

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium  
oxysporum* f. sp. *ubense* DO NORDESTE, SUDESTE E SUL DO  
BRASIL**

**SHIRLEY NASCIMENTO COSTA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MARÇO – 2013**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* DO NORDESTE, SUDESTE E SUL DO BRASIL**

**SHIRLEY NASCIMENTO COSTA**

Bacharel em Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira

Co-Orientador: Fernando Haddad

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**MARÇO – 2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C837	<p>Costa, Shirley Nascimento. Caracterização molecular de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil / Shirley Nascimento Costa. _ Cruz das Almas, BA, 2013. 71f.; il.</p> <p>Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira. Coorientador: Fernando Haddad.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Mal-do-Panamá – Fungos fitopatogênicos. 2.Banana – Análise. 3.Microsatélites – Diversidade genética. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 632.3</p>
------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
SHIRLEY NASCIMENTO COSTA**

Dr. Fernando Haddad  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Aristóteles Pires de Matos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MARÇO – 2013**

*Aos meus pais Nildes e Dinho;  
Pelo apoio, amor, compreensão e cuidado.*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e seu infinito cuidado.

Ao meu orientador Dr. Francisco Ferraz Laranjeira que mesmo distante se fez presente. Foi amigo e pai - Quando for uma orientadora, vou lembrar-me de você.

Ao meu co-orientador, Dr. Fernando Haddad, pela oportunidade, apoio, ensinamentos e cobranças. Tudo isso serviu para meu crescimento profissional e pessoal. Hoje já estou “colhendo os frutos” dessa dedicação.

Ao meu co-orientador, Dr. Saulo Oliveira. Palavras seriam insuficientes para definir minha imensa gratidão por você. Serei sempre grata. Seu apoio foi essencial nessa minha jornada!

Aos amigos de laboratório Gil, Milene, Djalma, Nara, Yslai.

A Dr. Hermes, Dr. Carlos Vildoso, Dr. Edson pela atenção e ensinamentos.

As minhas amigas Ane, Jú, Verinha e Jack que nos momentos de ansiedade e nervosismo estiveram sempre presentes, e por todos os momentos de descontração.

Ao meu namorado Luiz Alberto, pela dedicação; e a sua família, por todo cuidado, principalmente na etapa final deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular: Eliane, Paulo, Raimundão, e em especial Vanderson.

Ao pessoal de campo – “Bizunga” e Sinésio.

Aos vigilantes da EMBRAPA pelo cuidado e atenção (Max, Rogério, Ivonildo, Bruno), muito obrigada!

Aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal, em especial Jorge Teodoro.

A minha família, meu espelho.

Aos que colaboraram, Larissa, Ana Cristina, Ângelo, Lílian, Dani, Naíra, Rafael, Wilma, Décio, Néia, Cátia, Dalma, os João e Thuany.

A todos os agricultores que auxiliaram nas coletas e cederam as amostras para a realização da pesquisa; à equipe do projeto Formoso.

Aos colegas de curso, Heliab, Tamires, Keilla e Tamãra.

Ao programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e a Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade.

À FAPESB e Capes pela bolsa de estudo e pelo financiamento para a execução do trabalho.

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.0 Aspectos gerais da cultura da bananeira.....	10
1.1 O mal - do- Panamá.....	11
1.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> .....	13
2.0 Marcadores moleculares.....	14
2.1 Variabilidade genética em <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> .....	16
2.2 Biologia de populações.....	17
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>19</b>

## Capítulo 1

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* DO NORDESTE, SUDESTE E SUL DO BRASIL

Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Objetivo.....	30
Material e métodos .....	30
Resultados.....	35
Discussão.....	62
Considerações finais.....	65
Referências Bibliográficas.....	67



## RESUMO

COSTA, S.N. Caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Cruz das Almas, 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A bananicultura é fundamental para o agronegócio brasileiro. Contudo, diversos problemas fitossanitários limitam a sua produção. O mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é uma das principais preocupações, visto que esse fungo é endêmico em todas as regiões produtoras e é habitante do solo, o que dificulta o manejo da doença. O objetivo deste trabalho foi compreender a estrutura populacional de Foc em diferentes regiões produtoras do Brasil, uma vez que essas informações são relevantes para o entendimento desse patossistema. Para isso, foram utilizados 214 isolados de Foc das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país, os quais foram caracterizados por meio de marcadores microssatélites (SSR). Os marcadores separaram os isolados em 52 haplótipos distintos. Não foi encontrada correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas para as regiões Sudeste e Nordeste. No entanto, para a região Sul a correlação foi moderada, e significativa. Por meio da AMOVA constatou-se que 67,9% da variação total ocorreu dentro dos estados, ou seja, entre os municípios, e 25,3% entre os estados. Com base na composição genética dos isolados, foi verificada a existência de 16 prováveis grupos genéticos ancestrais. Entretanto, tais grupos estão distribuídos nas diferentes regiões geográficas e cultivares de onde foram obtidos. Os resultados indicam que os isolados dos diferentes estados compõem uma única população. Assim, as diferenças genéticas entre isolados podem ser, devidas à mistura de diferentes linhagens clonais. A diversidade encontrada reafirma a necessidade de estudos com este patógeno, pois essa característica pode estar relacionada ao seu potencial evolutivo e, possivelmente, à sua capacidade de suplantar a resistência das cultivares geradas por programas de melhoramento genético.

Palavras chave: mal-do-panamá, microssatélite, diversidade genética

## ABSTRACT

COSTA, S.N. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* isolates. Cruz das Almas, 2013. Dissertation (Master's Degree in Agricultural Microbiology). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

The banana production is a major component of Brazilian agribusiness. However, several problems limit the production of this crop. Panamá disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), is a major concern since the only control measure is the use of resistant varieties. Foc is endemic to all producing regions, and is soilborne, which hinders this disease's management. The objective of this study was to understand the population structure of Foc in different producing regions of Brazil. Therefore, 214 Foc isolates from the Northeast, Southeast and Southern regions were used and characterised by microsatellite markers (SSR). The markers sorted the isolates into 52 distinct haplotypes. There was no correlation between the genetic and geographical distances for the Southeast and Northeast region. However, a moderate significant the correlation was moderate and highly significant for the Southern region. The AMOVA analysis showed that 67.9% of the total variation occurred within the states. Based on the isolates' genetic constitution, 16 genetic clusters were formed. These were distributed into different geographical regions and cultivars from which they were obtained. Results indicate that isolates from different states comprise a single population, which is predominantly clonal. Moreover, the genetic differences between isolates are due to the mixture of different clonal lineages. The encountered diversity points to the need for additional studies since that characteristic might be related to Foc's evolutionary potential and possibly to its ability to overcome the resistance of by breeding programs' generated cultivars.

Keywords: Panamá-disease, microsatellite, genetic variability

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.0 Aspectos gerais da cultura da bananeira

A banana é a fruta mais consumida no mundo (FAO, 2013). O Brasil ocupa a 5ª posição na produção mundial, e tem uma área cultivada de 512 mil hectares (FAO, 2013), sendo que quase a totalidade dessa produção é destinada ao consumo interno.

A bananicultura está entre as atividades agrícolas de maior expressão econômica e de elevado alcance social no Brasil. A banana é cultivada em todos os Estados brasileiros. No entanto, a região Nordeste se destaca com 38% da produção, sendo a Bahia responsável por mais de 15% desse total produzido nessa região. (IBGE, 2013).

A bananeira (*Musa spp.*) pertence à família *Musaceae* e seu provável centro de origem é região sudoeste da Ásia (DE LANGHE *et al.*, 2009). A planta é uma herbácea de caule subterrâneo (rizoma), a partir do qual formam-se as folhas, raízes e inflorescências. De acordo com Cordeiro (2000), diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento e produção da cultura, tais como os relacionados às características genéticas de cada variedade, condições edafoclimáticas, fatores bióticos e a intervenção humana.

Como ocorre em qualquer espécie cultivada, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. Entre as principais doenças fúngicas destacam-se a Sigatoka-negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a Sigatoka-amarela, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach, e o mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* E.F. Smith Sn. & Hansen (Foc) (CORDEIRO *et al.*, 2005; PLOETZ, 2006).

Ao contrário da Sigatoka-negra, o mal-do-Panamá é endêmico em todas as regiões bananiculoras do mundo. Seu controle com fungicidas é inviável, sendo reconhecida como uma das principais ameaças a produção da banana (DITA *et al.*, 2010). A medida de controle mais eficiente é o uso de variedades resistentes, mas sua utilização está condicionada às raças do patógeno (GERLACH *et al.*, 2000; GROENEWALD *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006). Um exemplo, é a cultivar

Cavendish, que é resistente às raças 1 e 2 de Foc, mas não à raça 4, a qual está presente nos países asiáticos. No entanto, cultivares apreciadas pela população, como a banana 'Maçã', estão desaparecendo do mercado devido à alta suscetibilidade ao mal-do-Panamá. Altos níveis de incidência da doença têm sido constatados nos últimos anos em variedades dos subgrupo Prata, principalmente em perímetros irrigados, aumentando a preocupação com a doença no Brasil (Zilton Cordeiro, Embrapa CNPMF, comunicação pessoal).

### 1.1 O mal-do-Panamá

O mal do Panamá foi descrito pela primeira vez na Austrália, em 1876, sendo em seguida disseminado para países da América do Central e do Sul. (STOVER, 1972).

No Brasil o mal-do-Panamá foi inicialmente observado em 1930, em Piracicaba-SP, e em menos de 4 anos dizimou cerca de um milhão de plantas de banana cv. 'Maçã' (CORDEIRO *et al.*, 2005). Posteriormente, grandes áreas de banana 'Maçã' foram dizimadas em outras regiões daquele Estado e também em Minas Gerais, Goiás e Espírito Santo. Neste último, mais de 20% das plantas pertencentes ao grupo 'Prata' também foram eliminadas (PLOETZ, 1990; MATOS *et al.*, 1998).

A infecção dá-se pelas raízes, seguidas do sistema vascular da planta, em um processo sistêmico, atingindo os tecidos parenquimáticos anexos (CORDEIRO *et al.*, 2005). Em algumas cultivares resistentes a formação de géis e tiloses foram relatados como mecanismos de defesa (ASCENSÃO e DUBERY, 2003). Tiloses são modificações da parede celular, que crescem a partir dos plasmodesmas obstruindo parcialmente ou totalmente os vasos do xilema (HARPER *et al.*, 2012). Ocorre em respostas a injúrias mecânicas ou, àquelas causadas por microrganismos. Vandermolen *et al.* (1987) avaliando plantas da cultivar Valery, resistente a Foc, observaram a formação de tiloses após 8 dias de inoculação.

Nas doenças vasculares, a produção de tiloses pode ocorrer em associação à formação de géis. Os géis são compostos de pectinas produzidas nas células do parênquima adjacentes aos vasos do xilema (SUN *et al.*, 2008). De acordo com Beckman e Zarrogian (1967), variedades suscetíveis de banana,

como 'Maçã', respondem com formação de tiloses, porém tardiamente, permitindo a colonização de Foc. Além da formação de gel e tiloses como respostas de defesa, Ascensao e Dubery (2000) comprovaram acúmulo de compostos fenólicos e lignina nas paredes celulares como parte dos mecanismos de defesa nas raízes de bananeiras.

Os sintomas exibidos pelas plantas infectadas podem ser observados interna ou externamente. Externamente nota-se um amarelecimento progressivo, das folhas mais velhas para as folhas mais novas, começando pelos bordos do limbo em direção à nervura principal. Posteriormente ocorre murcha, seguida da quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, o que dá à planta o aspecto típico de um guarda-chuva fechado (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Frequentemente, também podem ser encontradas rachaduras na base do pseudocaule. O tamanho de tais lesões varia conforme a área afetada no rizoma. Esses sintomas são mais comuns em plantas mais velhas, no entanto isso não descarta a possibilidade de plantas jovens serem afetadas (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Pontuações pardo-avermelhadas e descoloração vascular caracterizam os sintomas internos (DITA *et al.*, 2010). Estes podem ser observados ao se realizarem cortes transversais ou longitudinais no pseudocaule ou rizoma. As pontuações pardo-avermelhadas tem origem na oxidação de fenol quando na presença do patógeno (CORDEIRO *et al.*, 2005).

A descoloração vascular no pseudocaule concentra-se mais periféricamente, mantendo-se o centro claro. No rizoma, a descoloração é mais visível na área de densa vascularização, onde o estelo se junta ao córtex, podendo-se observar a evolução dos sintomas do rizoma para as brotações a ele aderidas (CORDEIRO *et al.*, 2005). Dependendo do nível de resistência da cultivar, plantas doentes não chegam a produzir cachos ou, quando produzem, têm frutos com valor comercial comprometido.

