

Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA

Eiko Eurya Kuramae* e Nilton Luiz de Souza

Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, C.P. 237, 18.603-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. e-mail: kizioka@fca.unesp.br

RESUMO. Diferenciação de *formae speciales* e raças de *Fusarium oxysporum* através de características morfológicas e culturais é bastante difícil e muitas vezes duvidosa. Marcadores moleculares RAPD e sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 (internal transcribed spacer) e o gene 5.8S rDNA foram utilizados para estimar a variabilidade genética existente entre quatro *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (*F. o. cubense*, *F. o. lycopersici*, *F. o. phaseoli* and *F. o. vasinfectum*) e entre 2 raças de *F. o. lycopersici*. A variabilidade genética em nível de DNA genômico utilizando-se marcadores moleculares RAPD foi de até 50% entre as *formae speciales* e, entre as raças 1 e 2 de *F. o. lycopersici* foi de 7%. Houve similaridade maior que 97,2% entre as diferentes *formae speciales* e raças fisiológicas de *F. o. lycopersici* na regiões correspondentes a ITS1 e ITS2, enquanto que o gene 5.8S rDNA apresentou 100% de homologia entre os isolados.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, variabilidade genética, ITS.

ABSTRACT. Genetic variability among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* and races 1 and 2 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by RAPD and DNA sequences of ITS and rDNA. Differentiation from *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* by morphological and cultural characteristics is difficult and uncertain. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and ITS1 and ITS2 (internal transcribed spacer) sequences were used to evaluate genetic variability among four different *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* (*F. o. cubense*, *F. o. lycopersici*, *F. o. phaseoli* and *F. o. vasinfectum*) and two races (1 and 2) of *F. o. lycopersici*. Genetic variability up to 50% was observed among the *formae speciales* and 7% between races 1 and 2 of *F. o. lycopersici* using RAPD molecular markers. Similarity more than 97.2% among *formae speciales* and races 1 and 2 of *F. o. lycopersici* was observed at ITS1 and ITS2 regions, whereas the 5.8S rDNA gene was 100% homologous among isolates.

Key words: *Fusarium oxysporum*, genetic variability, ITS.

Introdução

Fusarium é um gênero heterogêneo com uma distribuição muito ampla que inclui várias espécies as quais já foram descritas desde os árticos até nas areias do Sahara. Uma característica comum de *Fusarium* spp. é a produção de macroconídios na forma de foice (Windels, 1991). O estágio sexual já foi detectado em algumas espécies de *Fusarium* e características morfológicas e patológicas sobre o gênero são pouco conhecidas e menos ainda se conhece a respeito da espécie *Fusarium oxysporum*.

A especificidade de *Fusarium* em colonizar determinadas espécies hospedeiras permitiu que

Snyder e Hansen (1940) criassem um novo táxon das espécies denominadas *formae speciales*.

Segundo Windels (1991), a identificação de *Fusarium* a nível de espécies, *formae speciales* e raças é bastante difícil porque muitas variáveis devem ser consideradas.

Com o advento dos métodos moleculares baseados na análise de DNA, estes têm sido ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de *Fusarium* e na diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados. Dentre os vários métodos existentes, a análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos restringidos (RFLP) tem sido utilizada para diferenciar isolados de *Fusarium oxysporum*, por meio de sondas nucleares

(Manicom *et al.*, 1987; Manicom *et al.*, 1990) ou sondas de regiões de mitocôndrias (Kistler *et al.*, 1987; Jacobson e Gordon, 1990; Kim *et al.*, 1993) ou ainda de regiões do DNA ribossômico (Kistler *et al.*, 1987; Guadet *et al.*, 1989; Peterson, 1991; Lodolo *et al.*, 1993). O método de polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) tem sido utilizado para verificar a variabilidade genética existente entre populações de *Fusarium graminearum* Schwabe (Ouellet e Seifert, 1993) e *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *curcubitae* Snyder e Hans. (Crowhurst *et al.*, 1991) e para diferenciar raças de *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *pisi* (J.C. Hall) Snyder e Hans, (Grajal-Martín *et al.*, 1993). As regiões ITS e rDNA tem sido utilizados nos estudos de filogenia de *Fusarium* spp. (Paavanen-Huhtala *et al.*, 2000)

