, ocupando 45% da área plantada. Além disso, a passicultura caracteriza-se, por ser uma atividade predominantemente desenvolvida em pequenas propriedades, com tamanho entre 3 e 5 hectares e mão-de-obra eminentemente familiar.

Mesmo com esse destaque, nossa produtividade ainda é considerada baixa, devido uma série de problemas como práticas culturais inadequadas, fatores nutricionais, problemas fitossanitários, e conseqüentemente, a falta de variedades produtivas e resistentes às principais pragas e doenças. Isso se deve ao reduzido número de instituições públicas e privadas que se dedicam a pesquisar esta cultura. O melhoramento genético, visando à produtividade, qualidade de frutos e resistência aos principais patógenos é de extrema importância para o desenvolvimento da cultura (Faleiro, 2005; Oliveira et al., 2008). A falta de variedades melhoradas constitui um entrave à produção de frutos homogêneos e de qualidade, devido a utilização de mudas de variedades locais sem garantia de origem. Essas mudas são de sementes coletadas em plantios comerciais de polinização aberta, onde existe grande heterogeneidade entre plantas com relação à qualidade de frutos, potencial produtivo e resistência a pragas e doenças (Stenzel e Sera, 1999).

Até alguns anos atrás, mesmo com a baixa produtividade o agricultor ainda persistia na atividade, pois a cultura é importante fonte de renda alternativa. Entretanto, em algumas áreas a atividade vem sendo abandonada em função de diversos problemas fitossanitários, que têm reduzido o tempo de exploração

econômica da cultura e, até mesmo, inviabilizado o seu cultivo em determinadas regiões (Fischer et al., 2005). As doenças quando não controladas adequadamente causam danos irreparáveis nos pomares, acarretando em prejuízos para os produtores, tornando-se um fator limitante para a produção da cultura. A incidência de várias doenças nos pomares de maracujazeiro, aliada à inexistência de cultivares resistentes, tem contribuído para a redução da área plantada (Meletti et al., 2005). As doenças causadas por patógenos do solo apresentam grande importância em termos de expressão econômica (Chaves et al., 2004; Meletti & Bruckner, 2001), reduzindo a vida útil do maracujazeiro, tornando a cultura itinerante. Até a década de 90, a vida útil de um plantio era de cinco a seis anos e atualmente, os pomares são renovados a cada dois anos ou mesmo anualmente (Ruggiero, et al., 1996), e isso em grande parte é devido as doenças que afetam a cultura. Dentre essas doenças merece destaque a fusariose ou murcha do maracujazeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Mcknight, 1951) (FOP), que causa grandes perdas de produção por levar a planta à morte, chegando a inviabilizar o plantio em determinadas regiões (Oliveira, 2006).

Em 1973, estudos conduzidos no Instituto Biológico de São Paulo identificaram o patógeno FOP como responsável pela murcha do maracujazeiro (Yamashiro et al., 1973). Desde então, a doença foi relatada em todo o Brasil e hoje possui ocorrência generalizada nas principais regiões produtoras da cultura. A fusariose é uma das doenças mais devastadoras do maracujazeiro, pois provoca murcha imediata, deficiência de água, colapso e morte das plantas independente do estágio de desenvolvimento (Bastos, 1976; Manica, 1981), reduzindo de forma significativa a vida útil dos pomares, antes mesmo de iniciar o ciclo de produção.

A fusariose do maracujazeiro apresenta incidência de até 80% nos plantios comerciais do país. Não existem estimativas precisas dos danos causados pela doença, entretanto observações de campo indicam que os prejuízos são enormes e podem chegar a 100%, tendo em vista que as plantas sequer chegam a produzir frutos. Além dos danos diretos na produção, a fusariose provoca a restrição do uso de variedades altamente produtivas, além da eliminação de grande número de variedades e híbridos produtivos nos programas de

melhoramento genético, devido à suscetibilidade à doença. Estes danos têm causado sérios problemas às economias locais, devido à desistência da atividade e conseqüente não-fixação do homem no campo, além da inibição do surgimento de outras atividades ligadas ao sistema produtivo como o de processamento da fruta.

A maioria das espécies do gênero *Fusarium* é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que alguns isolados são parasitas de plantas. Geralmente as espécies produzem esporos dos tipos macroconídios e microconídios e podem também produzir estruturas de resistência, os clamidósporos (Alexpoulos et al., 1996). Uma vez introduzidos no solo, as espécies do gênero *Fusarium*, persistem quase que indefinidamente como clamidósporos.

De modo geral, esses fungos penetram nas raízes das plantas hospedeiras e colonizam o córtex pelo crescimento intra e intercelular. No processo de penetração e colonização da planta hospedeira, o *F. oxysporum* secreta uma série de enzimas como poligalacturonases, liases, pectases e xilanases que contribuem para o processo de degradação das barreiras estruturais das células (Ruíz-Roldan, 1999; García-Maceira et al., 2000). Após atingir o tecido vascular, o patógeno se propaga rapidamente pelos vasos do xilema, provocando os sintomas característicos da murcha da planta, devido ao bloqueio destes vasos, evitando assim, o transporte de água e nutrientes (Beckman, 1987). A murcha também pode ser decorrente das toxinas produzidas, afetando a permeabilidade das membranas celulares e interrompendo o metabolismo celular. O primeiro sintoma visível da fusariose do maracujazeiro é um murchamento dos ramos ponteiros, que pode ocorrer em diferentes épocas do ano e em qualquer etapa do ciclo de vida da planta. Em seguida, ocorre uma murcha generalizada e as folhas que permanecem aderidas necrosam. Cortes longitudinais nos tecidos do lenho revelam estrias de coloração ferruginosa, significando a presença de células cromáticas que causam a impermeabilização dos vasos lenhosos (Santos Filho, 1998). Externamente, a doença se manifesta por lesões que se iniciam nas raízes primárias e secundárias, que apresentam podridão seca na casca, facilmente destacável dos tecidos internos. É comum essa doença afetar inicialmente poucas plantas que, via de regra, encontram-se próximas. A partir desse foco o agente

causal se dissemina por meio do solo e restos culturais contaminados (Laranjeira & Santos Filho, 2002).

O controle das doenças incitadas por estes fungos que apresentam a capacidade de sobreviver no solo e possuem estruturas de resistência, como a fusariose, é dificultado pelo meio em que os mesmos sobrevivem. Assim as medidas são preventivas, e uma vez afetada pelo patógeno, certamente a planta morrerá, pois não há controle curativo (Roncatto et al., 2004). As principais medidas preventivas são: organizar o pomar na ocasião de sua instalação, evitando áreas encharcadas e cultivadas anteriormente com maracujazeiro; efetuar o plantio o mais superficial possível, visando à aeração do colo e das raízes; controlar formigas e plantas daninhas, evitando injúrias na casca; evitar irrigação excessiva, e efetuar adubações equilibradas (São José et al., 1997). Diante do exposto fica evidente que o uso de cultivares resistentes é um dos métodos de controle mais efetivos, econômicos e práticos, sobretudo quando associado ao manejo adequado da cultura.

Três etapas básicas devem ser consideradas em qualquer programa de obtenção e utilização de cultivares resistentes: 1) identificação das fontes de resistência; 2) identificação da herança da resistência para que se possa traçar a melhor estratégia para que a resistência seja duradoura face à natureza dinâmica das populações patogênicas; 3) incorporação destes genes de resistência em cultivares comerciais (Agrios, 2005).

Para a identificação de genes de resistência, o melhorista geralmente recorre ao germoplasma da espécie comercial, que pode já possuir algumas características desejáveis do ponto de vista agrônomo, de forma a reduzir o tempo na obtenção de novas cultivares. Entretanto, em alguns casos os genes inexistem neste tipo de germoplasma ou, se presentes, não conferem um nível satisfatório de resistência, quando os acessos são utilizados de forma isolada. Neste caso, deve-se recorrer a exploração dos recursos genéticos disponíveis, que inclui o uso de espécies silvestres.

Para Valois (1999), entende-se por recursos genéticos a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse sócio-econômico, atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins. Os recursos

genéticos vegetais abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, parentes silvestres das plantas cultivadas, raças locais de plantas, variedades de plantas, linhagens melhoradas e populações experimentais e linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais, dentre outras (Valois, 1999). A diversidade ou variabilidade genética dos recursos genéticos é a base dos trabalhos de seleção e melhoramento, de modo que a sua conservação e caracterização é um grande desafio da pesquisa. A conservação de germoplasma no Brasil é realizada em sua maioria, incluindo o maracujazeiro, por meio de coleções de plantas no campo (conservação *ex situ*), ou na forma de sementes, armazenadas em câmaras frias.

O maracujazeiro é extremamente rico em diversidade biológica, por pertencer ao gênero que possui mais de 400 espécies descritas (Bernacci et al., 2003; Nunes & Queiroz, 2006), sendo 20 delas restritas à Índia, China, Sudeste Asiático, Austrália, ilhas da Oceania e regiões vizinhas. O restante distribui-se dos Estados Unidos ao Chile e Argentina, que inclui as espécies produtoras de frutos comestíveis, os maracujás do comércio ou do extrativismo (Lorenzi et al., 2006). O segundo maior gênero, *Adenia*, apresenta cerca de 100 espécies, com ocorrência na África, Ásia e Oceania (Bernacci et al., 2005).

Para o Brasil (Cervi et al., 2010), são reconhecidos quatro gêneros (*Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast., *Passiflora* L.) e 137 espécies (131 de *Passiflora*), das quais 88 exclusivas do Brasil (endêmicas), sendo que o gênero *Tetrastylis* foi, atualmente, incluído no gênero *Passiflora*.

Apesar de sua importância atual e potencial e do seu elevado número de espécies, esse gênero ainda é pouco explorado comercialmente. A realização de estudos de caracterização de espécies de *Passiflora* é imprescindível para subsidiar o uso econômico dessas espécies, contribuindo para a sua conservação (Faleiro et al., 2005). Considerando as potencialidades e a grande diversidade genética desse gênero, podemos dizer que o número de acessos conservados em bancos de germoplasma, em nível mundial, de aproximadamente 1200 é modesto (Ferreira, 2005).

Há grande variabilidade genética a ser explorada dentro do gênero *Passiflora* (Bernacci et al., 2005), visto serem observadas variações no florescimento, produtividade, resistência a pragas e doenças, tolerância ao frio e

características de fruto (Meletti, 2003). Estas plantas poderiam ser submetidas ao melhoramento genético, vindo também a construir novas fontes de alimento (Pereira, 1998). Dessa forma, Oliveira & Ruggiero (2005) ressaltam que é de grande importância a intensificação das pesquisas visando ao maior conhecimento do germoplasma do maracujazeiro silvestre. Assim, é de interesse estudar as espécies desse gênero, cultivados ou não, visando ampliar o seu cultivo comercial e identificar fontes de resistência às doenças, incluindo a fusariose.

Entretanto, não é somente necessária a identificação de fontes de resistência e a incorporação destas em cultivares. Como já foi dito, um dos passos do programa de melhoramento é traçar a melhor estratégia para que a resistência seja durável face à natureza dinâmica das populações patogênicas. Portanto, é importante e fundamental conhecer as raças e/ou patótipos predominantes em um determinado local e sua epidemiologia, para facilitar os programas de melhoramento e conhecer a variabilidade do fitopatógeno, que é essencial na estabilidade e durabilidade da resistência (Lucas, 1998). Há na literatura inúmeros exemplos de substituição de cultivares originalmente resistentes devido ao aparecimento de raças patogênicas capazes de superar essa resistência (Agrios, 2005). Além disso, são apresentadas diferenças na severidade da doença. Isto porque, uma determinada cultivar resistente em um local pode não ser em outra, devido a divergência genética entre os patógenos, o que torna necessário a caracterização molecular dos envolvidos na doença.

Dentro do gênero *Fusarium*, existe 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 *forma specialis* foi introduzido por Snyder & Hansen (1940), para reconhecer isolados patogênicos que são morfológicamente semelhantes a isolados da mesma espécie, mas que se diferenciam na habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Ou seja, cada grupo de *forma specialis* é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o elevado grau de especificidade de hospedeiro (Nelson et al., 1983).

As espécies e *formae speciales* que formam o gênero *Fusarium* são agentes etiológicos de muitas doenças de importância econômicas em plantas



cultivadas. Algumas espécies são organismos que causam decomposição e estão associadas com podridões em órgãos de reserva de vários vegetais (*Fusarium moliniforme*, podridão da cana-de-açúcar); outras espécies são invasoras do tecido cortical, causando “damping off” ou tombamento (*Fusarium* spp., em eucalipto, cebola, fumo e tomate); podridões de raízes e da coroa e cancrios do caule (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, em feijoeiro) e outras são parasitas vasculares altamente específicos, como as várias *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*. Isolados patogênicos estão classificados em mais de 120 *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (Baayen, 2000). Entre algumas doenças de importância econômica podem ser citadas: murcha do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), murcha de fusarium do feijoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*), murcha da bananeira (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*); murcha do algodoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *vasenfectum*) (Bedendo, 1995), e a murcha do maracujazeiro, como já foi dito.

Em nível de raças o patógeno é específico a cultivares, por exemplo, para a cultura da banana existem quatro raças predominantes de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* já identificadas (Groenewald et al., 2006). Para o tomate e melão existem três raças predominantes em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Reis et al., 2005) e *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Namiki et al., 2000), respectivamente. No maracujazeiro, ainda não foram definidas raças patogênicas e muito pouco se sabe à respeito da variabilidade genética dos isolados coletados em campos infestados.

Nas últimas décadas várias metodologias moleculares têm sido desenvolvidas, contribuindo significativamente para um grande avanço da caracterização de microrganismos. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphi DNA*), microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*) e sequências de subunidades do rDNA (Baayen et al., 2000; Abd-Elsalam et al., 2004; Bogale et al., 2006; Stewart et al., 2006; Groenewald et al., 2006; Bayraktar et al., 2010; Dubey et al., 2010).

A classe de marcadores AFLP vem se destacando para a caracterização do complexo *Fusarium oxysporum*. Esses marcadores aliam a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade de amplificação da PCR (*Polimerase*

*Chain Reaction*) (Vos et al., 1995). O AFLP se baseia no polimorfismo detectado que se traduz em padrão de fragmentos originados pela digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição, uma de corte raro e uma de corte frequente. Após a digestão, os fragmentos recebem sequências, denominadas adaptadores, que se ligam às suas extremidades. São então amplificados, seletivamente, em reações de PCR, utilizando-se como iniciadores as sequências complementares às dos adaptadores acrescidos de 1 a 3 nucleotídeos arbitrários, que realizam a seleção dos fragmentos que serão amplificados. Assim, a reprodutibilidade e eficiência da técnica a tornaram mais ampla para a análise de populações de *Fusarium* (Abd-Elsalam et al., 2002; Sivaramakrishan, et al., 2002; Abdel Satar, et al. 2003, Leslie et al., 2005).

Outra ferramenta molecular utilizada para a caracterização, estudos filogenéticos e para taxonomia de fungos é o PCR-RFLP da região ITS. Essa região está localizada entre os genes 18S e 28S e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (Hillis & Dixon, 1991). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (Schlotterer et al., 1994). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento (Gerbi, 1985), sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros (Antoniolli et al., 2000; Gomes et al., 2002).

Diante dos problemas expostos em relação aos enormes danos econômicos e sociais causados pela fusariose do maracujazeiro, associado à falta de variedades resistentes e os escassos conhecimentos sobre as variações genéticas do seu agente patogênico, este trabalho teve como objetivo a avaliação de 31 acessos de germoplasma disponível no BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura para definir as potencialidades de cada acesso quanto à resistência à doença e a caracterização molecular de 14 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* com o uso de marcadores moleculares do tipo AFLP e PCR-RFLP, de forma a conhecer as diferentes formas de estruturação deste importante agente infeccioso do maracujazeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K.A.; KHALIL, M.S.; ALY, A.A.; ASRAN-AMAL, A. Genetic diversity among *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates revealed by UP-PCR and AFLP markers. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, p. 1–7, 2002.

ABD-ELSALAM, K. A., OMAR, M. R. MIGHELI, Q. NIRENBERG, H. I. Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Journal Plant Disease Protect**, v. 111, p. 534–544, 2004.

ABDEL-SATAR, M.A.; KHALIL, M.S.; MOHMED, I.N.; ABD-ELSALAM, K.A.; VERREET, J.A.; Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 51–55, 2003.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5° Ed. Elsevier Academic Press, California, p. 518-526, 2005.

ALEXPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL. M. **Introductory mycology**. 4. ed. New youk: J. Wiley, 880 p. 1996,

ANTONIOLLI, Z.I.; SCHACHTMAN, D.; OPHELKELLER, D.; SMITH, S.E. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycology Research**, v.104, p. 708-715, 2000.

BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot diseases. **Phytopathology**, v. 90, p. 891-900, 2000.

BASTOS, C. N. Produção de metabólitos tóxicos por *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* causando murcha de plântulas de maracujá (*Passiflora edulis* Sims). **Turrialba**, v. 26, p. 371-373, 1976.

BAYRAKTAR, H.; TÜRKKAN, M.; DOLAR, F. S. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP Analysis. **Journal of Phytopathology**, v, 158, p. 691–697, 2010.

BECKMAN, C.H. **The nature of wilt diseases of plants**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A., 182 p.1987,

BEDENDO, I. P. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p. 838-847, 1995.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de Maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina - DF: EMBRAPA Cerrados, p. 559-586, 2005.

BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. 2003. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (coord.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 3, p. 247-274, 2003.

BOGALE, M., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. AND STEENKAMP, E.T. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. **Fungal Diversity**, v. 23, p. 51-66, 2006.

CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2010. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>> Acessado em: 22 jan. 2011.

CHAVES, R.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; MANICA, I.; PEIXOTO, J.R.; PEREIRA, A.V.; FIALHO, J.F. Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 120-123, 2004.