O controle é dificultado pelo fato de a murcha ser causada por um fungo habitante do solo que sobrevive por períodos prolongados mesmo na ausência da cultura (STOVER, 1962, 1990). Existem medidas preventivas que podem impedir o aumento da intensidade da doença, como, por exemplo, evitar áreas encharcadas e cultivadas anteriormente com bananeira; controlar nematóides e insetos e efetuar adubações equilibradas.

Nesse sentido, o uso de variedades resistentes é a medida de controle mais efetiva. No entanto, o surgimento de novas raças é uma preocupação para os programas de melhoramento genético, pois uma cultivar pode apresentar diferentes níveis de resistência, a depender das condições locais. Isso torna imprescindível o conhecimento da biologia de população desse patógeno.

### 1.3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* é um fungo habitante de solo. Os esporos por ele produzidos são os macroconídios e microconídios. Clamidósporos são produzidos como estruturas de resistência e sobrevivência (ALEXPOULOS *et al.*, 1996).

A classificação atual de *Fusarium oxysporum* é dividida em seções: *formae speciales* e raças (SNYDER e HANSEN, 1940). Esses autores usaram o conceito *forma specialis* para distinguir isolados patogênicos que são morfologicamente semelhantes a isolados da mesma espécie, mas que diferem quanto à habilidade em parasitar hospedeiros específicos. Assim, cada *forma specialis* possui um elevado grau de especificidade ao hospedeiro (NELSON *et al.*, 1983). Na cultura da banana o agente etiológico é *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Quanto às raças, o patógeno é específico a cultivares. Para a bananicultura há 3 raças predominantes (GROENEWALD *et al.*, 2006), as quais são diferenciadas por variedades indicadoras. A variedade Gros Michel e Maçã são indicadoras da raça 1, a Bluggoe, indicadora da raça 2, e as variedades do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão e Grande Naine) são indicadoras da raça 4 (SU *et al.*, 1986; CORDEIRO *et al.*, 2005).

A Raça Tropical 4 (TR4) e a subtropical (ST4) foram descritas como biótipos da Raça 4 (SU *et al.*, 1986; BENTLEY *et al.*, 1998). Desde seu aparecimento, a TR4 vem causando sérios problemas em plantações comerciais de banana na Austrália, China, Filipinas, Malásia, Sulawesi, Sumatra, Taiwan e Vietnã (MOLINA *et al.*, 2008; BUDDENHAGEN, 2009). A TR4 é patogênica tanto nos subtrópicos quanto nos trópicos (BUDDENHAGEN, 2009), enquanto que a ST4 se torna mais agressiva quando bananas Cavendish são expostas a estresses abióticos nos subtrópicos. O surgimento dessa nova raça é

preocupante, pois além do subgrupo Cavendish, também afeta as cultivares susceptíveis às raças 1 e 2 (SU *et al.*, 1986).

A dispersão de Foc pode ocorrer a partir de rizomas, raízes e pseudocaule de plantas doentes. Além disso, animais, o homem, equipamentos e ferramentas podem ser agentes de disseminação (VENTURA e HINZ, 2002). Para que não ocorra a disseminação da doença, as mudas devem ser provenientes de áreas sem histórico da doença, ou de preferência deve-se utilizar mudas micropropagadas para a instalação dos novos plantios de banana.

Há duas portarias referentes ao trânsito para a cultura da banana, considerando a Sigatoka- amarela (Nº235 de 21/09/2004 e Nº 220 de 19/08/2004), para o Estado da Bahia as quais só permitem o trânsito e comércio de materiais propagativos (mudas, rizomas, etc.) frutos e flores originários do próprio Estado, se essas cargas estiverem acompanhadas de Permissão de Trânsito Interno de Vegetais – PTIV. Essas portarias dificultam também o transporte de mudas de banana infectadas com Foc.

## 2.0 Marcadores moleculares

Nas últimas décadas várias metodologias moleculares têm sido desenvolvidas, contribuindo significativamente para o conhecimento da variabilidade genética dos microrganismos. A técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta robusta para diagnosticar e detectar fungos fitopatogênicos e tem contribuído na geração de informações para programas de melhoramento genético visando resistência a fitopatógenos.

A sua utilização tem aumentado a cada ano possibilitando a ampliação dos conhecimentos dos aspectos da diversidade genética dos fitopatógenos (DUTECH *et al.*, 2007). Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: RAPD (Polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso), AFLP (Polimorfismos do comprimento de fragmentos amplificados) e microssatélites ou SSR (GROENEWALD *et al.*, 2006; DUTECH *et al.*, 2007).

Os microssatélites (SSR) são caracterizados por, ao longo do genoma, possuírem repetições em cadeia de mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos. Para amplificação dessa região, utilizam-se iniciadores específicos de 20 a 30 bases. De acordo com Dutech *et al.*(2007), cada segmento

amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo locus dentro da população.

Os marcadores moleculares SSR têm sido bastante utilizados, principalmente em função do polimorfismo e locos específicos (YANG e ZHONG, 2008). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou até mesmo entre espécies geneticamente relacionadas. Isso permite a seleção de iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Esse marcador tem sido aplicado em estudos de genética de populações e biologia evolutiva de muitos organismos, incluindo as espécies fúngicas (BALMAS *et al.*, 2005).

Njambere *et al.* (2010) desenvolveu 33 loci microssatélite para caracterizar uma população de 42 isolados de *Sclerotinia trifoliorum*. Esses loci mostraram-se úteis para a avaliação da estrutura de população, e para análises ecológicas em *S. trifoliorum* e em outras espécies de *Sclerotinia*.

Xu *et al.* (2012) desenvolveram 109 marcadores microssatélites para análise de diversidade genética de isolados de *Fusarium verticillioides*, com base em informações do seu genoma. Esses marcadores mostraram-se altamente polimórficos e detectaram a diversidade entre os isolados, sendo que a diversidade não apresentou correlação com a distribuição geográfica do fungo.

Nesse contexto, os marcadores moleculares microssatélites podem ser utilizados de maneira complementar para o entendimento de eventos em diversas escalas temporais, revelando diferentes aspectos e percepções de uma história evolutiva (ZHANG e HEWITT, 2003). Assim, muitos estudos estão sendo conduzidos separadamente, com o objetivo de se conhecer os efeitos da fragmentação histórica versus contemporânea na estrutura genética de populações com o auxílio de diferentes marcadores, os quais refletem respostas distintas nas escalas temporais (KEYGHOBADI, 2007).

Contudo, trabalhos que incluem diversidade de fungos com reprodução assexuada são complexos e requerem não a simples utilização de ferramentas que avaliem o genótipo, mas sim uma combinação que avaliem o fenótipo e o genótipo.



## 2.1 Variabilidade genética em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Há diversos mecanismos evolutivos que podem criar novos tipos de variação genética nas populações de microrganismos, ou até mesmo promover a reorganização da variação preexistente. Dentre esses mecanismos podem ser citados a mutação, a recombinação e a migração (HARTL e CLARK, 2010).

A mutação é a responsável pelo surgimento de novos alelos na população, e por isso, pela geração de variabilidade. De acordo com Pierce (2003), ela é a matéria-prima da evolução. Já a recombinação é responsável pelo rearranjo alélico, ou seja, ela une em um único cromossomo mutações que ocorrem em diferentes genes, ampliando a variabilidade criada pela mutação. A migração é o evento que favorece a ampliação das mutações entre as subpopulações, por meio do fluxo gênico (PIERCE, 2003).

O surgimento de indivíduos com diferenças no padrão de virulência e/ou agressividade está intimamente relacionado a esses mecanismos evolutivos (MILLER e JOHNSON, 2000). Sendo assim, a migração é responsável pelo influxo de novos genótipos do patógeno em diferentes áreas. A introdução de novas variantes de um patógeno ocasiona o aumento da diversidade e diferenças na patogenicidade (GOODWIN 1997; LINDE *et al.*, 2010).

Assim, quanto à especificidade a cultivar, Foc permanece dividido da seguinte forma: a raça 1 afeta 'Gross Michel' e 'Maçã', a raça 2 afeta 'Bluggoe' e outras bananas de cocção e a raça 4 afeta as variedades do subgrupo Cavendish (SU *et al.*, 1986; BENTLEY *et al.*, 1998). Outros métodos tem sido utilizados para classificação das raças de Foc. Dita *et al.* (2010), desenvolveram um primer específico para raça TR4, com base nos polimorfismos encontrados na região IGS, para identificação dessa raça, pertencente ao VCG 01213.

Outros critérios baseados na estrutura dos grupos de compatibilidade vegetativa (VCG – Vegetative Compatibility Groups) e diversidade molecular também têm sido adotados (PLOETZ, 1990; BENTLEY *et al.*, 1998; FORIE *et al.*, 2009).

Thangavelu *et al.* (2012), por meio de marcadores ISSR, estudaram a diversidade genética de 107 isolados de Foc de diferentes regiões da Índia e com base nas análises filogenéticas foi possível inferir a ampla diversidade genética existente, assim como a origem polifilética dos isolados. Além disso, esses

marcadores separaram os isolados de Foc em sete grupos com base nas raças e grupo de compatibilidade vegetativa.

No Brasil, poucos estudos têm sido realizados visando caracterizar a estrutura das populações de Foc em bananeiras. No entanto, segundo Goes e Moreto (2001), no Brasil ocorrem as raças 1 e 2, com predominância da raça 1. Silva *et al.* (2010), utilizaram marcadores SSR e RAPD para caracterizar a variabilidade genética de Foc no Estado de Santa Catarina, os quais foram eficazes na detecção da variabilidade existente entre os isolados, e permitiu a separação desses em 3 grupos distintos.

Em relação aos VCGs, isolados brasileiros tem sido agrupados em 0120, 0124, 0124/5, 0125, 0129 e 01210 (PLOETZ, 1990; MATOS *et al.*, 2009). Todavia sabe-se da existência de outros grupos, pois estudos em andamento, isolados brasileiros não foram alocados nesses VCGs (DITA *et al.*, resultados não publicados).

Para a estimativa da influência de cada um dos mecanismos evolutivos são utilizados os marcadores genéticos neutros, como RAPD, RFLP, AFLP e microsatélites ou SSR (MCDONALD, 1997; MEEÛS *et al.*, 2007). Quanto maior a resolução dos marcadores, maior é a capacidade de responder a perguntas mais complexas associadas à diversidade (riqueza e equitabilidade) genética.

Até a presente data, não há marcadores moleculares desenvolvidos para Foc. No entanto, Bogale *et al.* (2005) desenvolveram alguns SSR para *Fusarium oxysporum* utilizando 21 *formae speciales*. Sendo estes testados por Silva *et al.* (2010) para análise da diversidade em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina, conseguindo separar os isolados em grupos distintos. Demonstrando a possibilidade de utilização destes em estudos de diversidade de Foc.

### 2.3 Biologia de populações

A biologia de população de fitopatógenos estuda os aspectos ecológicos e genéticos de populações, portanto é importante para o conhecimento de epidemiologia de doenças de plantas (MILGROOM e PEEVER, 2003).

Evolutivamente, a variabilidade genética das populações pode determinar o potencial adaptativo de uma organismo diante de fatores bióticos e abióticos. A

variabilidade afeta diretamente o manejo de doenças. Logo, o fluxo de genes pode resultar na introdução de isolados mais agressivos e a seleção vai influenciar a eficácia e durabilidade de cultivares resistentes (McDONALD e LINDE, 2002).

Nesse sentido, conhecer a variabilidade genética de uma população é importante para determinação de estratégias que visam o manejo das doenças, principalmente aquelas relacionadas à resistência do hospedeiro. Já que a estrutura genética reflete a história e o potencial evolutivo de uma população (LEUNG *et al.*, 1993), programas de melhoramento de plantas que visam à resistência a doenças podem ser beneficiados com os estudos de biologia populacional de fitopatógenos (McDONALD e LINDE, 2002)..

A estrutura genética mostra a distribuição aleatória dos alelos e genótipos, espacial e temporalmente. Tal distribuição é o resultado da ação de forças evolutivas como, por exemplo, mutação, migração e deriva genética, que atuarão dentro do contexto de cada espécie e população (HAMRICK, 1982).

Duas questões são imprescindíveis no estudo da variação genética populacional de uma espécie: a quantificação da variabilidade genética dentro da população, e a caracterização de sua estruturação (HAMRICK, 1982).

Para a quantificação da variabilidade genética em população de fungos fitopatogênicos, têm-se usado o índice de fixação e porcentagem de locos polimórficos (McDONALD, 2004).

As mudanças nas frequências genótípicas e gênicas numa população são promovidos por processos microevolutivos, tais como, sistemáticos e evolutivos. Os processos sistemáticos tendem a mudar as frequências gênicas de uma maneira prevista, tanto em quantidade como em direção, já o dispersivo, surge em pequenas populações por efeitos de amostragem, no entanto não é possível prever a direção (MAYR, 1977).