O presente estudo teve como objetivo determinar a variabilidade genética existente entre *formae speciales* e raças fisiológicas de *F. oxysporum* através de RAPD e seqüências de nucleotídeos das regiões ITS1, ITS2 e o gene 5.8S rDNA.

Material e métodos

Isolados de *Fusarium oxysporum*, extração de DNA genômico e reações de RAPD

Os isolados de *F. oxysporum* utilizados neste estudo foram *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. o. lycopersici* (raças 1 e 2), *F. o. phaseoli* e *F. o. vasinfectum*.

Para a obtenção de micélio bem como a extração de DNA, utilizou-se a metodologia segundo Kuramae-Izioka (1997). Os “primers” utilizados para as reações de RAPD foram provenientes dos “kits” R e X da Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) (Tabela 1). Os procedimentos para as reações de RAPD foram basicamente aquelas descritas por Williams *et al.* (1990). Utilizaram-se para as reações tubos Eppendorf de 200 µL contendo 2 µL de tampão *Taq* polimerase [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM Cl⁻]; 1,5 mM MgCl₂; 200µM de cada um dos quatro dNTPs; 30 pmoles de “primer”; 9 ng de DNA genômico e; 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL Life Technologies, Inc.). Para as amplificações de RAPD, o termociclador (MJ Research) foi programado para um ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 2,5 minutos, e um ciclo a 72°C por 5 min (Ouellet *et al.*, 1993).

Em cada tubo contendo 20 µL de reação foram adicionados 3,0 µL de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0.25% azul de bromofenol) (Sambrook *et al.*, 1989) assim como 200 ng do marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Gibco BRL Life Technologies, Inc.). Os produtos de RAPD e o

marcador de peso molecular foram separados em gel de agarose a 1,7% em TBE (0,1M de Tris-HCl, 0,1M de Ácido Bórico, 200 mM de EDTA, pH 8,3) contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989), numa voltagem de aproximadamente 5V/cm de gel.

Tabela 1. Seqüência dos “primers” usados em reações de RAPD com o número total de fragmentos usados para determinar similaridade genética entre *formae speciales* e raças de *Fusarium oxysporum*

Código – Operon	Seqüência 5'→3'	Número de fragmentos amplificados	Número de fragmentos polimórficos
OPR-08	CCCGTTGCCT	07	06
OPR-09	TGAGCAGAG	10	09
OPR-10	CCATTCCCCA	03	03
OPR-15	GGACAACGAG	10	10
OPX-01	CTGGGCACGA	02	02
OPX-02	TTCCGCCACC	05	05
OPX-03	TGGCGCAGTG	07	06
OPX-04	CCGCTACCGA	11	10
OPX-12	TCGCCAGCCA	12	10
OPX-19	TGGCAAGGCA	07	07
Total		74	68

Análise dos padrões de RAPD

Todas as análises foram realizadas no programa computacional NTSYS-pc 1.7, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1992). As análises dos padrões de RAPD foram realizadas para estimar-se a distância genética entre as *formae speciales* e raças de *F. oxysporum*. Para essa finalidade, a matriz de similaridade foi obtida com base no coeficiente Dice e o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Sequenciamento das regiões ITS1, ITS2 e gene 5.8S rDNA