DUBEY, S. C.; TRIPATHI, A.; SINGH, S. R. ITS-RFLP fingerprinting and molecular marker for detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. **Folia Microbiológica**, v. 55, p. 629-634, 2010.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafio da pesquisa. In: **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**, p. 187-209, 2005.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 143-158, 2005.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causado por *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 250-258, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO Statistical Databases. **FAOSTAT**, 2008. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso em 22 fev. 2011.

GARCÍA-MACEIRA, F. I.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M.I.G. Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.13, p.359-365, 2000.

GERBI, S.A. Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. **Molecular Evolutionary Genetics**, p. 419-517, 1985.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C. M.; BARROS, E.G., BORGES, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetic Molecular Biology**, v. 25, p. 477-483, 2002.

GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. Fruta da Paixão: panorama econômico do maracujá no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 36, p. 29-36, 2006.

GROENEWALD, S.; BERGA, N.V.D.; MARASASB, W.F.O.; VILJOEN, A. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, v. 110, p. 297-305, 2006.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, v. 66, p. 411-453, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. **Soluções fruta a fruta**, 2009. Disponível em: < <http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

LARNAJEIRA, F. F.; SANTOS FILHO, H. P. Podridões radiculares e murchas do maracujazeiro. **Comunicado Técnico**, Embrapa, 2002.

LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A.; LAMPRECHT,S.C.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology**, v. 95, p. 275–283, 2005.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M. & SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura***. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 674 p. 2006.

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

MANICA, I. **Fruticultura tropical: maracujá**. In: Doenças e Pragas. 26. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, p. 105-121, 1981.

MATTA, F. P. **Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* em maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2005. 230 p. Tese de Doutorado.

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

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.

MELETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*passifloraceae*) (1 CD-ROM). In: simpósio brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. da S. . *Melhoramento Genético do Maracujá: passado e futuro*. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F.(Org.). **MARACUJÁ - Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, v. 1, p. 55-78, 2005.

NAMIKI, F.; SHIMIZU, K.; SATOH, K.; HIRABAYASHI, T.; NISHI, K.; KAYAMURA, T.; TSUGE, T. Occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1 in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, p. 12-17, 2000.

NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. 193p. 1983.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, p. 194-226, 2006.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 153 p. Tese de Doutorado.

OLIVEIRA, E.J.; SANTOS, V.S.; LIMA, D.S.; MACHADO, M.D.; LUCENA, R.S.; MOTTA, T.B.N.; CASTELLEN, M.S. Seleção em progênies de maracujazeiro-amarelo com base em índices multivariados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1543-1549, 2008.

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

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 143-158, 2005.

PEREIRA, M. C. N. **Fenologia, Produção e Conservação de Frutos de *Passiflora H. B. K.* nas condições de Jaboticabal – SP**. Universidade Estadual Paulista – UNESP. Jaboticabal. 1998. Dissertação (Mestrado).

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.



RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 552-554, 2004.

RUIZ-ROLDÁN, M. C.; DI PIETRO, A.; HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D.; RONCERO, M. I. G. Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 530–536, 1999.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; MAKAMURA, K. I.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**, Brasília, 64 p. 1996.

SANTOS FILHO, H.P. Doenças do sistema radicular do maracujazeiro. In: **Maracujá: do plantio à colheita**. 388p. 1998.

SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER, C. H.; HOFFMANN, M. In Manica, I. (Ed.). **Maracujá: Temas Seleccionados (1) Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 72p. 1997.

SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M.T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 513-522, 1994.

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

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67, 1940.

STENZEL, N. M. C.; SERA, T. Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., 1999, Londrina. **Anais**. Londrina: IAPAR-SBF, p. 81, 1999.

STEWART, J. E.; KIM, M.; JAMES, R. L.; DUMROESE, R. K.; KLOPFENSTEIN, N. B. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* Isolates from a Conifer Nursery. **Phytopathology**, v. 96, p. 1124-1133, 2006.

VALOIS, A. C. C. A biodiversidade e os recursos genéticos. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds). **Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em 10 jan. 2011

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

YAMASHIRO, T. et al. Doenças do maracujazeiro constatadas no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2. Viçosa, 1973. **Anais...** Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 2, p. 411-419, 1973.

## **CAPÍTULO 1**

### **IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À FUSARIOSE NO GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO**

## IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA À FUSARIOSE NO GERMOPLASMA DE MARACUJAZEIRO

**Autora:** Aline dos Santos Silva

**Orientador:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Orientador:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dra. Maria Angélica P. de C. Costa

**RESUMO:** Objetivou-se a avaliação de 31 genótipos de maracujazeiro (*Passiflora* sp.), dentre acessos de germoplasma e híbridos melhorados, quanto à reação à fusariose causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). Foram avaliadas em média 20 plântulas de maracujazeiro com cerca de 50 dias de idade. Os genótipos foram inoculadas utilizando o método de imersão das raízes em suspensão de  $10^6$  macroconídios.ml<sup>-1</sup> por cinco minutos e depois transplantadas para vasos contendo mistura de terra e substrato estéril. Utilizou-se a variedade FB100 como testemunha comercial. Até 120 dias após a inoculação (DAI), avaliou-se diariamente, o número de plantas mortas para a obtenção da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), e análise de agrupamento dos genótipos. Os sintomas de murcha e morte das plantas iniciaram-se no 10<sup>o</sup> DAI no genótipo BGP181 e se estendeu até o período final de avaliação, o que demonstra grandes diferenças no comportamento dos materiais e que a resistência é dependente do genótipo. O índice de mortalidade variou de 0 a 100% e a AACPD variou de 0, para genótipos sem sintomas da doença a 6.650,63, para o híbrido de maracujazeiro HFOP-01. O agrupamento permitiu a classificação dos genótipos em quatro subgrupos, os resistentes (um acesso de maracujazeiro amarelo, um de maracujazeiro doce, cinco de *P. cincinnata* e um híbrido), moderadamente resistente (quatro acessos de maracujazeiro amarelo, dois acessos de maracujazeiro roxo, e um híbrido), susceptível (seis acessos de maracujazeiro amarelo, quatro de maracujazeiro roxo e quatro híbridos) e altamente susceptível (um acesso de maracujazeiro amarelo e dois híbridos).

**Palavras-chave:** maracujá, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP), melhoramento genético, murcha do maracujazeiro.

## IDENTIFICATION OF RESISTANCE SOURCES TO FUSARIOSIS FROM PASSION FRUIT GERMLASM

**Author:** Aline dos Santos Silva

**Adviser:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Adviser:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dr Maria Angélica P. de C. Costa

**ABSTRACT:** Thirty-one passion fruit (*Passiflora* sp.) genotypes, including accessions of germplasm and improved hybrids, were evaluated to resistance of fusariosis caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). We evaluated an average of 20 passion fruit seedlings with about 50 days old. Roots of the genotypes were immersed in a suspension of  $10^6$  macroconidia.ml<sup>-1</sup> for five minutes and then transferred to pots containing mix of soil and sterile substrate. A commercial check variety (FB100) was used. Until the 120 days after inoculation (DAI), the number of dead plants was evaluated daily, to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC), and further cluster analysis of genotypes. Symptoms of wilt and plant death began on the 10th day after inoculation in BGP181 genotype, and continued until the final period of evaluation. This find shows large differences in the behavior of the materials and that resistance is genotype-dependent. The mortality rate ranged from 0 to 100% and AUDPC ranged from 0 to genotypes without symptoms of disease to 6350.63 for HFOP-01, which is a passion fruit hybrid. Genotypes were classified into four subgroups, according the clustering analysis, such as resistant (one accession of yellow passion fruit, one sweet passion fruit, five *P. cincinnata* and one improved hybrid), moderately resistant (four accession of yellow passion fruit, two purple passion fruit and one improved hybrids), susceptible (six accessions of yellow passion fruit, four purple passion fruit and four improved hybrids) and highly susceptible (one accession of yellow passion fruit and two improved hybrid).

**Key-words:** passion fruit, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP), breeding, passion wilt

## 1. INTRODUÇÃO

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora*, o mais importante economicamente e que apresenta o maior número de espécies da família *Passifloraceae* (Bernacci et al., 2003; Nunes e Queiroz, 2006). É um gênero originário da América Tropical e Subtropical, e no Brasil são encontradas cerca de 131 espécies de *Passiflora*, das quais 88 são endêmicas do Brasil (Cervi et al., 2010). Mesmo com a ampla diversidade genética existente nessa família associado às diversas potencialidades de uso de outras espécies, o *Passiflora edulis* Sims, conhecido como maracujá-amarelo ou azedo, é a espécie mais cultivada comercialmente (Ganga et al., 2004; Junqueira et al., 2005).

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de maracujá. Entretanto, a expansão da área plantada foi acompanhada do surgimento ou agravamento de um grande número de doenças. Estes problemas fitossanitários têm reduzido o tempo de exploração econômica da cultura e até mesmo inviabilizado o seu cultivo em determinadas regiões, com perdas podendo chegar a 80% (Fischer et al., 2005).

Dentre as doenças que atacam a cultura, a fusariose ou murcha-do-maracujazeiro ocorre em diversas regiões produtoras, ocasionando grandes perdas devido à morte das plantas, afetando a produtividade e reduzindo a vida útil dos pomares (Liberato & Costa, 2001), gerando prejuízos econômicos e sociais. O fato é agravado pelo sistema de produção da cultura ser caracterizado por pequenas propriedades com tamanho entre 0,5 a 3,0 hectares e mão-de-obra eminentemente familiar. A ocorrência da doença obriga os produtores a mudarem de cultura ou de área, o que nem sempre é possível, pelo pequeno tamanho das propriedades.

A doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) (McKnight, 1951), habitante do solo, com forma sexual desconhecida e que produz esporos dos tipos micronídios, macroconídios e as estruturas de resistência chamadas clamidósporos (Alexopoulos et al., 1996). A importância da fusariose é agravada pelo fato do patógeno ser capaz de sobreviver no solo por longos períodos por meio de clamidósporos, estruturas adaptadas a condições

extremas à espera de condições adequadas para o seu desenvolvimento (Lacaz et al., 2002).

O sintoma mais evidente dessa doença é a murcha rápida dos ramos e folhas que, no entanto, não se desprendem da planta. Essa murcha é causada pela invasão dos vasos do xilema pelas hifas do fungo. Externamente a doença se manifesta por lesões que se iniciam nas raízes primárias e secundárias, que apresentam podridão seca na casca (Laranjeira & Santos Filho, 2002). A causa da murcha pode ser devido a toxinas, enzimas hidrolíticas e reguladores de crescimento agindo isoladamente ou em combinação, (Mai & Abawi, 1987; Leslie et al., 2001; Zemankova & Lebeda et al., 2001). É possível observar internamente os sintomas da fusariose através de corte transversal feito no caule e na raiz onde se percebe o escurecimento marrom-avermelhado dos tecidos do xilema, que se encontram completamente bloqueados pelo crescimento do fungo, se tornando impermeáveis, impedindo assim o transporte de água para outros tecidos e órgãos da planta (Viana et al., 2003).

Essa doença não possui controle curativo e as principais medidas são preventivas, e não eliminam o patógeno (Dianese, 2008). Na literatura existem diversos relatos de autores que buscaram resistência a essa doença, sem sucesso. Yamashiro & Landgraff (1979) recomendaram a enxertia como controle da fusariose e relataram que o *P. alata* (maracujá-doce) foi resistente a doença. Entretanto, em trabalho posterior Yamashiro e Cardoso (1982) alertam que a espécie citada também é suscetível. Por um longo período o maracujá amarelo foi utilizado como porta-enxerto para o maracujá-roxo, considerado suscetível a doença. No entanto, nos últimos anos comprovou-se a suscetibilidade de ambas as formas da espécie de *P. edulis* (Souza, 2004).

O uso de cultivares resistentes é reconhecida como a mais prática e eficiente forma de controle para a maioria das doenças causadas por fungos de solo, incluindo o complexo *Fusarium oxysporum* (Navas-Cortés et al., 2008). Em espécies resistentes, ocorrem processos específicos levando a ativação de resposta de defesa (Koretsky, 2001). Entretanto, as cultivares atualmente disponíveis para o maracujazeiro não apresentam essa resistência. Assim, torna-se necessária a realização de estudos e estratégias de melhoramento para solucionar este problema. Para isso, a exploração dos recursos genéticos do

maracujazeiro é fundamental, considerando a grande diversidade para o gênero *Passiflora*.

Os programas de melhoramento genético do maracujazeiro ainda são recentes, mas também promissores. De acordo com Bruckner et al., (2005) a alta diversidade, ciclo relativamente curto e o interesse pela cultura, são fatores favoráveis para o crescimento das pesquisas nessa área. Tal variabilidade genética é determinante para a identificação e seleção de acessos superiores para resistência ao FOP. Assim, é premente a avaliação e identificação dessas fontes de resistência no germoplasma de maracujazeiro para se conhecer as potencialidades de cada acesso no desenvolvimento de variedades comerciais com resistência duradoura ao patógeno. A identificação dessas fontes de resistência constitui-se na primeira e fundamental etapa do processo.

Este trabalho objetivou a avaliação de 31 acessos de maracujazeiro, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG-Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, quanto a resistência à fusariose por meio de inoculações em condições controladas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

O isolado de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* - FOP002 - utilizado no presente trabalho, foi obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os discos com micélio do fungo crescido em BDA (Batata-Dextrose-Agar) (41 gramas/litro água estéril), foram obtidos de material conservado pelo método Castellani em água destilada estéril à temperatura de 25°C.

### **2.2 Material vegetal**

Para a identificação de fontes de resistência à fusariose utilizaram-se 31 acessos do BAG-Maracujá (código BGP), oriundos de sementes, sendo seis de maracujá roxo, 11 de maracujá amarelo, cinco de *P. cincinnata* Mast., um acesso de *P. alata* Curtis, e oito híbridos de maracujazeiro amarelo. A variedade comercial FB 100 de maracujá amarelo foi utilizada como testemunha (Tabela 1).



Foram analisadas em média 20 plantas por acesso, sendo que cada planta foi considerada como uma observação.

**Tabela 1.** Relação de acessos do BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, híbridos e variedade comercial, utilizados na identificação de fontes de resistência à fusariose.

<b>Acesso</b>	<b>Nome científico</b>
BGP018	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP020	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP023	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP028	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP029	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP033	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP037	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP168	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP177	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP179	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP181	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP185	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP188	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP207	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP208	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP224	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)
BGP229	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)
BGP235	<i>Passiflora alata</i> (maracujá doce)
BGP268	<i>Passiflora cincinnata</i>
BGP290	<i>Passiflora cincinnata</i>
BGP296	<i>Passiflora cincinnata</i>
BGP297	<i>Passiflora cincinnata</i>
BGP298	<i>Passiflora cincinnata</i>
HFOP-01	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-04	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-05	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-07	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-08	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-09	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-10	Híbrido (maracujá-amarelo)
HFOP-13	Híbrido (maracujá-amarelo)
FB 100	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)

## **2.2 Inoculação dos acessos**

O método de inoculação utilizado foi o de imersão das raízes. Para a produção do inóculo, discos de micélio foram repicados para placas de Petri, contendo meio BDA. As culturas foram incubadas em BOD durante 7 dias, a 25°C e 24 h de luz. A suspensão de esporos foi preparada minutos antes das inoculações. A suspensão foi obtida pela liberação dos conídios por meio da adição de 10 mL de água destilada às placas de Petri e raspagem das colônias do fungo. A solução resultante foi filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada e em seguida, a suspensão de conídios foi ajustada para  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com auxílio da câmara de Neubauer. Apenas os macroconídios foram considerados na contagem dos esporos.

As mudas foram retiradas do solo estéril onde foram formadas e as raízes lavadas com água esterilizada. Em seguida, as raízes foram imersas durante cinco minutos na suspensão de conídios e posteriormente, procedeu-se o replantio em vasos plásticos de 15 cm, contendo solo e substrato estéril (vermiculita) na proporção de 3:1. O tratamento da testemunha foi representado por plantas com seus sistemas radiculares mergulhados apenas em água estéril.

## **2.3 Confirmação da morte das plantas por fusariose**

Após alguns testes para o FOP, a melhor forma encontrada para seu isolamento é a descrita a seguir. As mudas que apresentaram sintomas de murcha foram coletadas e partes do caule e raiz foram cortadas e desinfestadas por 1,30 min em etanol 70%, em seguida por 40 segundos em hipoclorito de sódio 0,5% e por último lavadas por duas vezes em água destilada estéril. Os segmentos desinfestados foram transferidos para o meio BDA e após 5 dias as colônias crescidas foram analisadas morfológicamente quanto a presença de macro e microconídios, para a confirmação do patógeno.

## **2.4 Avaliação da doença e análise dos dados**

As avaliações foram realizadas a cada 24 h a partir do 3º ao 120º dia após inoculação (DAI). O período de incubação (PI) foi determinado pelo tempo transcorrido (em dias) entre a inoculação e o aparecimento de sintomas (murcha). As plantas que não apresentaram sintomas da doença tiveram esse período

ajustado para 121 dias, correspondendo ao período de avaliação total acrescido de um dia.

Ao final das avaliações foi analisado o percentual de mortalidade de cada acesso, de acordo com:

$$\% \text{ de mortalidade} = \left( \frac{\text{número de plantas mortas}}{\text{número de plantas}} \right) \times 100$$

À partir destes dados de mortalidade, foi estimada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os acessos de maracujazeiro, que corresponderam a expressão dos sintomas externos ao longo de todo o período de avaliação

A análise de agrupamento foi realizada com o objetivo de separar os genótipos com base nos valores da AACPD. Utilizou-se a distância euclidiana como medida de dissimilaridade, e em seguida esta matriz foi utilizada para proceder o agrupamento dos genótipos com base no método Ward. Todas as análises foram realizadas com o uso do programa estatístico R versão 2.12.0 (R Development Core Team, 2008).