Além disso, o conhecimento da frequência gênica ou alélica, permite avaliar as mudanças genéticas de uma população (NEI, 1978), sendo que o número de alelos observados por loco tende a aumentar em função do tamanho da amostra, assim quanto maior a amostragem, maior a chance de detecção de alelos raros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXPOULOS, C. J.; MIMS, C. J.; BLACKWELL. M. **Introductory mycology**. New York, J. Wiley e Sons Inc., 4<sup>a</sup> ed. 1996. 880 p.

ASCENSÃO, A. R. D. C. F. de; DUBERY, I. A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp.  *cubense* race four. **Biochemistry and Cell Biology**, v.90, p.1173-1180, 2000.

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

BECKMAN, C.H.; ZARROGIAN, G.E. Origin and composition of vascular gel in infected banana roots. **Phytopathology**, v.57, p 11-13, 1967.

BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; MOORE, N.Y.; DAVIS, D. R.; 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.; STEENKAMP, E.T. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. **Molecular Ecology**, v.5, p.622-624, 2005.

BUDDENHAGEN, I.W.. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* and history of introduction of tropical race 4 to better manage banana production. In: Jones D.; Van Den Bergh I (Eds) **Proceedings of the international Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for**

***sustainable production and improved Livelihoods***, White River, South Africa. ISHS Acta Horticulture v. 828, p.193-204, 2009.

CORDEIRO, M. J. Z. (Org.). **Banana Fitossanidade**, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 121p. 2000.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: H. Kimati , L. Amorin, *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. Doenças da bananeira (*Musa* spp.), p.99-117.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; MARET, P.; PERRIES, X.; DENHAM, T. Why bananas matter: An introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v.7, p.165-177, 2009.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA JR, M. T.; KEMAG, H. J. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. **Plant Pathology**, v.59. p.348–357, 2010.

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

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)**  
Disponível em: < [http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/). > . Acesso em: 16 de jan. 2013.

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

GERLACH, K.S.; BENTLEY S.; MOORE, N.Y.; PEGG K. G.; AITKEN E. A. B. Characterisation of Australian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* by

DNA fingerprinting analysis. **Australian Journal Of Agricultural Research**, v. 51, p.945-953, 2000.

GOODWIN, S.B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology**, v.87, p.462–473, 1997.

GOES, A.; MORETO, K.C.K. Mal-do-Panamá. In **Bananicultura**. RUGGIEIRO, C. FUNEP, Jaboticabal. p.419-435. 2001.

GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG N.; MARASAS 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.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, p.1685-1693, 1982.

HARL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de Genética de populações**. 4º ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HARPER, J.C.; BENJAMIN BOMFLEUR, B.; DECOMBEIX, A. L.; EDITH L.; TAYLOR, E.L.; TAYLOR, T. N.; KRINGS, M. Tylosis formation and fungal interactions in an Early Jurassic conifer from northern Victoria Land, Antarctica. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.175 p.25–31, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA. Disponível em :<<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 16 de jan. 2013.

KEYGHOBADI, N. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. **Canadian Journal of Zoology**, v.85, p.1049–1064. 2007.

LEONG, S. K.; LATIFFAH, Z.; E BAHARUDDIN, S. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp.  *cubense* isolates from Malaysia. **African Journal of Microbiological Research**, v.4, p.1026–1037. 2010.

LEUNG, H.; NELSON, R.J.; LEACH, J.E., Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. **Advances in Plant Pathology**, v.10, p. 157-205, 1993.

LINDE, C. C.; LILES, J. A.; THRALL, P. H. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile maritima* in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1946-1954, 2010.

MATOS, A. P.; BORGES, M. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. M.; ANDRADE, S. M. Reaction of banana genotypes to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) under field conditions in Brazil. **Reunion Acorbat**, p.311-319, 1998.

MATOS, A. P.; SILVEIRA, J. D. S.; FERREIRA, D. M. V.; CORDEIRO, Z. J. M.; TROCOLI, R. O. Characterisation of Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* into Vegetative Compatibility Groups in Brazil. **Acta Horticulturae**, 2009.

MAYR, E. **Populações, espécie e evolução**. São Paulo: EDUSP, 1977. 485p.

McDONALD, B.A. The population genetics of fungi: Tools and techniques. **Phytopathology**, v. 87, p.448-453, 1997.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, p.163-80, 2002.

McDONALD, B. A. Populations genetics of plant pathogens. **APSnet Educations Center Advanced Topics**. 2004. 1 CD ROM.

MEEÛS, T. D.; MCCOY, K. D.; PRUGNOLLE, F.; CHEVILLON, C.; DURAND, P.; HURTREZ-BOUSSÈS, S.; RENAUD, F. Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". **Infection Genetics and Evolution**., v.7, p.308-332, 2007.

MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **Plant Disease**, v. 87, p.17-608, 2003.

MILLER, J. S.; JOHNSON, D. A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. **Phytopathology**, v.90, p.220–227, 2000.

MOLINA, A. B.; FABREGAR, E. G.; SINOHIN, V.; FOURIE, G.; VILJOEN, A., Tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* causing new Panama wilt epidemics in Cavendish varieties in the Philippines. **Phytopathology**, v.98, p.108. 2008.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.

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.

NJAMBERE, E. N.; VANDEMARK, G.; CHEN, W. Development and characterization of microsatellite markers of the fungal plant pathogen *Sclerotinia trifoliorum*. **Genome**, v 53, p. 494–500, 2010.

PEGG, K., LANGDON. Fusarium wilt (Panama Disease): a review. In: Persley, G.J.; De Langhe, E. A. Banana and Plantain breeding strategies. Camberra: ACITAR. **INTERNATIONAL WORKSHOP HELD ET CAIRNS**. v.21, 1987, Austrália. Proceedings... ACIAR, 1987. 187p.

PIERCE, B. A. **Genética: Um enfoque conceitual**. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2003. 615p.

PLOETZ, R. C. Variability In *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1357-1363,1990.



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

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.

SILVA, C. M.; HINZ, R. H.; STADNIK, M. J.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A. Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v.40, p. 2480-2485, 2010.

SMITH, M. K.; HAMILL S.D.; LANGDON, P. W.; GILES, J. E.; DOOGAN, V. J.; PEGG, K. G. Towards the development of a Cavendish banana resistant to race 4 of Fusarium wilt: gamma irradiation of micropropagated Dwarf Parfitt (*Musa* spp., AAA group, Cavendish subgroup). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.46, p. 107-113, 2006.

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

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

SU, H. J.; HWANG, S. C.; KO, W. H. Fusarial wilt of Cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, v.70, p.814–818, 1986.

SUN, Q.; ROST, T. L.; MATHEWS, M. A. Wound-induced vascular occlusions in *Vitis vinifera* (vitaceae): tyloses in summer and gels in winter **American Journal of Botany**, v.95 n.12, p.1498–1505, 2008.

THANGAVELU, R.; MUTHU KUMAR, K.; GANGA DEVI, P.; MUSTAFFA, M. M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Isolates (Foc) of India by

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. **Molecular Biotechnology**, v.51, p.203–211, 2012.

VANDER MOLEN, G. E.; BECKMAN, C. H.; RODEHORST, E. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, p.185-200, 1987.

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.

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

ZHAN, J.; McDONALD, B.A. The interaction among evolutionary forces in the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Fungal Genetics. Biology.**, v.41, p.590-9, 2004.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v.12, p.563–584, 2003.

XU, R.; ZHEN-DONG, Z.; HONG-JIE, LI.; CAN-XING, D.; XIAO-MING, W. SSR Marker Development and Analysis of Genetic Diversity of *Fusarium verticillioides* Isolated from Maize in China. **China Agriculture Science**, v.45, p.52-66, 2012.

## **CAPÍTULO 1**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* DO NORDESTE, SUDESTE E SUL DO BRASIL**

## RESUMO

COSTA, S.N. Caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Cruz das Almas, 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é o agente etiológico do mal-do-Panamá. Essa doença vem destruindo inúmeras plantações de banana em diferentes regiões produtoras. A medida de controle mais eficiente para Foc é a utilização de variedades resistentes, no entanto o surgimento de novas raças que suplantem a resistência de cultivares é uma preocupação constante. Assim, estudos de variabilidade genética da população deste patógeno são importantes para determinação de estratégias que visem o manejo da doença. O objetivo deste trabalho foi conhecer a estrutura populacional de Foc em diferentes regiões produtoras do Brasil. Para tanto, 214 isolados de Foc foram caracterizados com a utilização de marcadores microssatélites (SSR). Os isolados foram separados em 52 haplótipos distintos. A correlação observada entre distâncias genéticas e geográficas para as regiões Sudeste e Nordeste foi baixa, e não foi verificada significância. Para região Sul houve correlação moderada e significativa. Foi verificado por meio da AMOVA que a maior variação total ocorre dentro dos Estados, ou seja entre os municípios. Com base na composição genética dos isolados constataram-se 16 prováveis grupos genéticos ancestrais, no entanto os isolados compõem uma única população. A diversidade encontrada pode estar relacionada a mistura de diferentes linhagens clonais. Nesse sentido, estudos envolvendo este patógeno, são fundamentais para o conhecimento do seu potencial evolutivo, assim como para estudos de agressividade e virulência.

Palavras chave: banana, patógeno, população

## ABSTRACT

COSTA, S.N. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. Cruz das Almas, 2013. Dissertation (Master's Degree in Agricultural Microbiology). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) is the etiologic agent of evil-the-Panama. This disease has destroyed many banana plantations in different regions. The most effective control measure for Foc is the use of resistant varieties, however the emergence of new breeds that can outperform the resistance of cultivars, is a constant concern. Thus, genetic variability of the population of this pathogen are important in determining strategies to manage the disease. The aim of this study was to identify the population structure of Foc in different regions of Brazil. For this purpose, Foc 214 isolates were characterized using microsatellite markers (SSR). The isolates were divided into 52 distinct haplotypes. The observed correlation between genetic and geographic distances for the Southeast and Northeast regions was low, and no significance was found. To the South there were significant and moderate correlation. Was verified by means of AMOVA that most total variation occurs within states, ie between the municipalities. Based on the genetic makeup of the isolates found were 16 probable ancestral genetic groups, however the isolates comprise a single population. The diversity could be related to mixing of different clonal lineages. In this sense, studies involving this pathogen, are fundamental to the understanding of evolutionary potential, as well as for studies of aggressiveness and virulence.

Keywords: banana, pathogen, population.

## INTRODUÇÃO

O mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* E.F. Smith Sn. & Hansen (Foc), é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras de banana. A forma de controle mais eficiente é o uso de variedades resistentes (PLOETZ, 2006). Na metade do século passado, muitas empresas bananicultoras foram à falência devido a essa doença (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Foc é um fungo habitante do solo e pode sobreviver por muitos anos sob a forma de clamidósporos, sua estrutura de resistência e sobrevivência (ALEXPOULOS *et al.*, 1996). Vinte e um grupos de compatibilidade vegetativa (VCG – *Vegetative Compatibility Groups*) e três raças fisiológicas do patógeno já foram descritas (PLOETZ e PEGG, 1987; FOURIE *et al.*, 2009), o que dificulta o desenvolvimento de medidas de controle.

A classificação das raças de Foc segue o seguinte padrão: a raça 1 afeta ‘Gros Michel’ e ‘Maçã’, a raça 2 afeta ‘Bluggoe’ e outras bananas de cocção, e a raça 4 afeta as variedades do subgrupo Cavendish. A raça 4 foi dividida em subtropical e tropical para diferenciar populações que afetam Cavendish em condições subtropicais ou tropicais (PLOETZ, 1990).

A raça 4 tropical (RT4) foi descrita no início da década de 1990 no Sul da Ásia, onde tem se disseminado rapidamente, causando severos danos e inviabilizando o plantio de banana nos locais afetados (SU *et al.*, 1986). Embora ainda restrita àquela região, RT4 é considerada a maior ameaça à bananicultura mundial, pois as grandes empresas exportadoras produzem variedades do subgrupo Cavendish, que são resistentes às raças 1 e 2, mas altamente suscetíveis a RT4 (DITA *et al.*, 2010). Adicionalmente, outras variedades utilizadas para consumo local de alta importância na segurança alimentar, são suscetíveis. Estima-se que mais de 80% das bananas cultivadas sejam suscetíveis a essa raça.

Independentemente da ameaça representada pela dispersão da RT4, o mal-do-Panamá é de grande importância para o Brasil, pois as variedades mais consumidas no país são suscetíveis. De acordo com Cordeiro *et al.* (2005), fatores abióticos, como baixas temperaturas associadas a chuvas, seriam determinantes para a expressão de sintomas.

É necessário entender o nível de variabilidade genética e fenotípica dos fitopatógenos, uma vez que isso implica na compreensão do processo evolutivo dessas populações. Esse entendimento pode ser traduzido na duração da efetividade da adoção de uma planta hospedeira resistente (MILGROOM e PEEVER, 2003).