Os “primers” ITS1 e ITS4 (Figura 1) (White *et al.*, 1990) foram utilizados para amplificar as regiões ITS1, ITS2 e o gene 5.8S rDNA dos isolados de *F. oxysporum* utilizados nas reações de RAPD. Para a amplificação destas regiões, reações de PCR contendo 1X tampão (200 mM Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM KCl), 100 mM de dNTPs (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 50 mM MgCl₂ (Gibco BRL Technologies, Inc.), 10 pmoles do “primer” ITS1, 10 pmoles do “primer” ITS4, 100 ng de DNA total, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL Technologies, Inc.) e água destilada autoclavada para completar o volume de 100 µL. Os controles foram realizados, porém, no lugar do DNA adicionou-se água destilada autoclavada estéril. As reações foram realizadas no termociclador MJ Research com o seguinte programa: denaturação inicial de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C por

1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Depois da amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel agarose a 2% em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico, 200mM EDTA pH 8,3).

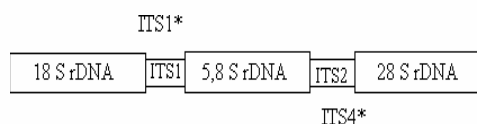


Figura 1. Localização dos genes rDNA nuclear (18S rDNA, 5,8S rDNA, 28S rDNA), espaços internos transcritos (ITS 1, ITS2) e “primers” (ITS1* e ITS4*) utilizados para amplificar as regiões ITS e o gene 5,8S rDNA

Os produtos de PCR foram purificados com colunas do kit MicroSpin S-400 HR (Amersham Pharmacia) e nas reações de sequenciamento, utilizou-se o primer ITS1 e BigDye Terminator (Perkin Elmer). Para as reações de sequenciamento, purificação das reações, géis de sequenciamento e sequenciamento utilizou-se o protocolo fornecido pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado no 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando-se o programa computacional Sequencher 3.0.

As seqüências de nucleotídeos dos diferentes isolados e mais quatro isolados de *F. o. vasinfectum* do NCBI (gi/11692813, gi/11692814, gi/1122871, gi/467737) foram alinhados utilizando-se o programa computacional Clustal W, e a análise filogenética foi realizada através do software PAUP (versão 4.0b5a) utilizando busca heurística com 50 réplicas de algoritmo branch-swapping com tree-bisection-reconnection (TBR).

Resultados e discussão

Dez diferentes “primers” de 10 bases cada foram utilizados para amplificar o DNA genômico de quatro *formae speciales* e de duas raças de *F. oxysporum*. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 4.500 a 250 pares de bases, entretanto as melhores amplificações foram de fragmentos de 2.500 a 350 pares de bases, pois alguns “primers”, para alguns isolados, não amplificaram fragmentos acima de 2.500 pares de bases, ou, quando isto ocorreu, resultaram em bandas fracas, as quais não foram consideradas nas análises.

Fragmentos na mesma posição no gel de agarose foram considerados iguais, de mesmo tamanho, como se tivessem a mesma seqüência de bases (Figura 2). O número de fragmentos polimórficos por “primer” variou de 2 a 10 (Tabela 1), e o

número total de fragmentos analisados foi 74, dos quais 68 foram polimórficos e apenas 6 monomórficos.

A distância genética entre os isolados foi determinada pelo coeficiente Dice e o agrupamento pelo método UPGMA. No fenograma obtido (Figura 3), observa-se que as quatro *formae speciales* são geneticamente distintas, assim como as duas raças de *F. o. lycopersici*.

A distância entre as raças 1 e 2 de *F. o. lycopersicum* foi 7% (Tabela 2). A distância entre as *formae speciales* *F. o. cubense* com *F. o. phaseoli* foi 50%, com *F. o. lycopersici* raça 1 e raça 2 foram 69% e 62%, respectivamente e, com *F. o. vasinfectum* foi 58% (Tabela 2).

