

C. Ciências Biológicas - 8. Genética - 4. Genética Molecular

Uso de marcadores AFLP para *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*

Camila Santiago Hohenfeld ¹

Eder Jorge de Oliveira ²

Aline dos Santos da Silva ³

Onildo Nunes de Jesus ⁴

1. UFRB □ Estudante de Licenciatura em Biologia
2. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical □ Pesquisador
3. UFRB - Mestranda de Recursos Genéticos Vegetais
4. CAPES/Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - Bolsista PNPd

INTRODUÇÃO:

Dos principais problemas fitossanitários que contribuem para a baixa produtividade do maracujazeiro destaca-se a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* (FOP). Além da especificidade a grupos de plantas (f.sp), raças deste fungo podem atacar cultivares específicas indicando a elevada plasticidade genética deste patógeno. O mecanismo desta variabilidade é pouco conhecido, sabe-se que fator que promova alta taxa de mutação possa estar relacionado. Para a cultura do maracujá pouco se sabe a respeito da variabilidade genética deste fungo, sendo este estudo não apenas importante para conhecimento do fungo, mas também para ações de melhoramento, visando identificar fontes de resistência a este fitopatógeno. Os marcadores AFLP por combinar o polimorfismo de restrição com a capacidade de detecção do PCR, alto polimorfismo e maior cobertura do genoma torna-se um marcador ideal para a caracterização deste fungo. Assim, este trabalho teve como objetivo validar a técnica AFLP para estudos de divergência genética em isolados de FOP.

METODOLOGIA:

Foram utilizados os isolados FOP013 e FOP071 para extração do DNA pelo método CTAB. Nas etapas de digestão e ligação dos adaptadores testou-se as metodologias de Vos et al., 1995 e o Core Reagent Kit (Invitrogen). Para a etapa de reação de digestão, 250ng de DNA genômico foi digerido utilizando a combinação EcoRI /MseI, por 2 horas a 37°C e a 70°C por 15 minutos. Os fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores e diluídos na proporção 1:10 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na reação de pré-amplificação foram utilizados iniciadores EcoRI e MseI, com extensão de um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' (EcoRI + A e MseI + C); O produto desta reação foi diluído na proporção 1:60 numa solução 1:10 (TE:água miliQ). Na etapa de amplificação os iniciadores EcoRI e MseI possuíam 2 e 3 pares de bases adicionados na extremidade 3', respectivamente. Os produtos foram separados em gel desnaturante de 6% poliacrilamida e corado com prata. Usou o marcador de 50 pb.

RESULTADOS:

O protocolo de extração de DNA genômico utilizando método de CTAB permitiu a obtenção de DNA de qualidade para amplificação com marcadores AFLP. Na etapa de amplificação utilizando apenas o protocolo desenvolvido por Vos et al. (1995) os resultados obtidos não foram satisfatórios. Entretanto, o uso do kit comercial (AFLP® Core Reagent Kit) apresentou os melhores resultados. A amplificação utilizando as 32 combinações de AFLP mostrou-se altamente polimórfica. Estas combinações permitiram a obtenção de 913 bandas com média de 28,5 fragmentos por primers, com peso molecular variando de 35 a 916pb. A combinação mais polimórfica foi a EcoRI + CT /MseI + AAA com 38 bandas. A combinação EcoRI + A /MseI + C não produziu fragmentos nítidos. As 32 combinações testadas apresentaram alta capacidade informativa, possibilitando seu uso em pesquisas futuras com maior número de isolados, visando compreender a variabilidade do FOP, bem como definir subpopulações dentro das forma *specialis* permitindo sua identificação ou de novas raças. Aliado a compreensão genética do organismo este conhecimento é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle desta doença e para

ações de melhoramento visando obtenção de cultivares resistentes ou tolerante.

CONCLUSÃO:

Os iniciadores testados permitiram detectar alto polimorfismo nos isolados avaliados. Estes iniciadores permitirão dar os primeiros passos para a compreensão da variabilidade dessa espécie e assim desenvolver estratégias de controle desta doença.

Instituição de Fomento: Fapesb e CNPq

Palavras-chave: fusarium, AFLP, passiflorae.