Em relação a população de Foc torna-se imprescindível entender a estrutura genética, uma vez que a biologia populacional está intimamente relacionada ao manejo de doenças. Além disso, diferenças nesses grupos genéticos podem estar vinculadas a resposta de variedades ao mal-do-Panamá, assim como, nos parâmetros de virulência e agressividade em cultivares diferenciadoras.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* oriundos de diferentes cultivares e regiões geográficas do Brasil, para tanto, se fez necessário identificar a origem da diversidade de Foc, verificar se a estrutura populacional estava correlacionada com origem geográfica e /ou a hospedeira, além de definir grupos de isolados que representariam a população para estudos de agressividade e virulência .

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.0 Coleta de amostras, isolamento e obtenção de culturas monospóricas

Por ocasião da coleta foram registrados dados sobre a cultivar, idade do plantio, ciclo e coordenadas geográficas. A coleta foi realizada de forma hierárquica, com pelo menos três isolados por campo, e quatro campos amostrados por município, dentro do Estado.

Amostras de tecido vascular de plantas de bananeiras com sintomas típicos do mal-do-Panamá foram levadas e processadas no Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os tecidos vasculares infectados foram desinfestados em álcool 70% e em hipoclorito

de sódio a 0,5%, transferidos para placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), e as placas incubadas em BOD a 25 °C por 8 dias (Figura 1). Culturas monospóricas foram obtidas e preservadas pelo método de Castellani (1967) ou em papel filtro com sílica gel, e depositados na micoteca do referido laboratório. Alguns isolados foram avaliados quanto a coloração, morfologia de macroconídio e fiálides para caracterização como *Foc*.

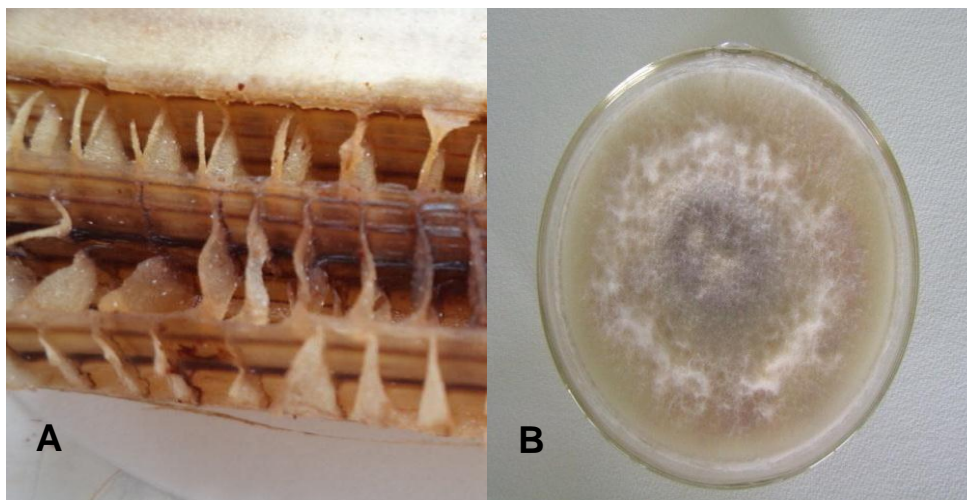


Figura 1. Amostra de pseudocaule de bananeira com sintoma típico do mal-do-Panamá (A) e crescimento micelial de fungo em meio BDA, após oito dias de incubação (B).

## 2.0 Estudo da estrutura populacional

### 2.1 Extração de DNA

Culturas monospóricas de cada isolado foram crescidas em placas de Petri contendo BDA e mantidas a 25 °C durante 8 dias. Discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram transferidos para erlenmeyers contendo meio BD (batata e dextrose) e crescidos durante 7 dias. Após esse período a cultura foi filtrada em papel filtro e o micélio coletado foi armazenado a -22°C. O DNA dos isolados foi extraído pela metodologia de Doyle e Doyle (1990) modificada e quantificado em gel de agarose 1,0%. Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração final de trabalho (20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).



## 2.2 Estudos moleculares de diversidade genética por meio de marcadores SSR

Para a análise da variabilidade dos 214 isolados de Foc, testaram-se nove iniciadores SSR (Tabela 2) desenvolvidos por Bogale *et al.* (2005).

Tabela 2 - Iniciadores SSR (*simple sequence repeats*) utilizados na análise de variabilidade dos isolados de Foc. Cruz das Almas, 2013.

Iniciadores	Sequência dos nucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)
MB2	F: TGCTGTGTATGGATGGATGG R: CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG	57
MB5	F: ACTTGGAGGAAATGGGCTTC R: GGATGGCGTTTAATAAATCTG	54
MB9	F: TGGCTGGGATACTGTGTAATTG R: TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG	51
MB10	F: TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC R: TTGCAATTACCTCCGATACCAC	48
MB11	F: GTGGACGAACACCTGCATC R: AGATCCTCCACCTCCACCTC	68
MB13	F: GGAGGATGAGCTCGATGAAG R: CTAAGCCTGCTACACCCTCG	68
MB14	F: CGTCTCTGAACCACCTTCATC R: TTCCTCCGTCCATCCTGAC	57
MB17	F: ACTGATTCACCGATCCTTGG R: GCTGGCCTGACTTGTTATCG	57
MB18	F: GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC R: TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC	57

F: Forward

R: Reverse

As reações de amplificação dos loci microssatélites foram feitas em volume final de 15  $\mu$ L, utilizando: 20,0 ng de DNA, tampão de PCR 10X (Invitrogen), 50 mM de  $MgCl_2$ , 2,5  $\mu$ M de dNTP, 0,3  $\mu$ M de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 4 min; 30 ciclos a 94 °C por 50s, (temperatura de anelamento variando de 55 a 68 °C de acordo com o iniciador), 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV (Figura 2) para verificar-se a amplificação da região desejada. Confirmada a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliácridamida a 6%, por um período de cinco horas, a 600v e 180mA. Os perfis de bandas gerados pela amplificação foram convertidos em dados binários, atribuindo-se um para presença e zero para ausência de bandas.



Figura 2. Padrão de amplificação do Iniciador MB13. M: Marcador de massa molecular 50 pb. 15 amostras de isolados de Foc.

### 3.0 Análises dos dados

Os haplótipos foram identificados por meio dos 5 loci microssatélites. O polimorfismo de cada loci foi inferido utilizando o programa POPGENE 1.32. (YEH e BOYLE, 1999). Os valores de riqueza foram estimados com base no número de haplótipos para a população total e suas subpopulações (localidades). Para

mensurar a diversidade genotípica (riqueza e equitabilidade), foram calculados os índices de Shannon-Wiener (1949), Hill (1973), Índice de Simpson ( $\lambda$ ) (1949) e Stoddart e Taylor ( $G'$ ) (1988), além do índice  $E5 = [(G-1)/(N1-1)]$  (1988) que mede quão equânime é a distribuição da variabilidade. As diferenças nas amostragens dos isolados por localidades foram corrigidas pela curva de rarefação, considerando os menores valores obtidos para Estados (5), e para regiões (10) (GRÜNWARD et al., 2003).

Para calcular a diferenciação genética entre as regiões foi utilizada a estatística  $F$  de Wright (1965), e seu estimador o  $G_{ST}$ , comumente usado para análises de biologia populacional em fungos haplóides. Os valores de  $G_{ST}$  foram utilizados para calcular o número de migrantes por geração ( $N_m$ ), com a fórmula  $N_m = 0.5 (1 - G_{ST})/G_{ST}$  (McDERMOTT e McDONALD, 1993). Já a matriz de distância em função da distância genética de Nei (1973) foi usada para gerar o dendrograma no critério de agrupamento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (SNEATH e SOKAL, 1973), considerando níveis hierárquicos. Ou seja, isolados foram agrupados em subpopulações conforme local de coleta e hospedeiro, considerando os municípios nas regiões amostradas.

Para testar a relação entre distância genética e geográfica dos isolados de Foc foi usado o teste de Mantel, com 1000 permutações, por meio do pacote “ecodist” implementado no programa de análise estatística R (MANTEL, 1967; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

A hipótese de acasalamento aleatório (recombinação sexual) foi testada usando os índices  $I_A$  e  $R_D$ , no programa Multilocus 1.3 (AGAPOW e BURT, 2001). A estimativa do desequilíbrio de ligação ( $I_A$  e  $R_D$ ) foi estimada em comparação com a distribuição esperada para os loci quando em associação. Foi realizada uma simulação com 1000 permutações.

Para inferir a estrutura da população, foi realizada uma análise de agrupamento genética utilizando o programa Structure 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000). O conjunto de dados foi analisado utilizando o modelo de mistura. O número de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) foi de 30.000 repetições, com o *burnin* de 10.000. Os demais parâmetros foram definidos com os valores

padrão. O número de grupos de base (k) variou de 1 a 10 e a análise foi realizada cinco replicatas independentes. A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada com o programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) para testar a variância significativa entre as regiões.

## RESULTADOS

Um total de 336 isolados foi obtido de diferentes regiões do Brasil (Nordeste, Sudeste e Sul). Todas as amostras foram preservadas pelo método de Castellani (1967) e em tiras de papel com sílica gel para criação de uma micoteca de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, de Cruz das Almas, Bahia.

Dos 336 isolados obtidos, apenas 214 (Tabela 1) foram utilizados no presente estudo. A população de Foc foi analisada com 9 iniciadores microssatélites (Bogale *et al.*, 2005) no entanto, apenas cinco foram capazes de amplificar para todos os isolados (MB02, MB11, MB13, MB14 e MB18), gerando um total de 28 loci polimórficos. Os fragmentos gerados pelos iniciadores variaram entre 125 a 330 pb, sendo que para maior parte dos loci, foram verificadas mais que uma cópia do fragmento amplificado para cada isolado. As proporções de loci polimórficos variaram de 21,43 % para a região Sul, 42,86 % para a região Sudeste e 100% para região Nordeste. Esses dados confirmam a eficácia dos marcadores SSR para estudos de variabilidade genética

Para a população total, 52 haplótipos distintos foram encontrados, sendo a diversidade haplotípica ( $H_d$ ): 0,8361. Foram observados 34 haplótipos únicos (H1, H4, H5, H6, H8, H9, H10, H14, H15, H16, H17, H19, H22, H24, H25, H26, H28, H32, H33, H34, H35, H36, H38, H39, H41, H44, H45, H46, H47, H48, H49, H50, H51 e H52).

O estado da Bahia apresentou 79,43% dos isolados coletados, Minas Gerais 10,28%, Rio Grande do Sul 4,67%, Rio Grande do Norte 3,27% e o Ceará 2,33%. Como a amostragem da população foi desigual para os estados, então foi realizada uma padronização por meio da curva de rarefação. Quando os dados de riqueza (número de haplótipos) foram rarefeitos com base no menor tamanho de amostra para estados ( $n = 5$ ), identificou-se a maior riqueza para o estado do

Ceará. O número de haplótipos para os estados da Bahia e Minas foram similares, diferenciando-se dos estados do Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, os quais assumiram os menores valores (Tabela 3).

Quando o valor da curva de rarefação foi alterado para 10, os valores de riqueza para os Estados de Minas Gerais e Bahia, foram 8 e 6, respectivamente. Contudo, o valor de riqueza observado para o estado do Rio Grande do Sul, não foi diferente daquele encontrado na população real, pois o número de amostras antes e depois da rarefação foi o mesmo. Não foi possível fazer essa rarefação para o estado do Ceará, uma vez que sua amostragem real era igual a 5, logo superestimar esse valor, ocasionaria resultado impreciso (Tabela 3).

Os haplótipos H2 e H7 foram encontrados na maioria dos isolados, sendo mais frequentes na população da Bahia. Além disso, o haplótipo 7 foi verificado em todas as regiões, Nordeste, Sudeste e Sul (Tabela 1).

Foram encontradas diferenças para os índices de diversidade nas populações. Considerado o índice de Shannon, a diversidade encontrada na Bahia foi similar a de Minas Gerais (2,4), no entanto difere das do Rio Grande do Norte (0,79), Rio Grande do Sul (0,63) e Ceará (1,61). O Rio Grande do Sul apresentou o menor valor de diversidade. Os valores do índice e Hill foram semelhantes aos do índice de Shannon (Tabela 3).

O índice de Simpson indicou diversidades similares nos Estado da Bahia (0,20) e Ceará (0,20) diferindo daquelas encontrados para os Estados de Minas Gerais (0,11), Rio Grande do Norte (0,55) e Rio Grande do Sul (0,66). Já o índice de  $G'$ , mostrou diversidade próxima para os Estados de Bahia (4,81) e Ceará (5) diferindo do Rio Grande do Norte (1,81) e Rio Grande do Sul (1,51). O Estado de Minas Gerais (8,64) apresentou o maior valor para este índice de diversidade (Tabela 3).