O agrupamento foi confirmado através do teste de comparação de proporções (Zar, 1996) no programa Statistica 7.1 (Statsoft, 2005). Também foi feita a análise de sobrevivência pelas curvas Kaplan-Meier, dos grupos formados, analisando o período desde a inoculação até a morte das plantas, também no programa Statistica 7.1.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Identificação de fontes de resistência à fusariose no BAG-Maracujá**

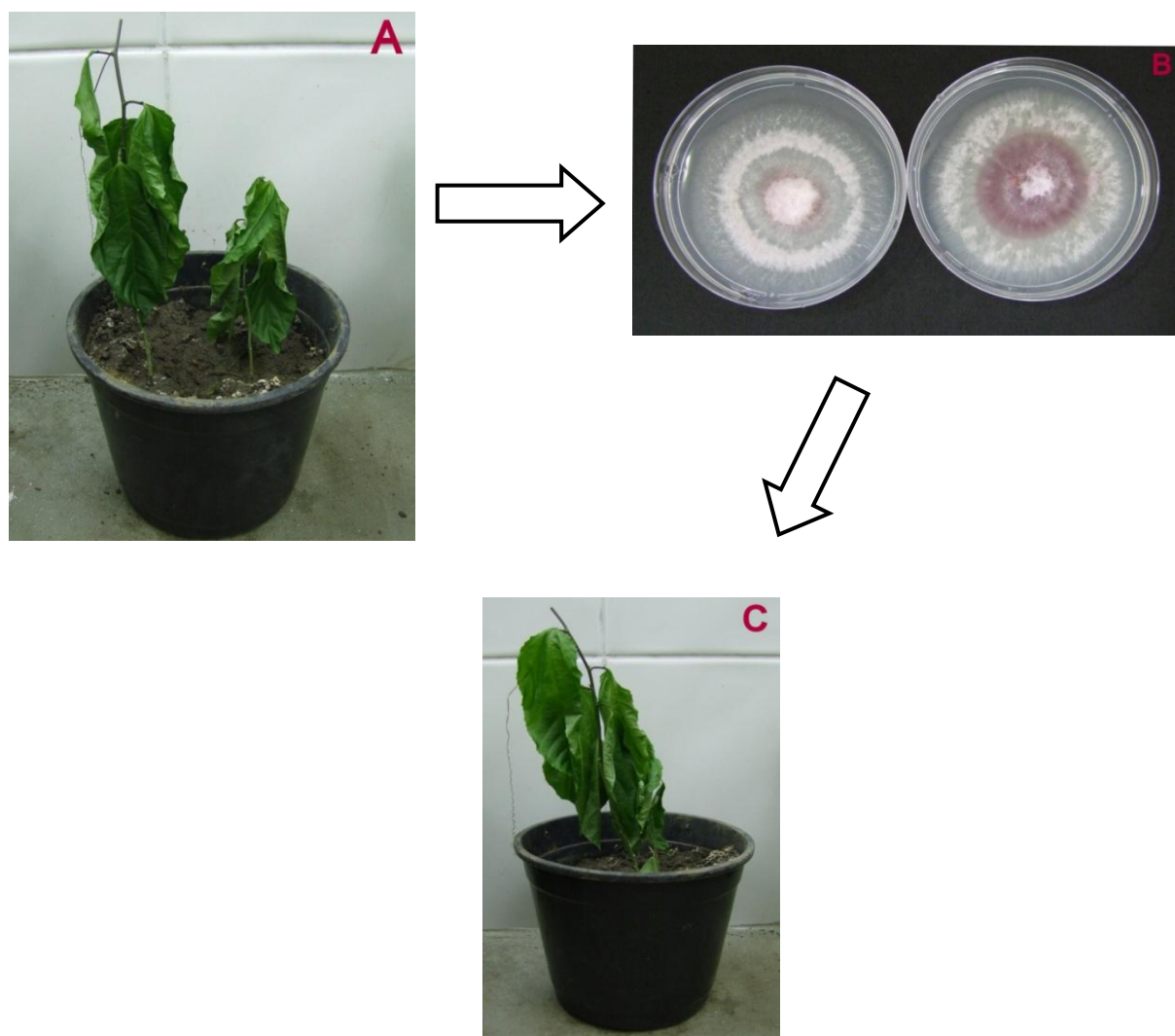
Observaram-se grandes diferenças na resistência ao FOP entre os genótipos de maracujazeiro avaliados. Os sintomas de murcha e posterior morte das plantas iniciaram-se no 7º e 10º DAI, respectivamente no acesso BGP181. Entretanto o período de incubação de todos os acessos foi em média de 55 dias.

Em um total de 900 plantas, 262 apresentaram sintomas de fusariose e posterior morte. Desse total, em cerca de 97,32% das plantas mortas foi possível o reisolamento do patógeno, confirmando a morte por fusariose. Além disso,

alguns isolados obtidos das plantas mortas foram reinoculados em outras mudas para confirmar a patogenicidade do fungo, por meio da manifestação dos sintomas e fechamento do postulado de Koch (Figura 1).

O percentual de mortalidade das plantas por acesso variou de 0 a 100%. O maracujá amarelo BGP018 apresentou o maior índice de mortalidade, com todas as plantas mortas em quatro meses de avaliação. Por outro lado, oito genótipos não apresentaram nenhuma mortalidade por causa da fusariose, sendo um acesso de maracujá amarelo (BGP020), um de maracujá doce (BGP235), cinco de *P. cincinnata* (BGP268, BGP290, BGP296, BGP297, BGP298) e um híbrido (HFOP-07) (Tabela 2).

Índices de mortalidade entre 56 e 85% foram obtidos para um acesso de maracujazeiro roxo (BGP229), um acesso de maracujazeiro amarelo (BGP179) e dois híbridos (HFOP-04 e HFOP-01). Índices de mortalidade entre 5 e 42% foram obtidos na análise de nove acessos de maracujazeiro amarelo (BGP028, BGP037, BGP177, BGP181, BGP185, BGP188, BGP207, BGP224 e FB100), cinco acessos de maracujazeiro roxo (BGP023, BGP029, BGP033, BGP168 e BGP208) e cinco híbridos (HFOP-05, HFOP-08, HFOP-09, HFOP-10 e HFOP-13).



**Figura 1:** Sintomas da fusariose, isolamento e reinfecção em maracujazeiro amarelo. **(A):** Mudas de maracujazeiro do acesso BGP028 inoculadas e com sintomas de fusariose. **(B):** Patógeno FOP isolado a partir das plantas infectadas. **(C):** Muda de maracujazeiro reinoculada como o patógeno, para confirmação da doença.

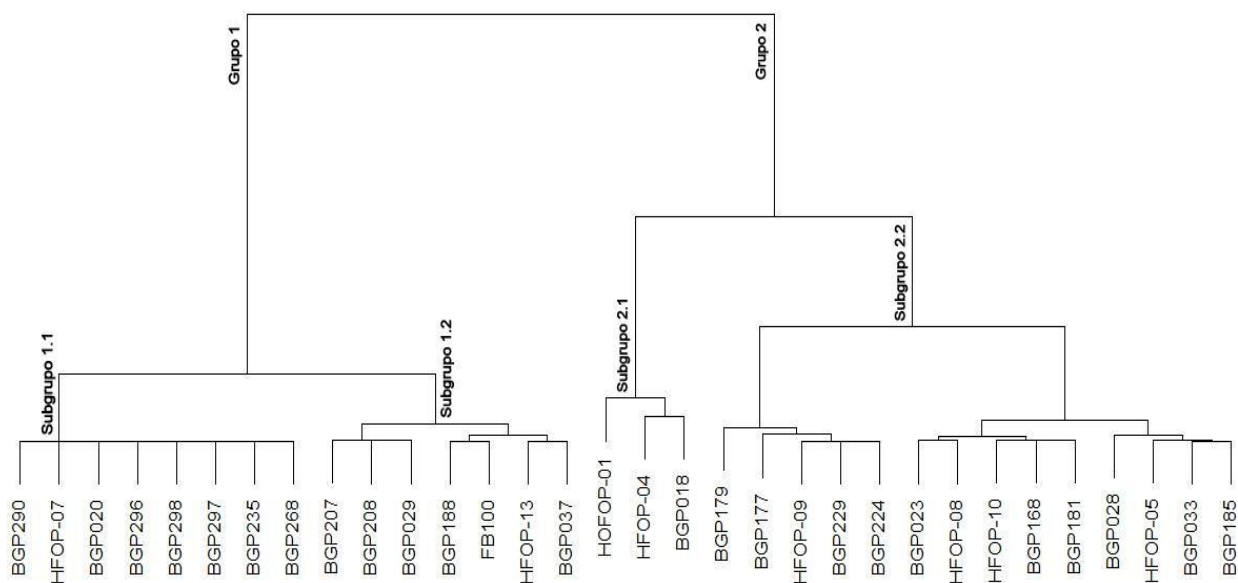
A AACPD variou de 0, para genótipos sem sintomas da doença (BGP020, BGP235, BGP268, BGP290, BGP297, BGP298, BGP296, e HFOP-07) a 6.350,63, para o híbrido de maracujazeiro HFOP-01, que apesar de ter apresentado a segunda maior mortalidade teve período de incubação menor que o acesso BGP018 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados das avaliações provenientes da inoculação FOP 120 dias após a inoculação, quanto à porcentagem de plantas mortas e a AACPD.

<b>Acesso</b>	<b>Nome científico</b>	<b>PI<sup>1</sup></b>	<b>% Mortalidade</b>	<b>AACPD</b>	<b>Nível de resistência<sup>2</sup></b>
BGP020	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	121	0,00	0,00	R
BGP235	<i>Passiflora alata</i> (maracujá doce)	121	0,00	0,00	R
BGP268	<i>Passiflora cincinnata</i>	121	0,00	0,00	R
BGP290	<i>Passiflora cincinnata</i>	121	0,00	0,00	R
BGP296	<i>Passiflora cincinnata</i>	121	0,00	0,00	R
BGP297	<i>Passiflora cincinnata</i>	121	0,00	0,00	R
BGP298	<i>Passiflora cincinnata</i>	121	0,00	0,00	R
HFOP-07	Híbrido (maracujá-amarelo)	121	0,00	0,00	R
BGP029	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	41	5,88	358,68	MR
BGP037	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	72	28,57	791,20	MR
BGP188	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	85	19,04	609,28	MR
BGP207	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	95	27,77	419,33	MR
BGP208	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	49	9,09	301,48	MR
FB 100	Variedade comercial	15	12,76	612,20	MR
HFOP-13	Híbrido (maracujá-amarelo)	39	17,77	759,60	MR
HFOP-01	Híbrido (maracujá-amarelo)	11	85,41	6350,63	AS
HFOP-04	Híbrido (maracujá-amarelo)	10	62,71	3756,21	AS
BGP018	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	14	100,00	5040,05	AS
BGP023	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	13	22,00	1397,00	S
BGP028	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	18	27,58	1861,37	S
BGP033	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	8	17,77	1590,56	S
BGP168	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	22	26,92	1270,68	S
BGP177	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	26	31,57	2317,74	S
BGP179	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	31	56,25	2990,39	S
BGP181	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	7	17,94	1332,79	S
BGP185	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	34	28,57	1599,59	S
BGP224	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá amarelo)	32	33,32	2565,64	S
BGP229	<i>Passiflora edulis</i> (maracujá roxo)	67	80,95	2546,19	S
HFOP-05	Híbrido (maracujá-amarelo)	37	36,84	1665,43	S
HFOP-08	Híbrido (maracujá-amarelo)	30	16,66	1457,75	S
HFOP-09	Híbrido (maracujá-amarelo)	12	42,00	2595,00	S
HFOP-10	Híbrido (maracujá-amarelo)	43	19,04	1204,28	S

<sup>1</sup>PI= período de incubação; <sup>2</sup>R = resistente; MR = moderadamente resistente; S = suscetível e AS = muito suscetível

A matriz de dissimilaridade permitiu agrupar os genótipos em dois grupos principais de resistência à fusariose, aqui classificados como resistentes (Grupo 1) e suscetível (Grupo 2) (Figura 2). Cada grupo se subdividiu em dois subgrupos, totalizando quatro subgrupos classificados como: resistente, moderadamente resistente, susceptível e altamente susceptível, como base na AACPD.



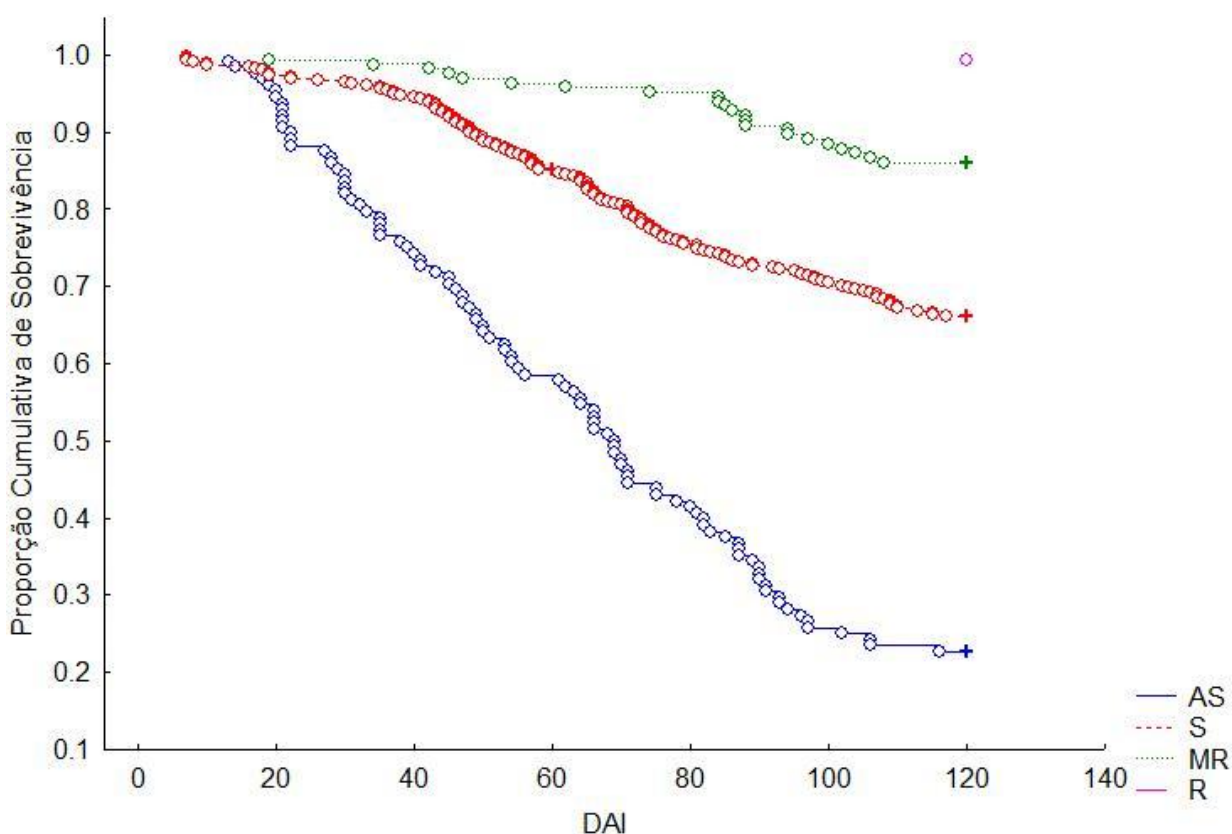
**Figura 2:** Agrupamento dos genótipos de maracujazeiro avaliados para resistência à fusariose com base na área abaixo da curva de progresso da doença.

Dentre os 32 acessos avaliados 25% (oito acessos) foram incluídos na classe dos resistentes, Subgrupo 1.1 (BGP020, BGP235, BGP268, BGP290, BGP296, BGP297, BGP298 e HFOP-07), que incluem um acesso de maracujazeiro amarelo, um de maracujá doce, cinco de *P. cincinnata* e um híbrido. Outros sete como moderadamente resistentes no Subgrupo 1.2 que inclui três acessos de maracujazeiro amarelo (BGP037, BGP188 e BGP 207), dois acessos de maracujá roxo (BGP208 e BGP029), um híbrido de maracujazeiro amarelo (HFOP-13) e a testemunha comercial FB100, com PI médio do grupo de 56 DAI.

No subgrupo definido como altamente susceptível (Subgrupo 2.1), foram classificados um acesso de maracujazeiro amarelo (BGP018) e dois híbridos (HFOP-01 e HFOP-04), com PI médio do grupo de 11 DAI. No Subgrupo 2.2,

classificado como suscetível, foram alocados seis acessos de maracujazeiro amarelo (BGP028, BGP177, BGP179, BGP181, BGP185 e BGP224), quatro acessos de maracujazeiro roxo (BGP023, BGP033, BGP168 e BGP229) e quatro híbridos de maracujazeiro amarelo (HFOP-05, HFOP-08, HFOP-09 e HFOP10), com PI médio do grupo de 27 DAI.

O teste de proporção indicou não existir diferenças estatísticas dentro dos grupos formados. Entretanto, os grupos diferiram estatisticamente entre si, confirmando o agrupamento formado. As curvas de sobrevivência geradas pelo método não-paramétrico Kaplan-Meier estão representadas na Figura 3. Como já era esperado, os subgrupos altamente suscetível e suscetível apresentaram a menor sobrevivência, enquanto que os subgrupos moderadamente resistente e resistente apresentaram a maior sobrevivência.



**Figura 3:** Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência dos grupos, formados a partir dos acessos de maracujazeiro inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*.



Para o agrupamento altamente suscetível a maioria das mortes se concentrou até pouco antes dos 100 dias evidenciando a grande suscetibilidade deste grupo. Enquanto que no grupo classificado como suscetível as mortes se estenderam além dos 100 DAI e para o agrupamento moderadamente resistente as mortes se concentraram 80 DAI.