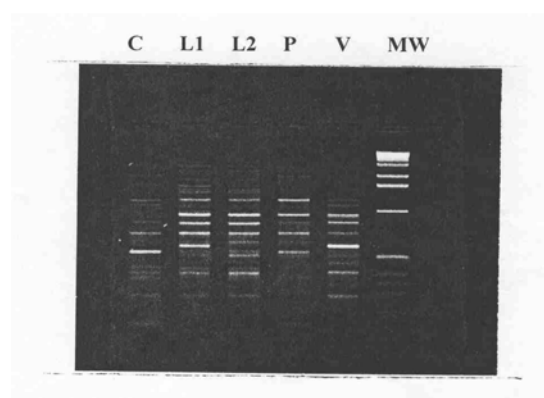


Figura 2. Padrões de RAPD com “primer” OPX-12. C: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; L1: *F. o. lycopersici* raça 1; L2: *F. o. lycopersici* raça 2; P: *F. o. phaseoli*; V: *F. o. vasinfectum*; MW: marcador de peso molecular ladder 1kb

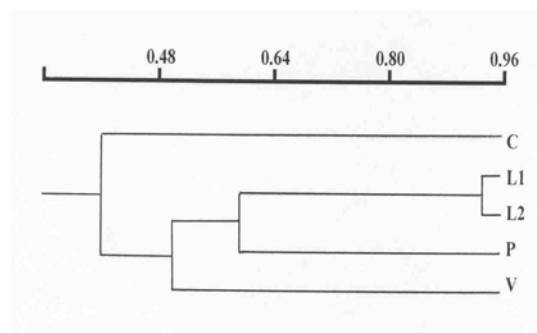


Figura 3. Fenograma de similaridade entre *formae speciales* e raças de *Fusarium oxysporum* gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente “Dice”. C: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; L1: *F. o. lycopersici* raça 1; L2: *F. o. lycopersici* raça 2; P: *F. o. phaseoli*; V: *F. o. vasinfectum*

A análise do polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso tem sido utilizada recentemente no estudo de relações genéticas entre táxons (Williams *et al.*, 1990) e representa sido

também uma ferramenta muito útil na identificação de raças e subgrupos de fungos de plantas, como por exemplo *Fusarium* spp. (Grajal-Martín *et al.*, 1993; Assigbetse *et al.*, 1994). Assigbetse *et al.* (1994) baseados em estudos de patogenicidade encontraram três raças diferentes de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e o mesmo agrupamento foi encontrado quando utilizaram marcadores moleculares RAPD, mostrando, portanto, que esses marcadores podem ser alternativas para diferenciar isolados de *F. o. vasinfectum* de acordo com sua patogenicidade. Grajal-Martín *et al.* (1993) também observaram variabilidade genética entre quatro raças (2, 1, 5 e 6) de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* através de marcadores RAPD.

Tabela 2. Similaridade (%) genética entre as *formae speciales* e raças de *Fusarium oxysporum* baseada no coeficiente "Dice". C: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; L1: *F. o. lycopersici* raça 1; L2: *F. o. lycopersici* raça 2; P: *F. o. phaseoli*; V: *F. o. vasinfectum*

Isolado	C	L1	L2	P	V
C	1,00				
L1	0,31	1,00			
L2	0,38	0,93	1,00		
P	0,50	0,46	0,52	1,00	
V	0,42	0,60	0,60	0,53	1,00

Os produtos de PCR gerados com os "primers" ITS1 e ITS4 geraram fragmentos em torno de 600 bp e, fragmentos de trezentos e setenta e quatro nucleotídeos de cada isolado foram submetidos a análise. Em *F. oxysporum*, a região ITS1, 5.8S rDNA e ITS2 correspondem a 137, 157 e 149 nucleotídeos, respectivamente. O fragmento analisado de cada isolado corresponde ao gene 5.8S rDNA completo e, 77 e 140 nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2, respectivamente. A diferença de nucleotídeos observada corresponde as regiões ITS1 e ITS2, enquanto que o gene 5.8S rDNA apresentou 100% de homologia entre os isolados. A relação filogenética entre os isolados (Figura 4) mostra que a similaridade entre as diferentes *formae speciales* e raças fisiológicas de *F. o. lycopersici* foi maior que 97,2%. As seqüências de *F. o. vasinfectum*, gi/11692813, gi/11692814, gi/1122871 e gi/467737, foi 100% similar ao isolado de *F. o. vasinfectum* por nós estudado. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* apresentou similaridade de 99,5%, 99,0% e 99,0% com *F. o. cubensis*, *F. o. phaseoli* e *F. o. lycopersici*, respectivamente.