Para equitabilidade, o Estado do Ceará apresentou o valor máximo (1), e o menor valor foi encontrado no Estado da Bahia (0,36).

Quanto à diferenciação populacional, estimada pelo  $G_{ST}$ , foi observado que a diferenciação genética entre as regiões Sul e Sudeste foi de 0,17, entre as regiões do Sudeste e Nordeste 0,02, e entre Nordeste e Sul 0,06. Já o número de migrantes por geração para as regiões estimado com base em cálculos do  $G_{ST}$  entre as regiões geográficas foi de 23,32 entre o Nordeste e o Sudeste, 7,29 entre Nordeste e Sul e 2,28 entre Sudeste e Sul (Tabela 4).

Já para os Estados, o maior  $G_{ST}$  foi observado entre o Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul (0,44), e o menor entre Bahia e Ceará (0,024). Quanto ao número de migrantes, o valor obtido entre Bahia e Ceará (19,61) também foi o maior, já o valor para Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul (0,62) foi o menor (Tabela 5).

O índice de associação (IA) para todas as regiões, assim como os valores de desequilíbrio de ligação ( $R_{barD}$ ) foram significativamente diferente da expectativa do acasalamento ao acaso, revelando que a população não está tendo recombinação sexual. O mesmo resultado foi encontrado para os estados da Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Ceará e Rio Grande do Sul. Algumas localidades não apresentaram amostragem suficiente para testar se a população estava ou não em equilíbrio de ligação  $p$  (Tabela 6).

Não foi possível estabelecer grupos, a partir dos isolados das diferentes regiões e estados, mesmo com alguns dados inferido correlação moderada e significativa (Figura 2). Não houve correlação entre a localidade e a diversidade genética, ou seja, entre os haplótipos formados para região Nordeste e Sudeste, exceto para a região Sul, e a população total. Os isolados de Foc ficaram dispersos no dendrograma, mostrando variabilidade. Entretanto, os isolados das subpopulações do Rio Grande do Sul mostram-se geneticamente próximos (DPA-CT, DPA-P, MP-Pe MS-P), exceto para subpopulação (MS-TP) (Tabela 8). As diferenças nas amostragens podem ter contribuído para os dados obtidos. Não foi possível observar correlação entre os isolados de Foc e seus respectivos hospedeiros.

O valor para correlação total entre distâncias genéticas e geográficas foi significativa (0,15;  $p=0,005$ ), sendo que para a região Nordeste foi de 0,09 ( $p=0,06$ ), não significativa, para o Sul 0,31 ( $p=0,02$ ), significativa, e para a região Sudeste o valor foi de 0,10 ( $p=0,24$ ), não significativa.

A AMOVA foi usada para estimar a origem da variabilidade genética nas diferentes localidades. Foi observado que 67,86% da variação total ocorreu dentro dos estados, ao passo que 25,28% entre os estados e 6,85% ocorreu entre as regiões (Tabela 7), porém a variação encontrada entre as regiões não foi significativa. Logo, apenas a variação dentro dos estados e entre os estados permitiram separar os isolados em subpopulações.

Os isolados de cada localidade também foram avaliados quanto à composição genética, utilizando-se o programa Structure versão 2.3.3. A análise inferiu a presença de 16 prováveis grupos ancestrais para localidades em estudo. Contudo, cinco prováveis grupos ancestrais foram mais evidentes, representados pelas cores, roxo, lilás, verde, verde escuro e vermelho conforme o gráfico (Figura 3).

Os isolados dos demais grupos foram formados por uma mistura dos 16 prováveis grupos ancestrais (cores), tendo uma composição variada. Por exemplo, o isolado 102, possui aproximadamente 5% do grupo representado pelo vermelho, e o restante de sua composição é dada pelos demais grupos (cores). (Figura 3). Isso ocorre com os outros isolados que se apresentam posteriormente a ele, evidenciado a formação de uma população clonal (Figura 3).

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* utilizados para as análises. Cruz das Almas, 2013.

Isolados	Municípios	Variedade	Haplótipos	Latitude	Longitude
2011.06A	Porteirinha- MG	Prata anã	H1	S 15°55'24"	W 43°22'24"
2011.07A	Porteirinha- MG	Prata anã	H2	S 15°55'24"	W 43°22'24"
2011.08A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H2	S 13°20' 58"	W 43°52'29"
2011.09A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H3	S 13°15'011"	W 43°39'58"
2011.11A	Guanambi-BA	Prata anã	H2	S 14°27'55"	W 42°52'25"
2011.12B	Jaíba - MG	Prata anã	H3	S 15°51'13"	W 43°03'52"
2011.13A	Jaíba-MG	Prata anã	H3	S 15°18'19"	W 43°49'7.42"
2011.14A	Jaíba-MG	Prata anã	H4	S 15°18'19"	W 43°49'7.42"
2011.15A	Jaíba-MG	Prata anã	H5	S 15°31'37"	W 43°58'12"
2011.15B	Jaíba-MG	Prata anã	H2	S 15°31'37"	W 43°58'12"
2011.16A	Jaíba-MG	Prata anã	H2	S 15°16'022"	W 43°58'14"
2011.16B	Jaíba-MG	Prata anã	H7	S 15°16'022"	W 43°58'14"
2011.17B	Jaíba-MG	Prata anã	H8	S 15°29'30"	W 43°50'56"
2011.18A	Jaíba-MG	Prata anã	H3	S 15°30'05"	W 43°58'59"



2011.18B	Jaíba-MG	Prata anã	H3	S 15°30'05"	W 43°58'59"
2011.19A	Porteirinha- MG	Prata anã	H2	S 15°57'44"	W 43°23'44"
2011.20A	Porteirinha- MG	Prata anã	H2	S 14°57'56"	W 43°24'30"
2011.20B	Porteirinha- MG	Prata anã	H2	S 14°57'56"	W 43°24'30"
2011.21B	Porteirinha- MG	Prata anã	H9	S 15°58'01"	W 43°23'16"
2011.21C	Porteirinha- MG	Prata anã	H7	S 15°58'01"	W 43°23'16"
2011.22A	Porteirinha- MG	Prata anã	H10	S 15°45'45"	W 43°15'35"
2011.22C	Porteirinha- MG	Prata anã	H11	S 15°45'45"	W 43°15'35"
2011.23A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H11	13°25'3.96"	W 43°44'36"
2011.23B	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H12	13°25'3.96"	W 43°44'36"
2011.24A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H12	S 13°14'28"	W 46°36'33"
2011.25B	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H13	S 13°14'18"	W 43°40'36"
2011.25C	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H14	S 13°14'18"	W 43°40'36"
2011.26A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H2	S 13°15'02"	W 43°55'19.8"
2011.26B	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H2	S 13°15'02"	W 43°55'19.8"
2011.27A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H15	S 13°14'22"	W 43°38'33"
2011.28A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H2	S 13°22'02"	W 43°27'0"

2011.29A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H2	S 13°22'08"	W 43°25'04"
2011.30A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H16	S 13°12'23"	W 43°24'0"
2011.30B	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H17	S 13°12'23"	W 43°24'0"
2011.31A	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H18	S 13°21'13"	W 43°35'02"
2011.31B	Bom Jesus da Lapa- BA	Prata anã	H18	S 13°21'13"	W 43°35'02"
2011.32A	Tancredo Neves-BA	Maçã	H19	S 13°34'56"	W 039°31'09"
2011.32B	Tancredo Neves-BA	Maçã	H20	S 13°34'56"	W 039°31'09"
2011.33A	Tancredo Neves-BA	Maçã	H18	S 13°34'20"	W 039°31'23"
2011.34A	Juazeiro- BA	Maçã	H21	S 09°28'25"	W 40°23'41"
2011.34B	Juazeiro- BA	Maçã	H20	S 09°28'25"	W 40°23'41"
2011.35A	Juazeiro- BA	Maçã	H20	S 09°28'34"	W 40°24'00"
2011.36A	Juazeiro- BA	Maçã	H13	S 09°28'10"	W 40°23'57"
2011.36B	Juazeiro- BA	Maçã	H20	S 09°28'10"	W 40°23'57"
2011.37A	Juazeiro- BA	Maçã	H22	S 09°27'57 "	W 40°23'51"
2011.38A	Juazeiro- BA	Maçã	H21	S 09°32'27"	W 40°20'16"
2011.39A	Juazeiro- BA	Maçã	H20	S 09°32'26"	W 40°20'35"
2011.39B	Juazeiro- BA	Maçã	H20	S 09°32'26"	W 40°20'35"

2011.40A	Juazeiro- BA	Maçã	H23	S 09 32'20"	W 40° 20'55"
2011.40B	Juazeiro- BA	Maçã	H24	S 09 32'20"	W 40° 20'55"
2011.41A	Juazeiro- BA	Maçã	H25	S 09°32'41"	W 40°20'28"
2011.41B	Juazeiro- BA	Maçã	H23	S 09°32'41"	W 40°20'28"
2011.42B	Juazeiro- BA	Maçã	H26	S 09°30'52"	W 40°25'34"
2011.43B	Juazeiro- BA	Maçã	H13	S 09°31'18"	W 40°25'26"
2011.44A	Juazeiro- BA	Maçã	H21	S 09°31'38"	W 40°24'57"
2011.44B	Juazeiro- BA	Maçã	H27	S 09°31'38"	W 40°24'57"
2011.45A	Juazeiro- BA	Prata anã	H2	S 09°31'44"	W 40°24'053"
2011.46A	Ponto Novo-BA	Prata anã	H28	S 10°57'01"	W 40°21'59"
2011.48A	Ponto Novo-BA	Prata anã	H29	S 10°57'01"	W 40°21'59"
2011.50A	Lavras- MG	Maçã	H30	S 21°13'53"	W 44°59'29"
2011.51A	Lavras- MG	Maçã	H21	S 21°13'53"	W 44°59'29"
2011.51B	Lavras- MG	Maçã	H31	S 21°13'53"	W 44°59'29"
2011.52A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°20'39"	W 43°52'11"
2011.52B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H31	S 13°20'39"	W 43°52'11"
2011.53A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13° 31'21"	W 43°40'050"

2011.54B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°21'09"	W 43°49'30"
2011.55A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°17'49"	W 43°41'23"
2011.56A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°20'34"	W 43°51'49"
2011.56B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°20'34"	W 43°51'49"
2011.57A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°26'31"	W 43°52'36"
2011.58A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°29'32"	W 43°48'14"
2011.58B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°29'32"	W 43°48'14"
2011.59A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H7	S 13° 24'41"	W 43°44'40"
2011.60A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°27'43"	W 43°52'12"
2011.61A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13° 21'08"	W 43°51'45"
2011.62A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°30'30"	W 43°48'10"
2011.63A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°18'32"	W43°41'00"
2011.64B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°30'19"	W 43°48'02"
2011.65A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°15'028"	W 43°55'11"
2011.65B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°15'028"	W 43°55'11"
2011.66A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13° 16'00"	W 43°55'00"
2011.68A	Guanambi-BA	Prata Anã	H2	S 14°51'53"	W 42°51'59"

2011.68B	Guanambi-BA	Prata Anã	H2	S 14°51'53"	W 42°51'59"
2011.68C	Guanambi-BA	Prata Anã	H2	S 14°51'53"	W 42°51'59"
2011.69A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H7	S 13°20'12"	W 43°41'20"
2011.70A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H32	S 13 °25'04"	W 43°44'36"
2011.70B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H33	S 13°25'04"	W 43°44'36"
2011.71A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H34	S 13°26'46"	W 43°52'20"
2011.72B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H35	S 13°20'50"	W 43° 49'38"
2011.73A	Barra do Choça- BA	Prata Anã	H31	S 14° 51'06"	W 40°34'50"
2011.73C	Barra do Choça- BA	Prata Anã	H29	S 14° 51'06"	W 40°34'50"
2011.74A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H36	S 13°18'49"	W 43°41'07"
2011.75A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°25'17"	W 43°44'00"
2011.76A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H37	S 13°16'46"	W 43°44'30"
2011.77A	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°31'29"	W 43°40'56"
2011.77B	Bom Jesus da Lapa- BA	Maçã	H2	S 13°31'29"	W 43°40'56"
2011.78A	Guanambi-BA	Prata Anã	H38	S 14 °49'34"	W 42°53'17"
2011.79A	Guanambi-BA	Prata Anã	H27	S 14°50'07"	W 42°53'22"
2011.80A	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°49' 38"	W 42°53'40"