A distância entre as curvas indicam a existência de diferença estatística entre os grupos. Essas diferenças podem ser comprovadas através do teste Cox's-F test (Tabela 3). Por este teste, pode-se concluir que as comparações duas a duas é significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Valores de probabilidade (p-valor) referentes ao teste de Cox's-F test, considerando-se a hipótese de curvas de sobrevivência estimadas serem iguais.

Comparação	p-valor	Comparação	p-valor
AS x S	$p < 0,001$	S x MR	$p < 0,001$
AS x MR	$p < 0,001$	S x R	$p < 0,001$
AS x R	$p < 0,001$	MR x R	$p < 0,001$

#### 4. DISCUSSÃO

Em geral, os sintomas iniciais da fusariose que incluem murcha, ocorrem entre o 2º e o 4º DAI em diversas espécies (Alexpoulos, 1996). Entretanto, os primeiros sintomas do FOP foram registrados sete dias após a inoculação, no genótipo mais sensíveis, estendendo-se até o 117º DAI em genótipos com algum nível de resistência. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de identificação de fontes de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodoeiro, onde os primeiros sintomas ocorreram entre o 10 e 19º DAI, dependendo do nível de resistência da cultivar (Machado, 2008). Por outro lado, no caso do maracujazeiro, o início e a continuidade dos sintomas foram muito variáveis em cada acesso, o que indica que a seleção de plantas resistentes parece ser um processo genótipo dependente e de longo prazo, mesmo em condições controladas para o crescimento do fungo e manifestação dos sintomas. A ocorrência de mortes de plantas em determinados acessos próximos ao período final de avaliação (120 DAI) indica que estas avaliações devem ser estendidas por um período maior.

Um período de incubação longo é um importante componente de resistência parcial de uma espécie de planta hospedeira a um dado patógeno (Van der Plank, 1963). O acesso BGP207, classificado como moderadamente resistente, apresentou maior taxa de mortalidade que o HFOP-08, agrupado como suscetível. Entretanto, a AACPD do primeiro foi menor que a do segundo. Isso pode ser explicado pelo período de incubação, que foi de 95 dias para BGP207 e de 30 dias para HFOP-08. O PI médio foi maior para grupos com maior nível de resistência, como foi 56 DAI no grupo moderadamente resistente e de 27 DAI para o grupo suscetível.

A análise dos resultados com base nos dados de AACPD permite distinguir a resistência entre os acessos com confiabilidade, por englobar tanto o tempo de avaliação quanto a severidade da doença. Com base neste critério, e contrariamente à hipótese de que o maracujá-roxo é uma das formas mais suscetíveis de *Passiflora* (Morwani, 2008), os resultados deste estudo revelaram que embora hajam acessos considerados suscetíveis como BGP023 e BGP033, existem diferentes germoplasmas da forma roxa com níveis de resistência à fusariose, ou seja, BGP029 e BGP208 (moderadamente resistentes).

Segundo Roncatto et al., (2004), a busca de resistência dentro de *P. edulis* é importante por viabilizar a obtenção de materiais genéticos resistentes, com potencial comercial em um espaço curto de tempo. Por outro lado, Laranjeira et al., (2005) quantificaram a incidência da murcha de *Fusarium* em plantas de maracujá-amarelo enxertadas em *P. edulis*, *P. alata*, *P. gibertii* e *P. cincinnata*, por meio da análise de sobrevivência e revelaram que a incidência final foi muito semelhante nos quatro porta-enxertos, porém o de maracujá-amarelo apresentou um perfil de sobrevivência diferente e pior que os demais. Contudo, apenas quatro acessos foram avaliados neste trabalho e como a resistência ao FOP parece ser genótipo dependente é possível que especificamente estes, sejam altamente suscetíveis à fusariose. Isso pode ser confirmado pelo fato de que dos 20 genótipos de maracujazeiro amarelo avaliados, entre germoplasma e híbridos, três foram considerado altamente suscetíveis, 10 suscetíveis e outros cinco moderadamente resistentes, ainda assim um acesso de germoplasma (BGP020) e um híbrido de maracujazeiro amarelo (HFOP-07) foram considerados resistentes à fusariose.

Estas observações são muito relevantes para a cultura, pois o híbrido HFOP-07 já possui características agronômicas altamente competitivas em relação às cultivares disponíveis no mercado. Além disso, apesar dos acessos BGP020 (R), BGP029, BGP037, BGP188, BGP207 e BGP208 (MR) não serem competitivos do ponto de vista agronômico, por pertencerem à espécie *P. edulis*, compartilham características fenotípicas que facilitam a transferência dos genes de resistência à fusariose via programas de melhoramento.

Dentre os genótipos classificados como resistentes, inclui-se os cinco acessos de *P. cincinnata* investigados, assim como o genótipo de *P. alata*. Avaliações em nível de campo têm mostrado que a espécie *P. cincinnata*, apresenta resistência à fusariose, além de outras doenças de importância econômica do maracujazeiro, como a virose, antracnose e bacteriose. Isto indica alto potencial para uso deste germoplasmas em futuros cruzamentos com espécies cultivadas comercialmente para resistência a fusariose. *P. cincinnata* é considerada uma espécie vigorosa e apresenta ampla adaptação, características importantes para a sua utilização em programas de melhoramento do maracujazeiro (Ruggiero & Oliveira, 1998; Santos, 2006).

Como espécies silvestres podem servir de alternativas para a ampliação da base genética da resistência, Coppens D'eeckenbrugge (2005) mencionou vários autores que conseguiram sucesso no cruzamento de *P. alata* com outras passifloras. Junqueira et al. (2005) também relataram a obtenção de híbridos interespecíficos de *P. alata* com outras passifloras, o que amplia ainda mais as possibilidades de uso destas espécies. São José et al. (2000) testaram as espécies *P. edulis*, *P. alata*, *P. macrocarpa*, *P. giberti*, *P. laurifolia* e *P. foetida* em local infestado com fusariose e observaram que *P. alata* e *P. giberti* apresentaram melhor comportamento em relação à morte provocada por fusariose. Oliveira e Ruggiero (1998) relatam diversas espécies silvestres, dentre elas *P. cincinnata* e *P. alata* que além de apresentarem ampla adaptação, possuem características de resistência a doenças como porta-enxerto do maracujazeiro amarelo, o que as torna promissoras para o uso no melhoramento genético.

Atualmente, em função da inexistência de fontes de resistência no germoplasma de *P. edulis*, o melhoramento genético visando a obtenção de variedades de maracujazeiro resistentes às doenças do sistema radicular, tem

sido direcionada para a obtenção de híbridos interespecíficos, às vezes sem muito sucesso, em função da incompatibilidade entre espécies e mesmo esterilidade dos híbridos gerados. Entretanto, as observações do presente trabalho podem contribuir em muito para a geração de genótipos com resistência à fusariose e ainda com padrão comercial de frutos e competitividade agrônômica, em menor tempo do que o necessário nos cruzamentos interespecíficos.

Embora possam ser analisados de distintas maneiras, é a análise de sobrevivência que fornece ferramentas especialmente criadas para lidar com dados nos quais a variável resposta é um “tempo até a ocorrência de um evento” (Cox & Oakes, 1984; Kleinbaum, 1995; Scherm & Ojiambo, 2004). Na terminologia da análise de sobrevivência define-se tempo de sobrevivência como o período desde o início do acompanhamento até a ocorrência de um evento qualquer; evento neste caso pode ser morte, aparecimento de sintomas, germinação, ou qualquer acontecimento de interesse. Para este estudo, o evento foi a morte de cada planta. As curvas Kaplan-Meier de sobrevivência relacionam as probabilidades de um indivíduo sobreviver num dado momento, na escala de tempo considerada. Essas curvas permitem não apenas uma comparação visual de tratamentos, mas também a descrição das próprias curvas por variáveis como o tempo médio de sobrevivência, a taxa média de risco e a mediana da sobrevivência. Uma característica importante dos dados de sobrevivência é a presença de censuras, as quais são consideradas observações incompletas e se caracterizam como dados de indivíduos em que a ocorrência não foi verificada.

As curvas de sobrevivência dos quatro grupos indicam que a maioria das mortes ocorreu entre 45 aos 100 dias, e sugerem que o período de avaliação deva se de pelo menos 150 dias. Esse fato pode explicar algumas espécies que foram considerados resistentes, mas que quando estão em campos infestados durante um ou dois anos, têm comportamento susceptível ao patógeno, como *P. cincinnata* no trabalho de Laranjeira et al., 2005. As curvas confirmaram os agrupamentos formados com base na AACPD.

O próximo passo no estudo da resistência genética destes acessos refere-se ao direcionamento das pesquisas para entendimento da herança da resistência ao FOP. A resistência das plantas aos patógenos é classificada como monogênica, oligogênica ou poligênica (Agrios, 2005). A interação *Fusarium*

*oxysporum*-planta é bem estudada para muitas culturas e sabe-se que a maioria das plantas possui o mecanismo genético para se defender e, conseqüentemente, a suscetibilidade das plantas a alguns patógenos é o resultado de uma falha da planta para detectar rapidamente a presença do patógeno ou falta de um gene importante para a resistência (Hammershimidt, 2001), ou ainda alguma mudança genética no fungo que não permite a interação de sinais entre patógeno-hospedeiro, impedindo assim a reação da planta.

Segundo Van der Plank (1963) existem resistências efetivas contra algumas raças de patógenos, ditas verticais ou qualitativas e resistências contra todas as raças de patógenos, chamadas de horizontais ou quantitativas. Geralmente a resistência vertical é monogênica, enquanto que a horizontal é oligo/poligênica (Agrios, 2005). Apesar de ser mais trabalhosa, demorada e complexa, a incorporação da resistência horizontal em cultivares comerciais, vai também contribuir para sua maior durabilidade (Van der Plank, 1963), sendo mais adequada para essa cultura.

O controle genético da resistência à murcha do maracujazeiro ainda é desconhecido, sendo que as hipóteses de controle monogênico, poligênico ou mesmo integrando os dois tipos de resistência precisam ser avaliadas. Para outras doenças que atacam o maracujá, como a bacteriose, estudos preliminares indicam existência significativa de resistência horizontal em espécies e híbridos interespecíficos de maracujazeiro (Junqueira, 2010). Até o presente nenhum gene para resistência ao FOP foi descrito e a interação genética desse sistema, ainda é desconhecida. Entretanto, há vasta literatura para muitas culturas onde esses genes de resistência ao *Fusarium* já foram identificados. Para a resistência de *Arabipodis thaliana*, seis genes de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiole*, entre eles RFO1, RFO2, RFO4, RFO6, já foram descritos (Diener et al., 2005). Em plantas de tomate o gene de resistência I-3SIX-1 desencadeia a reação de reconhecimento que resulta na resistência da planta (Rep et al., 2005). Na verdade, seis *locus* que conferem resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* já foram identificados em genomas de tomate (Sela-Buurlage et al. 2001). Para a resistência do grão-de-bico às raças 0, 1A, 2 e 4 são consideradas digênicas ou trigênicas, enquanto que, para as raças 3 e 5 é monogênica (Jímenes-Díaz et al., 1993).

Com relação a diferença na resistência das plantas dentro de cada genótipo, uma hipótese plausível pode estar relacionada a alta heterozigosidade do maracujazeiro, por se tratar de uma planta alógama com autoincompatibilidade esporofítica-gametofítica (Suassuna et al., 2003), o que confere grande variabilidade genética dentro da espécie e de acessos. Assim, considerando a resistência do maracujazeiro à fusariose como quantitativa, a mortalidade de plantas dentro de cada genótipo estaria diretamente relacionada com a frequência alélica dos genes de resistência. O fato de se ter utilizado apenas um isolado, também pode ter interferido nos resultados, uma vez que, a reação das plantas a diferentes isolados diferentes pode ser diferenciada.

As plantas desenvolveram vários mecanismos de defesas ao longo da coevolução com os microrganismos que incitam doenças. Estas defesas podem ser de natureza estrutural ou química. Morwani (2008) fez um estudo de espécies de *Passiflora* resistentes à murcha do maracujazeiro de acordo com os níveis de quitinase, uma enzima comum envolvida na resistência de plantas. Poucos fungos são sensíveis a quitinase isoladamente, porém muitos são sensíveis a combinação desta com a  $\beta$ -1,3-endoglucanase (Stahl e Bishop, 2000). Segundo Morwani (2008), as plantas têm diferentes formas e quantidades da enzima, o que pode ser a razão para a variação da resistência. Como resultado do estudo, os níveis de quitinase aumentaram com o passar do tempo em plantas não infectadas, quando comparadas com as que apresentaram a doença. Outros autores indicam que 15% da parede celular do *Fusarium oxysporum* é composta por quitina e o restante de glicogênio e proteína Alexopoulos (1996), que implicaria na existência de outros mecanismos como responsáveis pela resistência das espécies indicadas, embora o mecanismo de defesa por quitinase possa ser um deles (Morwani, 2008).

O maracujazeiro apresenta grande variabilidade genética natural para as diversas características de planta e de fruto (Meletti, 2003). Grande parte da diversidade genética do gênero *Passiflora* se encontra dispersa no território brasileiro, colocando nosso país entre os principais centros de diversidade genética dessa espécie (Oliveira et al., 2008). É possível explorar toda essa diversidade em programas de melhoramento, com significativos ganhos genéticos (Meletti & Brukner, 2001). Dessa forma, a caracterização e avaliação das

espécies de interesse são ferramentas indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento, podendo revelar recursos genéticos de grande valor.

A identificação de fontes de resistência à fusariose em condições controladas uniformiza as condições ambientais para que diferenças na manifestação dos sintomas sejam exclusivamente de efeito genético. Entretanto, a resposta da resistência deve ser confirmada em nível de campo sob infestação natural do FOP. Vale salientar que este foi um estudo preliminar, mas que possibilitou a pré-seleção de oito acessos classificados como resistentes e que serão levados para campos infestados com o patógeno para a realização de outros testes e confirmação dos resultados aqui encontrados. É também fundamental o estabelecimento de um sistema de monitoramento constante da variabilidade do patógeno, incluindo o potencial surgimento de novas variantes.

O sucesso em um programa de melhoramento está intimamente ligado à avaliação eficiente de um grande número de acessos em um curto espaço de tempo e com pouco uso de recursos físicos e financeiros. Dentro desta perspectiva, este *screening* inicial garante confiabilidade dos resultados, além de reduzir o número de acessos a serem avaliados em condições de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ed. Elsevier Academic Press, California, p. 518-526. 2005.

ALEXPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL. M. **Introductory Micology**. 4ed. New youk: J. Wiley, 880 p. 1996.

BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. 2003. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (coord.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 3, p. 247-274, 2003.

BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÉGO, M.; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In:

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**, p. 317-338, 2005.

CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. **Promesas de las pasifloras**, 2005. Disponível em: <[http://www.reuna.edu.co/temporales/memorias/especies/magistrales/24\\_pasifloras%20medellin2\\_geo.htm](http://www.reuna.edu.co/temporales/memorias/especies/magistrales/24_pasifloras%20medellin2_geo.htm)>. Acesso em: 26 set. 2005.

COX, D.R.; OAKES, D. **Analysis of Survival Data**. London, Chapman & Hall, 1984.

DIANESE, A.D. Manejo de doenças causadas por *Fusarium* spp. no maracujazeiro. **Toda Fruta**, 2008. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acessado em 17 dez. 2010.

DIENER, A.C. AND AUSUBEL, F.M. Resistance to *Fusarium Oxysporum*, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. **Genetics**, v. 171, 305–321, 2005.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causado por *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 250-258, 2005.

GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares f-AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 494-498, 2004.



HAMMERSCHMIDT, R. Cytological and biochemical aspects of the induced resistance response of cucumber to fungal pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 253-254, 2001.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M., ALCALÁ-JIMÉNEZ, A.R.; HERVÁS, A.; TRAPERO-CASAS, J.L. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem. In: **Proceeding of European Seminar: Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity, and Host Resistance**, 3r' (E. Arseniuk and T. Goral, Eds.), Breeding and Acclimatization Institute, Radzikov, Poland, p. 87–94, 1993.

JUNQUEIRA, K. P. **Resistência genética e métodos alternativos de controle da bacteriose do maracujazeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae***. Universidade de Brasília, DF. 2010, 160 p. Tese de Doutorado.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; PAULA, M.S.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base em marcadores moleculares. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO. Planaltina. **Trabalhos apresentados...** Planaltina: Embrapa Cerrados. p.122–127, 2005.

KLEINBAUM, D.G. **Survival Analysis: a self-learning text**. New York, Springer-Verlag. 1995.

KORETSKY, L.S., 2001. The influence of *Fusarium oxysporum* infection and low temperature on the activity soybean esterase and PR proteins. **Icel Agronomic Science**, v.14, p. 67–73, 2001.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Tratado de Micologia Médica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Sarvier, p. 34-46, 2002.

LARANJEIRA, F. F.; SANTOS FILHO, H. P. Podridões radiculares e murchas do maracujazeiro. **Comunicado Técnico**, Embrapa, 2002.

LARANJEIRA, F. F.; LIMA, A.A.; COSTA, M.M.; PFENNING, L. Progresso da fusariose do maracujá em porta-enxertos do gênero *Passiflora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.146, 2005. Suplemento.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 107-117, 2001.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H. Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, p.243-245, 2001.

MACHADO, L. P. **Seleção para resistência à murcha-de-fusário em genótipos de algodoeiro**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, RE. Dissertação (Mestrado). 2008.

MAI, W.F.; ABAWI, G. S. Inter-reactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 317-38, 1987.

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

MELETTI, L.M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoramento Genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**, p. 345-38, 2001.

MELETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*passifloraceae*) (1 CD-ROM). In: simpósio brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003

MORWANI, G. R. **Screening *Passiflora* species for drought tolerance, compatibility with purple passion fruit, fusarium wilt resistance and the relationship between irrigation, drenching and media composition in the control of fusarium wilt.** The Ohio State University, 2008, 232 p. Dissertação (Mestrado).