Atualmente, seqüências de espaços internos transcritos de genes de rDNA, bem como os genes 28S, e 5.8S de rDNA têm sido amplamente utilizados nos estudos de filogenia e taxonomia de *Fusarium* spp. Com o presente trabalho pôde-se estabelecer a variabilidade genética existente nas

regiões ITS1 e ITS2 das *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças *F. o. lycopersici*.

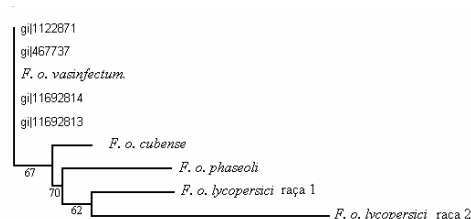


Figura 4. Dendrograma ilustrando a distância derivada das seqüências das regiões ITS-5.8S rDNA de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (gi/1122871, gi/467737, gi/11692814, gi/11692813), *F. o. cubense*; *F. o. phaseoli*; *F. o. vasinfectum*, *F. o. lycopersici* raça 1 e *F. o. lycopersici* raça 2. O número nas ramificações representa o valor de 100 bootstras

Referências

- ASSIGBETSE, K.B. *et al.* Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*, St. Paul, v.84, n.6, p.622-626, 1994.
- CROWHURST, R.N. *et al.* Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *curcubitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA. *Current Genet.*, Heidelberg, v.20, n.5, p.391-396, 1991.
- GRAJAL-MARTÍN, M.J. *et al.* Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.6, p.612-614, 1993.
- GUADET, J. *et al.* Phylogeny of some *Fusarium* species as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Bio. Evol.*, Camberra, v.6, p.227-242, 1989.
- JACOBSON, D.J.; GORDON, T.R. The variability of mitochondrial DNA as a indicator of the relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mycol. Res.*, Cambridge, v.94, p.734-744, 1990.
- KIM, D.H. *et al.* Mitochondrial DNA (mtDNA)-relatedness among *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the curcubitaceae. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.1, p.91-97, 1993.
- KISTLER, H.C. *et al.* Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.9, p.1289-1293, 1987.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium Oxysporum* for RAPD. *Revista Unimar*, Maringá, v.19, n.3, p.683-689, 1997.
- LODOLO, E.J. *et al.* A rapid molecular method to distinguish *Fusarium species*. *Mycol. Res.*, Cambridge, v.97, p.345-346, 1993.

- MANICOM, B.Q. *et al.* A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.80, n.4, p.336-339, 1990.
- MANICOM, B.Q. *et al.* Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.5, p.668-672, 1987.
- OUELLET, T.; SEIFERD, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.9, p.1003-1007, 1993.
- PAAVANEN-HUHTALA, S. *et al.* RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycol. Res.*, Cambridge, v.5, n.103, p.625-634, 1999.
- PETERSON, S.W. Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequences comparisons. *Phytopathology*, St. Paul, v.81, n.9, p.1051-1054, 1991.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software Publ, Setauket, N.Y. 1992.
- SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. 1989.
- SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium* with reference to discolor and other sections. *Am. J. Bot.*, Columbus, v.27, p.64-67, 1940.
- WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* (Ed.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.
- WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNAs polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Ac. Res.*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WINDELS, C.E. Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology*, St. Paul, v.81, n.9, p.1048-1051, 1991.

Received on August 09, 2001.

Accepted on April 01, 2002.