2011.81A	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°46'39"	W 42°54'40"
2011.82B	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°47'33"	W 42°59'59"
2011.83A	Guanambi-BA	Prata Anã	H31	S 14°46'43"	W 42°59'59"
2011.83B	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°46'43"	W 42°59'59"
2011.83C	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°46'43"	W 42°59'59"
2011.84A	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°49'03"	W 42°59'16"
2011.86A	Guanambi-BA	Prata Anã	H30	S 14°48'26"	W 42°59'23"
2011.87A	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°49'20"	W 39°35'12"
2011.87B	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°49'20"	W 39°35'12"
2011.88B	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°50'24"	W 39°35'28"
2011.88C	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°50'24"	W 39°35'28"
2011.89A	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°50'53"	W 39°35'23"
2011.89B	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°50'53"	W 39°35'23"
2011.89C	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°50'53"	W 39°35'23"
2011.90A	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°48' 18"	W 39°23'07"
2011.90C	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°48'18"	W 39°23'07"
2011.91A	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°46'35"	W 39°23'030"

2011.91B	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°46'35"	W 39°23'030"
2011.91C	Itajuípe-BA	Prata Comum	H2	S 14°46'35"	W 39°23'030"
2011.92A	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°44'41"	W 39°23'031"
2011.92B	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°44'41"	W 39°23'031"
2011.92C	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°44'41"	W 39°23'031"
2011.93B	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°59'31"	W 39° 23'000"
2011.94A	Itajuípe-BA	Maçã	H39	S 14°57'59"	W 39°23'029"
2011.94B	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°57'59"	W 39°23'029"
2011.95A	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°57'23"	W 39° 23'010"
2011.95B	Itajuípe-BA	Maçã	H2	S 14°57'23"	W 39° 23'010"
2011.96A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°37'35"	W 39°37'42"
2011.96B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°37'35"	W 39°37'42"
2011.96C	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°37'35"	W 39°37'42"
2011.97A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°56'23"	W 39°24'53"
2011.97B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°56'23"	W 39°24'53"
2011.97C	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°56'23"	W 39°24'53"
2011.98A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°46'13"	W 39°24'05"

2011.99A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°57'57"	W 39°25'54"
2011.99B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°57'57"	W 39°25'54"
2011.100A	Itajuípe-BA	Prata	H40	S 14°43'03"	W 39°25'43"
2011.100B	Itajuípe-BA	Prata	H41	S 14°43'03"	W 39°25'43"
2011.101A	Itajuípe-BA	Prata	H42	S 14°45'47"	W 39°25'37"
2011.101B	Itajuípe-BA	Prata	H40	S 14°45'47"	W 39°25'37"
2011.103A	Itajuípe-BA	Prata	H40	S 14°45'24"	W 39°25'27"
2011.103B	Itajuípe-BA	Prata	H42	S 14°45'24"	W 39°25'27"
2011.103C	Itajuípe-BA	Prata	H30	S 14°45'24"	W 39°25'27"
2011.104A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°46'42"	W 39° 27'35"
2011.104B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°46'42"	W 39° 27'35"
2011.105A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°49'29"	W 39° 26'32"
2011.105B	Itajuípe-BA	Prata	H31	S 14°49'29"	W 39° 26'32"
2011.106A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°48'45"	W 39°25'34"
2011.106B	Itajuípe-BA	Prata	H31	S 14°48'45"	W 39°25'34"
2011.107A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°48'36"	W 39°25'31"
2011.107B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°48'36"	W 39° 25'31"



2011.108A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°47'38"	W 39°23'05"
2011.108B	Itajuípe-BA	Prata	H43	S 14°47'38"	W 39° 23'05"
2011.108C	Itajuípe-BA	Prata	H31	S 14°47'38"	W 39° 23'05"
2011.109A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°47'10"	W 39° 22'12"
2011.109B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°47'10"	W 39° 22'12"
2011.110A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°46'15"	W 39°37'05"
2011.110B	Itajuípe-BA	Prata	H43	S 14°46'15"	W 39°37'05"
2011.110C	Itajuípe-BA	Prata	H31	S 14°46'15"	W 39°37'05"
2011.111A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°45'38"	W 39°35'47"
2011.111B	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°45'38"	W 39°35'47"
2011.111C	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14 45'38"	W 39°35'47"
2011.112A	Itajuípe-BA	Prata	H2	S 14°45'52"	W 39° 35'05"
2011.112B	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°45'52"	W 39° 35'05"
2011.113A	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°42'09"	W 39°35'43"
2011.113B	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°42'09"	W 39°35'43"
2011.113C	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°42'09"	W 39°35'43"
2011.114A	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°47'33"	W 39°34'48"

2011.114B	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°47'33"	W 39°34'48"
2011.114C	Itajuípe-BA	Prata	H7	S 14°47'33"	W 39°34'48"
2011.115A	Gandu-BA	Prata	H7	S 13°53'51"	W 39° 31'36"
2011.115B	Gandu-BA	Prata	H7	S 13°53'51"	W 39° 31'36"
2011.116A	Gandu-BA	Prata	H7	S 13°56'52"	W 39°42'36"
2011.116B	Gandu-BA	Prata	H44	S 13°56'52"	W 39°42'36"
2011.117A	Wenceslau-BA	Prata	H7	S 13°47'32"	W 39°54'31'
2011.117B	Wenceslau-BA	Prata	H21	S 13°47'32"	W 39°54'31'
2011.117C	Wenceslau-BA	Prata	H7	S 13°47'32"	W 39°54'31'
2011.119B	Teolândia-BA	Prata	H45	S 13°47'28"	W 39°35'03"
2011.120A	Pedra Branca- CE	Maçã	H46	S 05°27'35"	W 39°43' 0"
2011.120B	Pedra Branca- CE	Maçã	H47	S 05°27'35"	W 39°43' 0"
2011.121A	Pedra Branca- CE	Maçã	H48	S 05°27'35"	W 39°43' 0"
2011.121B	Pedra Branca- CE	Maçã	H7	S 05°27'35"	W 39°43' 0"
2011.121C	Pedra Branca- CE	Maçã	H27	S 05°27'35"	W 39°43' 0"
2011.122A	Mossoró- RN	Tropical	H13	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.122B	Mossoró- RN	Tropical	H13	S 05°11'16"	W 37°20'38"

2011.122C	Mossoró- RN	Tropical	H13	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.123A	Mossoró- RN	Tropical	H13	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.123C	Mossoró- RN	Tropical	H13	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.124A	Mossoró- RN	Tropical	H49	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.124B	Mossoró- RN	Tropical	H11	S 05°11'16"	W 37°20'38"
2011.125A	Morrinhos do Sul-RS	Prata	H7	S 29°23'26"	W 49°56'46"
2011.126A	Dom Pedro de Alcântara- RS	Caturra	H7	S 29°21'36,9"	W 49°51'51,9"
2011.127A	Mâmpituba-RS	Prata	H7	S 29°23'30,9"	W 49°57'1,3"
2011.127B	Mâmpituba-RS	Prata	H7	S 29°23'30,9"	W 49°57'1,3"
2011.128A	Dom Pedro de Alcântara- RS	Prata	H7	S 29°21'08,8"	W 49°52'17,9"
2011.128B	Dom Pedro de Alcântara- RS	Prata	H7	S 29°21'08,8"	W 49°52'17,9"
2011.130A	Dom Pedro de Alcântara- RS	Prata	H7	S 29°21'49,5"	W 49°50'50,7"
2011.135A	Mâmpituba-RS	Prata	H7	S 29°23'45,8"	W 49°56'7,6"
2011.139B	Três Cachoeiras-RS	Prata	H50	S 29°27'20"	W 49°55'28"
2011.140A	Três Cachoeiras-RS	Prata	H51	S 29°27'20"	W 49°55'28"
2011.142A	Ponto Novo-BA	Prata Gortuba	H52	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.143A	Ponto Novo-BA	Grand Naine	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"

2011.143B	Ponto Novo-BA	Grand Naine	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.144A	Ponto Novo-BA	Prata Gorutuba	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.144B	Ponto Novo-BA	Prata Gorutuba	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.145B	Ponto Novo-BA	Grand Naine	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.145C	Ponto Novo-BA	Grand Naine	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.146A	Ponto Novo-BA	Tap Maeo	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.146B	Ponto Novo-BA	Tap Maeo	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.146C	Ponto Novo-BA	Tap Maeo	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.147A	Ponto Novo-BA	Prata Gorutuba	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.147B	Ponto Novo-BA	Prata Gorutuba	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.147C	Ponto Novo-BA	Prata Gorutuba	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.148A	Ponto Novo-BA	BRS Conquista	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"
2011.148B	Ponto Novo-BA	BRS Conquista	H7	S 10°57'01"	W 40° 21'59"

---

Tabela 3 - Cálculos da riqueza, diversidade e equitabilidade para populações de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* em diferentes localidades. Cruz das Almas, 2013.

<b>Estatística</b>	<b>PT</b>	<b>NORDESTE</b>	<b>RN</b>	<b>CE</b>	<b>BA</b>	<b>SUDESTE</b>	<b>MG</b>	<b>SUL</b>	<b>RS</b>
Tamanho da amostra (N)	<b>214</b>	182	7	5	170	22	22	10	10
<b>Índice de riqueza</b>									
Pobs	<b>52</b>	43	3	5	39	14	14	3	3
P(r5)	<b>4</b>	4	2	5	4	4	4	2	2
P(r10)	<b>6</b>	6	-	-	6	8	8	3	3
<b>Índice de diversidade</b>									
H'	2,687 (2,47 - 2,91)	2,549 (2,31 - 2,79)	0,796 (0,22 - 1,37)	1,609 (1,12 - 2,09)	2,427 (2,17- 2,67)	2,410 (2,06 - 2,75)	2,410 (2,06 - 2,75)	0,639 (0,12 - 1,15)	0,639 (0,12 - 1,15)
N1	14,680 (11,75 - 17,61)	12,803 (10,08 - 15,52)	2,217 (1,14 - 3,29)	5 (3,50 - 6,49)	11,333 (8,85 - 13,81)	11,136 (8,37 -13,89)	11,136 (8,37 -13,89)	1,894 (0,99 - 2,79)	1,894 (0,99 - 2,79)
Λ	0,167 (0,13- 0,21)	0,186 (0,14- 0,23)	0,551 (0,19 - 0,91)	0,2 (0,08- 0,39)	0,207 (0,15 - 0,26)	0,115 (0,04 - 0,18)	0,115 (0,04 - 0,19)	0,66 (0,33 - 0,98)	0,66 (0,33 - 0,98)
G'	5,958 (4,54 - 7,37)	5,349 (3,96 - 6,74)	1,814 (0,85 - 2,78)	5 (3,58 - 6,41)	4,813 (3,61 - 6)	8,642 (5,82 - 11,45)	8,642 (5,82 - 11,45)	1,515 (0,73 - 2,29)	1,515 (0,73 - 2,29)
<b>Índice de Equitabilidade</b>									
$E5[\frac{1}{\lambda} - 1] / (N1 - 1)$	0,362	0,368	0,669	1	0,369	0,754	0,754	0,575	0,575

PT= População total; RN= Rio Grande do Norte; CE= Ceará; BA=Bahia; MG= Minas Gerais; RS= Rio Grande do Sul; Pobs= População observada; H'= Índice de Shannon; N1= Índice de Hill; λ= Índice de Simpson; G'= índice de Stoddart e Taylor; Pobs= haplótipos observados, P(r5)- (r10)= Rarefação da população.

Tabela 4 – Diferenciação genética estimada pelo índice de  $G_{ST}$  (diagonal acima) e fluxo gênico (diagonal abaixo,  $N_m$ ) para as três regiões: Nordeste Sul e Sudeste. Cruz das Almas, 2013.

População	Nordeste	Sul	Sudeste
Nordeste	-	0,06	0,02
Sul	7,29	-	0,17
Sudeste	23,32	2,28	-

$N_m$  = fluxo gênico estimado por  $G_{st} = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$

Tabela 5 – Diferenciação genética estimada pelo índice de  $G_{ST}$  (diagonal acima) e fluxo gênico (diagonal abaixo,  $N_m$ ) para os cinco estados: Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte (R. Norte), Minas Gerais e Rio Grande do Sul ( R.Sul). Cruz das Almas, 2013.

População	Bahia	Ceará	R. Norte	Minas Gerais	R. Sul
Bahia	-	0,024	0,10	0,026	0,06
Ceará	19,61	-	0,13	0,09	0,20
R. Norte	4,08	3,16	-	0,24	0,44
Minas Gerais	18,70	4,63	1,51	-	0,17
R. Sul	6,77	1,93	0,62	2,28	-

$N_m$  = fluxo gênico estimado por  $G_{st} = 0.5(1 - G_{st})/G_s$

Tabela 6- Valores de  $I_A$  e  $R_D$  para as diferentes localidades dentro das regiões, Nordeste, Sudeste e Sul para Foc. Cruz das Almas, 2013.