NAVAS-CORTÉS J. A.; LANDA B. B.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ J.; JIMÉNEZ-DÍAZ R. M.; CASTILLO P. Infection by *Meloidogyne artiellia* does not break down resistance to races 0, 1A, and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea genotypes. **Phytopathology**, v. 6, 2008.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.6, p.194-226, 2006.

OLIVEIRA, E. J.; SANTOS, V. S.; LIMA, D. S.; MACHADO, M. D.; LUCENA, R. S.; MOTTA. T. B.; CASTELLEN, M. S. Seleção em progênies de maracujazeiro-amarelo com base em índices multivariados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.11, p.1543-1549, 2008.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5.; 1998, Jaboticabal, SP. **Anais...**Jaboticabal, SP: FUNEP, p. 143-158, 1998.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>. 2008.

REP, M. *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 18, p.15–23, 2005.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 552-554, 2004.

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C. Enxertia do maracujazeiro. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, Jaboticabal, **Resumos...** p. 70-92, 1998.

SANTOS, F.C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono**. Universidade Federal de Lavras – MG. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado).

SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER, C. H.; HOFFMANN, M. In Manica, I. (Ed.). Meacujá: Temas Seleccionados (1) **Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 72, 1997.

SÃO JOSÉ, A.R.; SANTOS, A.; SILVA, A.C. da; BOMFIM, M.P.; MORAIS, O.M.; ATAÍDE, E.M.; BARBOSA, N.M.L. Fusariose no semi-árido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16. **Anais...** p. 470, 2000

SCHERM, H.; OJIAMBO, P.S. Applications of survival analysis in botanical epidemiology. **Phytopathology**, v. 94, p. 1022-1026, 2004.

STATSOFT, Inc. *Statistica for Windows (data analysis software system)*, version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

SELA-BUURLAGE, M.B. Genome-wide dissection of *Fusarium* resistance in tomato reveals multiple complex loci. **Molecular Genetic Genomics** v. 265, p. 1104–1111, 2001.

SOUZA, A.D. Doenças do sistema radical do maracujazeiro. **Toda Fruta**. 2004. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em 20 jun. 2011.

STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 299-304, 2000.

SUASSUNA, T. M. F.; BRUCKNER, C. H.; CARVALHO, C. R.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 298-302, 2003.

VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases. Epidemics and control**. New York: Academic Press. p. 134, 1963.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle**. Fortaleza: EPACE, (EPACE. Comunicado Técnico, 86). 3p, 2003. Disponível em: <<http://www.embrapasemiarido.com.br>>. Acesso em: 23 nov. 2010.

YAMASHIRO, T., CARDOSO, R. M. G. Ocorrência de murcha de *Fusarium* em maracujá-doce (*Passiflora alata* Ait) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathológica**, v. 8, p. 57, 1982.

YAMASHIRO, T.; LANDGRAF, J.F. Maracujá-açú (*P. alata* Ait.) porta-enxerto resistente à fusariose do maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: S.B.F., p. 918-21, 1979.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 3ª ed. New Jersey. Prentice Hall. 1996.

ZEMANKOVA, M.; LEBEDA, A. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. Review. **Plant Protection Science UZPI**, v. 37, p. 25-42, 2001.

## CAPÍTULO 2

### **VARIAÇÃO GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* COM BASE EM MARCADORES AFLP E PCR-RFLP DA REGIÃO ITS<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Australasian Plant Pathology

## **VARIAÇÃO GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* COM BASE EM MARCADORES AFLP E PCR-RFLP DA REGIÃO ITS**

**Autora:** Aline dos Santos Silva

**Orientador:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Orientador:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dra Maria Angélica P. de C. Costa

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de 14 isolados de FOP (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) com o uso de marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região ITS (*Inter Transcribed Spacer*). No processo de otimização da técnica de AFLP, o uso do kit comercial apresentou melhor padrão de amplificação para a maioria das combinações de iniciadores avaliados. Vinte e cinco combinações de iniciadores foram selecionadas para a amplificação dos isolados de FOP, resultando em 99% de fragmentos polimórficos, com média de 40 bandas por combinação de iniciador. Os valores do conteúdo de informação polimórfica, o índice e o poder discriminatório do marcador apresentaram ampla variação e refletem o alto conteúdo informativo dos iniciadores utilizados na caracterização dos isolados de FOP. A detecção de polimorfismo com a técnica de PCR-RFLP, utilizando quatro enzimas de restrição não foi eficiente. Os isolados de FOP foram agrupados em quatro grupos, independente da sua origem geográfica. Mesmo com a marcante presença de variação molecular dentro dos grupos, esta observação demonstra a possibilidade de fluxo da doença entre as diversas regiões produtoras, provavelmente pelo transporte de mudas contaminadas. A existência de alta variação molecular no FOP deve direcionar as ações voltadas ao desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno, no sentido de buscar resistência múltipla a diferentes isolados.

**Palavras-chave:** maracujazeiro, fusariose, variabilidade, marcador molecular



## **GENETIC VARIABILITY OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* ISOLATES USING AFLP MARKERS AND PCR-RFLP FROM ITS REGION**

**Author:** Aline dos Santos Silva

**Adviser:** Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Co-Adviser:** Dr. Fernando Haddad

Prof. Dr. Maria Angélica P. de C. Costa

**ABSTRACT:** The objective of this work was to study the genetic variability of 14 isolates of FOP (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) from ITS (Inter Transcript Space) region. During the optimization of AFLP technique, the commercial kit showed the best amplification pattern for most of primers combinations. Twenty-five primer combinations were selected to amplify the FOP isolates. As a result we observed 99% of polymorphic fragments, with average of 40 bands per primer combination. Broad variation from estimates of polymorphic information content, marker index and resolving power were observed. These results showed the high information content regarding the primers used in the characterization of FOP isolates. The detection of polymorphism with PCR-RFLP, using four restriction enzymes were not efficient. The FOP isolates were clustered into four groups, independently of their geographic origin. Even with remarkable presence of molecular variation within groups, this observation showed the possibility of disease flow among different production regions, probably by shipping of infected seedlings. The evidence of high molecular variation among FOP isolates must drive the action related to development of resistant cultivars, aiming to find multiple resistances to different isolates.

**Keywords:** passion fruit, fusariosis, variability, molecular marker

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares formam um complexo de fungos de solo classificadas como *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. (Alexopoulos et al., 1996). Até o presente, nenhuma forma de reprodução sexuada para este complexo foi encontrada, sendo que estes produzem três tipos de esporos: macroconídios, microconídios e clamidósporos (Booth et al., 1971). Dentro desse gênero existem variações de patogenicidade e virulência, resultando na sua classificação em seções, *formae speciales* e raças (Oliveira e Costa, 2002).

A especificidade do *Fusarium* em colonizar determinadas espécies hospedeiras permitiu que Snyder & Hansen (1940) criassem um novo táxon denominado *forma specialis*, onde cada grupo é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, evidenciando o elevado grau de especificidade de hospedeiro (Nelson et al., 1983). Mais de 120 formas já foram descritas (Baayen et al., 2000), cada uma delas com habilidade em causar murcha em espécies específicas, como *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (banana), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (algodão), *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* (dendê), *F. oxysporum* f. sp. *rosellae* (vinagreira), *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (baunilha). Cada *forma specialis* pode se subdividir em raças fisiológicas de acordo com a especificidade a uma cultivar específica, confirmando a variabilidade em virulência encontrada nas variantes desse patógeno. A classificação em *formae speciales* e raças possuem algumas dificuldades, pois muitas variáveis devem ser consideradas e a base genética da seletividade do patógeno em relação às espécies e cultivares hospedeiras ainda são pouco conhecidas (Bayeen et al., 2000).

Dentre essas formas específicas do patógeno, encontra-se o agente etiológico da murcha ou fusariose do maracujazeiro, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (McKnight, 1951). A fusariose é uma das doenças mais devastadoras desta cultura, pois provoca deficiência de água, murcha imediata, colapso e morte das plantas independente do seu estágio de desenvolvimento (Bastos, 1976; Manica, 1981), reduzindo de forma significativa a vida útil dos pomares. A situação ainda é agravada por falta de controle curativo da doença, sendo o uso

de cultivares resistentes a estratégia mais prática e com melhor custo-benefício para o controle da murcha de *Fusarium* (Honnareddy & Dubey, 2006).

O conhecimento da diversidade genética da população em *Fusarium oxysporum* é importante para o desenvolvimento de estratégias para o controle de doenças (Kistler et al., 2001), uma vez que alguns patógenos possuem grande capacidade de variação. A aparente ausência de estágio sexual em espécies de *Fusarium oxysporum*, pode ser compensada por outros processos que assegurem a permuta e a manutenção da diversidade genética (Kistler et al., 1992; Leslie, 1993), como mutações, alta atividade de elementos transponíveis presentes no genoma ou eventos de parassexualidade (Agrios, 2005).

Populações de fungos com alto nível de diversidade genética podem ter difícil controle, pois tendem a adaptar-se mais rapidamente a qualquer medida de controle, como a introdução de uma cultivar resistente (Carlier et al., 2003). Aliado a isso, a existência de variantes do fungo com diferentes níveis de agressividade, além de diferentes raças do patógeno, pressupõe que um genótipo identificado como resistente numa região de cultivo pode ou não manter esta característica em outra. Logo, a resistência vai depender diretamente dos mecanismos envolvidos no processo de defesa da planta e também da composição genética do patógeno que a desafia. E somente os estudos de diversidade fenotípica não indicam a relação ou variabilidade genética entre e dentro de grupos de isolados.

Análise da variação genética por meio de marcadores moleculares tem se tornado útil para caracterizar populações de *F. oxysporum* dentro e entre *formae speciales* ou de espécies não patogênicas do fungo (Dubey et al., 2010; Abd-Elsalam et al., 2004; Bogale et al., 2006; Baayen et al., 2000; Stewart et al., 2006; Groenewald et al., 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e sequências de subunidades do rDNA. O AFLP é uma classe de marcador baseada na especificidade dos sítios de restrição do RFLP aliado à praticidade de amplificação da PCR (Vos et al., 1995), utilizado com muita frequência para fungos (Belabid et al, 2004; Leslie et al, 2004; Zeller et al, 2003). A técnica baseia-se na digestão do DNA genômico com duas enzimas de

restrição e ligação de adaptadores específicos com terminais complementares às extremidades dos sítios de restrição. Através de ampliações seletivas controladas por extensões de iniciador que apresentam apenas um subconjunto dos fragmentos, podem ser detectadas diferenças causadas por alterações nas sequências alvos dos sítios de restrição. A vantagem do AFLP sobre outras técnicas, como RAPD, se deve ao fato das várias bandas geradas serem provenientes da distribuição dos sítios de restrição ao longo do genoma, pois a exploração do genoma é arbitrária sem conhecimento prévio da sequência de DNA. Além disso, o AFLP produz grande quantidade de informação por gel (Oliveira, 2006).

Os estudos moleculares também podem ser conduzidos a partir da análise dos espaçadores (ITS) do DNA ribossomal nuclear (rDNA), o que facilita a identificação de fungos, contribuindo para expandir o conhecimento da diversidade microbiana nos últimos anos (Hermosa et al., 2000; Pianzola et al., 2004). As regiões ITS são flanqueadas pelos genes 18S, 5.8S e 28S, que são regiões conservadas úteis para a filogenia e taxonomia de fungos. Portanto, essa ferramenta auxilia a identificação taxonômica e de gêneros (Antoniolli et al., 2000; Gomes et al., 2002) e discriminação de espécies relacionadas.

Diante das necessidades expostas e das ferramentas moleculares disponíveis, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar molecularmente 14 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* obtidos de plantas infectadas com fusariose de diferentes regiões produtoras de maracujazeiro, permitindo conhecer as diferentes formas de estruturação deste importante agente infeccioso.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico**

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, provenientes de plantas de maracujá com fusariose de diferentes regiões produtoras da cultura (Tabela 1).

Foram estudados 15 isolados de culturas monospóricas, sendo 14 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP), e um isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) utilizado como *outgroup*.

**Tabela 1.** Relação de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, utilizados na análise molecular com marcadores do tipo AFLP.

Número	Isolado	f. sp.	Origem geográfica
1	FOC143	<i>cubense</i>	Janaúba (MG)
2	FOP001	<i>passiflorae</i>	Cruz das Almas (BA)
3	FOP002	<i>passiflorae</i>	Cruz das Almas (BA)
4	FOP003	<i>passiflorae</i>	Cruz das Almas (BA)
5	FOP004	<i>passiflorae</i>	Cruz das Almas (BA)
6	FOP005	<i>passiflorae</i>	Cruz das Almas (BA)
7	FOP008	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
8	FOP013	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
9	FOP022	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
10	FOP023	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
11	FOP028	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
12	FOP057	<i>passiflorae</i>	Ubaíra (BA)
13	FOP069	<i>passiflorae</i>	Linhares (ES)
14	FOP071	<i>passiflorae</i>	Porto Seguro (BA)
15	FOP072	<i>passiflorae</i>	Livramento de Nossa Senhora (BA)

## 2.2 Crescimento do fungo em meio líquido

Para obtenção de massa micelial e subsequente extração do DNA fúngico, os isolados foram repicados e incubados em meio líquido BD, contendo batata (200g) e dextrose (20g), a 25°C. Os materiais foram mantidos sob agitação contínua, com período dependente do crescimento de cada isolado. Decorrido esse tempo, a massa micelial de cada isolado foi filtrada e congelada em nitrogênio líquido para a extração do DNA.

## 2.3 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, foi realizada pelo método CTAB (brometo de

centiltrimetilâmonio), descrito por Zolan & Pukilla (1986). O micélio congelado foi macerado na presença de nitrogênio líquido, e cerca de 40mg foram transferidos para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão de extração (CTAB 1%; 0,7M de NaCl; 20 mM de Tris HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA e 1% de 2-mercaptoetanol), previamente aquecido por 30 minutos a 65°C. As amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos a 60°C, homogeneizando a suspensão a cada 10 minutos. Após essa etapa, foram acrescentados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), invertendo-se gentilmente os tubos até a formação de uma emulsão homogênea. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm e a fase sobrenadante cuidadosamente retirada. Esta foi transferida para um novo tubo de 2,0 mL e a etapa anterior repetida por mais duas vezes. Ao sobrenadante foi acrescentado de 400 µL de isopropanol (-20°C) e os tubos foram levemente agitados. Em seguida, estes foram colocados no freezer a -20°C por 30 minutos e centrifugados por 7 minutos a 10.000 rpm, para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% (-20°C) para remover os sais, e seco à temperatura ambiente. A etapa final consistiu na ressuspensão do DNA em 100 µL de Tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8), contendo 1 µL de RNase (10 mg/mL) e incubação a 37°C por 30 minutos. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada após eletroforese ( $3 \text{ v.cm}^{-1}$ ) em géis de agarose a 1,0% (p/v) contendo brometo de etídeo (1,0 µg/mL). Os dados da quantificação foram obtidos após comparação visual com uma série de concentrações conhecidas de DNA (20, 40, 60, 80 e 100 ng) do fago Lambda (Invitrogen). Em seguida o DNA foi diluído para concentração de  $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ .

## **2.4 Amplificação com os marcadores AFLP**

Antes das análises moleculares foi realizada uma otimização da técnica para sua utilização no fungo em questão.

### **2.4.1 Otimização da análise molecular com marcadores AFLP**

Duas combinações de enzimas foram utilizadas na digestão, sendo elas: *EcoRI* (corte raro) com *MseI* (corte frequente). Foram testados dois protocolos de amplificação.

#### **2.4.1.1 Teste com o protocolo descrito por Vos et al. (1995)**

O primeiro protocolo utilizado empregou a metodologia descrita por Vos et al. (1995) com pequenas modificações, como segue abaixo:

##### Restrição do DNA

Para a digestão, 300 ng de DNA genômico foram digeridos usando 8U de cada enzima de restrição, *EcoRI* (New England Biolabs®) e *MseI* (New England Biolabs®); 1X de tampão de PCR (New England Biolabs®); 0,6 µg de BSA (New England Biolabs®). O volume foi completado para 60 µL com água Mili-Q esterilizada. O material foi incubado por 3 horas a 37 °C, sendo cuidadosamente agitado a intervalos de uma hora. Após a digestão, a reação foi submetida a um tratamento térmico por 20 minutos a 65°C, para inativar as endonucleases.

##### Preparo dos adaptadores

O preparo dos adaptadores específicos (Tabela 2) aos terminais clivados para cada enzima foi realizado do seguinte modo:

- Adaptador *EcoRI*: foi preparada uma solução contendo 5 µM de adaptador *EcoRI forward*; 5 µM de adaptador *EcoRI reverse*; 0,5X de tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham); e água Mili-Q esterilizada para o volume final de 100 µL.

- Adaptador *MseI*: foi preparada uma solução contendo 50 µM de adaptador *MseI forward*; 50 µM de adaptador *MseI reverse*; 0,5X de tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham); e água Mili-Q esterilizada para o volume final de 100 µL.

Após a homogeneização dos componentes, a solução foi mantida a 95 °C durante 2 minutos; em seguida 95°C decrescendo 1°C por minutos até 25°C. Após o término da reação as amostras foram mantidas a - 20°C.

##### Ligação dos adaptadores

Para esta etapa, foram acrescentados aos fragmentos de DNA digeridos (39,5µL), 5X do tampão da enzima *T4* DNA ligase (Invitrogen); 0,1 µM de cada adaptador da enzima *EcoRI* e *MseI*; 1U de *T4* DNA ligase (1 UµL<sup>-1</sup>, Invitrogen);

5,0 µL de água Mili-Q esterilizada, completando a reação para 50 µL. As reações de ligação foram realizadas a 20 °C durante 3 horas, sendo gentilmente agitadas a intervalos de 1 hora e as amostras armazenadas à - 20 °C. A mistura foi diluída na proporção 1:5 numa solução 1:10 (TE + água Mili-Q).