Localidades	*N	$I_A$ Mín.	$I_A$ Máx.	$I_A$ Obs.	P< Valor	$R_D$ Mín.	$R_D$ Máx.	$R_D$ Obs.	P< valor
<b>Nordeste</b>	182	-0.189061	0.220323	1.99493	< 0.001	-0.0071160	0.0106869	0.0957838	< 0.001
<b>Bahia</b>	170	-0.193121	0.254593	1.90391	< 0.001	-0.0114039	0.0122051	0.0956660	< 0.001
B. Jesus da Lapa	45	-0.409831	0.661605	2.33773	< 0.001	-0.0194655	0.0267005	0.111033	< 0.001
Guanambi	14	-0.224799	0.803449	0.370503	< 0.038	-0.0767765	0.126539	0.274405	<0.038
Gandu	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Itajuípe	63	-0.224896	0.608192	1.02531	< 0.001	0.0850582	0.208344	-0.0557393	< 0.001
Juazeiro	18	-0.346306	0.723816	2.25126	< 0.001	-0.0181346	0.0486986	0.166163	< 0.001
Ponto Novo	17	-0.350548	0.883881	1.11800	< 0.005	-0.0709877	0.347079	0.226400	<0.005



Tancredo Neves	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Teolândia	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Wenceslau Guimaraes	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ceará</b>	5	0.722222	0.944444	2.88889	< 0.001	-0.101852	0.280093	0.361111	< 0.001
Pedra Branca	5	-0.722222	0.944444	2.88889	< 0.001	-0.101852	0.280093	0.361111	< 0.001
<b>R. Grande do Norte</b>	7	-0.693617	1.80851	6.42553	< 0.001	-0.0496348	0.148600	0.459807	< 0.001
Mossoró	7	-0.693617	1.80851	6.42553	< 0.001	-0.0496348	0.148600	0.459807	< 0.001
<b>Sudeste</b>	22	-0.339552	0.600651	1.66621	< 0.001	-0.0305207	0.0551252	0.157014	< 0.001
<b>Minas Gerais</b>	22	-0.339552	0.600651	1.66621	< 0.001	-0.0305207	0.0551252	0.157014	< 0.001

Jaíba	10	-0.560102	0.993606	1.22379	< 0.001	-0.0652272	0.196327	0.206015	< 0.001
Lavras	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Porteirinha	9	-0.467066	0.988024	2.76647	< 0.001	-0.0587026	0.158045	0.347700	< 0.001
<b>Sul</b>	10	-0.555556	0.925926	2.03704	< 0.001	-0.111111	0.333333	0.407407	< 0.001
<b>R. Grande do Sul</b>	10	-0.555556	0.925926	2.03704	< 0.001	-0.111111	0.333333	0.407407	< 0.001
Dom Pedro de Alcântara	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Mampituba	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Morrinhos do Sul	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Três Cachoeiras	2	-	-	-	-	-	-	-	-

---

\*=número de amostras;  $I_A$  obs= Índice de associação observado;  $R_D$  obs= Índice de associação corrigido observado;  $I_{A\text{Máx}}$  = Índice de associação máximo;  $I_{A\text{Min}}$  = Índice de associação mínimo;  $R_{D\text{Máx}}$  = Índice de associação corrigido máximo;  $R_{D\text{Min}}$  = Índice de associação corrigido mínimo. P= significância.

Tabela 7- Distribuição da variabilidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* entre regiões, entre estados dentro de regiões e dentro dos estados com base na análise de variância molecular (AMOVA). Cruz das Almas, 2013.

Fonte de variação	GL	Componente de variação	Percentual de variação	F	P
Entre regiões	2	0.03038	6.85	0,06855	0,12512
Entre Estados dentro das regiões	24	0.11206	25.28	0,27146***	0,00000
Dentro dos Estados	197	0.30074	67.86	0,32140***	0,00000
Total	223	0.44318			

F= Índice de Fixação; P= Significância, GL= Grau de liberdade. \*\*\*  $P < 0,001$

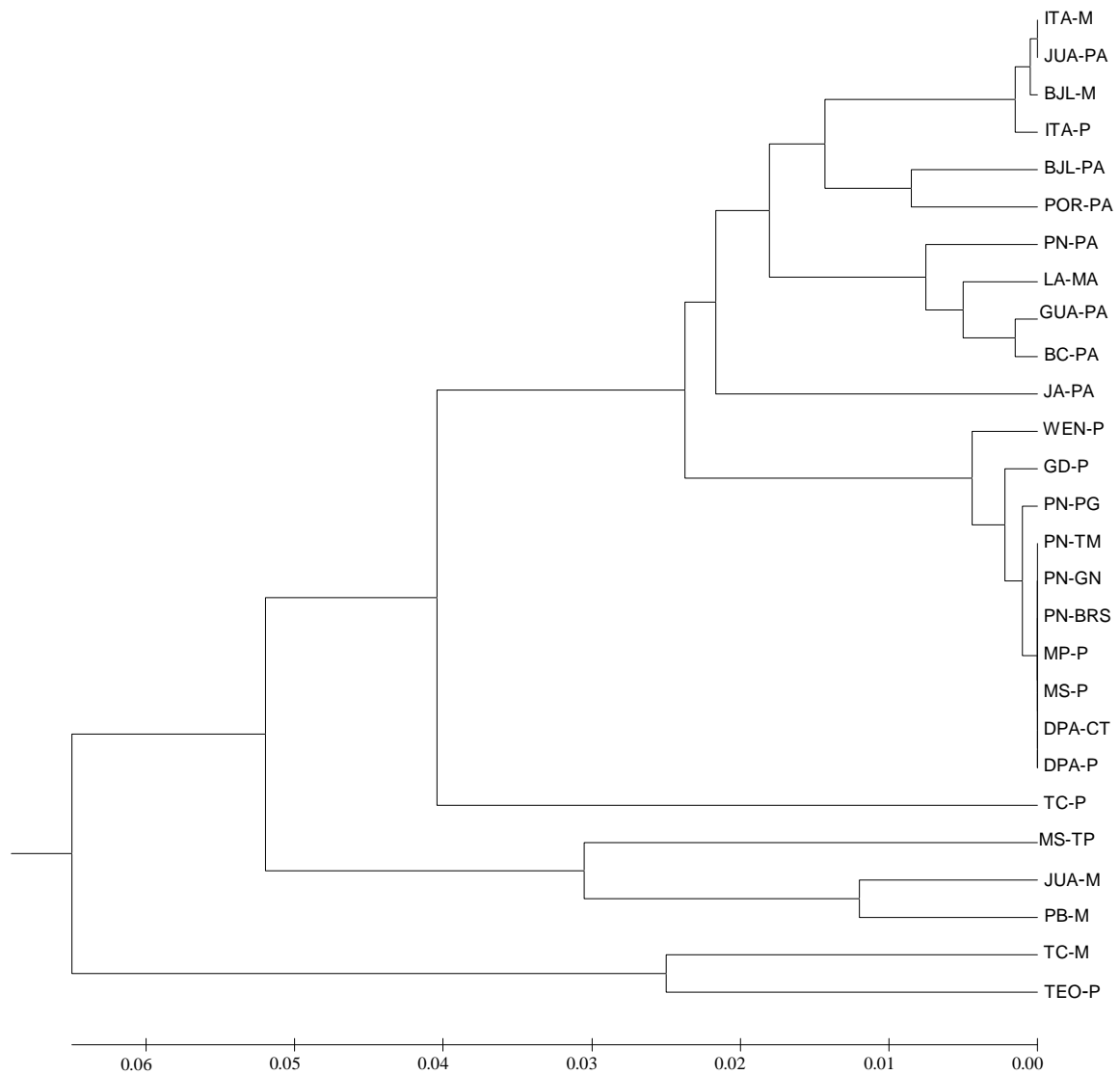


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética das 27 subpopulações (subpop) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, considerando os municípios e hospedeiros (Tabela 8), utilizando 5 iniciadores SSR pelo método de agrupamento UPGMA.

Tabela 8- 27 subpopulações de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, considerando os municípios e hospedeiros. Cruz das Almas, 2013.

Código	Localidade	Variedade
BJL-PA	Bom Jesus da Lapa-Bahia	Prata Anã
BJL-M	Bom Jesus da Lapa-Bahia	Maçã
GUA-PA	Guanambi-Bahia	Prata Anã
ITA-P	Itajuípe-Bahia-Bahia	Prata
ITA-M	Itajuípe- Bahia	Maçã
TC-M	Tancredo Neves-Bahia	Maçã
PN-PA	Ponto Novo- Bahia	Prata Anã
PN-TM	Ponto Novo- Bahia	Thap Maeo
PN-GN	Ponto Novo- Bahia	Grand Naine
PN-PG	Ponto Novo- Bahia	Prata Gorutuba
PN-BRS	Ponto Novo- Bahia	BRS Conquista
POR-PA	Porteirinha-Minas Gerais	Prata Anã
JA-PA	Jaíba-Minas Gerais	Prata Anã
JUA-PA	Juazeiro-Bahia	Prata Anã
JUA-M	Juazeiro-Bahia	Maçã
MS-TP	Mossoró-Rio Grande do Norte	Thap Maeo
PB-M	Pedra Branca- Ceará	Maçã
LA-M	Lavras-Minas Gerais	Maçã
MP-P	Mampituba-Rio Grande do Sul	Prata
TC-P	Três Cachoeiras- Rio Grande do Sul	Prata
MS-P	Morrinhos do Sul- Rio Grande do Sul	Prata
DPA-C	Dom Pedro de Alcântara-Rio Grande do Sul	Caturra
DPA-P	Dom Pedro de Alcântara-Rio Grande do Sul	Prata
TEO-P	Teolândia- Bahia	Prata
GD-P	Gandu-Bahia	Prata
WEN-P	Wenceslau Guimarães- Bahia	Prata
BC-PA	Barra do Choça- Bahia	Prata Anã

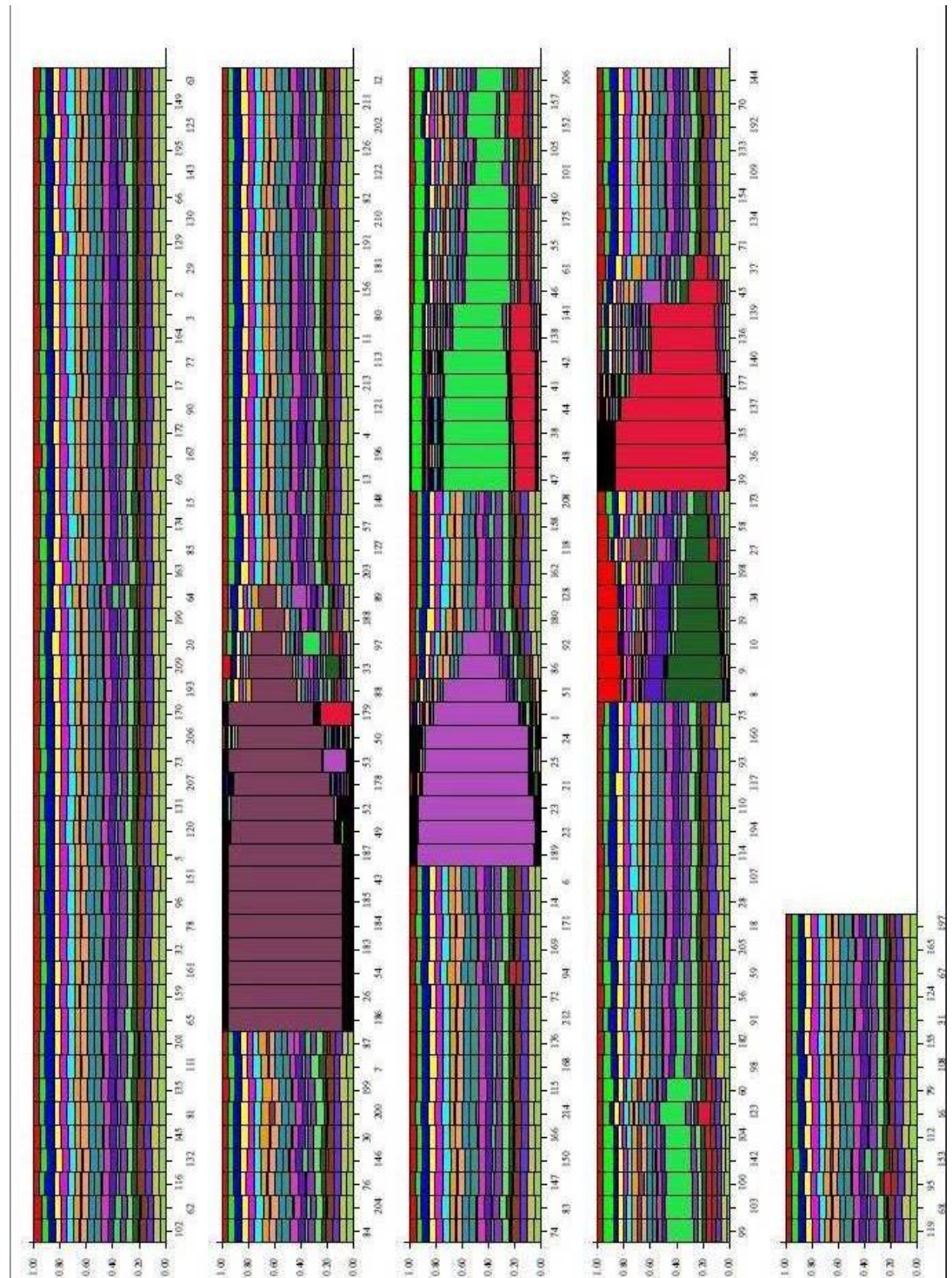


Figura 3 - Análise de agrupamento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* das diferentes localidades. Cada barra na figura dividida em cores de K representa um indivíduo, onde K é o número de agrupamentos (assumido  $k = 16$ ). Os isolados são ordenados por sua probabilidade de adesão ao grupo. Eixo X: isolados de Foc; Eixo Y: Contribuição em percentagem para variação de cada isolado, referentes aos 16 prováveis grupos ancestrais.