#### Pré-amplificação

Na reação de pré-amplificação, foram utilizados iniciadores de *EcoRI* e *MseI* com extensão de um nucleotídeo seletivo na extremidade 3', a fim de selecionar parte dos fragmentos. Utilizaram-se para teste os pares de iniciadores E+C / M+A; onde E = adaptador *EcoRI*; M = adaptador *MseI*; C = citosina; A = adenina.

As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, compostas por 3,0 µL da solução com o DNA digerido e ligado ao adaptador; 0,5 µM do iniciador da enzima de corte raro (E+C); 0,5 µM do iniciador da enzima de corte frequente (M+A); 0,15 mM de dNTP (Invitrogen); 1X de tampão sem MgCl<sub>2</sub> (Fermentas); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água Mili-Q esterilizada..

A condição da pré-amplificação foi de 95 °C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. O ciclo final foi de 5 minutos a 72 °C. O material pré-amplificado foi diluído na proporção 1:25 numa solução 1:10 (TE + água Mili-Q).

#### Amplificação seletiva

Nesta etapa seletiva utilizaram-se combinações de iniciadores, com extensão de 2 e 3 bases para *EcoRI* e *MseI*, respectivamente, adicionados ao adaptador na extremidade 3'. Nessas reações foram utilizados 2,5 µL dos produtos pré-amplificados; 0,5 µM do iniciador da enzima de corte raro (E+CN), onde N pode ser qualquer nucleotídeo; 0,5 µM do iniciador da enzima de corte frequente (M+ANN); 0,15 µM de dNTP (Invitrogen); 1X de tampão de PCR (Fermentas); 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 8 µg/mL de BSA (New England Biolabs®); 1,5U de Taq DNA polimerase (Fermentas); água Mili-Q esterilizada para completar o volume final de 20µL.

O programa de amplificação foi realizado de acordo com o protocolo: desnaturação inicial a 95 °C durante 2 minutos; seguida de 12 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos com redução de 0,7 °C por ciclo, 72 °C por 2



minutos; seguidos por 24 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; encerrando os ciclos com 72 °C por 2 minutos.

#### **2.4.1.2 Teste com o kit comercial**

O outro protocolo avaliado utilizou o kit comercial AFLP<sup>®</sup> Core Reagent Kit (Invitrogen) para as etapas de digestão e ligação dos adaptadores, com as posteriores etapas seguindo o protocolo anterior, com pequenas modificações:

##### Restrição do DNA

Para a reação de digestão, 250ng de DNA genômico foram digeridos utilizando a combinação *EcoRI/MseI*, por 2 horas a 37 °C e posteriormente a 70 °C por 15 minutos, para inativar as enzimas.

##### Ligação dos adaptadores

Para essa etapa, 9 µL os adaptadores do kit comercial, foram misturados com 1 µL da *T4* DNA ligase e ligados nos fragmentos digeridos, nas mesmas condições descritas no protocolo anterior. O material digerido e ligado foi diluído na proporção 1:10 numa solução 1:10 (TE:água Mili-Q esterilizada).

##### Pré-amplificação

As reação de pré-amplificação foram realizadas com os mesmos iniciadores, nucleotídeos seletivos, e condições de reação do protocolo de Vos et al., (1995). O produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água Mili-Q esterilizada).

##### Amplificação seletiva

Para a amplificação, também foram utilizados os mesmos iniciadores e bases adicionadas na extremidade 3', do protocolo anterior. A programação de amplificação também foi idêntica.

##### Separação dos fragmentos de AFLP e revelação dos géis

Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante 6% poli(acrilamida) (6% acrilamida/bis-acrilamida (19:1) e 7,5 M de uréia). O produto da amplificação foi misturado com 3 µL de tampão de carregamento (formamida 98%, EDTA 0,5M pH 8,0; azul de bromofenol 0,002% p/v e xileno cianol 0,002% p/v). Após a desnaturação das amostras a 95°C por 5 minutos foram carregado no gel, pré-aquecido durante 1 hora a 70 W, um volume de 3 µL de cada amostra. Foi utilizado como marcador o ladder 50 pb (New England Biolabs<sup>®</sup>). A

eletroforese foi realizada a 70 W por 3 horas. O produto da amplificação foi visualizado por coloração com prata de acordo com Creste et al., (2001).

#### 2.4.2 Avaliação das combinações de iniciadores

Após a escolha do protocolo que gerou os melhores resultados, foram avaliadas 64 combinações de iniciadores na amplificação seletiva, sendo 32 E+AN / M+CNN e 32 E+CN / M+ANN (Tabela 2). Foi feito um estudo preliminar das combinações de iniciadores com dois isolados de FOP (FOP013 e FOP071), visando identificar aquelas mais polimórficas para as análises definitivas com o marcador. As melhores combinações foram utilizadas para amplificação dos 15 isolados (Tabela 1).

#### 2.5 Análise molecular dos dados

Para cada par de iniciador, foram calculados o número de bandas polimórficas (NBP), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e poder de resolução dos iniciadores (Rp).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado como  $PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$  em que  $i$  é a informação do marcador  $i$ ;  $f_i$  é a frequência do alelo amplificado (presença de bandas) e  $(1 - f_i)$  é a frequência de alelos nulos (Roldan-Ruiz et al., 2000). O PIC foi dado como a média de cada combinação de iniciadores.

O índice do marcador (MI) foi calculado por  $MI = PIC \times EMR$  onde  $EMR$  é “relação multiplex efetiva” dado pelo produto do número total de fragmentos por iniciador ( $n$ ) e a fração de bandas polimórficas ( $\beta$ ) (Varshney et al., 2007). O poder discriminatório do iniciador (Rp) baseia-se na distribuição de bandas detectadas dentro das amostras analisadas (Azizi et al., 2009). O  $Rp = \sum I_b$  em que  $I_b = 1 - [2x / 0,5 - p]$  e  $p$  é a proporção de acessos que apresentam as bandas (Prevost & Wilkison, 1999).

O produto das amplificações do AFLP foi computado como ausência (0) e presença (1) de bandas. A dissimilaridade entre os genótipos foi calculada pelo complemento do *Simple Matching*, dado por  $SM_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$  em que  $a$

número de bandas comuns aos isolados  $i$  e  $j$  (1-1),  $b$  número de fragmentos presente no isolado  $i$  e ausente no  $j$  (1-0),  $c$  número de fragmentos ausente no isolado  $i$  e presente  $j$  (0-1) e  $d$  número de fragmentos não amplificados em  $i$  e  $j$  (0-0). A análise de dissimilaridade foi realizada com o programa Genes 1.0 (Cruz, 2008).

A partir das matrizes de dissimilaridade, foi utilizado o software Statistica 7.1 (Statsoft, 2005) para gerar o dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A correlação entre as matrizes foi verificada mediante análises de correlações e sua significância foi verificada com o teste  $t$  e de Mantel com 1000 permutações. A consistência entre a dissimilaridade dos *clusters* e das matrizes foi verificado através de correlações cofenéticas utilizando também o programa Genes.

## 2.6 Amplificação da região ITS do rDNA

A região ITS1 + 5.8S + ITS2 foi amplificada utilizando os iniciadores *ITS 1* 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e *ITS 4* 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (White et al., 1990). A reação de amplificação foi realizada no volume final de 50  $\mu$ L, contendo 25ng de DNA; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 0,1 mM de dNTP; 0.2 mM de cada iniciador; 1 U *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 1X de tampão de PCR (Fermentas) e água Mili-Q esterilizada. A reação de PCR foi realizada com desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 50°C, 1 minuto de extensão a 72°C; finalizando com um ciclo de 7 minutos a 72°C. Foi utilizado 15  $\mu$ L do produto amplificado para confirmação da amplificação. Após esta etapa, 20  $\mu$ L do PCR foram digeridos com 3 U das enzimas *HaeIII*, *HpaI*, *MseI* e *MspI*, *overnight* a 37°C. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, em tampão 0,5X TBE(100 mM Tris, 100 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) durante 4 horas a 100 W.

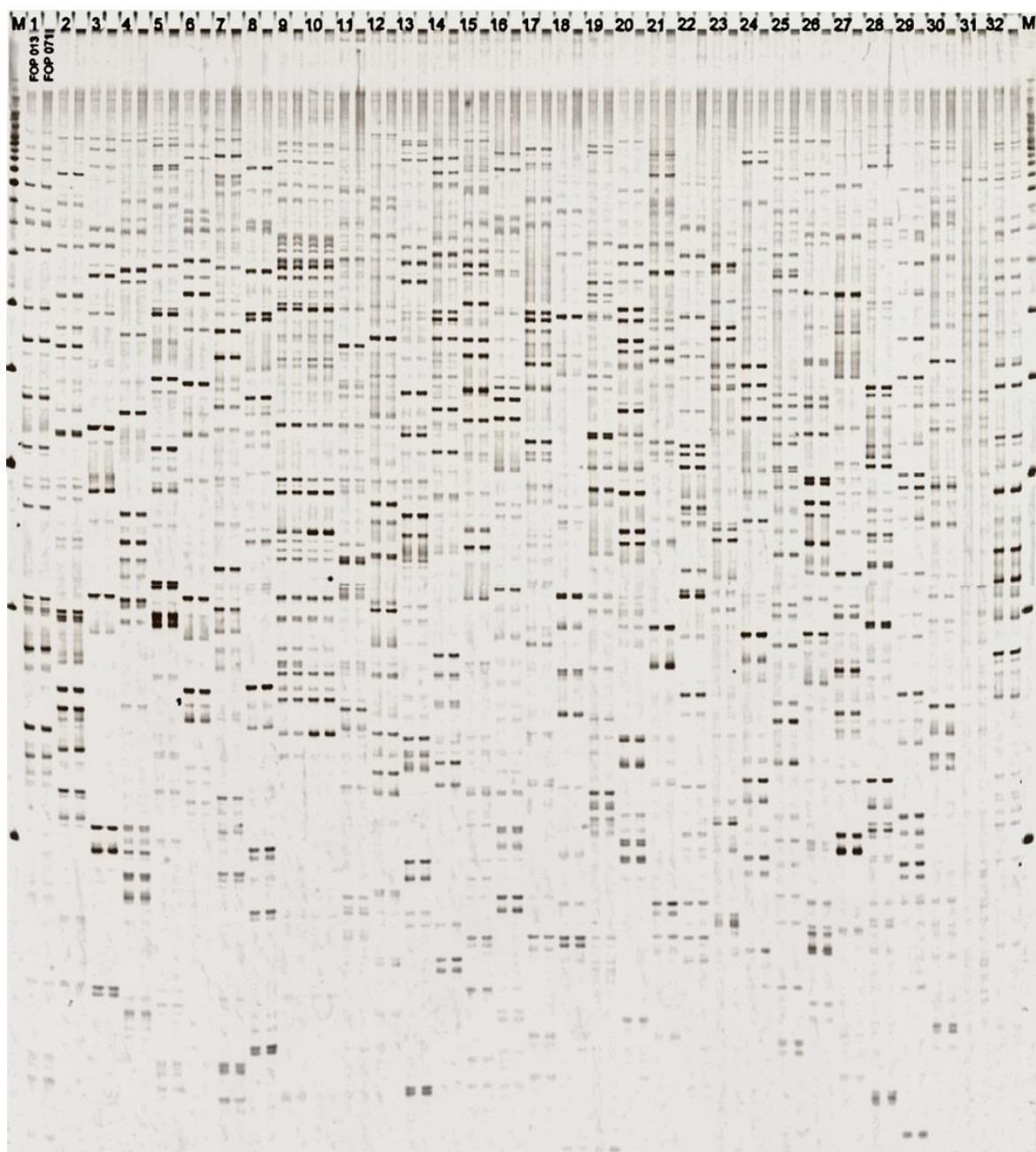
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Otimização da técnica de AFLP e seleção das combinações de iniciadores

No estudo preliminar, com dois isolados de FOP (FOP013 e FOP071) avaliou-se o protocolo de AFLP estabelecido por Vos et al. (1995), sem uso de kits. Com uso dessa estratégia, testou-se na pré-amplificação as combinações E+C / M+A e E+A / M+C. Na etapa posterior (amplificação) foram testadas 35 combinações, sendo 32 derivadas de E+C / M+A e três derivadas de E+A / M+C. Destas, apenas as três oriundas de E+A / M+C, quais sejam: E+AA / M+CTG, E+AT / M+CTG e E+AG / M+CTG, apresentaram bom padrão de amplificação e por isso foram utilizadas nas análises posteriores.

Por outro lado, o uso do kit comercial (AFLP<sup>®</sup> Core Reagent Kit) nas etapas de digestão e ligação dos adaptadores, permitiu a amplificação de um grande número de combinações. Com o uso deste kit foram avaliadas 64 combinações (32 E+C / M+A e 32 E+A / M+C). Ao contrário do que foi observado sem o uso do kit, houve 100% de amplificação nas combinações derivadas de E+C / M+A e nenhuma com o uso das combinações de E+A / M+C. Na Figura 1 é mostrado o perfil molecular de 32 iniciadores testados.

As 32 combinações produziram 964 bandas (com tamanho variando de 35 a 916pb) com média de 27,5 fragmentos por iniciador. O número de bandas variou de 9 para a combinação E+CG / M+ATC a 38 para E+CT / M+AAA. O critério para escolha dos iniciadores foi o número de bandas e o perfil molecular bem definido. Dessa forma, foram selecionados 22 pares de iniciadores (Tabela 2), além dos 3 que já haviam sido escolhidos.



**Figura 1.** Produto da amplificação de 32 combinações de marcadores AFLP. (M): marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb. As combinações estão indicadas por numeração (ver Tabela 2). Cada combinação foi testada com o isolado FOP013 e FOP071.

**Tabela 2.** Combinações de iniciadores e número de bandas geradas por combinação de iniciadores de AFLP, avaliados no estudo do polimorfismo em isolados de FOP

Número dos isolados	Combinação <i>EcoRI/Msel</i>	Número de bandas	Número dos isolados	Combinação <i>EcoRI/Msel</i>	Número de bandas
1	E+CA/ M+AAA*	30	19	E+CC/ M+AAC*	30
2	E+CA/ M+AAT*	31	20	E+CC/ M+AAG*	28
3	E+CA/ M+AAC	18	21	E+CC/ M+ATA*	34
4	E+CA/ M+AAG	19	22	E+CC/ M+ATT*	29
5	E+CA/ M+ATA*	25	23	E+CC/ M+ATC*	27
6	E+CA/ M+ATT	22	24	E+CC/ M+ATG	20
7	E+CA/ M+ATC*	29	25	E+CG/ M+AAA*	37
8	E+CA/ M+ATG	24	26	E+CG/ M+AAT*	34
9	E+CT/ M+AAA*	38	27	E+CG/ M+AAC*	31
10	E+CT/ M+AAT*	35	28	E+CG/ M+AAG*	36
11	E+CT/ M+AAC*	30	29	E+CG/ M+ATA	26
12	E+CT/ M+AAG*	29	30	E+CG/ M+ATT*	33
13	E+CT/ M+ATA*	31	31	E+CG/ M+ATC	9
14	E+CT/ M+ATT*	33	32	E+CG/ M+ATG*	30
15	E+CT/ M+ATC*	33	33	E+AT/ M+CTG*	23
16	E+CT/ M+ATG	26	34	E+AC/ M+CTG*	27
17	E+CC/ M+AAA	26	35	E+AA/ M+CTG*	12
18	E+CC/ M+AAT	19	-	-	-
<b>Total</b>					964
<b>Média</b>					27,5

\*Combinações selecionadas para análise molecular

### 3.2 Estudo da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* com marcadores AFLP

Foram obtidos perfis moleculares consistentes para todos os isolados avaliados. O DNA dos 14 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, foi analisados por AFLP usando 25 combinações de iniciadores previamente selecionadas. A Figura 2 ilustra três combinações de iniciadores avaliadas (E+CT / M+AAC, E+CT / M+AAG e E+CT / M+ATA).

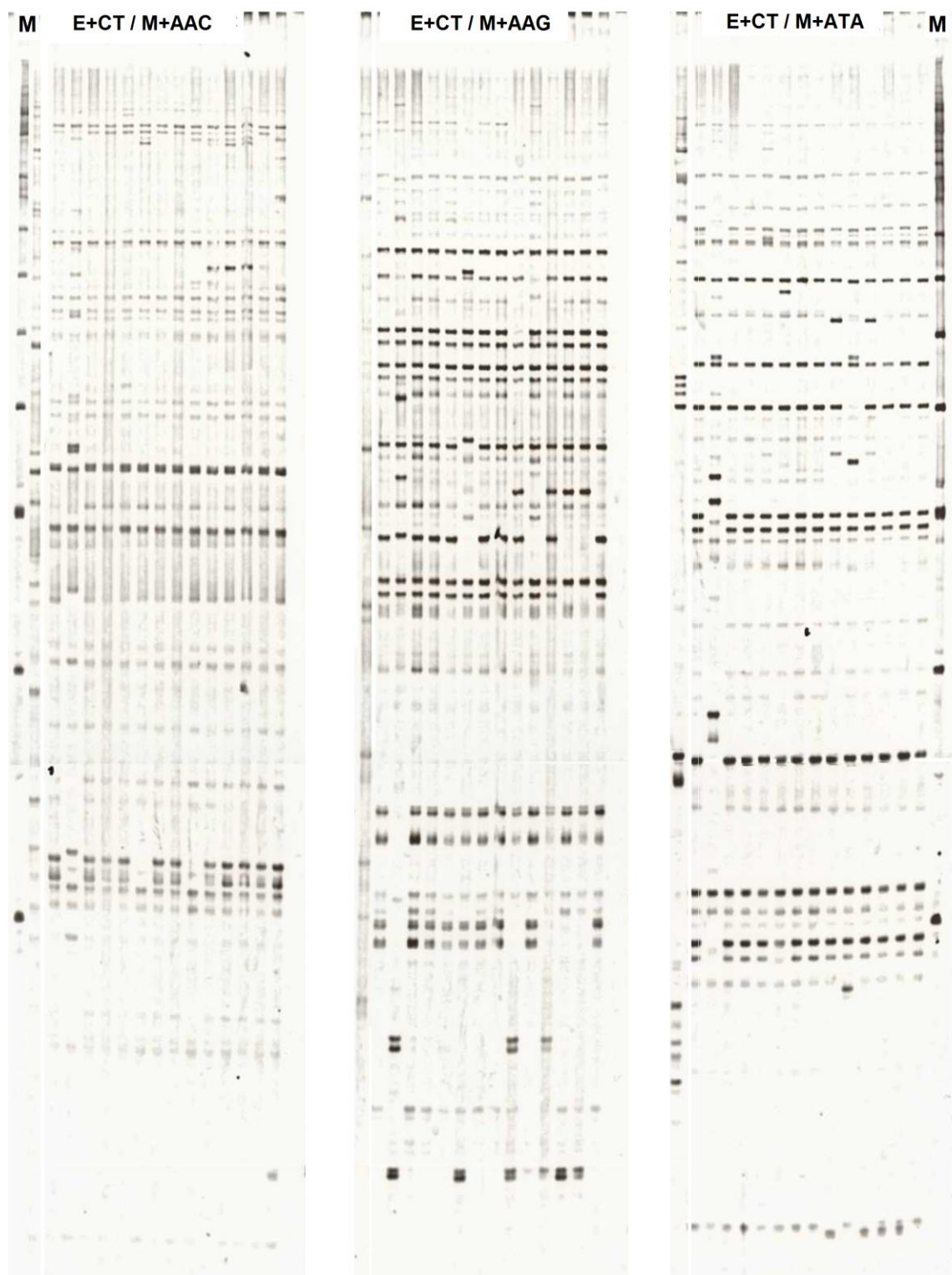
Os 25 pares de iniciadores produziram 1000 fragmentos (variando de 30 a 916pb), sendo que destes 990 (99,0%) fragmentos foram polimórficos e 10

fragmentos foram monomórficos (1,0%). O menor número de bandas polimórficas foi detectado para a combinação E+CC / M+ATC e maior foi detectado para E+CT / M+AAA. Em média, cada combinação de iniciador possibilitou a identificação de 40 bandas polimórficas (Tabela 3).

O conteúdo de informação polimórfica para marcadores dominantes, como o AFLP, varia de 0 a no máximo 0,50 (Roldán-Ruiz et al., 2000). Assim, em termos médios para os pares de iniciadores avaliados, o conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,15 (iniciadores E+CA / M+ATC e E+AA / M+CTG) a 0,28 (iniciador E+CT / M+ATA) com média de 0,20 que reflete o conteúdo informativo dos iniciadores utilizados (Tabela 3). O índice do marcador (MI) que incorpora o conteúdo informativo do marcador (PIC), número de fragmentos por iniciador e a fração de fragmentos polimórficos, variou de 3,60 (E+CC / M+ATC) a 12,72 (E+CA / M+AAT) com média de 7,92. O poder discriminatório do iniciador ( $R_p$ ) leva em consideração a capacidade de uma dada combinação de iniciador em discriminar genótipo. Nos isolados avaliados o  $R_p$  variou de 4,62 a 17,90, para as combinações E+CC / M+ATC e E+CA / M+AAT, respectivamente, seguindo a mesma tendência do MI, fato este, evidenciado pela alta correlação entre estes dois índices ( $r = 0,97$   $p < 0,01$ ). Tal fato reforça que ambos os índices podem ser utilizados como critério de seleção de iniciadores. Dessa forma, adotando o princípio de seleção com base no valor médio do MI (7,92) ou  $R_p$  (10,66) seriam selecionadas 14 combinações de iniciadores (Tabela 3).

Os dados genotípicos obtidos dos fragmentos polimórficos foram utilizados para estimar a dissimilaridade genética entre os 15 isolados, utilizando o coeficiente *Simple matching*. A matriz de dissimilaridade genética foi utilizada para obtenção de um dendrograma utilizando como método de agrupamento o UPGMA.

A dissimilaridade genética variou de 4 a 48% com média de 25%, indicando alta variabilidade genética entre os isolados estudados. Embora apresentem diferentes procedências geográficas, os isolados mais similares foram o FOP004 e FOP022, apresentando apenas 4% de dissimilaridade. A correlação foi de 0,95, indicando pouco desvio entre os dados originais da matriz e de construção do dendrograma, o que aumenta a confiabilidade na estruturação da variabilidade dos isolados de FOP estudados.



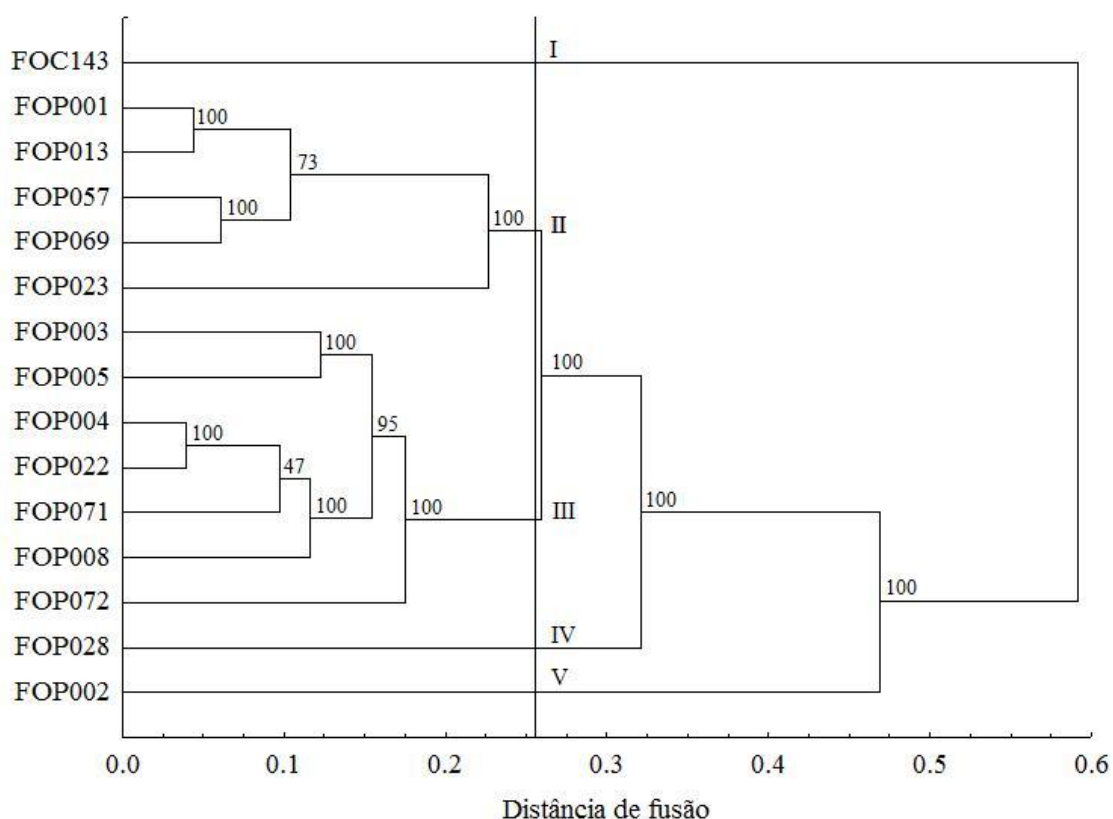
**Figura 2.** Produto da amplificação de três combinações de marcadores AFLP. (M): marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb. As combinações estão indicadas no gel, assim como o primeiro e o último indivíduo em cada combinação (ver Tabela 1).



**Tabela 3.** Informações sobre PIC, número de bandas polimórfica (NBP), índice do marcador (MI) e poder discriminatório do marcador (Rp) para cada combinação de iniciadores de AFLP.

<b>Combinação do iniciador</b>	<b>NBP</b>	<b>PIC</b>	<b>MI</b>	<b>Rp</b>
E+CC/M+ATA	28	0,19	5,32	7,28
E+CC/M+ATT	24	0,17	4,08	5,30
E+CC/M+ATC	20	0,18	3,60	4,62
E+CG/M+AAA	50	0,24	12,00	16,58
E+CG/M+AAT	46	0,18	8,28	10,28
E+CG/M+AAC	39	0,21	8,19	10,74
E+CT/M+AAC	38	0,18	6,84	8,44
E+CT/M+AAG	43	0,25	10,75	15,52
E+CA/M+ATC	47	0,15	7,05	8,56
E+CGM+ATG	25	0,17	4,25	5,66
E+CG/M+ATT	37	0,16	5,92	9,86
E+CC/M+AAC	38	0,21	7,98	11,66
E+CG/M+AAG	38	0,18	6,84	8,74
E+CT/M+ATA	28	0,28	7,84	12,46
E+CT/M+ATT	44	0,21	9,24	11,68
E+CT/M+ATC	30	0,16	4,80	6,36
E+CC/M+AAG	49	0,18	8,82	12,18
E+CT/M+AAA	58	0,21	12,18	15,84
E+CT/M+AAT	48	0,17	8,16	9,90
E+CA/M+AAA	47	0,23	10,81	14,76
E+CA/M+AAT	53	0,24	12,72	17,90
E+CA/M+ATA	31	0,20	6,20	8,54
E+AA/M+CTG	33	0,15	4,95	5,88
E+AT/M+CTG	42	0,21	8,82	11,42
E+AC/M+CTG	54	0,23	12,42	16,48
Mínimo	20	0,15	3,6	4,62
Máximo	58	0,28	12,72	17,90
Média	40	0,20	7,92	10,66

Utilizando o critério do ponto de fusão para definir o ponto de corte, foram formados cinco grupos (Figura 3). Os valores de *bootstrap* variaram de 47 a 100%, com a maioria dos ramos do dendrograma apresentando os maiores valores, indicando a confiabilidade dos grupos formados. Analisando os agrupamentos, o Grupo II foi formado por isolados oriundos de Cruz das Almas (FOP001), Ubaíra (FOP013, FOP023 e FOP057) e Linhares (ES) (FOP069). Entretanto, o maior agrupamento foi o Grupo III que incluiu sete isolados (FOP003, FOP004, FOP005, FOP008, FOP022, FOP071 e FOP072). Este grupo foi composto de isolados oriundos dos municípios baianos de Cruz das Almas, Ubaíra, Porto Seguro e Livramento de Nossa Senhora (Figura 3). Por outro lado, o FOP028 e FOP002, oriundos de Ubaíra e Cruz das Almas, respectivamente ficaram isolados nos Grupos IV e V. O FOC143 também permaneceu isolado dos demais, no Grupo I, confirmando a confiabilidade do dendrograma (Figura 3).

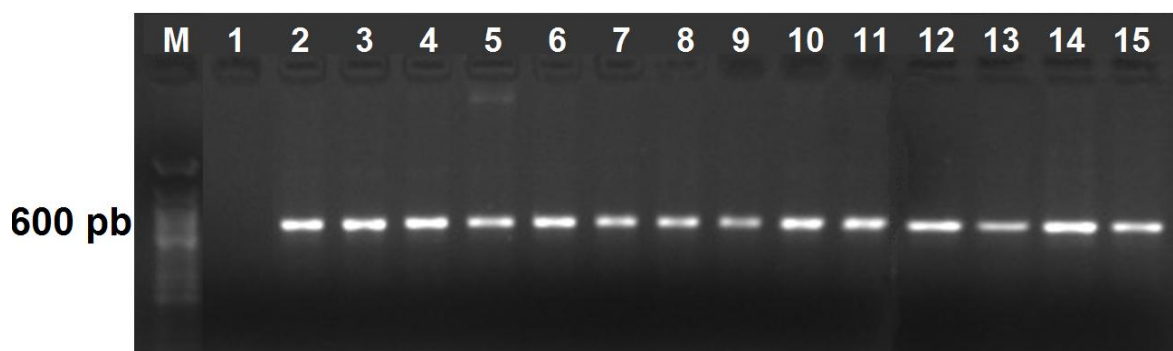


**Figura 3.** Dendrograma das relações genéticas entre 15 isolados (14 FOP e um FOC) obtido com uso da matriz de dissimilaridade e coeficiente *Simple Matching*. O método de agrupamento foi o UPGMA. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos.

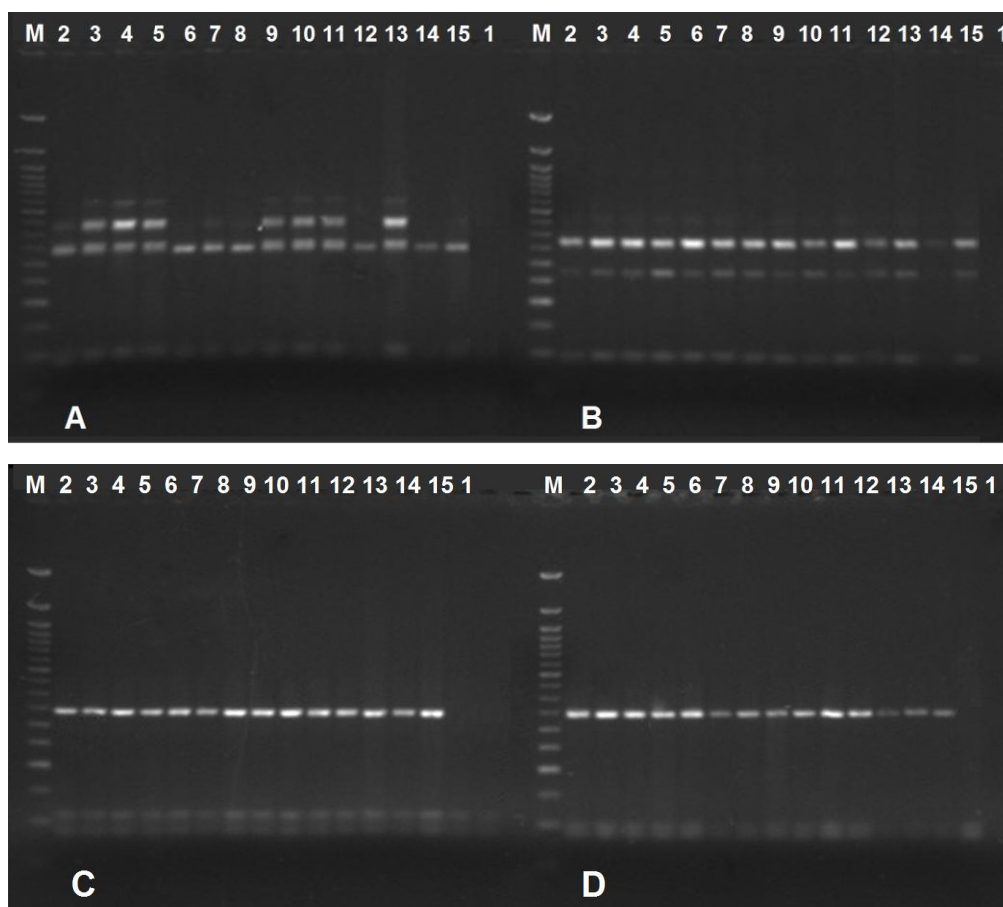
### 3.3 Estudo da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* com regiões ITS do rDNA

Os produtos de PCR obtidos na amplificação das regiões ITS1, 5,8S e ITS4 do rDNA dos isolados de FOP e FOC, apresentaram um fragmento em torno de 600 pb para todos os isolados de FOP. Não se observou amplificação no isolado de FOC (FOC143) (Figura 4).

Todos os isolados foram clivados com as enzimas *HaeIII*, *HpaI*, *MseI* e *MspI*. De acordo com os padrões de clivagem obtidos, as enzimas *MspI*, *HaeIII* e *HpaI*, produziram padrão de bandas similar para todos os isolados (Figura 5) enquanto a *MseI* detectou polimorfismo de sítio de restrição, porém não foi suficiente para diferenciar os 15 isolados (Figura 5).



**Figura 4.** Produtos amplificados da região ITS do rDNA dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* conforme numeração (ver Tabela 1). (M): marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb.



**Figura 5.** Produtos da amplificação da região ITS do rDNA e digestão com as enzimas *MseI* (A), *MspI* (B), *HaeIII* (C) e *HpaI* (D) dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* conforme numeração da Tabela 1. (M): marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb.

#### 4. DISCUSSÃO

Para uma ampla gama de táxons incluindo plantas, fungos e bactérias, os marcadores AFLP foram utilizados para acessar a variação genética de estirpes ou espécies intimamente relacionadas, impossíveis de serem descobertas com caracteres morfológicos ou outros mecanismos moleculares (Abdel-Satar et al., 2003).

Na etapa de otimização da técnica de AFLP, a amplificação sem uso de kits comerciais não se mostrou tão eficiente na análise de polimorfismo do FOP. Já o kit comercial (AFLP® Core Reagent Kit) apresentou uma alta eficiência de

amplificação para a maioria das combinações de iniciadores. A não utilização de kits reduz em muito o custo das análises moleculares com a técnica de AFLP. Entretanto, necessita de uma série de ajustes nas diversas etapas da metodologia o que leva bastante tempo para otimização. Contudo, após diversas tentativas sem sucesso no ajuste da metodologia, optou-se pelo uso do kit comercial de AFLP, que também tem sido empregado com grande sucesso em outros tipos de *Fusarium* (Baayen et al., 2000; Sharma et al., 2009).