## DISCUSSÃO

A alta resolução dos marcadores microsatélites (SSR) utilizados nesse estudo permitiu acessar a variabilidade existente nos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* das diversas regiões. O conhecimento e a distribuição da variabilidade genética destes isolados é essencial para adoção de estratégias de controle da doença e manutenção de uma resistência durável.

Para os 214 isolados analisados foi verificado a presença de 52 haplótipos, sendo que os haplótipos H2 e H7 foram mais frequentes na população, e o H7 foi observado em todas as regiões. Esse evento pode ter sido favorecido pelo fluxo gênico entre as diversas regiões produtoras de banana, provavelmente pelo transporte de mudas contaminadas pelos agricultores. Além disso, mecanismos adaptativos podem ter favorecidos estes haplótipos, uma vez que o H7 foi encontrado em todas as regiões, as quais possuem diferenças quanto a sua classificação climática e variedades de banana cultiváveis.

A riqueza de haplótipos observada no Estado da Bahia, não está distribuída de maneira uniforme, o que pode ser observado pelo valor índice de equitabilidade, diferente do que ocorre nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Norte e Ceará, os quais apresentaram os maiores valores de equitabilidade. O fato dos haplótipos do Estado da Bahia não estarem distribuídos de forma homogênea, ou seja, ter um baixo valor de equitabilidade, pode indicar diferentes padrões adaptativos para estes isolados, já que há maior predominância de alguns.

Com base nos valores de  $R_{barD}$  e de  $I_A$  não houve indícios de recombinação sexual para as populações em estudo. Assim, pode-se inferir que este mecanismo evolutivo não está atuando no processo de diferenciação nas populações, ou se estiver ocorrendo, é um evento muito raro. Não há relatos na literatura para reprodução sexuada em *Foc*, sendo assim, seu modo de reprodução é predominantemente clonal, o que muitas vezes dificulta estudos de diversidade genética para este patógeno (GROENEWALD *et al.*, 2006). Por outro lado, esse evento reduz as possibilidades de recombinação entre os isolados, o que dificulta o aumento da variabilidade para este fitopatógeno, fazendo com que a principal mecanismo evolutivo seja o processo de mutação. Além disso, a

ausência de reprodução sexuada vai favorecer estudos que visam o desenvolvimento de medidas de controle para a doença, pois se a população de Foc em diferentes regiões são similares, muitos estudos de agressividade e virulência poderão ser realizados com uma pequena amostra desta população.

O número de migrantes entre o Sul e Sudeste (2,28) foi menor que aqueles encontrados entre as populações Nordeste/Sudeste (23,32) e Nordeste/Sul (7,29). Assim, o Nordeste recebeu muito mais migrantes da região Sudeste, do que da região Sul. No entanto, diferenças nas amostragens de Foc para as regiões podem ter introduzidos algum erro nos dados obtidos, já que a amostragem populacional para as regiões Sudeste assumiram os menores valores respectivamente. Considerando que as regiões Sudeste e Nordeste são as maiores produtoras de banana, o fluxo gênico pode estar ocorrendo com maior frequência devido o transporte de materiais propagativos contaminados entre essas localidades. Além disso, esses dados corroboram com os resultados encontrados no índice  $G_{ST}$ , uma vez que a diferenciação entre essas duas regiões assumiram os menores valores, diferente daquele observado para região Sul/Sudeste e Nordeste/Sul.

Para os Estados o maior fluxo gênico ocorre entre Bahia e Ceará, assim como a menor diferenciação, e o menor fluxo gênico entre Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, assim como a maior diferenciação.

O número de migrantes indica o fluxo gênico entre as populações, portanto quanto menor o número de migrantes, menor o fluxo gênico. Esse mecanismo é responsável pela introdução de novas variantes de um potógeno em um determinado local, podendo alterar as relações em um patossistema. Um exemplo claro seria a introdução de novos alelos que conferem virulência para um isolado numa cultivar inicialmente resistente. Para McDonald e Linde (2002), o fluxo gênico é um processo em que alelos específicos ou indivíduos são trocados entre populações separadas geograficamente. E, em organismos com reprodução assexuada, genótipos inteiros podem ser trocados entre populações. Logo, se o número de migrantes por geração entre essas localidades foi alto, a estabilização populacional deveria ocorrer em um tempo reduzido.

Assim, a estrutura de uma população, onde eventos de recombinação podem ser raros, o fluxo gênico e as mutações assumem um papel extremamente importante, uma vez que eles são responsáveis pelas modificações na



composição genética desses patógenos, além disso, podem conferir variabilidade dentro e entre as localidades (McDonald e Linde, 2002).

A variabilidade encontrada dentro dos Estados em *Foc* também pode ter sido um artefato de sua origem polifilética, a qual também foi citada por Thangavelu *et al.* (2012), analisando a diversidade genética de 107 isolados de *Foc* de diferentes regiões da Índia por meio de marcadores ISSR e análises filogenéticas.

Mesmo com a diversidade encontrada nas localidades aqui em estudo, há fortes indícios de uma estrutura clonal na população de *Foc*, uma vez que a maioria dos isolados foram inclusos em dois haplótipos, reforçando mais uma vez a origem polifilética, a qual foi evidenciada pela primeira vez em estudos de O'DONNELL *et al.* (1998). Evolutivamente, a variabilidade genética das populações é importante, pois pode determinar o potencial adaptativo de uma organismo diante de fatores bióticos e abióticos (KATO *et al.*, 1997). Quanto aos haplotipos únicos, esses podem ter se mantido na população por diferentes processos de seleção, onde os mais aptos permaneceram, ou até mesmo, podem ter passado por vários eventos de mutação ao longo do tempo.

A correlação baixa, mas significativa encontrada para a população total, das diferentes regiões, pode estar relacionada ao valor da correlação encontrada para a população da região Sul, que foi moderada e significativa. No entanto o tamanho reduzido da população dessa região, podem ter interferido neste resultado, uma vez que a correlação entre distâncias genéticas e geográficas para a população das regiões Nordeste e Sudeste, foi baixa, e não significativa, as quais apresentaram um maior número de isolados respectivamente.

Leong *et al.* (2009) também não encontraram nenhuma correlação entre o perfil genético de *Foc*, hospedeiro e localidade, sugerindo que a variabilidade encontrada e a ausência de correlação podem ter sido uma consequência da dispersão do fungo por meio de materiais propagativos infectados. Outra suposição foi dada por Bentley *et al.* (1995) para explicar a variabilidade encontrada em *Foc*, onde esta pode ser devido à adaptação e co-evolução do fungo com seu hospedeiro, além de fatores ambientais.

Com base na composição genética dos isolados, foi verificada a formação de 16 grupos genéticos, entretanto estes estão distribuídos nas diferentes regiões geográficas e cultivares de onde foram obtidos. Os resultados indicam que os

isolados dos diferentes estados compõem uma única população, sendo que esta é predominantemente clonal, e as diferenças genéticas entre isolados é devida à mistura de diferentes linhagens clonais. Contudo, Estado do Rio Grande do Norte está quase que inteiramente dentro do grupo de cor roxa. Desses 16 grupos, cinco foram mais evidentes (roxo, lilás, verde, verde escuro e vermelho), não apresentando muita variação quanto a sua composição quando comparados com os demais isolados que possuem uma composição extremamente mista. Koenig *et al.* (1987) e Ploetz (2006) forneceram evidências genéticas que apoiaram esta hipótese, inferido que *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, tem uma estrutura de população predominantemente clonal.

A estrutura revelada pela composição genética dos isolados de Foc nessas localidades fornecerá subsídios para estudos epidemiológicos de agressividade e virulência. Para tanto, os isolados que mais se diferenciaram quanto a sua composição genética serão utilizados para estudos de agressividade e virulência visto que esses representam a diversidade encontrada nas subpopulações aqui estudadas, utilizando marcadores SSR. Além da composição genética, dados como locais de coleta e variedades hospedeiras também serão utilizados para a escolha dos isolados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nenhuma estruturação populacional foi observada;
- Existe correlação moderada entre distância genética e distância geográfica para a região Sul, no entanto, o número reduzido de isolados podem ter contribuído para este resultado.
- Não há evidências de recombinação sexual nas subpopulações avaliadas.
- Há mais variabilidade dentro dos Estados, do que entre os Estados ou entre regiões;

- Os grupos de isolados que mais se diferenciaram serão utilizados para estudos de agressividade e virulência;
- O fluxo gênico está contribuindo para a variabilidade encontrada;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOW, P. A.; BURT, A. 'Indices of multilocus linkage disequilibrium'. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.101-102, 2001.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**. v.20, p.78–91, 2009.

BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; E, DALE, J. L.. Genetic variation among world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological. Research.**, v.99, p.1378-1384, 1995.

BENTLEY, A. R.; LESLIE, J. F.; LIEW, E. C. Y. BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A. Genetic structure of *Fusarium pseudograminearum* populations from the Australian Grain Belt. **Phytopathology.**, v.98, p.250-255, 2008.

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

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181-184, 1967.

CORDEIRO, Z. J. M., KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: H. Kimati L. Amorin, *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, Doenças da bananeira (*Musa* spp.), p.113-136. 2005.

CORDEIRO, Z. J. M.; A. P. MATOS; H. KIMATI. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: H. Kimati , L. Amorin, *et al* (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças**

**das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. Doenças da bananeira (*Musa spp.*), p.99-117.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C.; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA, Jr, M. T.; KEMAG, H. J. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. **Plant Pathology**, v.59, p.348–357, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567, 2010.

FAO – FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em:  
< [http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/). > . Acesso em: 16 de jan. 2013.

FOURIE, G.; STEENKAM, P. E.T.; GORDON, T. R.; VILJOEN, A. Evolutionary relationships among the vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p.4770 – 4781, 2009.

GRÜNWARD, N. J.; GOODWIN, S.B.; MILGROOM, M.G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**. v.93, p.738–746, 2003.

GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG N.; MARASAS 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.

HARL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HILL, M.O. Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. **Ecology**, v.54, p.427-432, 1973.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em :

<[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso em: 16 de jan. 2013.

KATO, M.; MIZUBUTI, E. S. G.; GOODWIN, S. B.; FRY, W. E. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Phytopathology**, v.87, p.973-978,1997.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, v.87, p.915–923, 1987.

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.

LUDWIG, J. A.;REYNOLDS, J. F. **Statistical Ecology: A Primer on Methods and Computing**. John Wiley & Sons,1988. 337p.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.

MARTINS, M.K. **Variabilidade Genética de Isolados de *Fusarium spp.* e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**., v.31, p.353-57, 1993.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.349-379, 2002.

MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens - The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **Plant Disease**, v.87, p.608-617, 2003.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583, 1973.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.106, p. 283–292, 1972.

NEWMAN, D.; PILSON, D. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. **Evolution**, v.51, p.354–362, 1997.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; CIGELNICK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings. National Academy of Sciences.**, v.95, p. 2044 – 2049, 1998.

PLOETZ, R.; PEGG, K. Fusarium wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to this Indo-Malayan region? **Australasian Plant Pathology**, v.26, p. 239-49, 1987.

PLOETZ, R.C. Variability In *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1357-1363, 1990.

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

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p. 945, 2000.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. The Mathematical Theory of Communication. **University of Illinois Press**, Urbana, IL, 1949.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics**, v.118, p.705-711, 1988.

Stover, R. H. **Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other *Musa* Species**. Commonwealth Mycological Institute, 1962, 117p.

STOVER, R. H. Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease. In: Ploetz, R. c., ed. **Fusarium wilt of banana**, p.1-7, 1990.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v.163, p.688, 1949.

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.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 2011.

THANGAVELU R.; MUTHU KUMAR, K.; GANGA DEVI, P.; MUSTAFFA, M. M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* Isolates (Foc) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. **Molecular Biotechnology**, v.51, p.203–211, 2012.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v.129, p.157, 1997.