A escolha das enzimas de restrição, o tamanho e composição de nucleotídeos, também podem determinar o resultado e complexidade do *fingerprint* final por AFLP (Janssen et al., 1996). Alguns estudos para *Fusarium* utilizaram duas bases seletivas complementando ambos adaptadores (Arroyo-García et al., 2003; Abd-Elsalam et al., 2004; Groenewald et al., 2006). Da mesma forma, o uso de duas bases seletivas para *EcoRI* e três para *MseI* revelou alta eficiência na detecção de polimorfismo em FOP. Este resultado é consistente com o trabalho realizado para identificar a diversidade genética de *Fusarium graminearum* e *Fusarium asiaticum* (Qu et al., 2007), no qual a seleção de fragmentos foi realizada com duas e três bases para *EcoRI* e *MseI*, respectivamente. Devido ao reduzido tamanho do genoma fúngico (Agrios, 2005), entre 18,1 e 51,5 Mb, quando comparado ao genoma vegetal por exemplo, a utilização de duas bases seletivas para a enzima de corte raro (*EcoRI*) favorece o aumento no número de fragmentos gerados, com mais informação sem prejudicar a visualização dessas bandas como observado no presente estudo.

De maneira geral, os haplótipos gerados pelos marcadores AFLP apresentaram alta capacidade informativa, e possibilitaram a formação de cinco grupos geneticamente distintos indicando variabilidade genética para o patógeno causador da fusariose do maracujazeiro. O uso das informações polimórficas do marcador AFLP permitiu a identificação de quatro grupos de diversidade para o FOP, confirmando a existência de variabilidade genética nos isolados avaliados. As consistências no agrupamento dos ramos, expressa pelo alto valor de *bootstrap*, reforçam a confiabilidade dos grupos formados. Dois isolados, FOP002 e FOP028, mostraram-se como os mais diversos nas amostras analisadas por não se agrupar com nenhum dos isolados avaliados.

O Grupo III agrupou metade dos isolados (sete), evidenciando alguma similaridade genética entre indivíduos de diferentes e distantes regiões geográficas da Bahia. O mesmo aconteceu com o Grupo II, em que diferentes isolados da Bahia e inclusive do Espírito Santo (FOP069), ficaram agrupados, embora ainda com expressiva diversidade molecular. Por se tratar de uma espécie que se reproduz assexuadamente, a geração de variabilidade genética é bastante reduzida em comparação com espécies de reprodução sexuada e essa hipótese pode explicar o agrupamento de isolados de FOP provenientes de diferentes regiões geográficas, uma vez que, devido a menor variabilidade esses isolados são próximos geneticamente.

Mesmo com a frequência e o grau de variabilidade reduzidos consideravelmente, alguns descendentes irão apresentar caracteres diferentes (Agrios, 2005). Essa questão se aplica aos diferentes grupos formados. A consequência desse processo é muito importante, pois implica que a variação em populações de patógenos de reprodução assexuada pode ocorrer morfológicamente ou em termos de virulência (Groenewald et al., 2006). Essa variabilidade é bem documentada, por exemplo para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, onde isolados têm habilidade de atacar diferentes variedades de banana, e como resultado existe a subdivisão em raças biológicas (Moore et al., 1995).

Importante ressaltar que a detecção da variabilidade genética deve ser validada em relação à variabilidade patogênica dos isolados de FOP, que será foco de futuros estudos. É conhecida ampla variabilidade patogênica no complexo *Fusarium oxysporum*, onde dentro de uma forma podem ser encontradas várias raças.

A variabilidade genética existente dentro de uma determinada *formae specialis* gera os múltiplos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) e raças, com patogenicidade e virulência em evolução por meio de mutação, transposição ou propagação de linhagens relacionadas com parassexualidade (Baayen et al., 2000).

A mutação é o principal mecanismo gerador de novos genes, a mais importante força evolutiva em patógenos de reprodução assexuada, além de ser a última fonte de variabilidade genética, que podem superar a resistência de algum

gene (Agrios, 2005). Mutações ocorrem espontaneamente na natureza em todos os organismos vivos, tanto para aqueles que se reproduzem apenas sexualmente ou apenas de forma assexuada, e os que se reproduzem tanto sexual como assexuadamente. A mutação somática que ocorre em indivíduos com reprodução assexuada, é de extrema importância, uma vez que podem ser perpetuadas nos indivíduos mutantes. Os mecanismos da mutação incluem substituição, inserção e deleção de nucleotídeo, assim como reorganização e modificação em nível de genoma. Mutações em organismos unicelulares como em fungos com micélio haplóide, podem ser expressas imediatamente após a sua ocorrência (Agrios, 2005). A mutação em um único gene pode levar a mudança de virulência, resultando no desenvolvimento de uma nova raça. Isso foi bem demonstrado para *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, onde a mutação na raça 1 promoveu o surgimento da raça 2 (Kim et al., 1995). Ou ainda a mutação pode esclarecer a seletividade de raças que muitas vezes determinam seu hospedeiro devido a um único gene, como por exemplo, as raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* que correspondem aos genes I e I-2 em tomate.

No caso específico de *Fusarium oxysporum* na ausência de um estágio sexual, a origem e a manutenção da variabilidade exigem mecanismos que garantam altas taxas de mutação, que podem ser adquiridas por meio de elementos transponíveis conhecidos como transposons. Neste contexto, a atividade desses elementos, também tem sido usada para elucidar a variabilidade genética no complexo *Fusarium*. A descoberta de que estes são componentes comuns do genoma fúngico, os tornam interessantes em relação ao efeito que exercem no genoma de seus hospedeiros (Zanotti, 2005). Na verdade, 17 famílias de elementos transponíveis já foram identificadas (Huan-Van et al., 2001a), incluindo representantes de retroelementos e transposons de DNA (Daboussi & Langin, 1994; Huan-Van et al., 2000). Transposons podem compor até 5% do genoma de *Fusarium oxysporum*, e ter grande impacto sobre a estrutura e função do gene, bem como a composição total cromossômica da espécie (Daboussi & Langin, 1994). Eles são responsáveis por grande número de mutações espontâneas, gerando modificações na expressão dos genes, alteração das sequências de bases e modificações estruturais nos cromossomos (Deschamps et al., 1999; Langin et al., 1995; Hua-Van et al., 1998, 2000, 2001b). Elementos

transponíveis atuam como mutagênicos insercionais, e os genes mutados podem ser clonados com facilidade. Esses mutantes têm grande potencial para descoberta de genes que codificam determinantes de patogenicidade. A capacidade de adaptação a várias condições ambientais pode estar relacionada a uma aptidão particular para modificações genéticas geradas pelos elementos transponíveis (Edel et al., 2001). As mutações associadas com os elementos transponíveis também podem causar alterações na virulência do patógeno (Migheli et al., 2000).

Apesar da mutação ser o principal mecanismo criador de novos genes, existem outras formas de amplificar a variabilidade criada por meio de formação de novas combinações de genes, os chamados mecanismos de recombinação genética (Agrios, 2005). Como *Fusarium oxysporum* não tem estágio sexual conhecido, uma hipótese sugerida é que a variação genética seja em parte gerada por parassexualidade (Kistler, 1997). O parassexualismo se trata do processo pelo qual recombinações genéticas podem ocorrer dentro de heterocárions fúngicos, sendo que este surge da fusão ocasional dos dois núcleos e a formação de um núcleo diplóide. Durante a multiplicação, pode ocorrer *crossing-over* em algumas divisões mitóticas e resultar no aparecimento de recombinantes genéticos com núcleo diplóide, que rápida e progressivamente perde cromossomos individuais para reverter a seu estado haplóide (Agrios et al., 2005). Considerando que os fungos crescem principalmente como hifas que podem formar heterocárions como resultado de anastomoses, hipoteticamente a frequência de parassexualismo e, portanto da variabilidade genética através deste, podem igualar ou superar a provocada por reprodução sexual.

Apesar do *Fusarium oxysporum* ser considerado extremamente mitótico, pesquisas anteriores sugerem a troca genética entre e dentro de linhagens individuais. Essa troca genética ou recombinação poderia ser devido a parassexualidade ou heterocariose entre indivíduos com genomas muito semelhantes. Fourier et al. (2009) estudando as relações entre VCG de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* demonstraram recombinação de material genético dentro de algumas linhagens e deste patógeno. Já Bentley et al. (1998) sugerem que a variação genética no complexo *Fusarium oxysporum* seja devido a



adaptação e co-evolução do fungo com seu hospedeiro e envolve fatores de localidade.

Os resultados aqui encontrados são muito importantes para o estudo da interação maracujazeiro-FOP, uma vez que, a separação dos isolados de FOP em grupos diferentes auxiliará no *screening* por busca de fontes de resistência a este patógeno. A seleção dos genótipos poderá ser feita por inoculação das plantas com isolados de diferentes grupos. Assim, os genótipos com resistência a múltiplos isolados de diferentes grupos terão maior chance de apresentarem uma resistência mais duradoura em condições de campo. Para ampliar o conhecimento sobre a variabilidade genética do *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, este estudo será realizado novamente com um número maior de isolados provenientes das principais regiões produtoras do país.

A diversidade genética entre os isolados de FOP estudados deixa clara a importância desse trabalho para os programas de melhoramento genético da cultura do maracujazeiro. Entender a diversidade deste patógeno agrega valor à pesquisa para resistência à fusariose, permitindo a identificação de futuras raças e auxiliando na indicação de fontes de resistência genética que sejam consistentes nas diversas regiões do país.

O estudo feito com a região ITS do rDNA não evidenciou grande polimorfismo entre os isolados. Além disso, Oliveira et al. (2002) também não obtiveram sucesso com o uso das enzimas *MspI* e *MseI*, na diferenciação de isolados patogênicos nas culturas da soja e feijão. Já Lee et al. (2000) encontraram polimorfismo com *MspI* e *HaeIII*, utilizando para amplificação os mesmos iniciadores deste trabalho, porém dentro de espécies do gênero *Fusarium*. Entretanto, quando o estudo é feito para caracterização dentro da *forma specialis*, os resultados não indicam polimorfismos entre os isolados. Leong et al. (2009) utilizaram as enzimas *TaqI* e *MspI*, dentre outras e obtiveram padrões de restrição altamente semelhantes entre os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, o que revela limitada variação genética entre os isolados deste patógeno.

As enzimas utilizadas neste trabalho promovem poucos cortes no genoma do complexo *Fusarium oxysporum*, e provavelmente o genoma do FOP

apresentam pouca variação nos sítios de restrição das enzimas testadas, dificultando assim a diferenciação intraespecífica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A., OMAR, M. R. MIGHELI, Q. NIRENBERG, H. I. Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Journal Plant Disease Protect**, v. 111, p. 534–544, 2004.

ABDEL-SATAR, M.A.; KHALIL, M.S.; MOHMED, I.N.; ABD-ELSALAM, K.A.; VERREET, J.A.; Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 51–55, 2003.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Elsevier Academic Press, California, p. 518-526. 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MOMS, C. J.; BLACKWELL, M. **Introctory Mycology**. 4 ed. New York: J. Wiley, 880p. 1996.

ANTONIOLLI, Z.I.; SCHACHTMAN, D.; OPHELKELLER, D.; SMITH, S.E. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycology Research**, v. 104, p. 708-715, 2000.

ARROYO-GARCIA, R.; CENIS, J. L.; TELLO, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; CIFUENTES, D. Genetic relationships among seven specialized forms of *Fusarium oxysporum* determined by DNA sequencing of the ITS region and AFLPs. **Spanish Journal Agricola Research**, v. 1, p. 55–63, 2003.

AZIZI, A.; WAGNER, C.; HONERMEIER, B.; FRIEDT W. Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative

AFLP and SAMPL marker analysis. **Plant systematics and evolution**, v. 281, p. 151-154, 2009.

BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot diseases. **Phytopathology**, v. 90, p. 891-900, 2000.

BASTOS, C.N. Produção de metabólitos tóxicos por *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* causando murcha de plântulas de maracujá (*Passiflora edulis* Sims). **Turrialba**, v. 26, p. 371-373, 1976.

Belabid, L.; Baum M.; Forts Z.; Bouznad Z.; Eujayl I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 25-31, 2004.

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

BOGALE, M., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. AND STEENKAMP, E.T. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. **Fungal Diversity**, v. 23, p. 51-66, 2006.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*. **Commonwealth Mycological Institute**. Kew, Surrey, UK 237 p. 1971.

CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M.-F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on ***Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose**, 2002, Costa Rica.

*Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Montpellier: INIBAP, p. 123-129, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, C. D. **Programa genes** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

DESCHAMPS, F.; LANGIN, T.; MAURER, P.; GERLINGER, C.; FELENBOK, B.; DABOUSSI, M. J.; LANGIN, T. Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genetica**, v. 93, p. 49–59, 1999.

DABOUSSI, M. J.; LANGIN, T. Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genética**, v. 93, p. 45-59, 1994.

DUBEY, H. N. Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* causing chickpea wilt. **Current Science**, v. 91, p. 661-666, 2010.

FOURIER, G.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4770-4781, 2009.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETTE, C. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 61-71, 2001.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C. M.; BARROS, E.G., BORGES, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetic Molecular Biology**, v. 25, p. 477-483, 2002.

GROENEWALD, S.; BERGA, N.V.D.; MARASASB, W.F.O.; VILJOEN, A. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, v. 110, p. 297-305, 2006.

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DIAZ-MINGUES, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1890-1898, 2000.

HONNAREDDY, N. DUBEY, SC. Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wil. **Current Science**, v. 91, p. 661-666, 2006.

HUA-VAN, A.; HERICOURT, F.; CAPY, P.; DABOUSSI, M. J.; LANGIN, T. Three highly divergent subfamilies of the *impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular and General Genetics**, v. 259, p. 354-362, 1998.

HUA-VAN, A.; DAVIERE, J. M.; KAPER, F.; LANGIN, T.; BABOUSSI, M. J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. **Currents Genetics**, v. 37, p. 339-347, 2000.

HUA-VAN, A.; PAMPHILE, J. A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. Transposition fo autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. **Molecular and General Genetics**, v. 264, p. 724-731, 2001a.

HUA-VAN, A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. Evolutionary history of the *impala* transposon in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1959-1969, 2001b.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, H.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

KIM, D. H.; MAGILL, C. W.; MARTYN, R. D. Transformation of the plant pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, to hygromycin B resistance and altered pathogenicity. **Molecular Cells**, v. 5, p. 658-667, 1995.

KLISTER, CH., MIAO, V. P. W. New modes of genetics change in filamentous fungi. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.30, p.131-152, 1992.

KISTLER, H. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 87, p. 474-479, 1997.

KISTLER, H.C. Evolution in host specificity in *Fusarium oxysporum*. In: SUMMERELL, B.A.; LESLIE, J.F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W.L.; BURGESS, L.W. (Ed.), **Fusarium**: Paul E. Nelson Memorial Symposium, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA (2001), p. 70–82, 2001.

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

LEE; YOUNG-MI; YONG-KEEL, C.; BYUNG-RE M. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. **The Journal of Microbiology**, v. 38, p. 66-73, 2000.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 127–151, 1993.

LESLIE J.F.; ZELLER K.A.; LOGRIECO A.; MULE G.; MORETTI A.; RITIENI A. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex

strains isolated from native prairie grasses in Kansas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2254-2262, 2004.

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.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá. In: **Doenças e Pragas**. 26. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1981.

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

MIGHELI, Q.; STEINBERG, C.; DAVIERE, J.M.; OLIVAIN, C.; GERLINGER, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C; DABOUSSI, M.J. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology**, v. 90, p. 1279-1284, 2000.

MOORE, N. Y.; BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; JONES, D. R. Fusarium wilt banana. **Musa Disease Fact Sheet**, n. 5, 1995.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. ***Fusarium species***: an illustrated manual for identification. Pennsylvania/London: The Pennsylvania State University/University Park and London, 1993. 193 p.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 153 p. Tese de Doutorado.

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

PIANZZOLA, M. J.; MOSCATELLI, M.; VERO, S. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. **Plant Disease**, v. 88, p. 23-28, 2004.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 107–112, 1999.

QU, B., LI, H. P.; ZHANG, J. B.; XU, Y. B.; HUANG, T.; WU, A. B.; ZHAO, C. S.; CARTER, J.; NICHOLSON, P.; LIAO, Y. C. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. **Plant Pathology**, v. 57, p. 15-24, 2007.

ROLDAN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; E.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v. 6, p. 125-126, 2000.

SHARMA, M.; VARSHNEY, R. K.; RAO, J. N.; KANNAN, S.; HOISINGTON, D.; PANDE, S. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. **African Journal of Biotechnology** v. 8, p. 1016-1023, 2009.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67, 1940.

STATSOFT, Inc. *Statistica for Windows (data analysis software system)*, version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.



STEWART, J. E.; KIM, M.; JAMES, R. L.; DUMROESE, R. K.; KLOPFENSTEIN, N. B. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* Isolates from a Conifer Nursery. **Phytopathology**, v. 96, p. 1124-1133, 2006.

VARSHNEY, R.K.; CHABANE, K.; HENDRE, P.S.; AGGARWAL, R.K.; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v. 173, p. 638–649, 2007.

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

ZANOTTI, M.G.S.; SANTOS, J.K.; REIS, K.C.P.; ARAÚJO, E.F.; DHINGRA, O.D.; QUEIROZ, M.V. Distribuição do elemento transponível *impala* em isolados de *Fusarium oxysporum* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 244-249, 2005.

ZELLER K.A; SUMMERELL B.A.; BULLOCK S.; LESLIE J.F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 95, p. 943-954, 2003.

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fusariose do maracujazeiro é um dos grandes problemas enfrentados pela cultura e requer o desenvolvimento de novas cultivares como medida de controle efetiva. Neste estudo foram identificados como resistentes quatro acessos de maracujazeiro amarelo, um de maracujazeiro roxo, um de maracujazeiro doce, cinco de *P. cincinnata* e um híbrido melhorado.

Associado à identificação de fontes de resistência, detectou-se a existência de ampla variabilidade genética entre os 14 isolados do FOP (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*), independente da distribuição geográfica do patógeno. Estas informações serão de extrema importância para direcionar as ações do programa de melhoramento genético no desenvolvimento de híbridos intra e interespecíficos e futuras recomendações de cultivares com resistência mais duradoura ao patógeno.